

ACAUPED

TECHNIQUES DE BASE POUR LE LABORATOIRE DES CENTRES DE SANTE



Dominique VAURETTE
MEDECIN BIOLOGISTE
Diplômé de Médecine Tropicale
et de Paludologie

Remarques

Ces quelques notes sur les techniques biologiques n'ont pas la prétention de remplacer les cours, documents et encore moins les livres que vous possédez.

Le but de ce livret est de rappeler les différentes analyses exigées par le PMA dans les Centres de Santé.

Il s'agit simplement d'une remise à jour des différents examens qui vous sont demandés régulièrement.

Vous trouverez dans ce document les éléments nécessaires pour répondre de manière satisfaisante à vos prescripteurs notamment pour le suivi des grossesses et le diagnostic des MST.

Toute critique constructive sera la bienvenue.

Il s'agit d'un document qui pourra bien sûr évoluer en fonction notamment des différents appareils ou réactifs qui pourraient vous être fourni dans l'avenir.

Ne possédant pas de document officiel concernant les analyses requises dans les C.S. au Mali nous avons rédigé ce document en tenant compte de notre expérience dans les C.S. en Guinée Conakry.

Nous pensons que le modèle guinéen doit être voisin de celui des autres pays de l'Afrique francophone.

NB : Pour la rédaction de ce polycopié, nous nous sommes inspirés du « *Manuel des techniques de base pour le laboratoire médical* » édité par l'OMS.

PLAN

LISTE DES ANALYSES RELEVANT DES C.S.

GENERALITES

MODELE DE RENDU DE RESULTATS

BIOCHIMIE

HEMATOLOGIE

BACTERIOLOGIE

PARASITOLOGIE

GROUPES SANGUINS ET TRANSFUSION

PREPARATION DES ACTIFS

LISTE DES ANALYSES RELEVANT DES C.S.

HEMATOLOGIE

EXAMENS

- Hématocrite
- Hémoglobine
- Numérations globulaires
- Formule sanguine
- Vitesse de sédimentation
- Test d'Emmel
- Temps de saignement
- Temps de coagulation

MATERIEL NECESSAIRE

- Centrifugeuse à HTE
- AP. SAHLI
- Ø de Malassez de Neubauer + Pipettes de Potain
- Lames
- Tubes de Westergren
- Lames lamelles
- Vaccinostyle (ou aiguilles)
- Tubes à Hémolyse
- BM à 37

CONSOMMABLE REQUIS

- Tubes + pâte
- Acide chlorhydrique
- Liquide de Marciano et Lazarus
- Colorants MCG
- Citrate de Sodium à 3,8%
- Métabisulfite de Sodium

BACTERIOLOGIE

EXAMENS

Urines : dépistage d'infection

Sécrétions gynécologiques :
dépistage d'infection

MATERIEL NECESSAIRE

Flacons pour recueil
Tubes à Hémolyse
Lames lamelles
Centrifugeuse de paillasse

Ecouvillons
Lames lamelles

CONSOMMABLE REQUIS

Colorants Gram

Colorants Gram

PARASITOLOGIE

Paludisme

Selles

Urines

Lames

Flacons pour recueil
Lames lamelles

Flacons pour recueil
Tubes à Hémolyse

Colorants (Giemsa, MGG)

Lugoll
Ether pour une technique de concentration

CHIMIE

EXAMENS

Albumine

Glycémie

Tests de grossesse

HIV HBS BW

MATERIEL NECESSAIRE

Flacons pour recueil

Glucometeur

Tube à Hémolyse

Centrifugeuse de paillasse

CONSOMMABLE REQUIS

Acide Sulfosalicylique

Bandelettes

Tests savonettes

DOCUMENTATION

Manuel pour le laboratoire médical (OMS)

GENERALITES

- Utiliser 1 cahier de paillasse par spécialité :
 - hématologie
 - bactériologie
 - parasitologie
 - chimie
- Changer de page chaque jour.
- Bien identifier les demandes d'analyses :
 - les patients : nom, prénom, numéro d'ordre dans la série
 - noter éventuellement le motif de la demande
 - écrire de manière lisible le résultat
- Recopier en fin de journée les résultats sur 1 fiche individuelle regroupant tous les examens effectués.
- Contrôler tout examen anormal si possible par un nouveau prélèvement ++++.
- Toutes les étapes d'un examen sont importantes :
 - Le prélèvement : un prélèvement mal fait induira un résultat erroné.
 - La qualité des réactifs.
 - Le suivi de la méthode.
 - Le recopiage des résultats.

Toute erreur lors d'une de ces phases entraîne un résultat erroné et par conséquent un mauvais diagnostic avec un traitement inadapté.

MODELE DE RENDU DE RESULTAT

CENTRE DE SANTE

LABORATOIRE

NOM DU PATIENT :

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES :

DATE DE LA DEMANDE :

DATE DE LA REALISATION :

BACTERIOLOGIE

URINES

Chimie - Aspect - PH.....
- Albumine - Glycosurie.....
- Sang..... - Acétone

Cytologie - Culot
- Cylindres..... - Cristaux.....
- \mathcal{C} épithéliales / champ ou ml
- Hématies / champ ou ml
- Leucocytes / champ ou ml Pus
- Parasites - Levures.....

Examen bactériologique

- Direct.....
-
-

PRELEVEMENTS VAGINAL URETRAL PUS

Cytologie

- Aspect.....
- \mathcal{C} épithéliales..... / champ
- Hématies / champ
- Leucocytes / champ
- Levures..... - Parasites

Examen bactériologique

- Examen direct.....
-
-

CHIMIE

I – ALBUMINE : RECHERCHE ET DOSAGE

I.1 – Recherche d'albumine dans les urines

- a. Principe
- b. Méthode
- c. Résultats

I.2 – Dosage de la protéinurie

- a. Principe
- b. Méthode
- c. Résultats

II – GLYCEMIE : DOSAGE AVEC UN GLUCOMETEUR

II.1 – Prélèvement

II.2 – Méthode

II.3 – Résultats

III – AUTRES

- Diagnostic de grossesse
- Diagnostic de HIV
- Diagnostic de l'Hépatite B
- Diagnostic de la Syphilis

I - ALBUMINE : RECHERCHE ET DOSAGE

I.1 – RECHERCHE D'ALBUMINE DANS LES URINES

Méthode utilisant l'acide Sulfosalicylique à 30%

a. Principe

Quand on ajoute de l'acide sulfosalicylique à des urines contenant des protéines il se forme un précipité blanchâtre.

Urines :

Les urines seront prélevées au laboratoire.

Les urines doivent être claires. Si elles sont troubles, les filtrer au papier-filtre ou utiliser le surnageant d'un échantillon centrifugé.

b. Méthode

1. A l'aide d'une pipette, verser 5 ml d'urine dans un tube à essai.
2. Avec un compte-gouttes, ajouter à l'urine 2 gouttes de solution d'acide sulfosalicylique à 30%.
3. Comparer sur un fond sombre avec un tube d'urines non traitées.

c. Résultats

Résultat positif

Quand on ajoute le réactif, il se forme un précipité blanc. C'est une méthode utile quand il s'agit d'étudier un grand nombre d'échantillons d'urines. Indiquer les résultats comme suit :

- + trace
- ++ petite quantité
- +++ quantité assez importante
- ++++ grande quantité (opaque)

Résultat négatif

Il ne se forme aucun précipité quand on ajoute le réactif.

I.2 – DOSAGE DE LA PROTEINURIE

a. Principe

C'est une épreuve quantitative qui utilise de l'acide sulfosalicylique à 3% et des tubes témoins (protéinomètre) comme méthode de comparaison visuelle pour estimer les quantités présentes d'albumine.

b. Méthode

1. A l'aide d'une pipette, verser 1 ml d'urine dans un tube à essai dont l'ouverture a le même diamètre que les tubes témoins.

2. Ajouter 3 ml de solution d'acide sulfosalicylique à 3%.
Mélanger et attendre 5 minutes.
3. Comparer l'aspect plus ou moins trouble avec celui des tubes témoins.

c. Résultats

Indiquer la quantité d'albumine en g/l. * Si le résultat dépasse 1 g/l, diluer l'urine avec du soluté physiologique et répéter l'épreuve, compte tenu des ajustements voulus.

Albumine chez la femme enceinte :

Seuil : 0,30 G/L

0,30	-	1 G/L	:	+
1	-	3 G/L	:	++
		> 3 G/L	:	+++

Exemple :

Pour une dilution d'urine de 1:4, mélanger 0,25 ml d'urine à 0,75 ml de soluté physiologique. Multiplier par 4 le résultat obtenu.

II - DOSAGE DE LA GLYCÉMIE À L'AIDE D'UN GLUCOMETEUR

II.1 PRELEVEMENT

- Sur sang veineux ou capillaire.
- Précautions habituelles à tout prélèvement sanguin.
- Prélèvement effectué à jeun.

II.2 METHODE

- Suivre scrupuleusement les conditions indiquées par le fournisseur.
- Ne pas hésiter à refaire un second prélèvement en cas de doute du résultat.

II.3 RESULTATS

- N : - glycémie sur plasma 0,80 – 1,10
 - diabète si > 1,26
 - glycémie post prandiale (femme enceinte par exemple) < 1,30

Si > 1,30 faire une hyperglycémie provoquée après absorption de 100 gr de glucose et dosage de glycémie à

	TO	T60	T120	T180
Valeurs limites :	1,00	1,80	1,60	1,40

Si deux valeurs sont au-dessus de ces chiffres, il s'agit d'un diabète gestationnel.

- Attention les glycémies sur sang capillaire sont environ de 10% inférieur aux dosages effectués sur le plasma veineux ++++.

- En cas de doute, confiez votre patient à l'hôpital pour contrôle sur plasma veineux avec une technique plus fiable. On pourra également faire les prélèvements sur fluorure et transmettre ceux-ci au laboratoire ; dans ce cas, le taux de glycémie reste stable pendant 24h du fait du blocage de la glycolyse par le fluorure.

III – TEST DIVERS

Diagnostic :

- de grossesse
- de Sida
- d'Hépatite B
- de Syphilis

Ces tests peuvent être effectués dans les centres de soins. Il s'agit de tests « savonnettes » très simples qui sont réalisés à partir du sérum.

Il faudra bien sûr respecter les recommandations propres à chaque test.

Ne pas hésiter à adresser votre patient (ou son sérum) pour un contrôle au laboratoire de l'hôpital au moindre doute ; dans le cas de test HIV ⊕ un second prélèvement de contrôle sera exigé afin d'éviter toute erreur possible. Il devra naturellement être confirmé par le test de Western Blot.

HEMATOLOGIE

I – HEMATOCRITE

- I.1 – Définition
- I.2 – Méthode

II – HEMOGLOBINE

- Méthode de Sahli
- II.1 – Principe
- II.2 – Méthode

III – NUMERATIONS GLOBULAIRES

- III.1 – Prélèvement
- III.2 - Dilution
- III.3 – Numération en \mathcal{C} de Malassez, \mathcal{C} de Neubauer

IV - FORMULE LEUCOCYTAIRE

- IV.1 – Principe
- IV.2 – Préparation d'un frottis mince
- IV.3 – Coloration de May-Grünwald et Giemsa

V - VITESSE DE SEDIMENTATION

VI –TEST D'EMMEL

- VI.1 – Principe
- VI.2 – Méthode au métabisulfite de sodium

VII –TEMPS DE SAIGNEMENT : METHODE DE DUKE

- VII.1 - Principe
- VII.2 - Méthode

VIII –TEMPS DE COAGULATION DU SANG TOTAL

- VIII.1 - Principe
- VIII.2 - Méthode

I - HEMATOCRITE

I.1 – DEFINITION

Mesure de la proportion d'hématies par rapport au plasma.

I.2 – METHODE

1. Prélèvement de sang capillaire

Après désinfection à l'alcool, prélever à l'aide d'un vaccinostyle :

- au 3^{ème} ou au 4^{ème} doigt de la main gauche
- ou au lobule
- ou encore au talon (nourrissons).

Le sang doit s'écouler spontanément ou par une très légère pression. Essuyer la 1^{ère} goutte au papier filtre.

2. Technique de mesure

- a) Placer l'extrémité (cerclé de rouge) du tube capillaire hépariné dans la goutte de sang.

Le sang pénètre dans le tube par capillarité. Le laisser se remplir environ aux 3/4.

- b) Boucher avec la cire molle l'autre extrémité du tube (celle qui n'a pas touché le sang).

Vérifier qu'elle est complètement bouchée sur 2 mm environ.

Si on ne dispose pas de cire molle ou de pâte à modeler, fermer cette extrémité du tube en la chauffant avec prudence au-dessus de la flamme d'une lampe à alcool.

Laisser refroidir en *position horizontale*.

- c) Déposer les tubes capillaires dans une des rainures numérotées du plateau du centrifugeur, en s'assurant que chaque numéro correspond à celui de l'échantillon.

L'extrémité bouchée à la cire (ou à la flamme) doit être *sur le pourtour extérieur du plateau*.

- d) Centrifuger à grande vitesse.

Après la centrifugation, les tubes contiennent 3 couches :

- en haut, en colonne de plasma,
- au milieu, un très petit disque formé par les globules blancs,
- au fond, une colonne de globules rouges.

C'est exactement au sommet de cette colonne de globules rouges que se lit la fraction de volume érythrocytaire sur une table de lecture.

II - DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE

La méthode de référence qui fait appel au réactif de Drabkin et nécessite un spectrophotomètre est réservée aux hôpitaux.

METHODE DE SAHLI

II.1 – PRINCIPE

Le sang est dilué dans une solution acide, ce qui transforme l'hémoglobine en hématine acide, qui est alors comparée à une solution témoin colorée.

II.2 – METHODE

1. Verser 0,1 mol/l de HCl, jusqu'à atteindre la marque 20 (ou la marque 3g/100 ml) du tube gradué.
Attendre 5 minutes.
2. Aspirer du sang veineux ou capillaire à la pipette de Sahli, jusqu'à la marque 0,02 ml. Ne pas laisser pénétrer de bulles d'air. S'il s'agit de sang veineux, s'assurer qu'il est bien mélangé à l'anticoagulant en renversant le flacon qui les contient, à plusieurs reprises, pendant 1 minute, immédiatement avant de le prélever à la pipette (ne pas prendre la première goutte de sang perlant sur le doigt).
3. Essuyer extérieurement la pipette avec du papier absorbant. Vérifier que le sang atteint toujours le repère.
4. Souffler le sang de la pipette dans le tube gradué de solution acide.
Rincer la pipette en aspirant et en soufflant 3 fois la solution acide.
Le mélange sang et acide prend une coloration brunâtre.
5. Placer le tube gradué dans l'hémoglobinomètre.
Se placer face à une fenêtre.
Comparer la couleur du tube de sang dilué à celle du tube témoin.
Si la couleur est la même ou si elle est plus claire, la quantité d'hémoglobine est de 40g/l au plus.
6. Si la couleur est plus foncée, continuer à diluer en ajoutant goutte à goutte 0,1 mol/l d'HCl.
Mélanger avec l'agitateur après chaque goutte.
Retirer l'agitateur et comparer la couleur des deux tubes.
Arrêter lorsque les 2 tubes ont la même couleur.
On peut aussi à ce stade utiliser de l'eau distillée au lieu de HCl pour poursuivre la dilution.
7. Noter la graduation atteinte. Selon le type d'hémoglobinomètre utilisé, on obtient la concentration d'hémoglobine soit en g/100 ml, soit en pourcentage de « la normale » (ce dernier type n'est pas à conseiller). Pour passer des g/100 ml aux g/l, multiplier par 10. Pour passer des pourcentages aux g/l, multiplier par 1,46.

Exemples :

$$14,8 \text{ g/100 ml} \times 10 = 148 \text{ g/l}$$

$$85\% \times 1,46 = 124 \text{ g/l}$$

(La méthode de Sahli est si peu précise qu'on a jugé superflu de donner les facteurs nécessaires pour convertir ces chiffres en mol/l).

Méthode inexacte :

La méthode de Sahli ne donne pas un dosage exact de l'hémoglobine. Tous les types d'hémoglobine du sang circulant ne se transforment pas en hématine acide ; visuellement, les changements de couleur ne sont pas très sensibles et la couleur brune de la solution témoin n'est pas vraiment semblable à celle de l'hématine acide.

Cette méthode n'est décrite ici que parce qu'elle est encore employée dans certains laboratoires, mais elle est déconseillée. ++++

III - NUMERATION GLOBULAIRE

Comprend trois temps :

- la prise de sang
- la dilution
- la numération

III.1 – PRELEVEMENT

Le prélèvement doit être effectué de la façon suivante :

Désinfecter le doigt à l'alcool, ou encore faire plonger la main préalablement dans un bain d'eau chaude à 40°. Essuyer, piquer rapidement assez profondément soit avec un vaccinostyle, soit avec une aiguille tranchante triangulaire. Le sang doit s'écouler spontanément. Il est recommandé de ne pas faire d'expression, ce qui troublerait la composition du sang. Essuyer la première goutte, lorsque la deuxième goutte est suffisamment volumineuse, l'aspirer avec la pipette.

Il serait préférable de faire le prélèvement sur EDTA pour les NF et VS.

III.2 - DILUTION

Globules rouges : liquide de dilution *Marcano*.

Sulfate de soude chimiquement pur.....	5 gr
Formol.....	1 cc
Eau distillée.....	100 cc
Bleu de crésyl (facultatif).....	0,01

Pipette marquée 101.

Aspirer la goutte de sang dans la pipette jusqu'au trait 2, essuyer l'extrémité de la pipette avec du papier buvard et compléter en aspirant le liquide de Marciano jusqu'au trait IOI.

On obtient une dilution au 1/200°.

Agiter pendant 2 à 3 minutes en tenant la pipette de bout en bout entre les deux doigts.

Globules blancs : liquide de dilution *Lazarus*.

Acide acétique 5 cc

Bleu de méthylène (en solution alcoolique au 1/100)..... 2 à 3 gouttes

Eau distillée 100 cc

Pipette marquée II.

On opère de la même façon que pour les globules rouges. Prélever le sang jusqu'au trait 0,5, compléter jusqu'au trait II avec le liquide de Lazarus : agiter quelques minutes pour lyser les GR.

On obtient une dilution au 1/20°.

III.3 – NUMERATION EN Ç DE MALASSEZ

La numération globulaire est un examen fondamental. La numération des globules blancs permet de diagnostiquer une infection bactérienne, une leucémie. Tant que les CS ne seront pas équipés de centrifugeuse à hématocrite, la numération des globules rouges sera le meilleur moyen pour le diagnostic d'une anémie. +++

La cellule est quadrillée.

L'ensemble comprend à 1 mm³.

La cellule est divisée en 10 bandes et 100 grands carrés représentant respectivement 1/10 et 1/100 de mm³.

En fonction de la densité cellulaire, on peut compter les éléments contenus dans plusieurs carrés ou bandes.

En tenant compte de la dilution (GR ou GB) un calcul simple permettra d'obtenir le nombre de GR et de GB par mm³.

Schématiquement : $Hb = GR \times TCMH$

La TCMH est d'environ 30 ; ce chiffre varie avec la taille de GR et en fonction de son contenu d'hémoglobine.

A défaut de la méthode de Drabkin, cette numération des GR associée à la méthode de Sahli donnera au clinicien une estimation du degré ou non d'anémie de votre patient. ++++

Quelques rappels :

Volume globulaire moyen (VGM)

$$\text{VGM} = \frac{\text{Ht}}{\text{Nb GR}}$$

N	85 – 95 m3		< 80 = microcyte
			> 95 = macrocyte

Concentration corpusculaire moyenne en Hb = contenu ou hémoglobine des hématies

$$\text{CCMH} = \frac{\text{Hb}}{\text{Ht}} \approx 30 \rightarrow \text{Hb} \approx \text{nb de GR} \times 30$$

N	0,32 – 0,38		< 32 = hypochromie
			> 38 = erreur

Teneur corpusculaire moyenne en Hb

$$\text{TCMH} = \frac{\text{Hb}}{\text{Nb de GR}}$$

Varie en fonction du contenu d'hémoglobine et du volume globulaire.

IV - FORMULE LEUCOCYTAIRE

Les leucocytes (globules blancs) du sang ne sont pas tous identiques. Il y a 5 types principaux de leucocytes qui se différencient par la taille, la forme du noyau, la couleur des granulations du cytoplasme et d'autres facteurs. Leur répartition entre les différents types est important pour le diagnostic. On l'appelle traditionnellement « formule leucocytaire ».

IV.1 – PRINCIPE

On compte 100 leucocytes et on note le nombre de chaque type. La proportion de chaque type de leucocyte se traduit par une fraction décimale.

IV.2 – PREPARATION D'UN FROTTIS MINCE

Les lames destinées à recevoir des étalements minces de sang doivent être bien lavées et, le cas échéant, nettoyées à l'aide d'un chiffon doux imbibé d'alcool-éther.

Prélèvement d'un échantillon de sang :

Prélever du sang

du 3^{ème} au 4^{ème} doigt

sur le côté du doigt.

Laisser le sang s'écouler librement. Prélever en premier lieu les échantillons nécessaires pour déterminer les concentrations globulaires (si elles sont demandées).

Attention. Ne pas prélever de sang :

- à l'index ou au pouce
- à un doigt infecté (panaris, etc.)
- à l'oreille (trop de monocytes).

Utilisation d'anticoagulants :

N'employer que de la solution sèche de sel dipotassique de l'acide EDTA ; les autres coagulants altèrent l'aspect des leucocytes.

Technique de l'étalement :

1. Recueillir une goutte de sang de cette grosseur : ● en la mettant délicatement en contact avec une extrémité de la lame.
2. Tenir la lame d'une main. De l'autre, poser le bord de la lame rodée juste en avant de la goutte de sang.
3. Faire glisser la lame rodée jusqu'à ce qu'elle touche la goutte de sang.
4. Laisser le sang se répartir tout le long du bord de la lame rodée.
5. Pousser la lame rodée jusqu'au bout de la lame d'étalement, d'un mouvement doux et régulier (tout le sang doit être réparti avant que l'on atteigne le bout de la lame).
Le sang de malades atteints d'anémie doit être étalé plus rapidement.
6. Vérifier que l'étalement est bien fait :
 - il ne doit pas présenter de lignes transversales ou horizontales,
 - il doit être lisse aux extrémités, et non irrégulier ou strié,
 - il ne doit pas être trop long,
 - il ne doit pas être trop épais,
 - il doit être étalé uniformément (ce qui n'est pas le cas si l'on utilise une lame graisseuse).

Il est essentiel que l'étalement soit bien fait. Sinon, la formule leucocytaire s'en trouverait faussée et il serait impossible de rendre compte de la morphologie des hématies.

Séchage :

Un *séchage correct* est capital pour conserver la qualité de l'étalement, surtout dans les pays à *climat humide*.

IV.3 – COLORATION DE MAY-GRÜNWARD ET GIEMSA

1. Pour préparer les colorants, procéder comme suit :
 - Diluer du colorant de May-Grünwald (1 : 2) en mettant un volume égal de colorant et d'eau tamponnée. Mélanger.

- Diluer du colorant de Giemsa (1 : 10) en mettant une part de colorant pour 9 d'eau tamponnée. Mélanger délicatement.

Une fois dilués, les colorants ne se conservent pas bien ; n'en préparer que la quantité nécessaire pour une journée.

2. Couvrir la lame de colorant de May-Grünwald dilué et laisser agir 5 minutes.
3. Egoutter le colorant et le remplacer par du Giemsa dilué. Laisser agir 10 minutes.
4. Verser de l'eau tamponnée pour laver le colorant.

Ne pas incliner la lame car il resterait un dépôt de colorant sur l'étalement.

5. Laisser de l'eau propre sur la lame pendant 2 à 3 minutes pour obtenir une coloration différentielle.
6. Laisser égoutter l'eau et faire sécher la lame sur un râtelier.

Résultats normaux

	Homme	Femme	Enfant (1 an)	Nouveau-né
GR	4,5-5,9	4-5,4	3,6-5	4-6
HB	13-17	12-16	11-13	13-19
Hte	50-54	37-47	30-41	44-60
GB	4-10 000	4-10 000	6-15 000	10-26 000
PN	30-80	30-80	30	50
PE	1-5	1-5	1-5	1-5
PB	1	1	1	1
Lympho	10-50	10-50	60	40
Mono	1-10	1-10	5	8

Nombres absolus (adulte)

PN : 1800-7000

PE : 50-300

PB : 10-50

Lympho : 1500-4000

Mono : 100-700

Remarque : pour les globules blancs, il est impératif de faire la numération et la formule ; seul compte les valeurs absolues, la formule seule est sans intérêt pour le clinicien
++++

V - VITESSE DE SEDIMENTATION

Prélever du sang total.

Dans un tube à hémolyse, déposer 0,6 ml de citrate de sodium à 3,8%.

Ajouter 1,4 ml de sang total.

Mélanger.

Aspirer le mélange dans une pipette de Westergren jusqu'au trait « 0 ».

Au bout d'une heure et deux heures, noter la sédimentation en mm.

N 1 h = 5-7 N 2 h = 10-15

La VS est influencée par la température extérieure et l'anémie.

Tenir compte d'une augmentation > 30 mn.

VI – TEST D'EMMEL

VI.1 – PRINCIPE

Sur une lame, on mélange une goutte de sang à une goutte de réactif au métabisulfite de sodium. Si les hématies contiennent une hémoglobine anormale « l'hémoglobine S », elles prennent la forme d'une faucille ou d'une demi-lune.

Le réactif retire leur oxygène aux hématies, et c'est ce qui entraîne cette falciformation.

L'hémoglobine S constitue une anomalie héréditaire. Si elle est transmise par les deux parents, elle provoque la drépanocytose, (ou anémie drépanocytaire), qui est une maladie grave. Si elle n'est transmise que par l'un des deux parents, elle est la cause du trait drépanocytaire et entraîne une tendance à la falciformation, mais n'induit généralement pas de troubles sévères.

L'épreuve de falciformation ne permet pas de différencier l'anémie drépanocytaire du trait drépanocytaire.

L'hémoglobine S se retrouve surtout en Afrique tropicale, mais aussi au Moyen-Orient et parmi les Noirs américains.

VI.2 – METHODE AU METABISULFITE DE SODIUM

- Déposer une petite goutte de sang capillaire (environ 0,02 ml) au centre de la lame.
- Ajouter 1 goutte de solution de métabisulfite de sodium d'un volume égal.
- Mélanger soigneusement avec le coin de la lamelle.

Couvrir avec la lamelle en s'assurant qu'il ne se forme *aucune bulle d'air*.

- Placer la lame sur 2 bâtonnets, dans une boîte de Pétri dont le fond est garni de papier-filtre humide.

Note : lorsqu'on utilise un réactif réducteur comme le bisulfite de sodium, il n'est pas nécessaire de sceller la préparation.

- Attendre 15 minutes.

Examiner au microscope (objectif 40 x).

Si le résultat est négatif, répéter la lecture après 15 autres minutes, puis au bout d'une heure, et de nouveau 2 heures plus tard.

Résultats :

Résultat négatif : les hématies gardent leur forme ronde.

Résultat positif : les hématies prennent une forme de faucille ou de banane, souvent dentelée.

Il importe d'examiner plusieurs zones de la préparation, car la falciformation peut se produire plus rapidement dans l'une que dans l'autre.

Ne pas prendre pour des hématies falciformes des hématies couchées sur le côté ou crénelées.

Métabisulfite de sodium – solution aqueuse à 2%

Métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) 0,5 g

Eau distillée q.s.p. 25 ml

Préparer avant chaque utilisation.

VII – TEMPS DE SAIGNEMENT : METHODE DE DUKE

VII.1 - PRINCIPE

A l'aide d'un vaccinostyle, on pratique une petite incision au lobe de l'oreille. Cette blessure saigne et on mesure le temps nécessaire pour que le saignement s'arrête.

Cette épreuve est pratiquée :

- pour le diagnostic de certaines maladies hémorragiques,
- avant une intervention chirurgicale,
- avant une ponction du foie ou de la rate.

VII.2 - METHODE

1. Nettoyer délicatement (sans frotter) le lobe de l'oreille avec l'ouate imprégnée d'éther.
Laisser sécher.
2. Inciser profondément le lobe de l'oreille.
Déclencher le chronomètre.
Le sang doit couler librement, sans que l'on doive presser le lobe.
3. *Au bout de 30 secondes :*
Recueillir la 1^{ère} goutte de sang sur un coin de papier buvard.
Ne pas toucher la peau avec le buvard.
4. *Attendre encore 30 secondes :*
Recueillir la 2^{ème} goutte de sang de la même manière, un peu plus loin sur la bande de papier.
5. Continuer à recueillir une nouvelle goutte de sang *toutes les 30 secondes.*
Les tâches de sang diminuent peu à peu de diamètre.
6. Quand l'incision cesse de saigner, arrêter le chronomètre (ou noter le temps à la montre).

On peut aussi compter le nombre de gouttes sur le papier buvard et le multiplier par 30 secondes.

Par exemple, il y a 7 gouttes.

Le temps de saignement est $7 \times 30 \text{ secondes} = 3\frac{1}{2} \text{ minutes}$.

Résultats :

Temps normal pour la méthode de Duke 1 à 5 minutes.

VIII – TEMPS DE COAGULATION DU SANG TOTAL

VIII.1 - PRINCIPE

On prélève du sang veineux dans un tube de verre.

On mesure le temps qu'il lui faut pour se coaguler.

Cette épreuve n'a qu'une valeur limitée, car elle ne permet de déceler que les anomalies graves de la coagulation.

VIII.2 - METHODE

1. A l'aide d'une seringue en plastique, prélever un peu plus de 2 ml de sang veineux.
2. Enlever l'aiguille de la seringue et remplir chaque tube jusqu'à la marque 1 ml.
Boucher les 2 tubes avec du coton cardé.
3. Après 3 minutes retirer le 1^{er} tube du bain-marie.
L'incliner à un angle de 45° pour voir si le sang est coagulé.
4. Si ce n'est pas le cas, le remettre dans le bain-marie et l'examiner toutes les 30 secondes pour voir si la coagulation s'est faite.
5. Dès que le sang du 1^{er} tube est coagulé, examiner le 2^{ème} tube.
Celui-ci se coagule généralement très peu de temps après le 1^{er}. *Arrêter le chronomètre ou noter l'heure.*
Le temps de coagulation à indiquer est celui qui correspond au 2^{ème} tube.

Résultats :

Noter le temps de coagulation en minutes, à 30 secondes près.

Marge normale de variation :

- 5 à 12 minutes.

Un malade au temps de coagulation anormalement long doit être adressé pour plus ample examen à un spécialiste.

BACTERIOLOGIE

I – URINES – DEPISTAGE D'INFECTION

- I.1 Prélèvements
- I.2 Méthode directe
- I.3 Examen du culot urinaire
- I.4 Préparation et fixation des étalements
 - 1. Principe
 - 2. Préparation de l'étalement
 - 3. Fixation
- I.5 Coloration de Gram
 - Technique
 - Principe
 - Risque d'erreur
 - Différents groupes de bactéries
- I.6 Interprétation

II – SECRETIONS GYNECOLOGIQUES : DEPISTAGE D'INFECTION

- II.1 Trichomonas
 - 1. Prélèvement
 - 2. Méthode
- II.2 Candidoses
- II.3 Gonocoques
 - 1. Principe
 - 2. Prélèvement chez l'homme
 - 3. Coloration des étalements
 - 4. Examen des lames
- II.4 Urétrites – Vaginites aspécifiques

III – RECHERCHE DE BACILLE TUBERCULEUX

- III.1 Principe
- III.2 Recueil des produits pathologiques
 - a. Expectoration
 - b. Urines
 - c. Autres : LCR, abcès froid ferme, ganglion
- III.3 Traitement - coloration
 - a. Matériel
 - b. Réactifs
 - c. Techniques
- III.4 Examen des lames
- III.5 Résultats
- III.6 Principe de la coloration de Ziehl-Neelsen
- III.7 Autres germes pathogènes découverts dans les crachats

I - URINES

I.1 – PRELEVEMENT

Eviter le recueil des 1^{ère} urines du matin car elles sont souvent contaminées.

Demander au patient de rester 3-4 h sans uriner.

Recueillir les urines du 2^{ème} jet dans un flacon stérile après une toilette locale (Dakin par ex) +++.

I.2 – METHODE DIRECTE (Technique de référence) ++++

Examiner les urines en \varnothing de Malassez.

Faire la numération des leucocytes et des hématies.

Noter la présence de cristaux, parasites, levures, \varnothing épithéliales...

Résultats :

- Valeurs normales Hématies < 3 000/ml
 Leucocytes < 5 000/ml
- Infection probable si Leucocytes > 50 000 avec bactériurie.

I.3 – EXAMEN DU CULOT URINAIRE

—Prendre 5-10 ml d'urine.

—Centrifuge 10 min à 2500 Tr par min.

—Rejeter le surnageant.

—Mélanger le culot jusqu'à obtention d'une suspension homogène.

—Faire un étalement sur lame pour la coloration de gram.

—Examiner 1 partie du culot en lame-lamelle à obj. x 40.

Résultats :

- Hématies : 0-10 champ = rares
 10-30 = assez nb
 > 30 = nb
- Leucocytes : < 5 champ = rares
 5-10 champ = qq (normal)
 10-20 champ = assez nb (pus +)
 20-30 champ = nb (pus ++)
 > avec amq = très nb (pus +++)

Noter la présence de cristaux, levures, parasites, \varnothing épithéliales, TV, spermatozoïdes...

NB : attention à ne pas confondre des leucocytes avec des cellules rondes (noyaux ronds, nb granulations).

I.4 – PREPARATION ET FIXATION DES ETALEMENTS

a. Principe

L'échantillon à examiner (culot de centrifugation d'urine) est traité de la manière suivante :

- Il est étalé en couche mince sur une lame.
- Il est complètement séché.
- Il est fixé sur la lame par la chaleur, avant d'être coloré.

b. Préparation de l'étalement

1. Porter l'anse au rouge :

Tenir la boucle juste au-dessus de la partie bleue de la flamme.

Le fil doit être aussi vertical que possible.

Laisser refroidir (compter jusqu'à 20).

2. Prélever une partie de l'échantillon à examiner en posant l'anse à *plat* sur la surface du liquide.
3. Déposer l'anse sur la lame et presser légèrement à plat et au centre de la lame (celle-ci doit être numérotée).
4. Tourner l'anse, toujours à plat, en stries ovales de plus en plus grandes.
Laisser un espace libre sur les 4 côtés de la lame.
Laisser sécher complètement à l'air.
5. Porter de nouveau l'anse au rouge pour y détruire toutes les bactéries.

c. Fixation

S'assurer que l'étalement est bien sec.

Passer la lame dans la flamme d'un bec Bunsen, le côté de l'étalement au-dessus. Passer 3 fois à travers la flamme.

Laisser refroidir avant de colorer.

Il est parfois utile de tracer un cercle avec un crayon gras, autour de l'étalement, pour en faciliter le repérage.

I.5 – COLORATION DE GRAM

La coloration de Gram permet de classer les bactéries en 2 groupes :

- les *Gram positives* colorées en violet-noir
- les *Gram négatives* colorées en rose.

Elle est effectuée à partir du culot de centrifugation.

a. Technique

Fixer l'étalement et le laisser refroidir.

1. *Violet de gentiane* – 1 minute.

Verser le violet sur la lame et l'en recouvrir entièrement.

Laisser agir 1 minute.

Rincer à l'eau du robinet et égoutter.

2. Solution iodée de Gram – 1 minute

Arroser la lame de solution iodée de Gram et laisser agir 1 minute.

Égoutter la solution et rincer à l'eau du robinet.

3. Alcool à 95° - 1 minute

Recouvrir entièrement la lame.

Laisser agir 1 minute.

Laver à l'eau et égoutter.

Observer l'étalement : s'il reste des tâches violettes, remettre de l'alcool pendant 15 à 30 secondes.

Bien rincer à l'eau et égoutter.

4. Solution de safranine – 10 secondes

Laisser 10 secondes sur la lame.

Laver aussitôt sommairement à l'eau du robinet.

Égoutter et laisser sécher à l'air.

b. Principe de la coloration

1. Le violet colore toutes les bactéries en violet foncé.

2. La solution iodée fixe plus ou moins nettement le violet dans les bactéries.

3. L'alcool à 95° :

- Décolore certaines bactéries où le violet n'est pas fortement fixé par la solution iodée.
- N'en décolore pas d'autres où le violet est bien fixé par la solution iodée.

4. La solution de safranine :

- Précolore (en rose) les bactéries décolorées par l'alcool.
- N'agit pas sur les autres qui restent violet foncé.

c. Risque d'erreur

Il peut se produire une fausse réaction Gram positive dans les cas suivants :

—Étalement fixé avant d'être sec.

—Étalement trop épais.

—Dépôt de colorant dans le flacon de violet (filtrer avant l'emploi).

—Solution iodée de Gram mal égouttée.

—Alcool laissé trop peu de temps.

—Solution de safranine trop forte ou laissée trop longtemps.

Il peut se produire une fausse réaction Gram négative dans les cas suivants :

- Solution iodée de Gram laissée trop peu de temps.
- Alcool laissé trop longtemps et insuffisamment rincé.

d. Différents groupes de bactéries

1. Coques Gram positifs – formes rondes

- en grappes (staphylocoques)
- en chaînettes (streptocoques)
- par 2
- par 4, etc.

2. Diplocoques Gram négatifs – formes rondes groupées par 2

Peuvent être :

- en forme de grain de café
- en amas dans le cytoplasme d'un leucocyte

3. Bacilles Gram positifs – formes en bâtonnet

4. Bacilles Gram négatifs

5. Levures

I.6 – INTERPRETATION

- Une infection urinaire est exceptionnellement plurimicrobienne.
- Présence de pus + bactéries = infection.
- Présence de pus sans bactérie :
 - . réaction inflammatoire
 - . tuberculose
 - . néphropathie
 - . auto traitement
 - . modalités de prélèvement ?
- Absence de pus avec bactéries :
 - . modalités de prélèvement ?
 - . urines diluées ?

En cas de doute ne pas hésiter à demander un nouveau prélèvement.

II – SECRECTIONS GYNECOLOGIQUES

Principaux agents responsables d'infections :

1. Trichomonas vaginalis
2. Levures (candidoses)
3. Gonocoques
4. Uréthrites vaginites aspécifiques
 - . Staphylocoques
 - . Streptocoques
 - . Gardnerella
 - . Entérobactéries

II.1 – TRICHOMONAS

Trichomonas vaginalis est un protozoaire qui peut provoquer des écoulements génito-urinaires (exsudats), surtout chez la femme, et parfois aussi chez l'homme. On le recherche au microscope dans des préparations à l'état frais.

L'écoulement est blanchâtre et plus ou moins clair ; il peut aussi être gris verdâtre, mousseux ou écumeux.

a. Prélèvement

Chez la femme : l'écoulement doit être porté au laboratoire immédiatement après prélèvement (dans un tube ou sur une lame).

Chez l'homme : prélever au laboratoire comme indiqué pour la recherche des gonocoques. Examiner immédiatement.

b. Méthode

1. Placer une goutte d'écoulement sur une lame.
2. Faire ensuite un vaste étalement très mince de l'écoulement sur une 2^{ème} lame.
3. Examiner aussitôt à l'objectif 10 x

Rechercher de petits organismes ronds, transparents, de la taille d'un globule blanc, qui avancent par à-coups en tournant très vite.

4. Examiner à l'objectif 40 x pour observer le trichomonas

Taille environ 15 μ (10 à 20 μ)

Forme ronde, globuleuse

Mouvement tourbillonne, tourne, semble vibrer

Membrane ondulante : comme la nageoire d'un poisson, d'un côté seulement, très mobile (mouvement d'ondulation rapide).

4 flagelles : comme des fouets, très mobiles ; impression très nette de mouvement.

Lame avec étalement

Si on ne trouve rien dans la goutte examinée entre lame et lamelle, colorer l'étalement sec sur la deuxième lame par le Gram. Y chercher des bactéries (gonocoques ?).

II.2 – CANDIDOSES

Trouvés dans des écoulements épais, blancs (parfois jaunes ou incolores). A l'objectif 40x, rechercher :

a) Des levures

- organismes ovales ou ronds
- immobiles
- de tailles inégales (2 à 6 μ)
- certains portent des bourgeons

b) Des filaments mycéliens (quelquefois)

- filaments à extrémités arrondies
- longueur variable (20 à 100 μ)
- 2 à 4 μ de largeur

II.3 – GONOCOQUE

a. Principe

On soumet les étalements de pus uréthraux à une coloration de Gram. Les Gonocoques se reconnaissent aux trois caractères suivants :

1. ils sont diplocoques (par paires)
2. Gram négatifs
3. intracellulaires (à l'intérieur des leucocytes).

b. Prélèvement chez l'homme

1. Effectuer le prélèvement de préférence très tôt le matin, avant que le malade ait uriné. Si le méat est souillé, le nettoyer avec une compresse stérile imbibée de soluté physiologique.
2. Presser légèrement le pénis pour faire apparaître au méat une goutte de pus.
3. Prélever le pus avec une anse de platine stérile ou l'exprimer directement sur une lame propre.
4. Si le pus n'apparaît pas, faire pénétrer l'anse stérile sur environ 2,5 cm dans le canal urétral pour opérer le prélèvement.
5. Faire 2 étalements :
 - aussi minces que possible
 - couvrant une partie de la lame aussi large que possible

c. Prélèvement chez la femme

Le prélèvement doit être fait au col utérin par le médecin ou par un infirmier spécialisé. En cas de blennorragie chronique, prélever juste avant ou juste après les règles.

L'examen direct présente un grand intérêt pour diagnostiquer la blennorragie masculine : il a beaucoup moins de valeur dans le cas des femmes. *La culture est donc indispensable* pour isoler et identifier le gonocoque dans les prélèvements féminins.

d. Coloration des étalements

Effectuer une coloration de Gram.

Bien décolorer à l'alcool après application de la solution iodée de Gram.

Laver immédiatement à l'eau après coloration finale à la solution de safranine.

e. Examen des lames

Examiner surtout les bords de l'étalement, où les éléments, moins serrés, sont plus faciles à voir, le colorant y étant moins concentré.

Pus (voir s'il y a de nombreux amas de leucocytes altérés. Leurs noyaux sont rose vif, leur cytoplasme incolore).

Gonocoques ovales, en forme de grains de café, Gram négatifs (rose clair), disposés par paires.

Intracellulaires réunis en amas à l'intérieur du cytoplasme des leucocytes (1).

Extracellulaires amas découverts entre les leucocytes, ou près d'un leucocyte éclaté (2).

II.4 – URETRITE – VAGINITE – ASPECIFIQUES

- Staphylocoques
- Streptocoques
- Entérobactéries
- Gardnerella

III- RECHERCHE DE BACILLE TUBERCULEUX

III.1 PRINCIPE

Le bacille tuberculeux *Mycobacterium tuberculosis* est acido-résistant et se colore en rouge par le Ziehl-Neelsen, alors que presque tous les autres micro-organismes se colorent en bleu.

III.2 RECUEIL DES PRODUITS PATHOLOGIQUES

a. Expectoration

Recueillir le premier crachat après le réveil.

1. Le malade se tient debout, si possible.
2. Il inspire profondément, remplissant à fond ses poumons.
3. Il les vide d'un seul coup, en toussant très fort, du plus profond de lui-même.
4. Il crache son exproation dans le pot prévu à cet effet

Après obtention de l'échantillon.

Vérifier que le volume de l'échantillon est suffisant.

Les crachats de malades contiennent habituellement :

- des traînées épaisses de mucus, trouées de bulles d'air.
- de petits filaments de fibrine.
- des parcelles de pus.
- occasionnellement, des traînées brunâtres de sang.

Attention :

De la salive liquide et mousseuse, des sécrétions du nez et du pharynx ne constituent pas des expectorations suffisantes. Refaire cracher le malade.

b. Urines

- Centrifuger le maximum d'urines pendant 15 mn dans un tube conique.
- Rejeter le surnageant, sur le culot faire une lame à colorer par la méthode de Ziehl.

c. Autres : LCR, abcès froid ferme, ganglion

III.3 TRAITEMENT - COLORATION

a. Matériel

- Lame de verre.
- Anse de platine.

- Tampon de coton sur tige de métal pour flambage.
- Minuterie.

b. Réactifs

- Fuchisine phéniquée pour coloration de Ziehl-Neelsen.
- Mélange alcool-acide.
- Bleu de méthylène aqueux.
- Alcool à brûler.
- Pissette d'eau distillée.

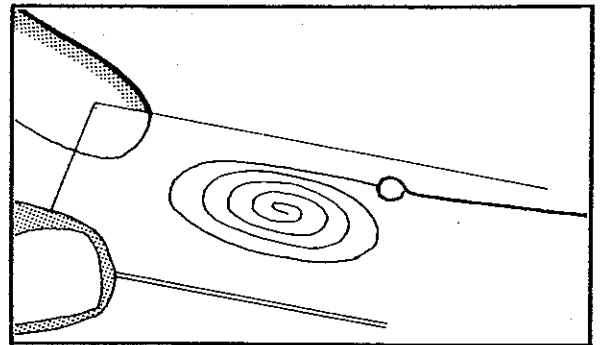
c. Techniques

5. Préparer deux lames.

Prendre une parcelle purulente pour chaque lame, soit avec une anse de platine stérile, soit avec deux anses formant pince.

6. Faire un étalement :

- aussi mince que possible
- aussi large que possible, formant des cercles concentriques bien distincts, mais sans atteindre les bords de la lame.



Important :

Après avoir fait les étalements, tremper l'anse dans du liquide désinfectant, pour en détacher les restes de crachat. Mettre ensuite l'anse près de la flamme, attendre qu'elle soit sèche, puis la flamber. On évite ainsi de répandre du crachat infecté, par exposition à la flamme.

7. Fixation :

Laisser sécher à l'air, puis fixer l'étalement en faisant passer les lames trois fois à travers la flamme.

8. Placer les lames numérotées sur 2 baguettes de verre au-dessus de l'évier.

9. Coloration à la fuschine phéniquée – 5 minutes à chaud :

Recouvrir complètement les lames de fuschine phéniquée filtrée au préalable.

Tremper le tampon de coton dans l'alcool, l'enflammer et le passer lentement sur les lames pour les chauffer.

10. Dès qu'on observe les 1^{ères} vapeurs, mettre la minuterie sur 5 minutes.

Continuer à chauffer pour maintenir l'émission de vapeur sans faire bouillir, pendant 5 minutes.

Rajouter immédiatement de la fuschine en cours de chauffage, si le colorant commence à sécher.

11. Lavage à l'eau distillée :

Laisser refroidir. Laver délicatement les lames avec un jet d'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de rinçage soit incolore.

12. Décoloration par l'alcool-acide :

Recouvrir les lames d'alcool-acide.

Attendre 3 minutes.

Laver les lames à l'eau ordinaire et les faire égoutter.

Examiner les lames : si elles sont complètement décolorées, colorer au bleu de méthylène comme indiqué ci-dessous sous j.

S'il reste encore des traces de fuschine (goutte épaisse) recouvrir une 2^{ème} fois d'alcool-acide et attendre encore 1 minute.

13. Laver à l'eau :

Vérifier que la décoloration soit bien complète.

14. Bleu de méthylène – 30 secondes :

Recouvrir les lames de colorant. Laisser agir 30 secondes.

Laver à l'eau ordinaire pendant 1 minute.

Egoutter et laisser sécher sur un ratelier à lames.

III.4 EXAMEN DES LAMES

Utiliser l'objet à immersion.

Les bacilles tuberculeux sont :

- colorés en rouge vif sur fond bleu
- droits ou légèrement incurvés
- courts (1 à 4µm)
- souvent granuleux
- disposés par groupes de 3 à 10 bacilles serrés comme les brins d'une corde, ou en forme de lettres ou de fourches (ils sont souvent trouvés près de filaments de fibrine).

On peut, au lieu de bleu de méthylène, utiliser une solution à 0,2% de vert de malachite dans de l'eau distillée. La méthode est la même. Le vert de malachite colore le fond en vert, les bacilles se colorent en rouge.

Ne pas prendre pour des bacilles tuberculeux :

1. Des levures plus ou moins colorées en rouge.

Chauffées, elles éclatent souvent en paquets de granules rouges.

2. Des tâches de colorants (lame mal décolorée).

Attention :

Il existe un autre bacille pathogène acido-résistant : le bacille de la lèpre. On trouve dans la nature et même dans l'eau du robinet divers bacilles plus ou moins acido-résistants. Ils peuvent parfois être à l'origine d'un résultat de laboratoire erroné.

Comment examiner les lames :

Examiner complètement la 1^{ère} lame à l'objectif à immersion (éclairage maximal, pas de filtre coloré), comme indiqué sur le schéma ci-contre.

III.5 RESULTATS

Résultat positif

Dès qu'on a observé environ **10** bacilles acido-résistants sur la 1^{ère} lame, examiner la 2^{ème} lame pour confirmer le résultat positif.

Résultat négatif

Examiner toute la 1^{ère} lame (10 minutes), puis toute la 2^{ème} lame (encore 10 minutes).

III.6 PRINCIPE DE LA COLORATION DE ZIEHL-NEELSEN

Le bacille responsable de la tuberculose chez l'homme est *Mycobacterium tuberculosis* :

- type humain
- type bovis et type avium (rares).

Ils sont acido-résistants, c'est-à-dire que colorés en rouge par la fuchsine, ils ne pourront plus être décolorés ni par l'acide ni par l'alcool.

Fuchsine phéniquée :

- elle colore tous les germes du crachat en rouge.

Mélange acide-alcool :

- il décolore tous les germes et les éléments cellulaires sauf les bacilles acido-résistants (bacille tuberculeux).

Bleu de méthylène :

- il colore en bleu tous les germes et les éléments décolorés au 2^{ème} temps, mais les bacilles acido-alcool-résistants restent rouges.

III.7 AUTRES GERMES PATHOGENES DECOUVERTS DANS LES CRACHATS

Pneumocoques : diplocoques Gram positifs. Chaque paire est entourée d'une capsule qui reste incolore.

Champignons : levures, filaments mycéliens avec ou sans spores. Il peut s'agir d'éléments pathogènes ou saprophytes.

PARASITOLOGIE

I - PALUDISME

I.1 – Préparation d'une goutte épaisse

a. Principe

b. Méthode

I.2 – Coloration de Giemsa

I.3 – Identification des parasites

II - SELLES

II.1 – Examen des selles

a. Obtention des échantillons

b. Parasites recherchés

c. Précaution

II.2 – Préparation des lames

a. Méthode

b. Parasites les plus fréquents

II.3 – Technique de concentration

III – URINES : SCHISTOSOMA HAEMATOBIMUM

II.1 – Obtention des urines

II.2 – Examen des urines

I - PALUDISME

I.1 – PREPARATION D'UNE GOUTTE EPAISSE

Recherche des parasites du sang.

Une goutte de sang du doigt est déposée sur une lame où elle est étalée et séchée.

Elle est colorée et examinée au microscope.

a. Principe

Pendant la coloration de la goutte de sang épaisse, l'hémoglobine des hématies est dissoute et enlevée par l'eau du colorant.

Il ne reste que :

- les parasites et
- les globules blancs

qui peuvent être vus au microscope.

b. Méthode

1. Choisir l'emplacement de la piqûre comme indiqué ci-contre :

Au 3^{ème} ou au 4^{ème} doigt de la main gauche sur le côté qui est moins sensible que le bout du doigt.

Chez les nourrissons de moins de 6 mois :

- piquer le talon ou le gros orteil.

2. Nettoyer l'endroit choisi :

- d'abord avec un tampon de coton imbibé d'alcool, puis
- avec un coton sec pour enlever toute trace d'alcool.

3. Piquer d'un coup sec et rapide.

4. Essuyer la première goutte de sang avec un tampon de coton sec.

5. De la main droite :

- prendre une lame en la tenant par les bords.

De la main gauche :

- presser le doigt piqué pour faire sortir une goutte de sang de cette grosseur environ : O

Préparation de l'étalement :

6. Faire un étalement épais, au centre de la lame.

Etaler le sang avec le coin d'une lame propre, jusqu'à épaissement uniforme. Les étalements trop minces ou trop épais ne se colorent pas bien.

7. Laisser sécher à l'air.

I.2 – COLORATION DE GIEMSA

- Faire une dilution (1 : 10) de colorant de Giemsa.
- Mélanger délicatement avec un agitateur en verre.
- Placer les lames à colorer sur 2 baguettes de verre.
Couvrir avec le colorant de Giemsa dilué.
- Laisser agir 30 minutes.
- Laver le colorant à l'eau tamponnée. Ne pas laisser s'égoutter avant de laver, car il resterait un dépôt de colorant sur la goutte.
- Egoutter les lames lavées. Les faire sécher sur un râtelier en les inclinant la face avec le sang coloré tournée vers le bas pour les protéger des poussières de l'air. Il est *déconseillé* de sécher les lames colorées en les pressant entre des feuilles de papier-filtre.

I.3 – IDENTIFICATION DES PARASITES DU PALUDISME

Préparation des étalements de sang

Quand doit-on faire le prélèvement ?

Les parasites sont généralement plus nombreux dans le sang vers la fin de l'accès de fièvre.

Toujours prélever le sang *avant* d'administrer des médicaments antipaludiques.

Préparer :

- 1 lame avec un étalement mince pour d'éventuelles identifications délicates d'espèces.
- 1 lame avec une goutte épaisse pour la recherche des parasites.

Coloration des lames au May Grunwald Giemsa

Identifier l'espèce de plasmodium (P. Palciparum, Vivax...) et quantifier le % d'hématies parasitées ; un pourcentage > à 5% est en faveur d'un accès pernicieux (P.F.).

II – SELLES

La recherche des parasites peut être négative sur l'échantillon ; si possible demander au patient 3 recueils de selles (par exemple 1 par jour pendant 3 jours).

NB IL EXISTE DES TESTS RAPIDS
TYPE "SAVONNETTE" POUR LE
DU PALUDISME. CES TESTS FONCTIONNENT
TRES BIEN. ³⁵ IL CONVIENT DE LES
ASSOCIER AU FROTIS AFIN DE QUANTIFIER
LE % DE PARASITEMIE.

II.1 – EXAMEN DES SELLES

a. Obtention des échantillons

Du soin apporté à l'obtention des échantillons dépendra en grande partie la qualité du résultat. Quand on recherche des parasites, on prendra les précautions suivantes.

1. *Obtention d'une quantité suffisante*

- pour trouver les parasites, s'ils sont rares,
- pour éviter le dessèchement rapide des selles, il faut au minimum un échantillon de 4 ml (4 cm³).

2. *Fourniture d'un récipient au malade*

Le laboratoire doit s'efforcer dans toute la mesure possible de remettre au malade l'un des types de récipients suivants :

- a) boîte en carton plastifié
- b) boîte métallique vide, avec couvercle
- c) boîte en plastique léger

3. *Examen des selles fraîches*

- a) Il faut examiner les selles dans l'heure qui suit l'obtention de l'échantillon.
- b) Si l'on reçoit tout un lot de selles, examiner en premier les selles liquides, contenant du mucus ou du sang, qui risquent d'abriter des amibes mobiles dont la vie à l'air libre est de courte durée.

b. Parasites recherchés

- a) Vers visibles à l'œil nu (anneaux de Taenia, Ascaris...).
- b) Œufs de ces vers ou leurs larves, visibles uniquement au microscope.
- c) Protozoaires (micro-organismes unicellulaires) qui peuvent être trouvés sous leur forme mobile (végétative) ou sous forme de kyste immobile et résistant.

c. Précaution

Ne jamais laisser des selles exposées à l'air libre dans des récipients sans couvercle.

Ne jamais grouper toutes les selles pour les examiner en fin de matinée (c'est-à-dire deux ou trois heures plus tard).

Ne jamais accepter des selles mélangées à de l'urine (dans un pot de chambre ou un bassin).

Ne jamais poser un récipient contenant des selles sur un formulaire d'analyse.

II.2 – PREPARATION DES LAMES

Méthode

1. Sur une lame, déposer :
 - 1 goutte de soluté physiologique *au milieu de la moitié gauche.*
 - 1 goutte de Lugol *au milieu de la moitié droite.*
2. Prendre avec un applicateur ou une anse de platine un petit morceau de selles (de ce volume : O environ).
Si les selles :
 - sont moulées, prendre bien à l'intérieur de l'échantillon (œufs de parasite ?), ainsi qu'à la surface,
 - contiennent du mucus ou sont liquides, prélever dans le mucus sanguinolent, à la surface des selles ou à la surface du liquide (amibes ?).
3. Mélanger l'échantillon de selles à la goutte de soluté physiologique.
4. A l'aide de l'applicateur ou de l'anse de platine, prendre un 2^{ème} échantillon de selles et le mélanger à la goutte de Lugol.
5. Recouvrir chaque préparation d'une lamelle.
6. Inscrire au crayon gras le numéro de l'échantillon sur la lame.
7. Examiner les préparations au microscope. Pour la préparation au soluté physiologique, utiliser les objectifs 10 x et 40 x et les oculaires 5 ou 6 x ; pour la préparation au Lugol, employer l'objectif 40 x. Comme les œufs et les kystes sont incolores, réduire l'éclairage en fermant le condenseur ou l'abaisser pour augmenter le contraste.
8. Examiner la 1^{ère} préparation à l'objectif 10 x, en partant du coin en haut et à gauche, comme indiqué ci-contre.
Bien examiner tout le champ, en prenant un repère sur le bord du champ et en faisant avancer la lame jusqu'à retrouver le repère sur l'autre bord du champ, et ainsi de suite pour toute la lame.
Sur chaque ligne horizontale d'examen, passer au moins une fois à l'objectif 40 x, pour voir s'il n'y a pas de protozoaires, qui sont de très petite taille.
Examiner ensuite à l'objectif 40 x la préparation au Lugol.

II.3 – TECHNIQUE DE CONCENTRATION DE BAILANGER

a. Principe

Les nombreux et parfois volumineux débris alimentaires, la masse des cadavres bactériens, tout cela encombre la dilution et gêne l'observation microscopique. En éliminant ces éléments inutiles, on éclaircit les préparations et simultanément on augmente la concentration des parasites. Ainsi, privés des particules sans intérêt parasitaire, les œufs et larves des vers, de même que les kystes de Protozoaires éventuellement contenus dans une masse fécale volumineuse se concentrent dans un faible volume et sont immédiatement décelables. Tel est le principe des méthodes d'enrichissement dont on saisit l'intérêt tout en comprenant la nécessité de les associer à l'examen direct avec lequel elles ne font pas double emploi. Certains éléments parasitaires (œufs d'*Ascaris* par exemple) sont, en effet, plus facilement trouvés à l'examen direct.

b. Réactifs

Tampon acéto-acétique pH = 5,00

Acétate de sodium cristallisé..... 15 g

Acide acétique 3,60 ml

Eau distillée q.s.p. 1 000 ml

Ether

c. Technique

Délayer 2 à 3 g de selles avec dix fois environ son volume de la solution tampon.

Laisser *sédimer* pendant moins d'une minute.

Décanner dans un tube à centrifuger où la dilution fécale est émulsionnée par agitation avec un égal volume d'éther.

Centrifuger 10 mn à 3000 tours. Examen du sédiment.

III – RECHERCHE DES ŒUFS DE SCHISTOSOMA HAEMATOBIIUM DANS LES URINES

Les vers schistosomes (bilharzies), agents de la schistosomiase vésicale, rencontrée en Afrique et au Moyen-Orient, pondent leurs œufs dans les vaisseaux sanguins proches de la vessie. Les œufs passent dans l'urine, souvent accompagnés de sang.

III.1 – OBTENTION DES URINES

Recueillir les urines entre 11 et 17 h ; c'est le moment où elles sont les plus riches en œufs de schistosomes, notamment dans les dernières gouttes.

Epreuve d'effort préalable

On peut, juste avant la miction, faire effectuer au malade 20 flexions rapide, ou lui demander de courir 100 mètres, ou de monter et descendre plusieurs fois un escalier (ces exercices ont pour effet d'augmenter l'élimination des œufs).

III.2 – EXAMEN DES URINES

Centrifuger l'urine dans des tubes coniques (10 à 15 ml) pendant 5 minutes, à vitesse réduite, ou au centrifugeur à main.

Après centrifugation, rejeter l'urine qui surnage.

Mélanger le culot de façon homogène en l'aspirant et en le refoulant avec un compte-gouttes capillaire.

Prélever une goutte du culot homogénéisé et le placer entre lame et lamelle.

Urines contenant du sang

S'il y a beaucoup de sang, l'examen est difficile, car les amas d'hématies peuvent cacher les œufs.

Ajouter à l'urine, dans le tube à centrifuger, 5 gouttes de solution de soude à 10%. La soude va lyser (dissoudre) les hématies et clarifier le culot. Les œufs en seront également affectés mais les coques resteront caractéristiques.

GROUPES SANGUINS ET TRANSFUSION

I - LES GROUPES SANGUINS

- I.1 Rappel théorique
 - a. Système abo : 4 groupes
 - b. Système Rhésus : 2 groupes principaux
- I.2 Groupe ABO avec les sérums-tests
 - a. Principe
 - b. Réaction sur lame
 - c. Réaction en tube
- I.3 Groupe ABO avec les hématies-tests
 - a. Principe
 - b. Réaction sur lame ou sur plaque
 - c. Réaction en tube
- I.4 Groupage Rhésus
 - a. Principe
 - b. Réaction sur lame
 - c. Réaction en tube
 - d. Erreurs de groupage rhésus
 - e. Intérêt du groupage rhésus

II - EPREUVE DE COMPATIBILITE

- a. Principe
- b. Matériel
- c. Méthode habituelle
- d. Résultats
- e. Cas d'urgence

I – LES GROUPES SANGUINS

I.1 RAPPEL THEORIQUE

a. Système abo : 4 groupes

Groupe sanguin du sujet	→	A	B	AB	O
Le plasma contient des anticorps	→	anti-B	anti-A	•	anti-A et anti-B
Les hématies contiennent Les antigènes	→	A	B	A et B	•

L'antigène A existe sous forme d'un antigène fortement réactif A_1 et d'un antigène faiblement réactif A_2 . Ce dernier se divise à son tour en 2 groupes A et AB, et en plusieurs sous-groupes : A_1 , A_1B_1 , A_2 et A_2B .

b. Système Rhésus : 2 groupes principaux

	Rh positif	Rh négatif
Les hématies contiennent	l'antigène D	pas d'antigène D

Autres systèmes :

Li, Lutheran, P, Lewis, MN, Kidd, Duffy, etc. Ils sont moins importants pour la prévention des accidents hémolytiques à la naissance ou pour les réactions aux transfusions.

Les accidents de transfusion du système ABO

Exemple : donneur A
 receveur B

Les hématies du sang du donneur A sont détruites par les anticorps anti-A du sang du receveur B.

Accident grave.

Pour éviter les accidents :

- 1) Faire un groupage minutieux pour chaque donneur et chaque receveur :
 - en testant leurs hématies (antigènes) avec des sérums-tests anti-A, anti-B, anti-AB.
 - en testant leur plasma ou sérum (anticorps) avec hématies-tests A, B et O.
 - en testant leurs hématies pour le facteur Rhésus avec un sérum-test anti-D, et, le cas échéant, avec d'autres sérums-tests spécifiques du système Rhésus (laboratoires spécialisés).
- 2) Choisir le groupe sanguin qui convient au malade. Dans toute la mesure possible donner la préférence aux transfusions isogroupes.

Dans les petits hôpitaux, et notamment en cas d'urgence, il peut arriver que l'on doive donner à un malade du sang d'un autre groupe que le sien. Se conformer aux règles suivantes :

 - *Pour un receveur A* un donneur A, ou, en cas d'impossibilité, un donneur O
 - *Pour un receveur B* un donneur B, ou, en cas d'impossibilité, un donneur B
 - *Pour un receveur AB* un donneur AB, et, en cas d'impossibilité, un donneur A, un donneur, B, ou O
 - *Pour un receveur O* un donneur O uniquement
- 3) Faire soigneusement une épreuve de compatibilité.

I.2 GROUPE ABO AVEC LES SERUMS-TESTS

a. Principe

Les hématies sont testées avec 3 sérums-tests :

- sérum anti-A
- sérum anti-B
- sérum anti-AB.

La réaction peut se faire :

- sur lame de verre
- en tube (notamment pour les cas douteux).

b. Réaction sur lame

Matériel :

- Compte-gouttes calibré (20 gouttes par ml)
- Pipettes Pasteur avec tétines
- Soluté physiologique

Sérums-tests anti-A, anti-B, anti-AB :

Les conserver conformément aux instructions du fournisseur, soit à 4°C, soit dans le compartiment à glace du réfrigérateur.

Si le sérum-test paraît trouble, il est probablement infecté par des bactéries et ne doit pas être utilisé.

Garder les flacons ouverts au réfrigérateur, à 4°C.

Prélèvements de sang : séparation

Utiliser :

Du sang recueilli sur anticoagulant EDTA ou CITRATE

- centrifuger 5 minutes à grande vitesse.
- prélever le plasma à la pipette Pasteur.

Le réserver pour le groupage avec les hématies-tests.

Du sang veineux coagulé : 5 à 10 ml dans un tube de verre :

- laisser le sang se coaguler.
- centrifuger 5 minutes à grande vitesse.
- prélever le sérum à la pipette Pasteur.

Le réserver pour le groupage des hématies-tests.

Lavage des hématies à tester

Mélanger :

- 5 gouttes de culot globulaire.
- 2 ml de soluté physiologique.

Centrifuger à grande vitesse.

Aspirer et rejeter le surnageant.

Ajouter à nouveau :

- 2 ml de soluté physiologique frais.

Agiter doucement.

On obtient ainsi une suspension d'hématies à 10%.

Réaction

Préparer et marquer 3 lames.

Placer :

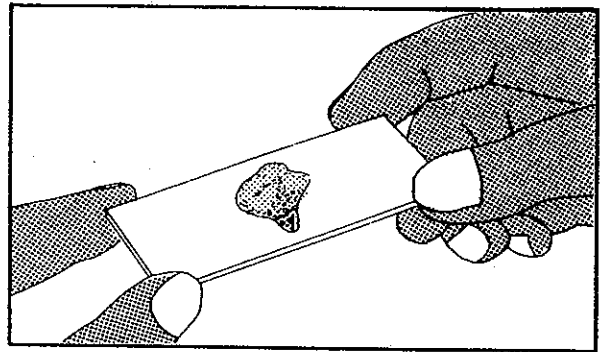
Sur la lame n° 1	Sur la lame n°2	Sur la lame n°3
1 goutte de sérum anti-A	1 goutte de sérum anti-B	1 goutte de sérum anti-AB

Ajouter sur chaque lame :

- 1 goutte suspension d'hématies à 10%

Mélanger la préparation sur chaque lame :
 soit avec un applicateur en bois
 soit avec le culot rond d'un tube à hémolyse
 soit avec le coin d'une lame

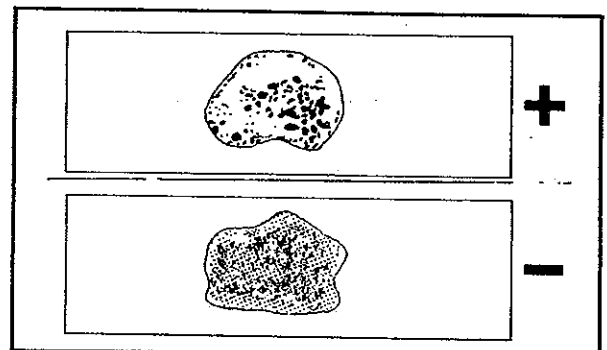
Pour parfaire le mélange, incliner ensuite les lames d'avant en arrière. Lire la réaction dans les 2 minutes qui suivent, en s'assurant qu'il n'y a pas eu d'évaporation qui risque de fausser la réaction.



Lecture des résultats

Résultat positif (+)

On voit flotter de petits amas d'hématies, bien séparées sur un fond de liquide limpide. L'agglutination doit apparaître en moins de 2 minutes.



Résultat négatif (-)

Pas d'agglutination des hématies.

Résultats

Lame 1 anti-A	Lame 2 anti-B	Lame 3 anti-AB	Le sujet est du groupe
+	-	+	Groupe A
-	+	+	Groupe B
+	+	+	Groupe AB
-	-	-	Groupe O

c. Réaction en tube

Les groupages en tube sont plus longs à pratiquer et demandent plus de matériel, mais les résultats sont plus sûrs. Pour les cas douteux, il faudra faire un groupage en tube, pour contrôle.

Matériel

Le même que pour la réaction sur lame, plus :

- tubes à hémolyse avec portoir
- miroir de microscope avec côté concave

Lavage des hématies (3 lavages)

Mélanger :

- 2 gouttes de culot globulaire
- 4 ml de soluté physiologique

Centrifuger à grande vitesse.

Rejeter le surnageant.

Rajouter :

- 4 ml de soluté physiologique.

Agiter doucement pour mettre en suspension.

On obtient ainsi une suspension d'hématies à 2%

Réaction

Inscrire le N° du sérum sur 3 tubes.

Mettre dans les tubes :

N°1	N°2	N°3
1 goutte de sérum anti-A	1 goutte de sérum anti-B	1 goutte de sérum anti-AB

Ajouter dans chaque tube :

- 1 goutte de suspension d'hématies à 2%

Réaction avec centrifugation (méthode rapide)

Laisser reposer les tubes 15 minutes à température ambiante.

Centrifuger ensuite 1 minute à vitesse réduite.

Lecture du résultat

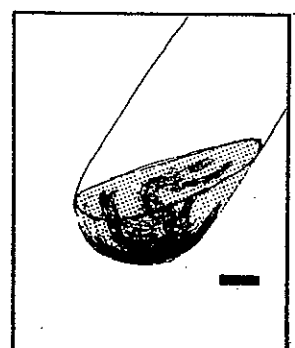
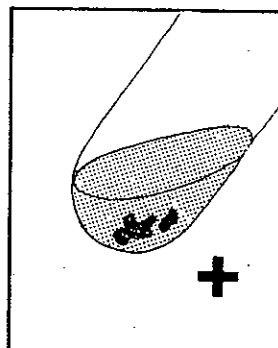
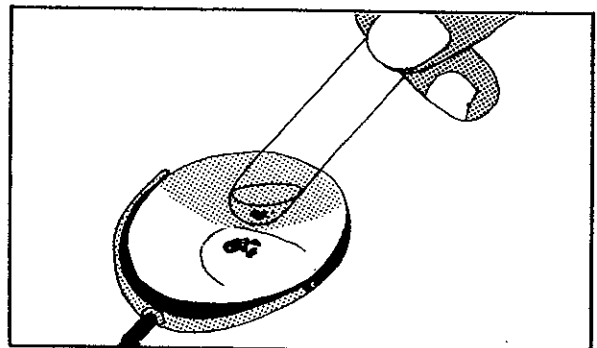
Agiter doucement le fond du tube et examiner le culot globulaire. On peut utiliser le miroir concave.

Résultat positif (+)

Les hématies forment un ou plusieurs blocs rouges compacts, le surnageant est limpide.

Résultat négatif (-)

Les hématies ne tardent pas à se remettre en suspension dans tout le liquide, sans former d'amas visibles.



Résultats douteux - Erreurs

Lecture au microscope

En cas d'agglutination faible, prélever une goutte du mélange hématies-sérum et l'examiner au microscope (objectif 10x).

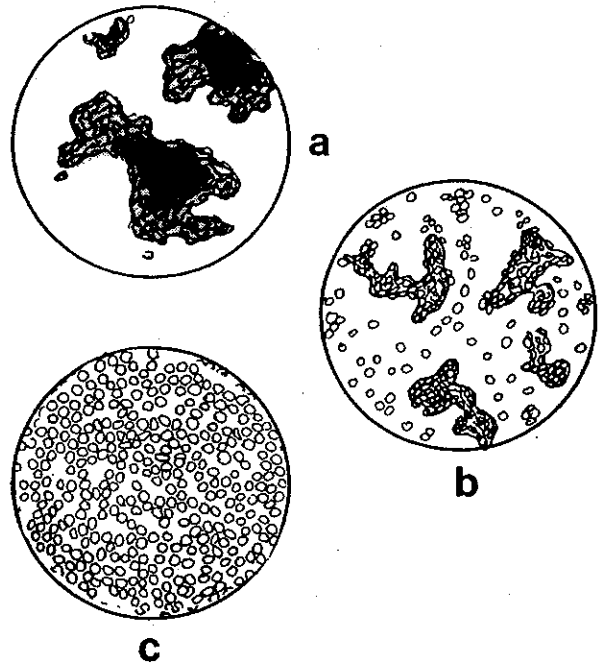
Agglutination nette :

gros amas d'hématies sur fond clair.

Agglutination faible :

paquets d'hématies plus petits et quelques hématies libres dans le champ.

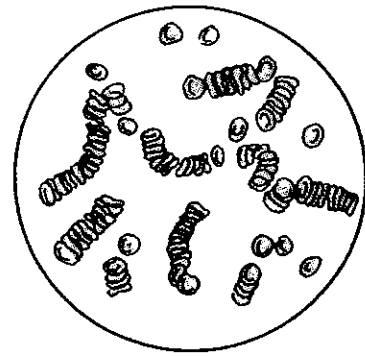
Pas d'agglutination : toutes les hématies sont libres.



Formation de rouleaux

Les hématies ne sont pas agglutinées, mais empilées les unes sur les autres. Il s'agit d'une fausse agglutination, difficile de distinguer à l'œil nu.

Pour disperser les rouleaux, ajouter 2 gouttes de soluté physiologique à la goutte de mélange hématies-sérum, sur la lame. S'il s'agit d'une fausse agglutination, les rouleaux auront disparu, alors que les vrais agglutinats subsistent.



Conservation des sérums-tests

Après ouverture du flacon : dans le réfrigérateur, à 4°C.

Toujours garder les flacons bien bouchés et les exposer le moins longtemps possible à température ambiante.

Le sérum contaminé a un aspect trouble, blanchâtre.

En examiner une goutte au microscope, à l'objectif 40x. Le jeter s'il contient des bactéries.

I.3 GROUPE ABO AVEC LES HEMATIES-TESTS

a. Principe

Le sérum ou le plasma qui doit faire l'objet du groupage est mis en présence de 3 suspensions d'hématies-tests :

- hématies A₁

- hématies B
- hématies O.

La rédaction peut se faire :

- sur lame
- en tube (notamment pour les cas douteux).

b. Réaction sur lame ou sur plaque

Matériel

Le même que pour les groupages avec les sérums-tests. Séparer des hématies le sérum ou le plasma du sujet.

Réactifs – hématies-tests

Sélectionner des échantillons de sang frais des groupes A1, B et O.

Sang A₁

Tester plusieurs échantillons de sang A avec du sérum-test anti-A1.

Sur lame : s'il s'agit de sang A1, on obtient une agglutination en moins de 30 secondes.

Lavage des hématies-tests

Laver les 3 types d'hématies-tests dans 3 tubes à hémolyse. Dans chaque tube, mélanger :

- 1 ml de sang total (sur anticoagulant) à 4 ml de soluté physiologique

Centrifuger 5 minutes à grande vitesse. Rejeter le surnageant. Le remplacer par une quantité équivalente de soluté physiologique. Mélanger. Centrifuger. Rejeter le surnageant.

On réalise ainsi des *suspensions d'hématies-tests à 10%* à conserver au réfrigérateur à 4°C dans des flacons compte-gouttes étiquetés (date de préparation indiquée sur l'étiquette).

Durée de conservation : soluté physiologique : 3 jours.

Faire de même avec sang B et O.

Réaction

Préparer 3 lames marquées A₁, B et O.

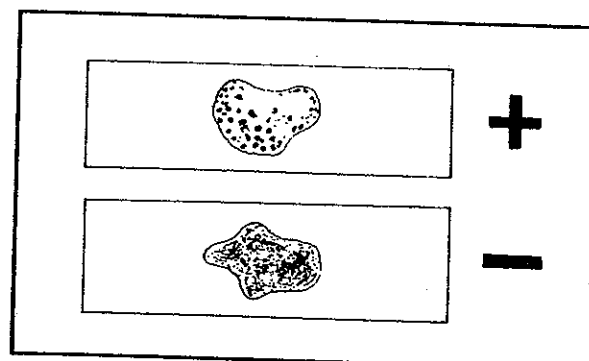
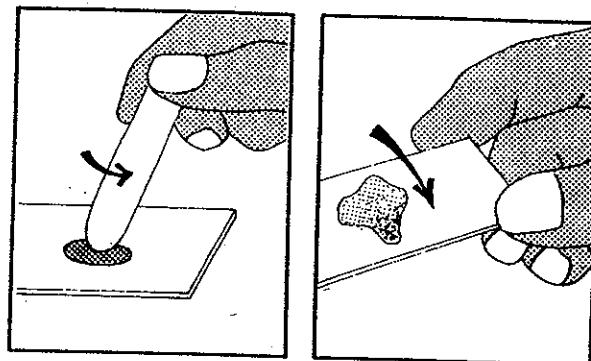
Placer sur :

La lame A1	La lame B	La lame O
1 goutte de suspension d'hématies A ₁ à 10%	1 goutte de suspension d'hématies B à 10%	1 goutte de suspension d'hématies O à 10%

Ajouter sur chaque lame : 2 gouttes de sérum ou du plasma du sujet.

Mélanger la préparation sur chaque lame, avec un applicateur en bois ou avec le culot rond d'un tube à hémolyse. Ne pas transférer de matière d'une lame à une autre.

Incliner les lames d'avant en arrière pour parfaire le mélange.



Lecture du résultat

La taille des agglutinats est variable d'un individu à l'autre (selon que leur sérum contient plus ou moins d'agglutines anti-A et anti-B).

Résultats

Hématies A1	Hématies B	Hématies O	Le sujet est du groupe
-	+	-	A
+	-	-	B
-	-	-	AB
+	+	-	O

Comparer les résultats obtenus à ceux de la méthode avec les sérums-tests. Les deux techniques doivent donner les mêmes résultats. Si ce n'est pas le cas, répéter toute l'épreuve.

Résultat douteux

Examiner au microscope.

c. Réaction en tube

Préparation des hématies-tests (2%)

Préparer des suspensions à 2% d'hématies-tests A₁, B et O, à partir des suspensions à 10% préparées pour la réaction sur lame ou sur plaque.

Mélanger :

- 2 ml de soluté physiologique
- 10 gouttes de suspension à 10%

Cette suspension à 2% doit être utilisée le jour même.

Réaction

Marquer 3 tubes A₁, B et O.

Placer dans chaque tube deux gouttes du sérum ou du plasma du sujet.

Ajouter dans chaque tube une goutte de suspension d'hématies à 2%.

Lecture du résultat

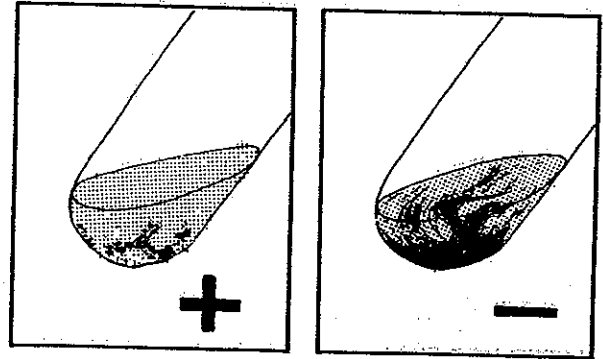
En agitant doucement le tube, examiner l'agglutination :

- *Résultat positif :*

les hématies forment de petits amas.

- *Résultat négatif :*

les hématies ne tardent pas à se remettre en suspension, sans former d'amas visibles.



Confrontation des résultats

	SÉRUMS-TESTS			HÉMATIES-TESTS		
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	A1	B	O
Groupe A	+	-	+	-	+	-
Groupe B	-	+	+	+	-	-
Groupe AB	+	+	+	-	-	-
Groupe O	-	-	-	+	+	-

Intérêt du contrôle avec les hématies « O »

Il permet de vérifier que le sérum du malade ne contient pas d'anticorps anormaux, qui peuvent agglutiner toutes les variétés d'hématies.

En cas de doute à ce sujet, on peut faire un test supplémentaire pour rechercher les anticorps. A l'aide d'une pipette, mettre dans un tube :

- 2 gouttes de sérum du malade
- 1 goutte de suspension à 2% de ses propres hématies

Laisser incuber 1 heure à température ambiante. Voir s'il y a agglutination.

Une réaction positive indique la présence d'auto-anticorps. Les résultats d'un groupage effectué à l'aide des hématies lavées du malade donneront une meilleure idée de son véritable groupe sanguin.

Si l'on soupçonne la présence d'auto-anticorps ou si la réaction aux sérums-tests et aux hématies-tests ne correspond pas aux résultats indiqués ci-après, expédier le sérum et les hématies à un laboratoire spécialisé.

1.4 GROUPAGES RHESUS

a. Principe

Les hématies sont testées à l'aide de sérum anti-D pour y déceler la présence d'antigène D.

Les sujets dont le sang contient de l'antigène D sont dits Rhésus (Rh) positifs.
Ceux dont le sang n'en contient pas sont dits Rhésus (Rh) négatifs.

La réaction se pratique à chaud : 37° à 40°C :

- sur lame
- ou en tube.

b. Réaction sur lame

Matériel

- Lames
- Pipette capillaire
- Rhéscope (boîte chauffante électrique)
- Sérum-test anti-D
- Echantillons de sang Rh positifs et Rh négatifs, utilisés comme témoins (si possible)

Préparation du sang pour le groupage

a) Sang total sur anticoagulant (sel dipotassique de l'acide EDTA ou CITRATE).

b) Sang coagulé :

- Briser le caillot à l'aide d'une pipette capillaire pour libérer les hématies.
- Transférer une partie des hématies libérées avec le sérum dans un tube à centrifuger.
- Centrifuger à grande vitesse pendant 5 minutes.
- Retirer à la pipette l'excès de sérum surnageant jusqu'à ce que les volumes de sérum et d'hématies soient égaux.
- Mélanger en agitant doucement le tube.
- Verser une goutte de la suspension sur une lame propre et l'examiner au microscope (objectif 10x). Si elle contient des amas d'hématies, rejeter la suspension et en préparer une nouvelle en ayant soin de n'utiliser que des hématies libres.

Méthode

- Allumer la plaque chauffante dont la température de surface doit être de 40°C.
Y placer les lames de verres numérotées.

Laisser chauffer 5 minutes.

Si on ne dispose pas de Rhéscope, on peut chauffer les lames sur une lampe à alcool, avant de faire la réaction. En contrôler la température en les appliquant sur le dos de la main : la chaleur doit être supportable.

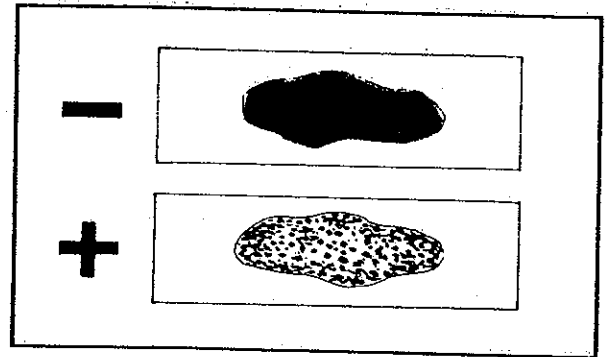
- Placer sur la lame à réaction :
 - 1 goutte de sérum-test anti D
 - 1 goutte du mélange hématies-sérum à tester
- Etaler le mélange avec un applicateur ou avec le culot d'un petit tube.
- Continuer à mélanger en inclinant la boîte chauffante d'avant en arrière.

Résultats

Agglutination = Rhésus positif

Nombreux agglutinats d'hématies, nets, tant au centre que sur le pourtour de la tache étalée. L'agglutination doit se produire en moins de 3 minutes.

Pas d'agglutination = Rhésus négatif



Contrôles

Pour chaque série journalière, il est conseillé de faire :

- un contrôle positif avec du sang Rh positif
- un contrôle négatif avec du sang Rh négatif

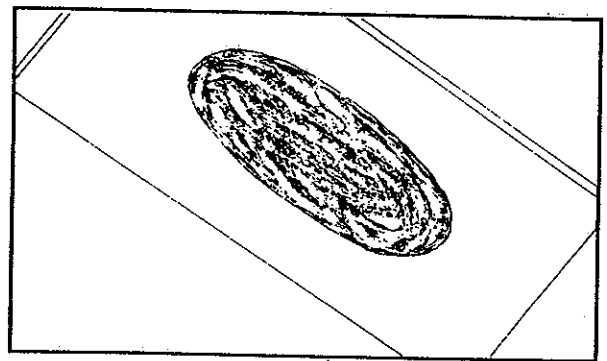
Réactions difficiles à lire

Stries

Au bout de 2 minutes, on voit apparaître des stries surtout sur les bords de la tache.

Il s'agit de formation de rouleaux dus à l'évaporation (chaleur excessive) ou à une quantité insuffisante d'anti-coagulant, ou encore à un plasma trop riche en protéines.

Déposer une petite goutte de soluté physiologique et mélanger. S'il s'agit d'un sang Rh négatif, les rouleaux disparaissent généralement.



Faible agglutination

Contrôler d'abord le sérum anti-D en vérifiant qu'il donne bien une forte agglutination avec un sang Rh positif connu.

Une réaction faible peut également provenir :

- d'un type Rh intermédiaire (type Du)
- de sang contenant des anticorps rares .

Vérifier les résultats douteux par une réaction en tube.

c. Réaction en tube

Préparer une suspension d'hématies à 2% dans leur propre sérum ou plasma.

Mettre dans un petit tube :

- 1 goutte de sérum-test anti-D
- 1 goutte de suspension d'hématies à 2%

Incubation sans centrifugation

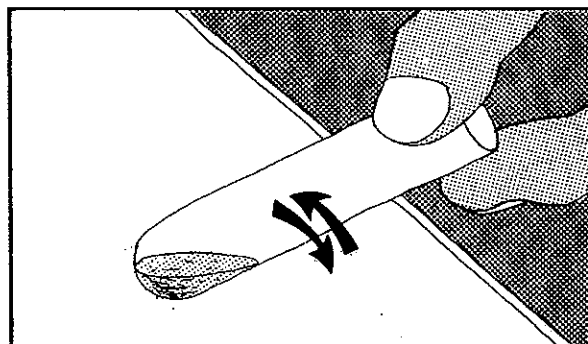
Laisser pendant 1 heure à 37°C (bain-marie ou incubateur).

Technique avec centrifugation (méthode rapide)

Centrifuger 1 minute à vitesse réduite.

Lecture à l'œil nu

Examiner le fond des tubes en les tournants doucement, en position presque horizontale, si possible au-dessus d'une surface illuminée (plaque du Rhésuscope ou lampe).

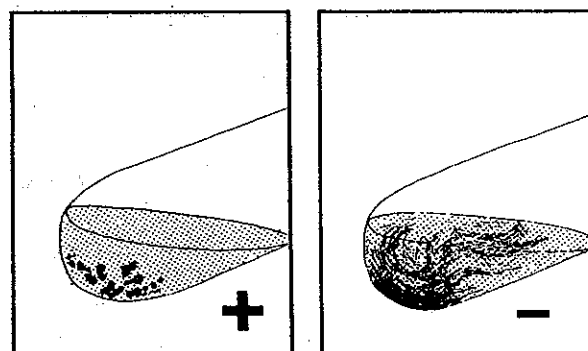


Rhésus positif

On observe de petits agglutinats d'hématies dans un liquide clair.

Rhésus négatif

Les hématies se remettent en suspension homogène, sans agglutinats visibles.



Lecture au microscope

En cas de doute chauffer légèrement une lame de verre, prélever une goutte de culot globulaire à la pipette Pasteur et l'étaler sur la lame chauffée. Examiner au microscope (objectif 10x).

d. Erreurs de groupage rhésus

Sérum-test anti-D contaminé par des bactéries.

Le sérum a un aspect trouble, blanchâtre.

Ne pas l'utiliser.

Erreurs de lecture des étiquettes.

Sang du malade hémolysé ou citraté.

Le groupage des sangs hémolysés (plasma rose) conservés plus de 2 jours au réfrigérateur est difficile.

Le groupage du sang recueilli sur solution de citrate trisodique ne peut se faire que par réaction en tube.

Tubes trop secoués.

Centrifuger pendant le temps et à la vitesse indiquée.

Retirer délicatement les tubes du centrifugeur. Les tourner lentement en position horizontale. On obtient souvent à tort des résultats négatifs parce que les tubes ont été trop secoués.

Utilisation correcte des sérums anti-D

Certains sérums anti-D ne peuvent être utilisés que pour l'un des deux types de réaction. D'autres doivent être employés en milieu salin : dans ce cas, faire une suspension d'hématies à 2% dans du soluté physiologique et pratiquer une réaction en tube. Toujours vérifier les indications portées sur les flacons de sérums-tests.

e. Intérêt du groupage rhesus

Transfusions multiples

Exemple : malade O Rh négatif

- 1^{ère} transfusion : il reçoit du sang *O Rh positif* et développe des anticorps anti-D.
- 2^{ème} transfusion : s'il reçoit encore du sang *O Rh positif*, les anticorps anti-D risquent d'agglutiner les hématies Rh positives (D) du donneur.

Maladie hémolytique du nouveau-né

Exemple : mère Rh négative

- 1^{ère} grossesse : elle a un enfant *Rh positif*. Pendant l'accouchement, certaines des hématies du fœtus (contenant des antigènes D) peuvent passer dans son sang, si bien qu'elle produira des anticorps anti-D.
- 2^{ème} grossesse : elle a un 2^{ème} enfant *Rh positif*. Les anticorps anti-D de la mère peuvent hémolyser les hématies du fœtus qui risque de présenter à la naissance une maladie hémolytique.

Aussi est-il conseillé de soumettre toutes les femmes enceintes à un groupage Rhésus.

II – EPREUVE DE COMPATIBILITE

a. Principe

L'épreuve de compatibilité est pratiquée pour prévenir les accidents de transfusion. Le but recherché est de déterminer si le sérum du receveur contient des anti-corps qui risqueraient d'agglutiner les hématies du donneur.

b. Matériel

- Sérum du malade.
- Hématies du malade.

- Hématies du donneur provenant du flacon pilote.
- Soluté physiologique.
- Albumine bovine à 20% en ED.
- Bain-marie ou incubateur à 37°C.
- Centrifugeur.
- Pipettes.
- Tubes à essai – petits et moyens.

c. Méthode habituelle

Choisir le sang du donneur à comparer au sang du malade compte tenu du groupe sanguin du malade.

1. Préparer une suspension (2 à 5%) d'hématies lavées du donneur :

- Inscrire le groupe sanguin et le nom du donneur sur un tube à essai de taille moyenne
- Verser dans le tube environ 4 ml de soluté physiologique
- Y ajouter 3 gouttes d'hématies du donneur
- Mélanger
- Laver 3 fois.

2. Prendre 4 petits tubes à essai et les marquer de 1 à 4 :

- Tube 1 – soluté physiologique contenant les hématies du donneur.
- Tube 2 – albumine pour épreuve de compatibilité.
- Tube 3 – soluté physiologique pour autocontrôle.
- Tube 4 – albumine pour autocontrôle.

3. A l'aide d'une pipette, verser dans les tubes :

Tubes 1 et 2

- 2 gouttes de sérum du malade.
- 2 gouttes de suspension à 2 à 5% des hématies lavées du donneur.

Tubes 3 et 4

- 2 gouttes de sérum du malade.
- 2 gouttes de suspension à 2 à 5% des hématies lavées du donneur.

4. Mélanger les hématies et le sérum en tapotant doucement le fond de chaque tube.

5. Mettre les tubes dans un bain-marie ou un incubateur à 37°C.

Attendre 1 heure et demie.

6. Ajouter 2 gouttes de solution d'albumine bovine à 20% :

- au tube 2

- au tube 4

Ne pas mélanger.

Laisser incuber encore 20 à 30 minutes.

7. Examiner au microscope le culot des hématies de chaque tube :

- utiliser une pipette Pasteur (au bout intact).
- aspirer soigneusement le culot en prenant garde de ne pas trop l'agiter
- l'étaler sur une lame propre
- l'examiner au microscope à l'objectif 10x pour voir si l'agglutination s'est produite

d. Résultats

Pas d'agglutination :

Les sangs sont compatibles et la transfusion est sans danger.

Forte agglutination ou hémolyse dans le tube 1, agglutination plus faible dans le tube 2

Il y a incompatibilité et la transfusion ne doit pas être faite. On a probablement utilisé un groupe ABO qui ne convient pas. Vérifier à nouveau les groupes sanguins du malade et du donneur.

Agglutination uniquement dans le tube 1

Il y a incompatibilité et la transfusion ne doit pas être faite. Le malade a ce que l'on appelle des anticorps complets. Il se peut que l'on trouve un sang compatible avec le sien en faisant appel à un autre donneur, mais il faut, dans toute la mesure possible, solliciter l'avis d'un service spécialisé.

Agglutination uniquement dans le tube 2

Il y a incompatibilité et la transfusion ne doit pas être faite. Le malade a probablement des anticorps, anti-D, par exemple, s'il est Rh négatif et que l'on a eu recours à du sang Rh positif.

Agglutination dans les quatre tubes

Le sérum du malade contient des auto-anticorps. Solliciter l'avis d'un service spécialisé, et, si possible, lui demander d'effectuer une épreuve de compatibilité.

Rouleaux

La présence de rouleaux importants peut être délicate à distinguer d'une véritable agglutination. La formation de rouleaux est souvent moins marquée dans les tubes d'albumine. Si l'on ajoute du soluté physiologique à la suspension d'hématies, sur la lame, les rouleaux pourront être suffisamment dispersés pour que la distinction soit possible.

e. Cas d'urgence

En cas d'urgence, il se peut que l'on ne puisse laisser incuber les tubes assez longtemps. Si l'on dispose de moins de 45 minutes, examiner le tube 1 :

- centrifuger le tube 1 pendant 1 minute, à vitesse réduite.
- examiner le culot de centrifugation au microscope.

S'il n'y a pas d'agglutination, transmettre le flacon à la personne chargée de la transfusion après avoir noté clairement sur l'étiquette « sang compatible après épreuve d'urgence ». Toujours achever l'épreuve de compatibilité par la méthode habituelle.

PREPARATION DES REACTIFS

ACIDE SULFOSALICYLIQUE – SOLUTION à 3%

Pour le dosage des protéines à l'aide de protéines étalons :

- diluer la solution aqueuse à 30% (réactif n°6) dans les proportions suivantes :

- acide sulfosalicylique à 30% 50 ml
- eau distillée 450 ml

ACIDE SULFOSALICYLIQUE – SOLUTION à 30% (SIGMA ref. S2130 en 100 GR)

Acide sulfosalicylique 30 g

Eau distillée q.s.p. 100 ml

BLEU DE CRÉSYL

Bleu de crésyl brillant 1,0 g

Citrate trisodique 0,4 g

Solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,85% 100 ml

Mélanger le colorant et le citrate dans la solution. Filtrer après dissolution.

CITRATE TRISODIQUE – SOLUTION à 3,8% (MERCK ref. 106448 en 500 GR)

Citrate trisodique, anhydre

(ou quantité équivalente du dihydrate ou de pentahydrate) 3,8 g

Eau distillée q.s.p. 100 ml

EAU TAMPONNÉE (MERCK ref. 109468 Bte de 100 tablettes)

Solution tampon pour colorants de May-Grünwald, Giemsa.

Phosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 3,76 g

Phosphate monopotassique (KH_2PO_4) anhydre 2,1 g

Eau distillée q.s.p. 1000 ml

Contrôler le pH à l'aide de papiers indicateurs, gamme étroite, ou avec un comparateur. Il doit être de 7,0 à 7,2.

MAY-GRÜNWARD - COLORANT

Poudre de May-Grünwald 5 g

Méthanol q.s.p. 1000 ml

Rincer un flacon propre au méthanol. Ajouter quelques billes de verre propres. Ajouter la poudre. Le colorant est meilleur si on le conserve pendant 1 à 2 semaines en le mélangeant de temps à autre. Lorsqu'on prépare un colorant de Romanowsky à l'alcool comme le May-Grünwald, il importe de ne laisser pénétrer aucune humidité, ni pendant la préparation ni lors du stockage.

MÉTABISULFITE DE SODIUM – SOLUTION ACQUEUSE à 2%
(SIGMA ref. S1516 en 100 GR)

Métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)..... 0,5 g

Eau distilléeq.s.p. 25 ml

Préparer avant chaque utilisation.

GIEMSA - COLORANT

Colorant de Giemsa en poudre 0,75 g

Methanol (CH_3OH) 65 ml

Glycérine 35 ml

Mélanger tous les ingrédients dans un flacon contenant des billes de verre et agiter.

Remuer trois fois par jour, pendant 4 jours consécutifs. Filtrer.

(Consulter la notice d'emploi du fabricant, pour le cas où il indiquerait une dose différente).

GRAM – SOLUTION IODÉE

Iode 1 g

Iodure de potassium (KI)..... 2 g

Eau distillée 300 ml

On peut procéder de 2 manières :

1. Broyer l'iode sec et l'iodure de potassium dans un mortier. Ajouter l'eau, en versant que quelques ml à la fois et broyer à fond à chaque adjonction, jusqu'à dissolution des produits. Verser le reste de l'eau distillée pour bien rincer et transvaser dans un flacon en verre brun.
2. Mesurer 100 ml d'eau distillée dans une éprouvette. Dissoudre d'abord l'iodure de potassium dans environ 30 ml d'eau. Ajouter l'iode et mélanger jusqu'à dissolution. Ajouter le reste de l'eau et bien mélanger. Conserver dans un flacon en verre brun.

LUGOL – SOLUTION (SIGMA ref. L6146 en 1 l.)

Iode 1 g

Iodure de potassium (KI)..... 2 g

Eau distilléeq.s.p. 1 000 ml

On peut procéder de 2 manières différentes :

1. Peser l'iode dans une capsule de porcelaine ou un verre de montre. Broyer l'iode sec et l'iodure de potassium dans un mortier. Ajouter l'eau, en ne versant que quelques ml à la fois, et broyer à fond à chaque adjonction, jusqu'à dissolution des produits. Verser dans un flacon en verre brun avec le reste de l'eau distillée.
2. Mesurer 100 ml d'eau distillée dans une éprouvette. Dissoudre d'abord l'iodure de potassium dans environ 30 ml d'eau. Ajouter l'iode et mélanger jusqu'à dissolution. Ajouter le reste de l'eau et bien mélanger. Conserver dans un flacon en verre brun.

SULFATE DE SODIUM (SIGMA ref. S 6264 en 500 GR)

ALBUMINE BOVINE (SIGMA ref. A 2153)

EDTA (SIGMA) ref. E9884 en 100 GR

ACIDE ACETIQUE (MERCK) ref. 10062 Flacon de 1 L

BLEU DE METHYLENE (MERCK) ref. 101287 1 flacon 100 ml

BUTANOL (MERCK) ref. 100988 Flacon de 1 L

SULFATE DE SODIUM (MERCK) ref. 106649 en 500 GR

ACETATE DE SODIUM (MERCK) ref. 106268 en 250 GR

ETHER

ALCOOL ACIDE pour coloration de Ziehl-Neelsen (n°8)

Acide chlorhydrique concentré..... 3 ml

Alcool à 95° 97 ml

Attention : l'acide chlorhydrique est extrêmement corrosif.

BLEU DE CRÉSYL – SOLUTION (n°11)

Bleu de crésyl brillant 1,0 g

Citrate trisodique..... 0,4 g

Solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,85% 100 ml

(réactif n°24)

Mélanger le colorant et le citrate dans la solution. Filtrer après dissolution.

BLEU DE MÉTHYLÈNE AQUEUX (n°12)

Bleu de méthylène..... 0,3 g

Eau distillée 100 ml

Filtrer après dissolution

ADRESSES DE FOURNISSEURS

SIGMA ALDRICH

L'Isle d'Abeau Chesnes

38297 St Quentin Fallavier

Tél. : 0800 21 14 08

MERCK UWR INTERNATIONAL SAS

201 rue Carnot

94126 Fontenay sous Bois

Tél. : 01 45 148 500

Annexe

DOSAGE DE L'ALBUMINE











Méthode à froid à l'acide sulfusolycylique (3%)

1. Préparation d'une solution à 1 GR/L d'albumine












- Prendre 1 GR d'albumine bovine
- Dissoudre 1 litre dans 1 L d'ED



2. Préparation de solutions mères de 0,1 GR/L à 1 GR/L

										
- Solution à 1 GR/L	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
en ml										
- ED en ml	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
concentration finale	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1 GR/L

3. Préparation de la gamme étalon

											
Concentration	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
											GR/L

Mettre dans un tube à hémolyse 1 ml de la solution mère correspondante et ajouter 3 ml d'acide sulfusolycylique. Boucher. Agiter. Faire un zéro en mettant uniquement 4 ml d'acide.

4. Dosage de l'albumine

Mettre dans un tube à hémolyse 1 ml d'urines filtrées ou centrifugées, ajouter 3 ml d'acide.

Ajouter et comparer l'opacité obtenue avec la gamme étalon.

Si le taux dépasse 1 GR/L, faire 1 dilution de l'urine avec de l'ED et refaire le dosage.



Annexe

NUMÉRATION GLOBULAIRE

La numération globulaire comprend trois étapes :

- la prise de sang
- la dilution
- la numération.

1. La prise de sang

Désinfecter le doigt à l'alcool. Essuyer, piquer rapidement assez profondément soit avec un vaccinostyle, soit avec une aiguille. Le sang doit s'écouler spontanément. Il est recommandé de ne pas faire d'expression, ce qui troublerait la composition du sang. Essuyer la première goutte, lorsque la deuxième goutte est suffisamment volumineuse, l'aspirer avec la pipette.

2. Dilution

2.1 Dilution des globules rouges

On utilise des pipettes de Potain (PGR) qui comportent plusieurs graduations :

Graduation 101, au-dessus de l'ampoule. C'est le volume total à atteindre pour le mélange sang et liquide de dilution ;

Graduation 1, 2, 3, 4, 5 au-dessous de l'ampoule qui permettent par aspiration du sang à ces niveaux des dilutions respectives de $1/100$ – $1/200$ – $1/300$ – $1/400$ – $1/500$.

2.2 Dilution des globules blancs

Pipette de Potain pour leucocytes (PGB)

Elle a le même aspect que celle utilisée pour la numération des hématies, mais le tube capillaire a une section plus importante et porte les graduations suivantes :

en dessous de l'ampoule 0,5 et 1 (correspondant respectivement à des dilutions de $1/20$ et $1/10$),

au-dessus de l'ampoule : 11.

3. Numération

3.1 Numération des globules rouges en ζ de Neubauer

3.1.1 *Description de la cellule*

Le réseau se compose d'un grand carré de 1 mm de côté, divisé lui-même en 400 petits carrés ayant par conséquent chacun $1/20$ de millimètre de côté.

Chaque petit carré a une surface de $1/400$ de millimètre carré, la profondeur de la cellule étant de $1/10$ de millimètre le volume du liquide contenu dans chaque carré est de :

$$1/400 \times 1/10 = 1/4\,000 \text{ mm}^3$$

Soit 10 le nombre d'éléments trouvés dans un petit carré, il y a donc 10 éléments dans $1/4\,000$ fois plus, soit :

$$10 \times 4\,000 = 40\,000$$

Si le sang a été dilué au $1/100$ il y aura 100 fois plus d'éléments, soit :

$$40\,000 \times 100 = 4\,000\,000$$

Pour faciliter les calculs, le réseau a été divisé en 16 grands carrés contenant chacun 16 des petits carrés.

3.1.2 Numération

En pratique on compte les hématies contenues dans 100 petits carrés, c'est-à-dire dans 6 grands carrés de 16 petits + 4 petits pris au hasard dans la cellule.

Pour compter les globules rouges contenus dans un petit carré, ne compter les hématies qui sont à cheval sur les lignes de séparation que sur 2 côtés, sur la ligne verticale de gauche, puis sur la ligne horizontale du haut par exemple.

Soit R, le nombre de globules rouges contenus dans 100 carrés ; dans 1 carré nous en avons 100 fois moins, soit $R/100$, comme le volume de chaque petit carré est de $1/4\,000$ de millimètre cube, il suffit de multiplier $R/100$ par 4 000 pour avoir le nombre de globules rouges dans 1 mm^3 . Suivant que la dilution est au $1/200$ ou $1/300$ on aura :

$$\frac{R \times 4\,000}{100} \times 200 = R \times 8\,000$$

3.1.3 Résultats

$$N : 4-5 \quad \overline{M} / \text{mm}^3$$

Concentrations faibles :

Malades atteints d'anémie due à une perte d'hématies ou à une hémolyse des hématies.

Concentrations élevées :

Malades déshydratés ou atteints de polyglobulie.

3.2 Numération des globules blancs en \mathcal{C} de Malassez

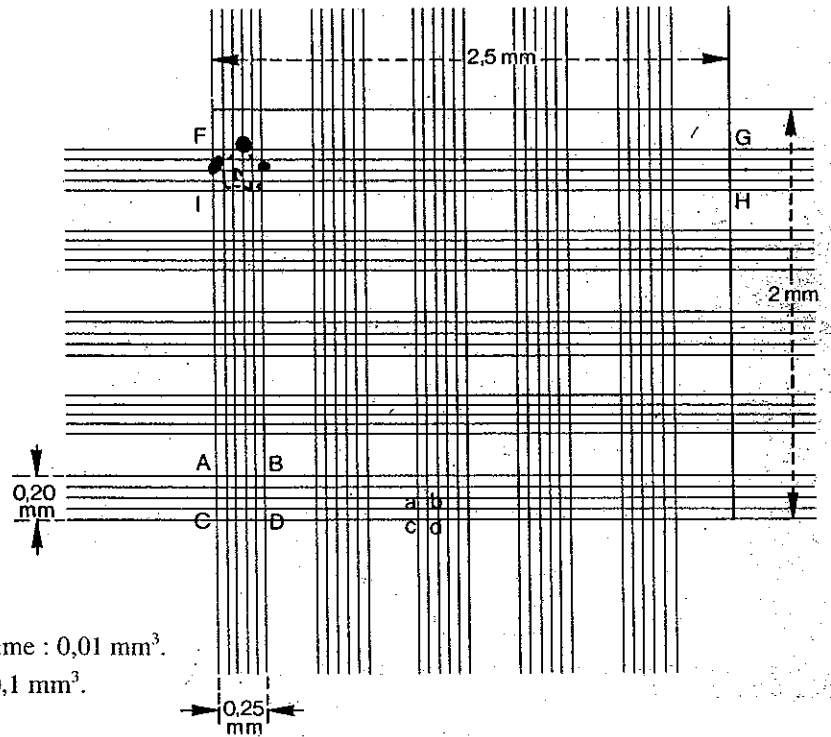
3.2.1 Description de la cellule

Le quadrillage est composé au total de 100 rectangles.

Certains sont divisés en 20 carrés, d'autres en bandes horizontales ou verticales, de telle sorte qu'il n'y a jamais deux rectangles semblables côte à côte.

La profondeur de la chambre est de 0,20 mm.

Chaque rectangle correspond à un volume de 0,01 mm³, et l'ensemble de la cellule à 1 mm³.



Hauteur de la chambre : 0,20 mm

Surface d'un rectangle ABCD : 0,05 mm². Volume : 0,01 mm³.

Surface d'une bande FGHI : 5 mm². Volume : 0,1 mm³.

3.2.2 Numération

Soit N le nombre de leucocytes comptés dans toute la cellule, à partir d'un sang dilué au 1/20.

$$\text{Leucocytes/mm}^3 = N \times 20$$

On peut également compter 1 bande soit 1/10 de mm³, 1 ou plusieurs carrés (1/100 mm³).

Chiffres élevés

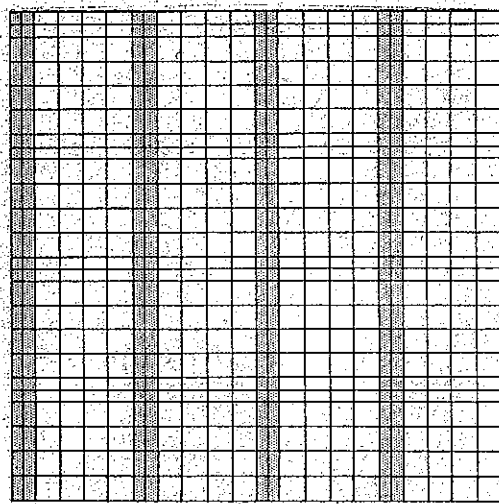
On appelle *leucocytose* un accroissement du nombre de leucocytes dans le sang circulant. Elle peut être due à certaines infections bactériennes pyogéniques. Dans la leucémie, on peut constater des concentrations leucocytaires allant de 50 000/mm³ à 400 000/mm³, voire davantage.

Chiffres faibles

On appelle leucopénie une diminution du nombre de leucocytes dans le sang circulant. Elle peut accompagner certaines infections comme la typhoïde ou le paludisme. Elle paraît également à la suite de l'absorption de certains médicaments.

Après usage, les cellules et les lamelles sont nettoyées à l'eau, puis à l'alcool et soigneusement essuyées avec un linge fin, non pelucheux.

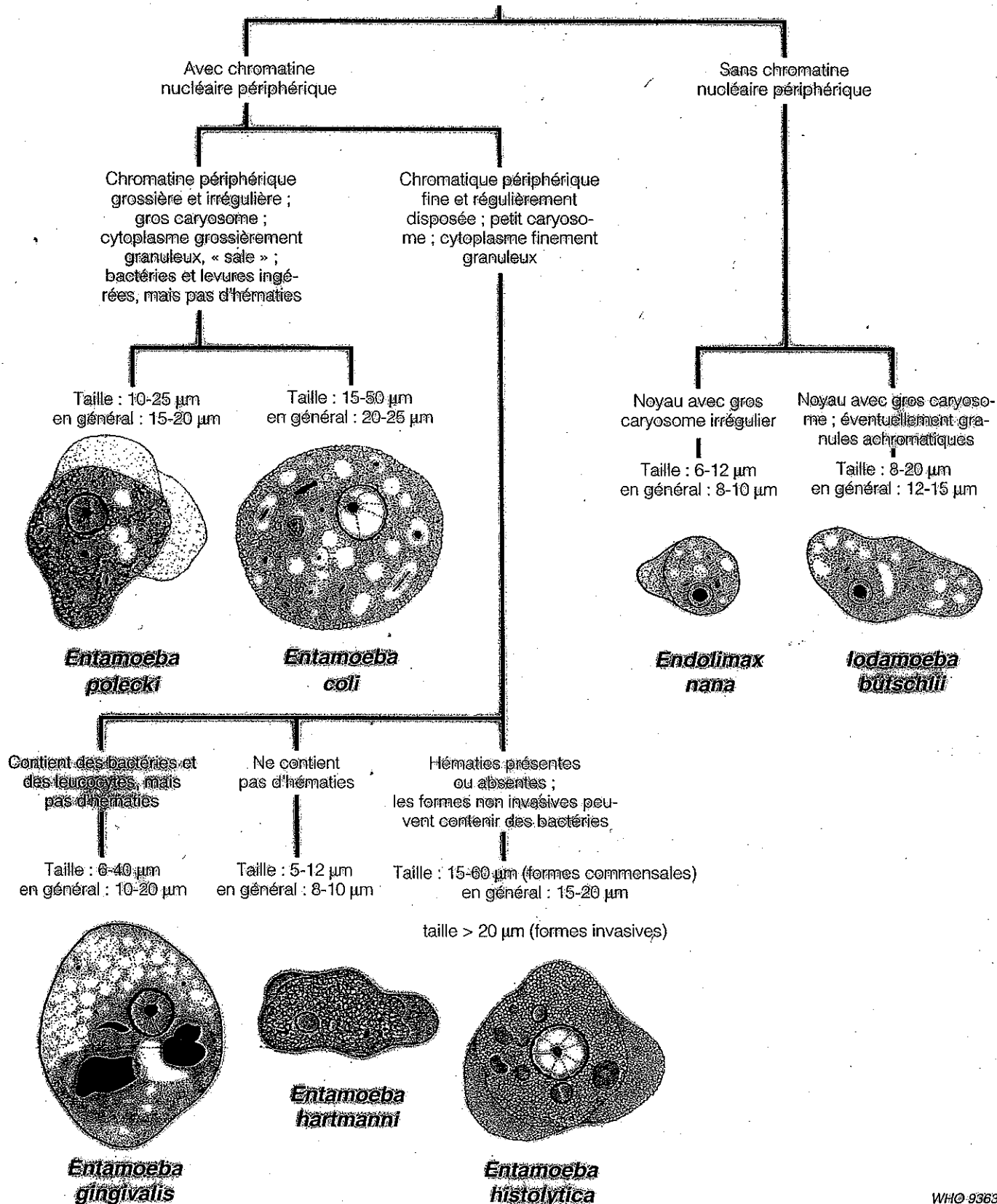
G DE NEUBAUEN





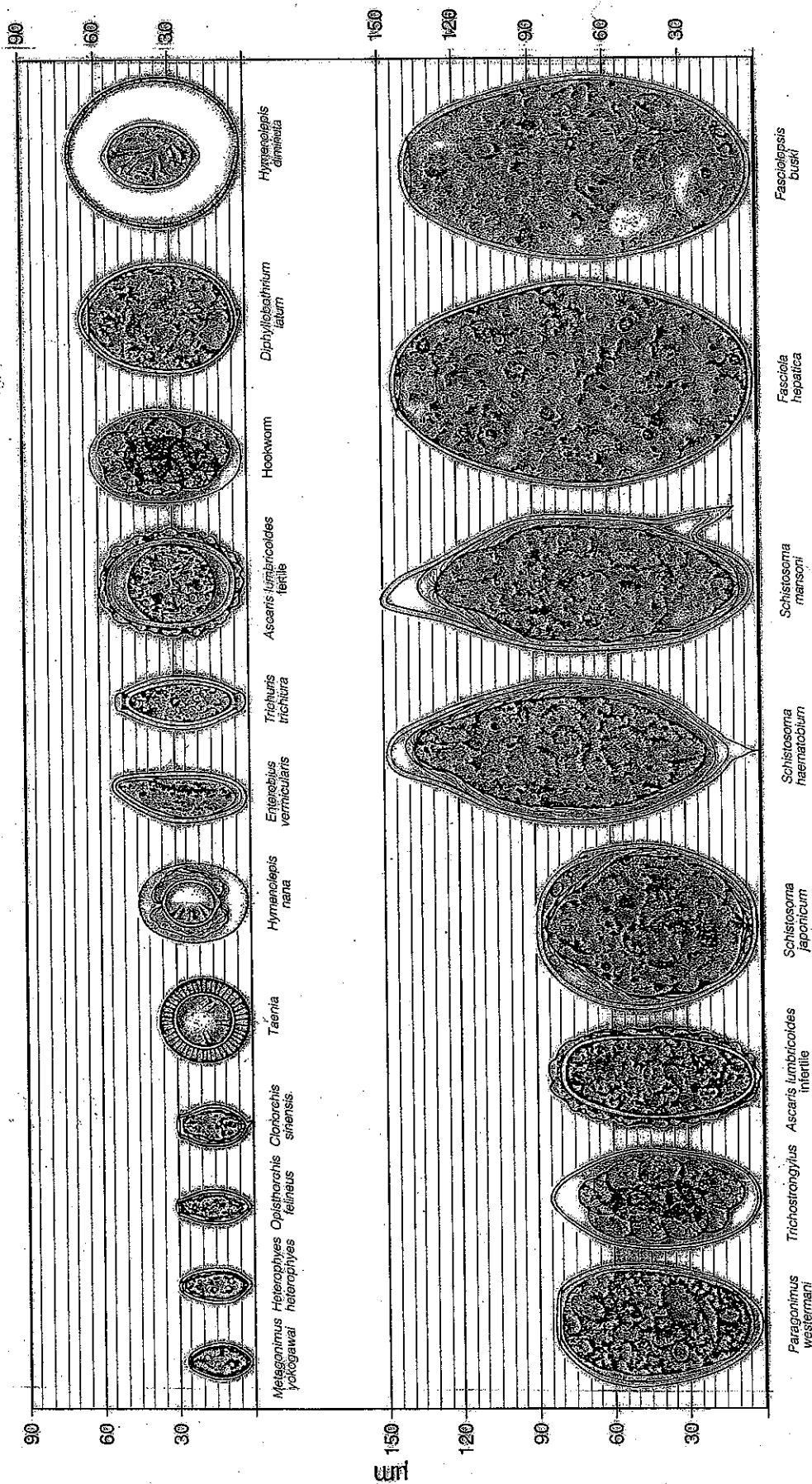
Clé de détermination des formes végétatives d'amibes dans les étalements colorés

Forme végétative à 1 noyau





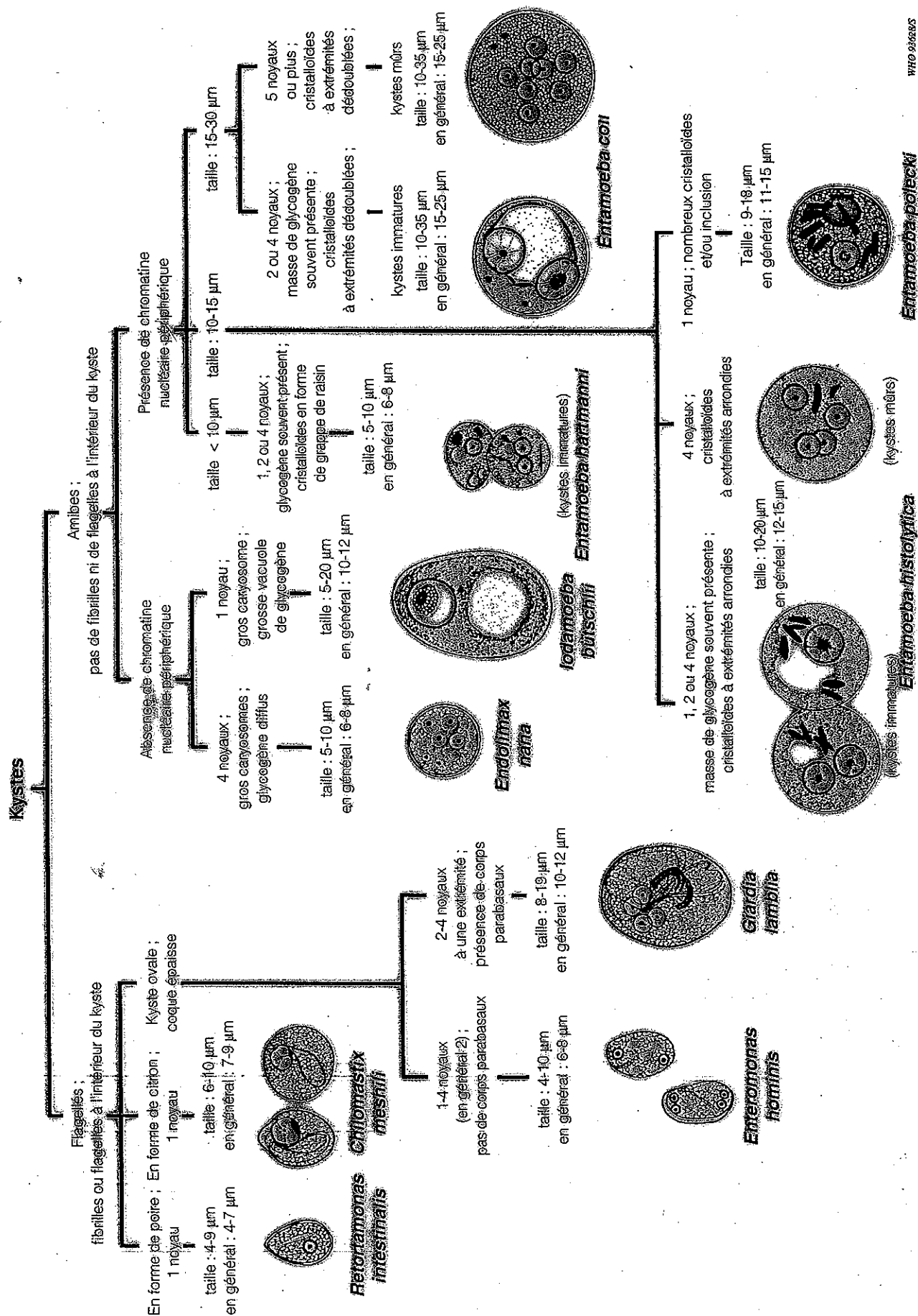
Dimensions relatives des œufs d'helminthes*



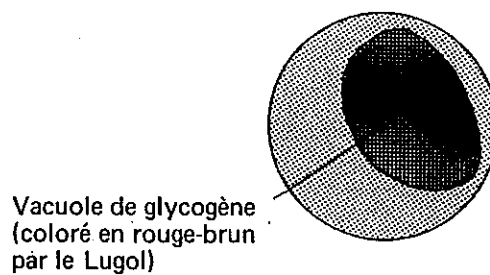
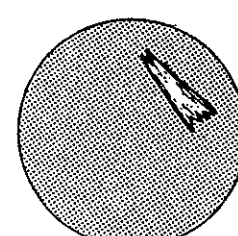
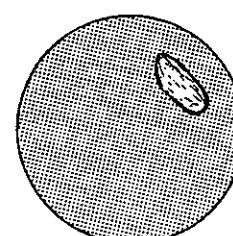
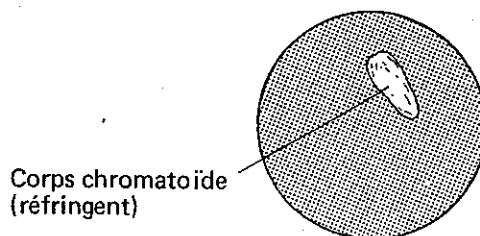
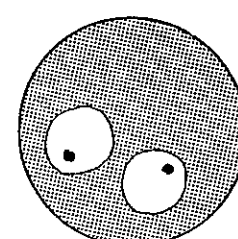
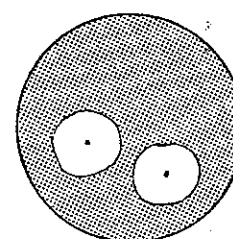
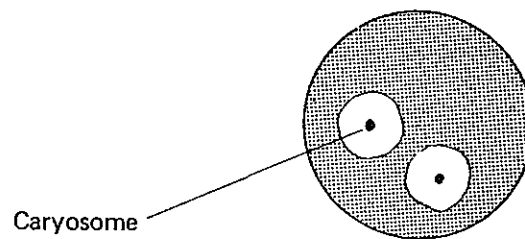
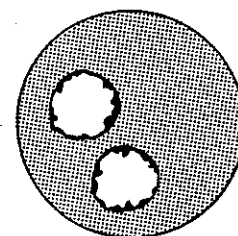
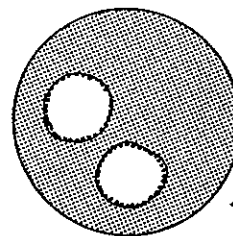
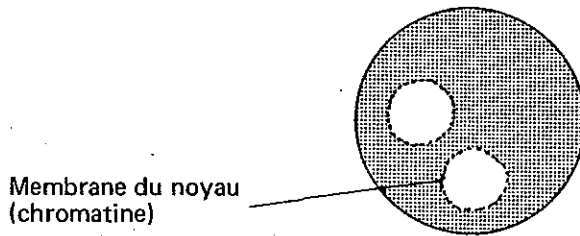
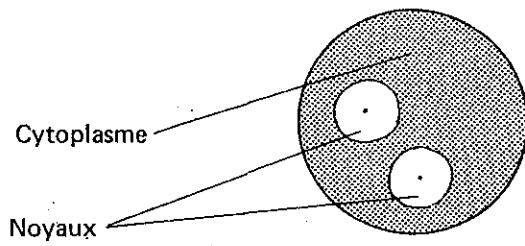
WHO 90580

* *Schistosoma mekongi* et *Schistosoma intercalatum* ne sont pas représentés ici. Les œufs de *S. mekongi* mesurent 51-78 µm sur 39-66 µm ; les œufs de *S. intercalatum* mesurent 140-240 µm de long.

Clé de détermination des kystes d'amibes et de flagellés dans les étalements colorés

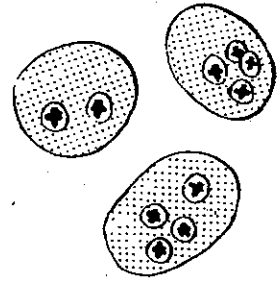


Quelques caractéristiques utiles pour reconnaître les kystes de protozoaires intestinaux



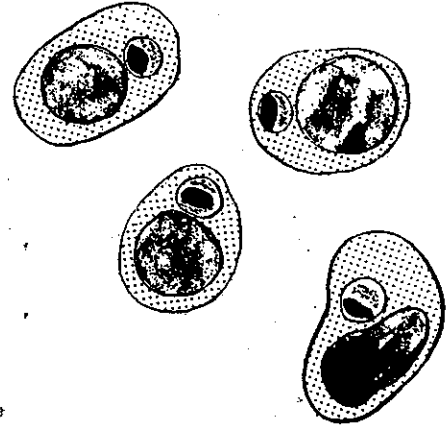
3. *Endolimax nana*

Taille	assez petit kyste de 8 à 10 μm
Forme	plus ou moins ovale
Noyaux	1 à 4
	— membrane: invisible
	— caryosome: gros, aspect irrégulier
Cytoplasme	clair, sans granulations, coloré en jaune foncé par le Lugol.



4. *Iodamoeba butschli*

Taille	petit kyste de 8 à 10 μm
Forme	variable (rond, ovale ou irrégulier)
Noyau	presque toujours un seul noyau
	— membrane: invisible
	— caryosome: très gros, ovale, plaqué contre un bouquet de granulations
Vacuole	très grosse vacuole de glycogène (colorée en brun-rouge par l'iode contenu dans le Lugol: d'où son nom d' <i>Iodamoeba</i>), occupe souvent la moitié du kyste.



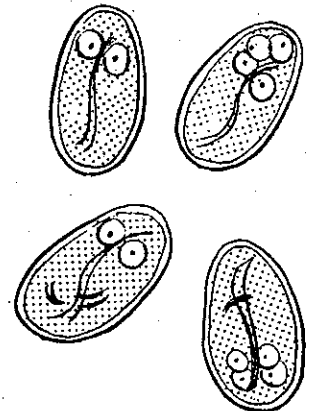
5. *Dientamoeba fragilis*

N'apparaît pas sous forme de kyste.

KYSTES DE FLAGELLÉS ET CILIÉS

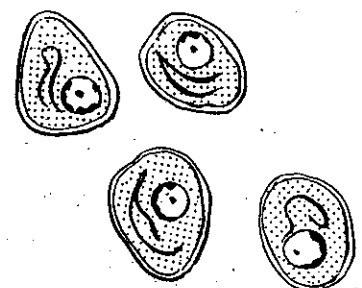
1. *Giardia lamblia*

Taille	8 à 12 μm
Forme	ovale, avec un pôle plus arrondi que l'autre
Coque	apparaît souvent comme une coque un peu épaisse à double paroi; en fait, la 2ème paroi est la membrane du cytoplasme
Noyaux	2 à 4 noyaux ovales:
	— membrane: très fine
	— caryosome: petit, central, peu coloré
Cytoplasme	clair, réfringent avant coloration, coloré en jaune-vert pâle ou bleuté par le Lugol
Fibrille	ligne réfringente, comme un cheveu, pliée en deux ou en forme de S, au milieu du kyste dans le sens de la longueur (faire varier la vis micrométrique).








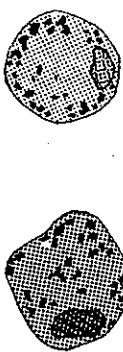
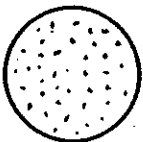
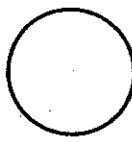


2. *Chilomastix mesnili*

Taille	petit kyste de 6 à 8 μm
Forme	rond, avec un pôle plus étroit (en forme de poire)
Noyau	1 seul gros noyau
	— membrane: bien visible, épaissie par endroits
	— caryosome: petit et central
Fibrille	repliée, comme un cheveu bouclé.









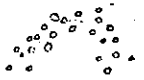
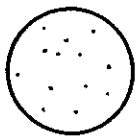
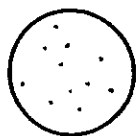


IDENTIFICATION DES 4 ESPÈCES DE PARASITES

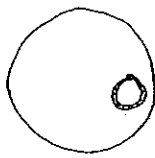
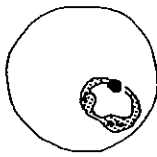
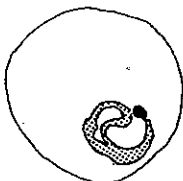
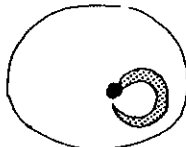
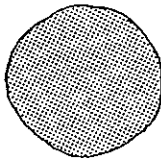
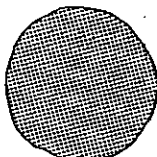
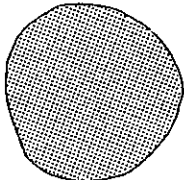
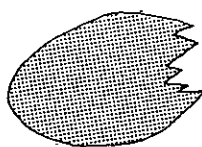
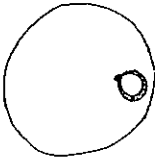
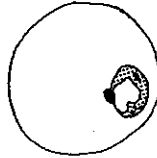
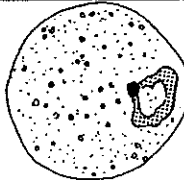
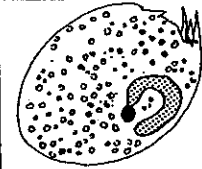
	<i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i>		<i>PLASMODIUM MALARIAE</i>	
TROPHOZOÏTE JEUNE	<p>(Stade fréquent)</p> <p><i>Cytoplasme</i>: petit anneau fin, bleu pâle, sans granulations</p> <p><i>Chromatine</i>: 1 ou 2 petits grains rouges</p>		<p>(Stade fréquent)</p> <p><i>Cytoplasme</i>: anneau bleu soutenu épais, avec quelques grains de pigment noirs</p> <p><i>Chromatine</i>: 1 grosse tache rouge</p>	
TROPHOZOÏTE ADULTE	<p>(Stade fréquent)</p> <p><i>Cytoplasme</i>: anneau bleu soutenu épais, ou aspect en virgule, ou en point d'exclamation</p> <p><i>Chromatine</i>: 1 ou 2 grains rouges, de taille moyenne</p>		<p>(Stade fréquent)</p> <p><i>Cytoplasme</i>: soit (1) tache compacte, arrondie, bleu foncé, avec nombreux grains de pigment noirs, soit (2) disposé en bande (étalements minces seulement)</p> <p><i>Chromatine</i>: tache ronde ou bande rouge</p>	 1  2
SCHIZONTE	<p>(Très rare)</p> <p>Pratiquement jamais trouvés dans les étalements de sang (sauf dans les cas très graves)</p> <p><i>Mérozoïtes</i>: 18 à 32</p> <p><i>Pigment</i>: brun foncé ou noir</p>		<p>(Stade assez fréquent)</p> <p><i>Mérozoïtes</i>: 8 à 10</p> <p>Chacun est une grosse tache rouge, entourée d'un peu de cytoplasme pâle. Ils peuvent avoir une disposition irrégulière (forme jeune) ou être disposés en couronne (forme adulte)</p>	
GAMÉTOCYTE	<p>(Stade assez fréquent)</p> <p><i>Forme</i>: banane, croissant ou faux</p> <p><i>Couleur</i>: bleu (mâle) ou bleu soutenu (femelle)</p> <p><i>Noyau</i>: rose-rouge</p> <p><i>Pigment</i>: quelques grains bleu-noir situés au centre du cytoplasme, ou dispersés</p>		<p>(Stade assez fréquent)</p> <p><i>Forme</i>: grand, ovale ou arrondi</p> <p><i>Couleur</i>: bleu soutenu (femelle) ou clair (mâle)</p> <p><i>Noyau</i>: 1 tache ronde de chromatine rouge contre un bord</p> <p><i>Pigment</i>: gros grains noirs dans le cytoplasme</p>	
HÉMATIE	<p>Taille normale</p> <p>Peuvent comporter des cellules crénelées contenant des trophozoïtes adultes. Contiennent souvent quelques grains rouges de taille et de forme irrégulières</p>		<p>Taille et forme normales</p> <p>En général, pas de grains rouges visibles</p>	
* DENSITÉ PARASITAIRE	Souvent très élevée		Faible	

* La densité parasitaire dans une région donnée dépend essentiellement du type de maladie (saisonniers ou endémique). Les adultes surtout acquièrent une certaine immunité dans les zones d'endémicité et la densité parasitaire y est souvent faible.

DU PALUDISME DANS LES ÉTALEMENTS DE SANG

	<i>PLASMODIUM VIVAX</i>		<i>PLASMODIUM OVALE</i>	
				L'identité de <i>Plasmodium ovale</i> doit être confirmée par l'examen d'un
TROPHOZOÏTE JEUNE	(Stade fréquent) <i>Cytoplasme</i> : anneau bleu assez gros, à contour irrégulier <i>Chromatine</i> : 1 grain rouge, assez gros		<i>Cytoplasme</i> : anneau régulier, bleu soutenu <i>Chromatine</i> : 1 grain rouge de taille moyenne	
TROPHOZOÏTE ADULTE	(Stade peu fréquent) <i>Cytoplasme</i> : large tache bleue, irrégulière (quelquefois divisée en 2, 3 ou 4); petits grains de pigment brun-orange <i>Chromatine</i> : 1 tache rouge		<i>Cytoplasme</i> : tache ronde compacte, très bleue avec quelques grains de pigment bruns <i>Chromatine</i> : 1 grosse tache rouge	
SCHIZONTE	(Stade assez fréquent) <i>Mérozoïtes</i> : 12 à 18 gros grains rouges compacts, posés sur le cytoplasme bleu pâle		<i>Mérozoïtes</i> : 8 à 14 grosses taches rouges en couronne, autour d'un amas central de grains de pigment bruns.	
GAMÉTOCYTE	(Stade fréquent) <i>Femelle</i> : ovale ou arrondi, bleu soutenu Noyau triangulaire rouge soutenu, souvent placé à une extrémité; nombreux grains de pigment orange dans le cytoplasme. <i>Mâle</i> : arrondi, bleu clair Noyau central rond, rouge clair; quelques grains de pigment orange dans le cytoplasme		<i>Forme</i> : grand, ovale ou arrondi, bleu soutenu <i>Noyau</i> : 1 tache ronde rouge <i>Pigment</i> : quelques grains bruns dans le cytoplasme <i>Différent</i> : — de <i>P. vivax</i> par son pigment brun — de <i>P. malariae</i> par la présence de granulations de Schüffner	
HÉMATIE	Grosses granulations de Schüffner, souvent colorées en rose, surtout autour des trophozoïtes adultes		Peut paraître ovale, avec extrémités irrégulières Grosses granulations de James, rouges, facilement visibles	
DENSITÉ PARASITAIRE	Moyenne		Moyenne	

COMPARAISON DES HÉMATIES PARASITÉES DANS UN ÉTALEMENT MINCE

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
TAILLE du trophozoïte jeune par rapport au diamètre d'une hématie (au même stade de développement)	 1/5 à 1/3 du diamètre	 1/4 à 2/3 du diamètre, mais souvent en forme de bande	 1/4 à 2/3 du diamètre	 1/4 à 2/3 du diamètre
ASPECT de l'hématie parasitée	 Reste inchangée	 Inchangée ou devenue plus petite et, parfois, plus colorée	 Agrandie et souvent de coloration pâle	 Agrandie, ovale, avec des bords déchirés, dentelés
GRANULATIONS dans l'hématie parasitée	 Souvent aucune*	 Aucune	 Souvent semis de fines granulations roses de Schüffner	 Toujours de grosses granula- tions de James
STADES rencontrés	Trophozoïtes ou gamétocytes, ou ces deux formes ensemble; on peut trouver de nom- breux trophozoïtes dans une seule hématie	Toutes les formes sont rencontrées sur une même lame	Toutes les formes sont rencontrées sur une même lame	Toutes les formes sont rencontrées sur une même lame

A NOTER:

Aspect des monocytes (dans les cas de paludisme de longue durée):

- le cytoplasme contient souvent des masses brunes ou vert noirâtre (corps sidérophiles).

Aspect des parasites après une injection de médicament antipaludique:

- les parasites se colorent mal. Ils sont altérés et ont un aspect flou.

* Dans certaines hématies parasitées par des trophozoïtes adultes de *P. falciparum* on peut trouver des granulations roses assez grosses dites "taches de Maurer".

Utilité des examens directs

Les examens directs sont des plus utiles pour donner une idée du type d'organismes en cause, ou, dans certains cas, pour poser le diagnostic de la maladie (tuberculose, lèpre, blennorragie, etc.).

Aussi est-il essentiel que le laboratoire donne une description détaillée des germes observés ainsi que de tout autre élément visible (leucocytes, hématies, cellules épithéliales, etc.). (Voir page 242).

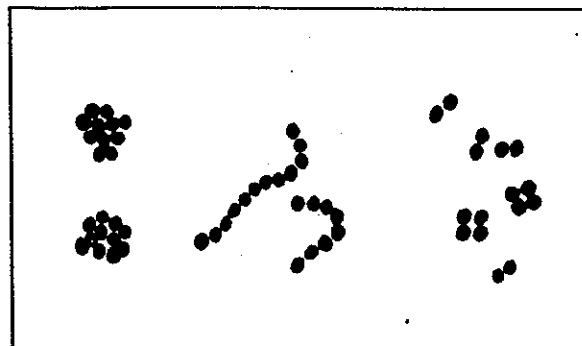
DIFFÉRENTS GROUPES DE BACTÉRIES OBSERVÉES AU MICROSCOPE (EXAMEN DIRECT – COLORATION DE GRAM)

1. Coques Gram positifs – formes rondes

Ils peuvent être disposés:

- en grappes (staphylocoques)
- en chaînettes (streptocoques)
- par 2
- par 4, etc.

Trouvés dans le pus, les urines, le sang et autres prélèvements.



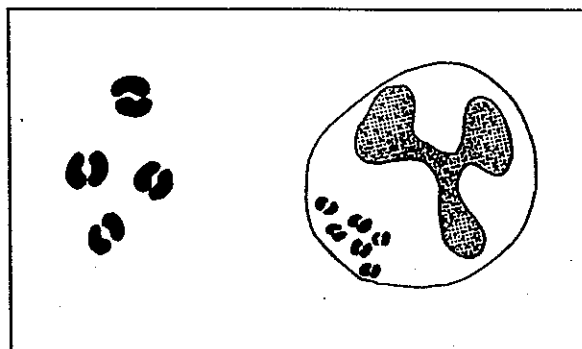
2. Diplocoques Gram négatifs – formes rondes groupées par 2

Peuvent être:

- en forme de grain de café
- en amas dans le cytoplasme d'un leucocyte.

Trouvés dans le pus urétral (gonocoques) et dans le LCR (méningocoques).

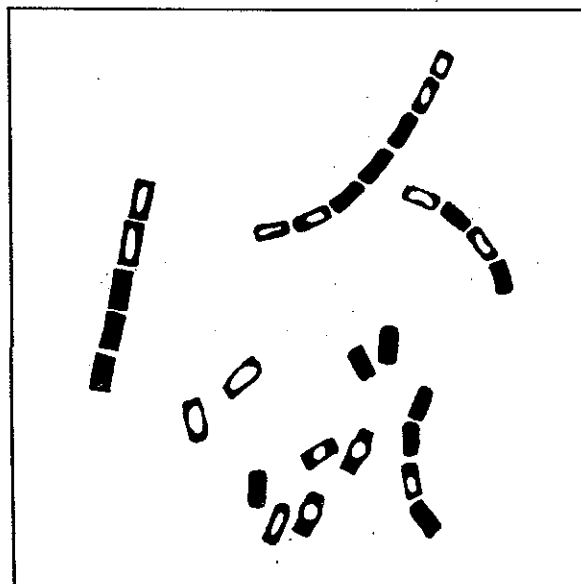
Il existe d'autres diplocoques Gram négatifs qui ne sont généralement pas pathogènes. Ils sont visibles dans les frottis de gorge ou les échantillons de crachat.



3. Bacilles Gram positifs – formes en bâtonnet

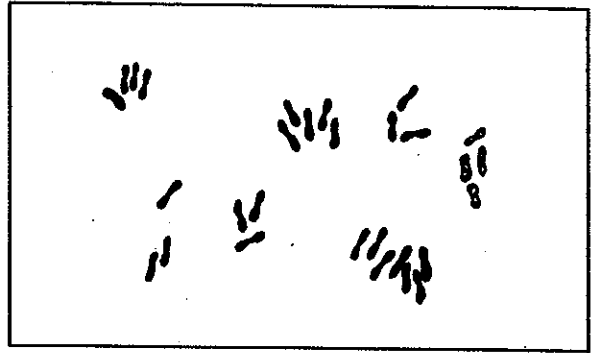
(a) *Bacilles Gram positifs – avec spores*

Longs et épais; extrémités carrées (anthrax) ou rondes (tétanos, saprophytes). Le spore se présente comme un gros granule incolore à l'intérieur du bacille, car il n'est pas coloré par le Gram.



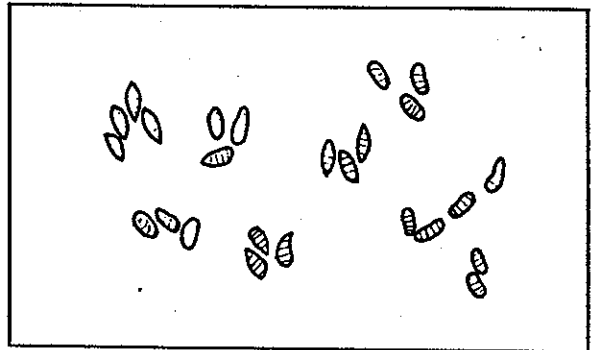
(b) *Bacilles Gram positifs – sans spores*

Généralement petits et de forme variable; leurs extrémités peuvent être gonflées; ils sont disposés en rangs ou prennent la forme de lettres. Trouvés dans les prélèvements de gorge, dans le sang, sur la peau, etc. (diphthérie, diphtéroïdes, *Listeria*).



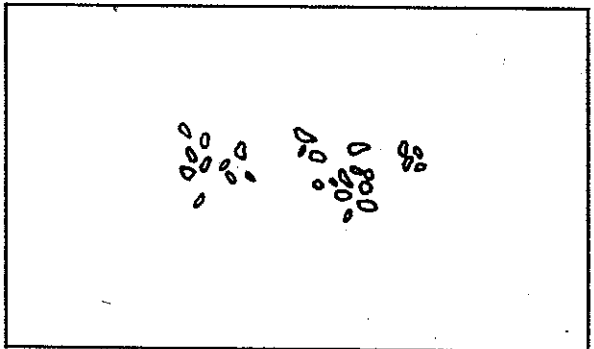
4. *Bacilles Gram négatifs*

De forme variable, bouts arrondis ou pointus. Peuvent être gros et droits (bacilles coliformes), en forme de virgule (vibrions) ou petits et gros (*Proteus*). Ce groupe inclut de nombreuses espèces.



5. *Coccobacilles Gram négatifs*

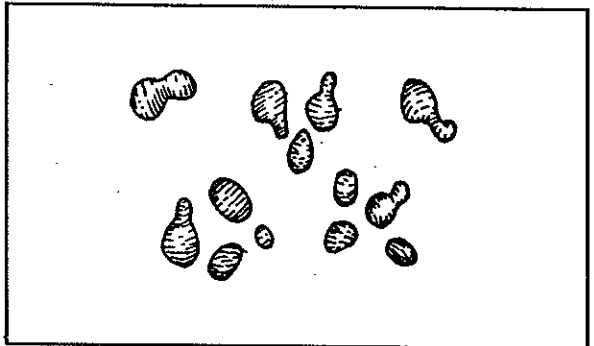
De forme variable, pas aussi ronds que les coques, mais pas aussi longs que les bacilles normaux (peste, *Haemophilus*). Se retrouvent dans toute une gamme de prélèvements.



6. *Levures et actinomycètes*

(a) *Levures*

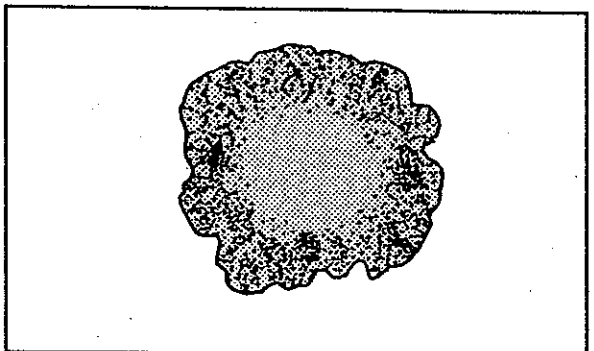
De taille variable, mais plus grosses que les bactéries. Peuvent porter des bourgeons. Généralement trouvées dans les prélèvements souillés; sont parfois pathogènes (exsudats génitaux, crachats, etc.).



(b) *Actinomycètes*

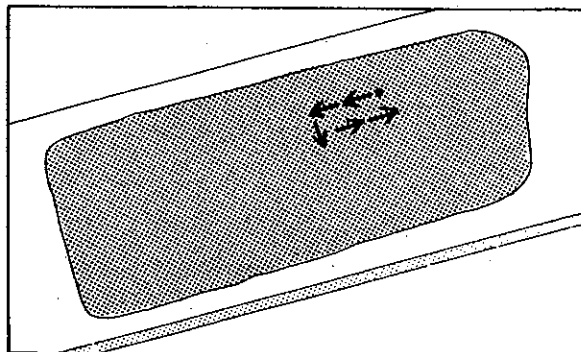
Gros grains, parfois visibles à l'œil nu (couleur blanc à jaune).

Centre Gram négatif, périphérie Gram positive. Trouvés dans le pus de la peau, les crachats, etc.



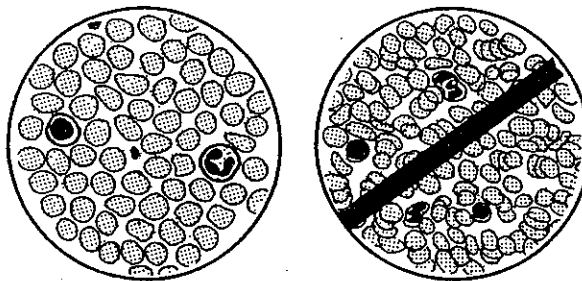
Numération des leucocytes

1. Commencer à compter au bord de l'étalement juste à l'endroit où les hématies commencent à recouvrir les leucocytes.
2. Examiner une bande de la lame, en progressant d'un champ à un autre (voir schéma). Noter le type de leucocyte observé dans chaque champ.
3. Compter au total 100 leucocytes.



S'assurer que l'étalement n'est pas trop épais.

Si l'étalement devient épais (hématies très serrées), cesser la progression vers l'avant et recommencer à compter dans l'autre sens.

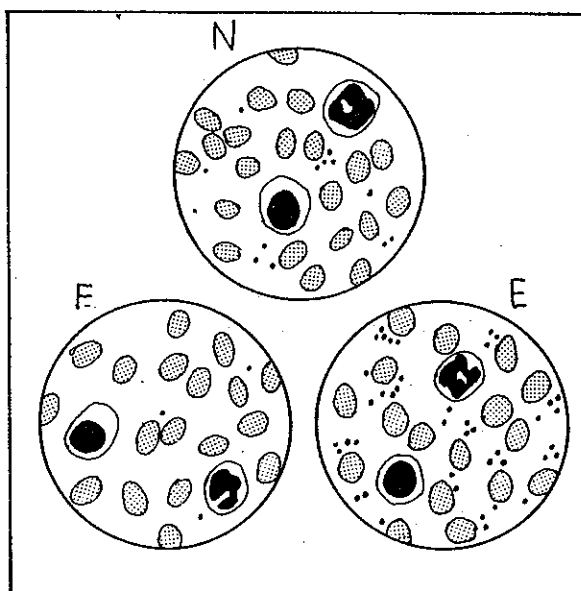


Recherche d'éventuelles anomalies des hématies ou des plaquettes

Examiner les hématies (voir page 407) et noter la présence éventuelle de parasites du paludisme (voir pages 200-201).

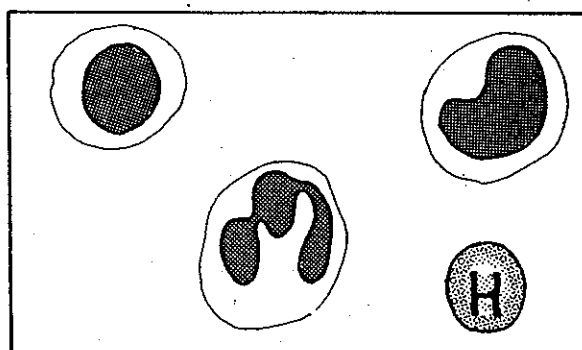
Examiner le nombre de plaquettes en précisant "normal" (N), "faible" (F) ou "élevé" (E).

Si l'étalement est fait à partir de sang capillaire, les plaquettes (voir page 351) se présenteront probablement en amas.

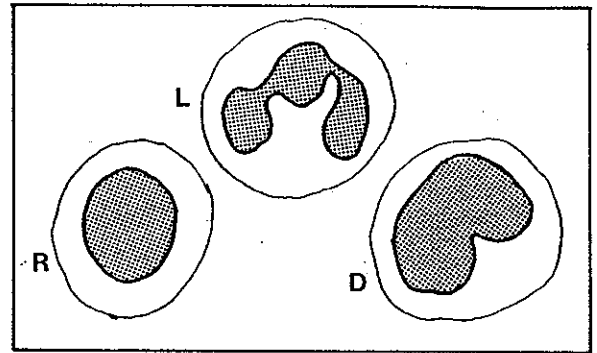


EXAMEN DES LEUCOCYTES

1. Noter la forme des leucocytes et leur taille par rapport à celle d'une hématie (H).



2. Noter la forme du noyau et sa taille par rapport à l'ensemble du leucocyte:
 — rond R, lobé L, dentelé D.



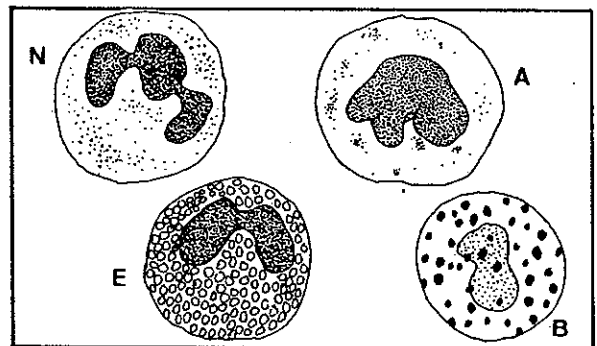
3. Noter l'aspect du cytoplasme.

Couleur:

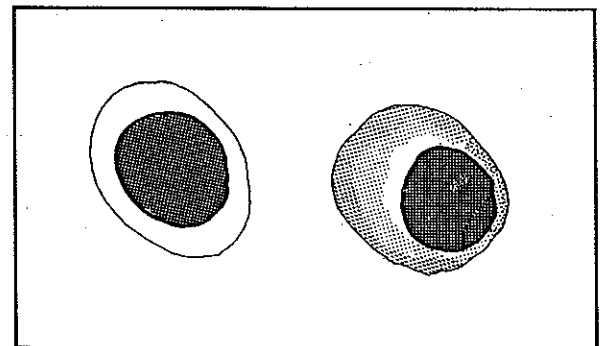
- incolore
- rose
- bleu pâle
- bleu foncé.

Granulations dans le cytoplasme:

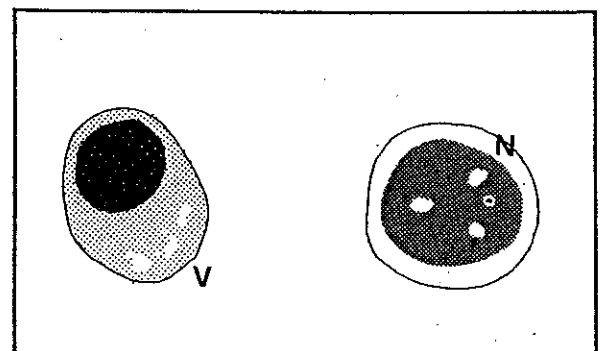
- granulations neutrophiles (N) — petites, mauves
- granulations éosinophiles (E) — grosses, orange à rouge
- granulations azurophiles (A) — assez grosses, rouge-violet vif
- granulations basophiles (B) — très grosses, violet-noir.



4. Noter l'aspect de la chromatine du noyau (coloration dense ou faible), ainsi que la position du noyau dans le leucocyte (centrale ou excentrique).



5. Les vacuoles et les nucléoles sont des plages rondes ou ovales, plus ou moins nettes, qui ne se colorent pas ou très peu.
 — vacuoles (V) dans le cytoplasme
 — nucléoles (N) dans le noyau.



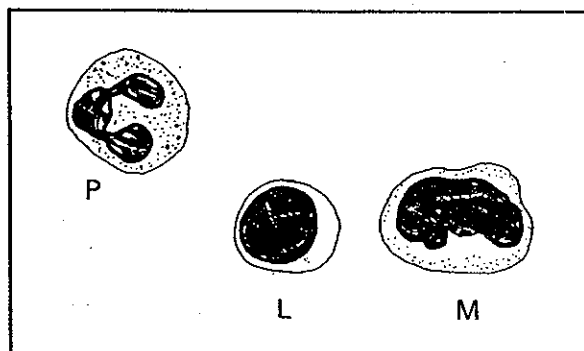
Formes normales

Les polynucléaires neutrophiles (P) ont:

- un noyau polylobé
- des granulations cytoplasmiques (d'où leur nom courant de "granulocytes").

Les lymphocytes (L) et les monocytes (M) ont:

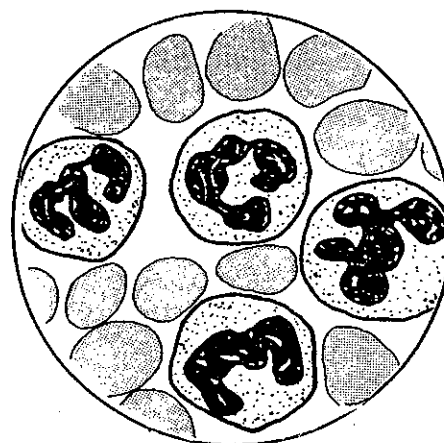
- un noyau compact
- avec ou sans granulations cytoplasmiques.



1a. POLYNUCLÉAIRE NEUTROPHILE

<i>Taille</i>	12 à 15 μm
<i>Forme</i>	arrondie, bien délimitée
<i>Cytoplasme</i>	abondant, rosé
<i>Granulations</i>	mauves et très petites, nombreuses mais distinctes
<i>Noyau</i>	divisé en plusieurs lobes (2 à 5) reliés par des filaments de chromatine. Celle-ci apparaît comme une masse uniforme violet foncé.

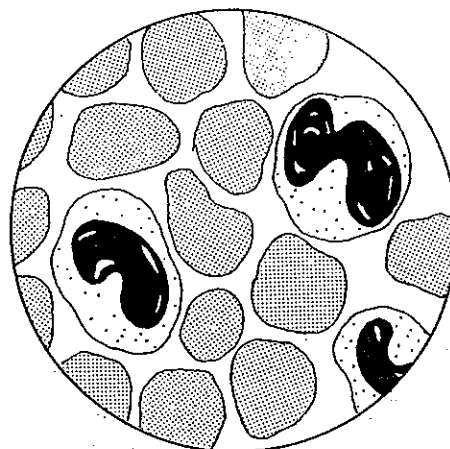
(Plus le polynucléaire est vieux, plus son noyau a de lobes.)



1b. POLYNUCLÉAIRE NEUTROPHILE UNILOBE (IMMATURE)

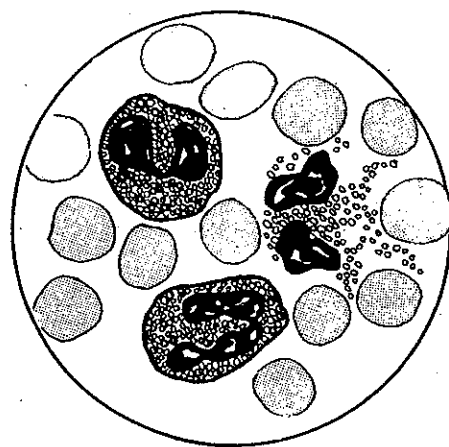
Leucocyte semblable au précédent, mais le noyau n'est pas encore divisé en lobes; souvent en forme de S.

Si l'on observe ce type de leucocyte, en indiquer la fraction de nombre, comme pour les autres types.



2. POLYNUCLÉAIRE ÉOSINOPHILE

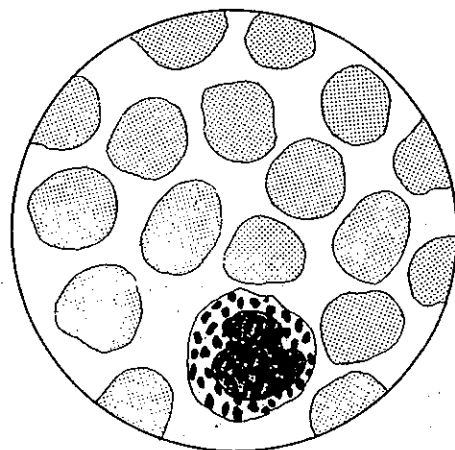
Taille 12 à 15 μm
Granulations grosses, rondes, orangé vif, nombreuses et serrées
Noyau généralement 2 lobes
Paraît parfois abîmé, avec des granulations dispersées.



3. POLYNUCLÉAIRE BASOPHILE

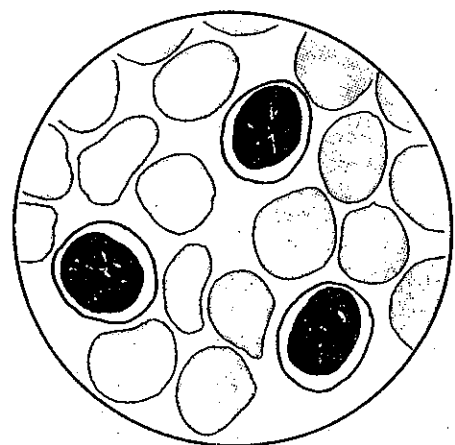
C'est le type le plus rare de granulocytes.

Taille 11 à 13 μm
Forme ronde
Granulations très grosses, rondes, violet-noir, nombreuses mais moins serrées que les granulations des éosinophiles
Noyau difficile à voir, parce que recouvert de granulations
Vacuoles parfois petites vacuoles incolores dans le cytoplasme.



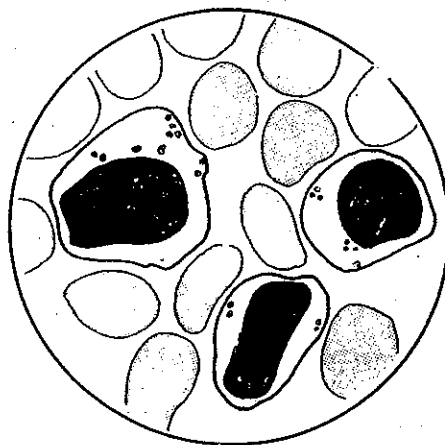
4. PETIT LYMPHOCYTE

Taille 7 à 10 μm
Forme ronde
Noyau volumineux, occupant presque toute la cellule — chromatine dense, violet foncé
Cytoplasme très peu visible; bleu, sans granulations.



5. GRAND LYMPHOCYTE

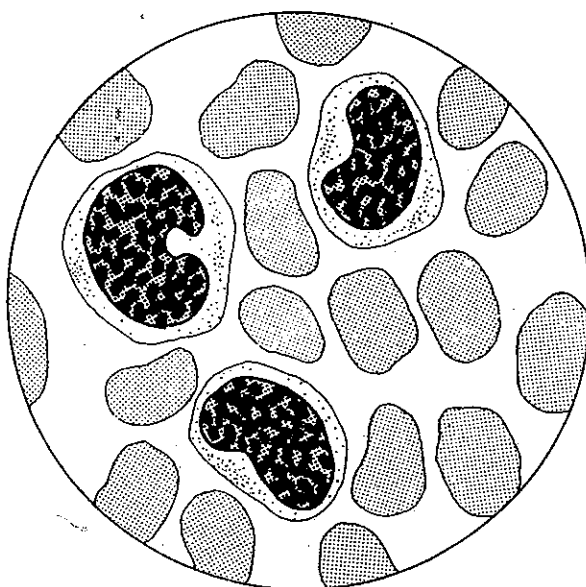
Taille	10 à 15 μm
Forme	ronde ou irrégulière
Noyau	ovale ou rond, peut être placé contre un bord
Cytoplasme	abondant, bleu pâle
Granulations	rare, assez grosses et azurophiles (rouge foncé).



6. MONOCYTE

Taille	15 à 25 μm ; c'est le plus grand des leucocytes
Forme	irrégulière
Noyau	d'aspect variable, souvent en forme de haricot, chromatine en filaments, mauve pâle
Granulations	très fines, en poussière, généralement rougeâtres
Vacuoles	généralement quelques vacuoles dans le cytoplasme.

Chez les malades atteints de *paludisme*, le cytoplasme contient souvent des masses brun noirâtre. Il s'agit de pigment paludéen.

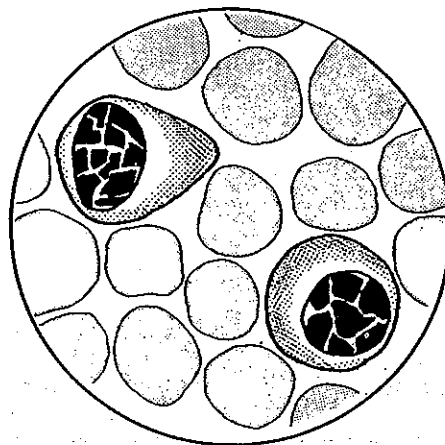


Formes rares ou anormales

7. PLASMOCYTE

Les plasmocytes produisent des anticorps que l'on peut observer sur les lames de sang de sujets atteints de rougeole, de tuberculose, d'autres infections virales et bactériennes, ainsi que dans les myélomes multiples.

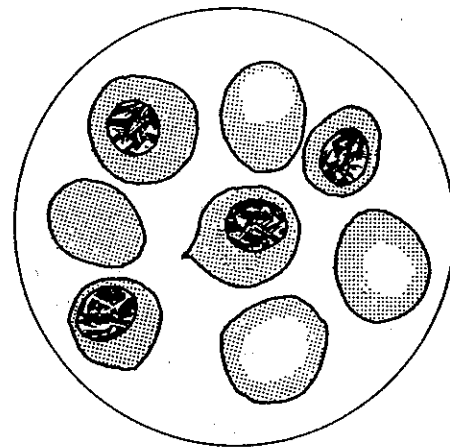
Taille	12 à 15 μm
Forme	ronde ou ovale
Noyau	rond, excentrique, chromatine formant des blocs, souvent disposés en rayons de roue
Cytoplasme	bleu sombre, avec un halo clair autour du noyau
Vacuoles	peu visibles, nombreuses et très petites.



8. HÉMATIE NUCLÉÉE (NORMOBLASTE)

Hématie nucléée immature trouvée normalement dans la moelle des os. Elle passe dans le sang dans certaines maladies (anémies).

<i>Taille</i>	8 à 9 μm
<i>Forme</i>	ronde ou irrégulière
<i>Cytoplasme</i>	rose ou gris-bleu, sans granulations
<i>Noyau</i>	rond, souvent excentrique, chromatine noire, dense, souvent disposée en amas.

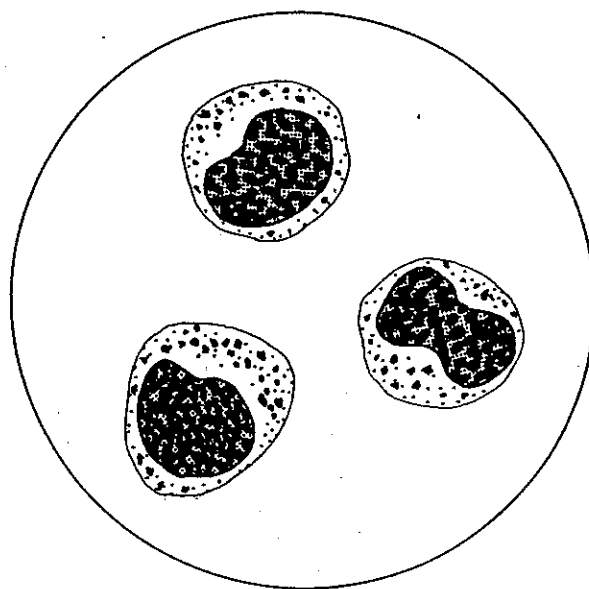


9. GRANULOCYTE IMMATURE

Les granulocytes immatures de la moelle passent dans le sang dans certaines maladies (infections bactériennes graves). Leurs caractéristiques sont les suivantes:

<i>Taille</i>	12 à 18 μm
<i>Noyau</i>	unique, non lobé, chromatine de couleur variable, allant du rouge sombre au violet
<i>Cytoplasme</i>	rose ou bleu pâle
<i>Granulations</i>	nombreuses, grosses, de couleur mauve ou rouge foncé.

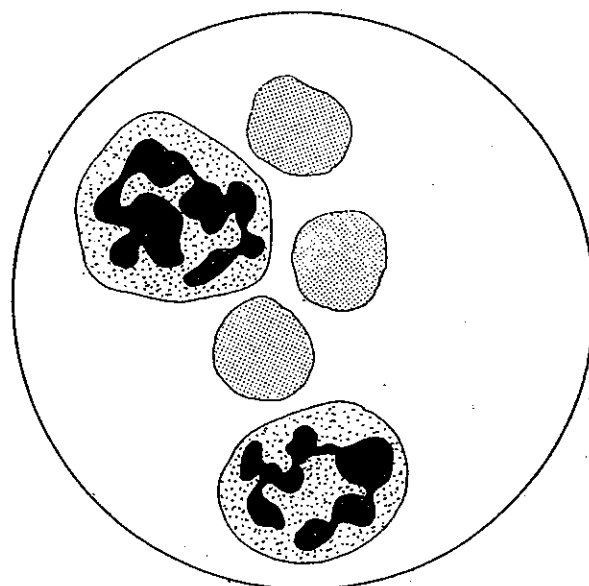
On peut observer des granulations toxiques dont les granules sont très gros et de couleur sombre. Il existe aussi des cellules immatures sans granulations et avec nucléoles: voir No. 12 ci-après.



10. POLYNUCLÉAIRE NEUTROPHILE HYPER-SEGMENTÉ

C'est un "vieux" polynucléaire neutrophile dont l'aspect est identique à celui d'un globule normal mais dont le noyau, souvent gros, a de 5 à 10 lobes.

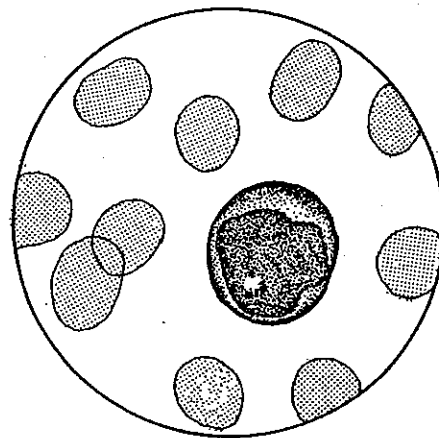
On peut l'observer chez des malades atteints d'anémie macrocytique provoquée par une carence en acide folique ou en vitamine B-12.



11. LYMPHOCYTE ATYPIQUE

Observé dans les infections virales, notamment les mononucléoses infectieuses, la coqueluche et la rougeole, ainsi que dans la tuberculose et les accès graves de paludisme.

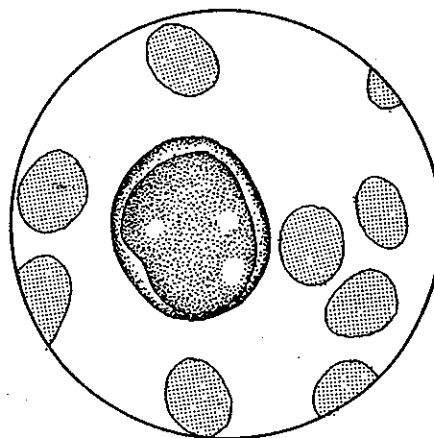
<i>Taille</i>	très variable, 12 à 18 μm
<i>Forme</i>	généralement irrégulière
<i>Noyau</i>	rond ou irrégulier, souvent excentrique; peut comporter des nucléoles
<i>Cytoplasme</i>	généralement bleu plus foncé que celui du grand lymphocyte; bords du globule plus sombres.



12. CELLULE BLASTIQUE, "BLASTE"

Elément le plus jeune (le plus immature) de la lignée des leucocytes. Observé dans les lames de sang de malades atteints de leucémie.

<i>Taille</i>	grandes cellules, 15 à 25 μm
<i>Noyau</i>	volumineux, rond, mauve pâle, contenant toujours 1 à 5 nucléoles
<i>Cytoplasme</i>	bleu foncé, avec une zone plus pâle autour du noyau.

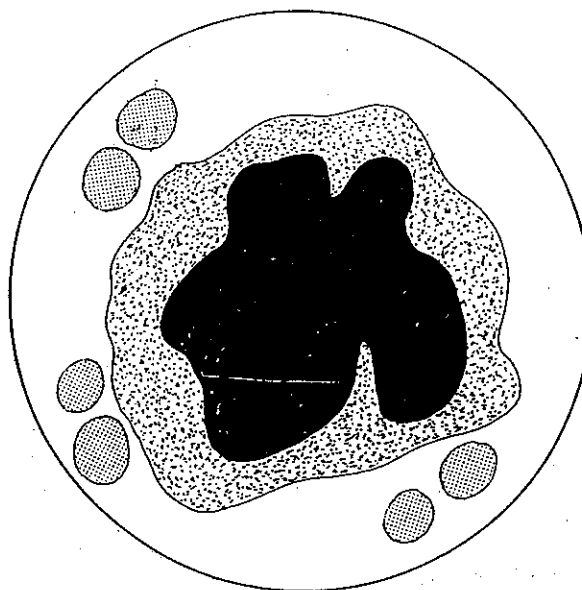


13. MÉGACARYOCYTE

C'est la cellule-mère des plaquettes trouvée dans la moelle osseuse.

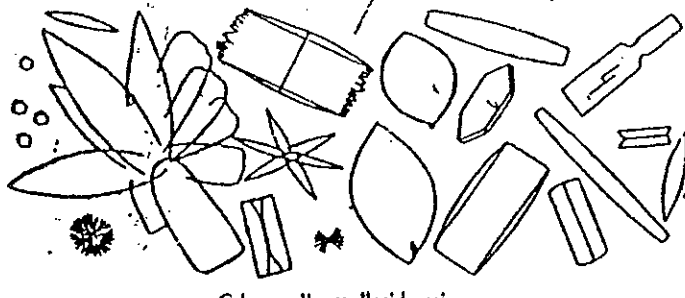
<i>Taille</i>	énorme, 60 à 200 μm
<i>Noyau</i>	très irrégulier, polylobé mais massif
<i>Cytoplasme</i>	rempli de fines granulations plutôt azurophiles et de plaquettes
	Membrane peu distincte.

(Très rarement trouvé dans le sang.)

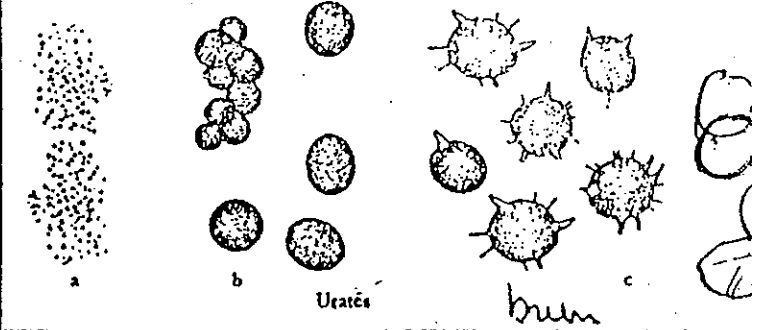


Sédiments urinaires (fin)

Sédiments chimiques amorphes et cristallins

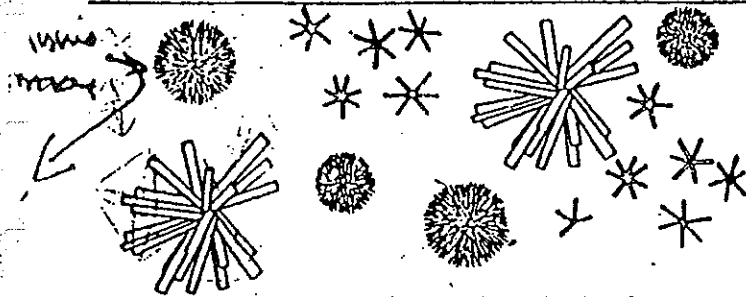


Cristaux divers d'acide urique

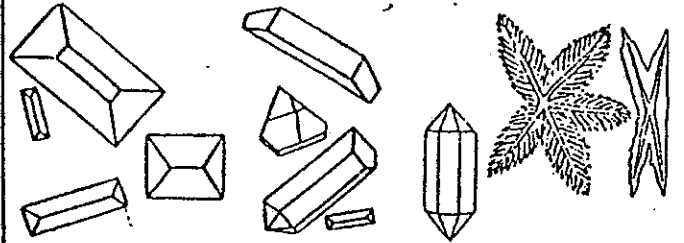


Urates

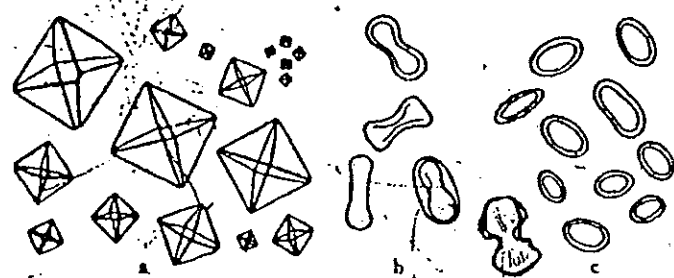
brun



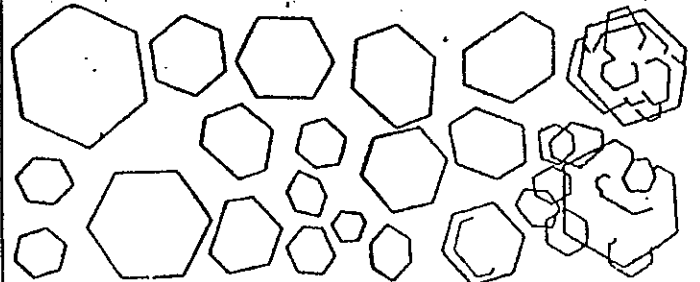
Cristaux de phosphate de calcium, en forme d'étoile et de rosette



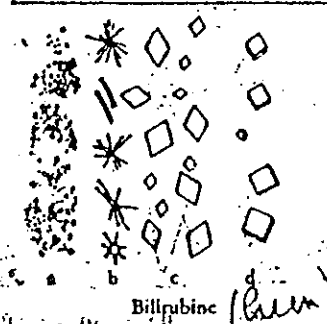
Cristaux de phosphate ammoniaco-magnésien



Cristaux d'oxalate de calcium



Cristaux de cystine hexagonaux

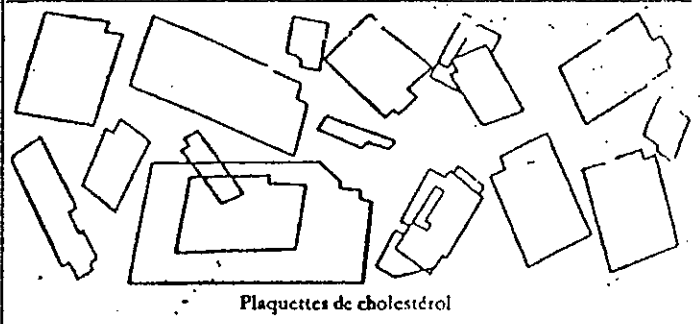


Bilirubine

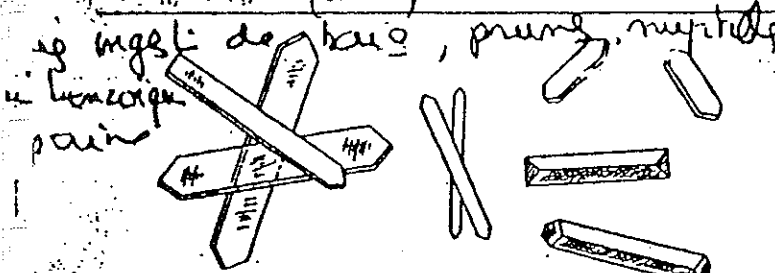
(brun)



Bleu d'indigo



Plaquettes de cholestérol



Acide hippurique

Urates

- a Urates de calcium, magnésium et potassium, le plus souvent amorphes
- b Urate d'ammonium (sphériques)
- c Urate de sodium (en forme de pommes épineuses)

Oxalate de calcium

- a Octaèdres, souvent aplatis, forme la plus fréquente
- b En forme de sablier
- c En forme d'anneaux

Bilirubine

rouge brun

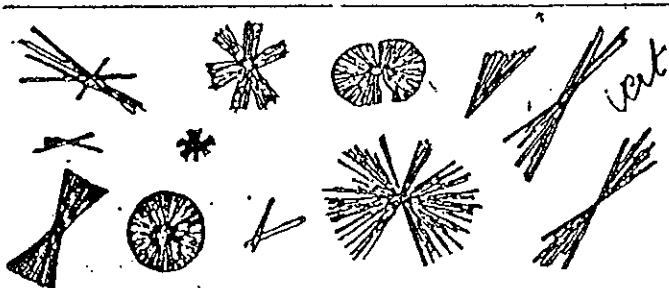
- a Amorphes
- b Amas d'aiguilles
- c Rhombiques
- d Cubes

Bleu d'indigo

bleu

- a Amorphes
- b Faisceaux d'aiguilles
- c Plaquettes à angles droits (cristallisées dans le chloroforme)

Urine



Cristaux de quelques sulfamides