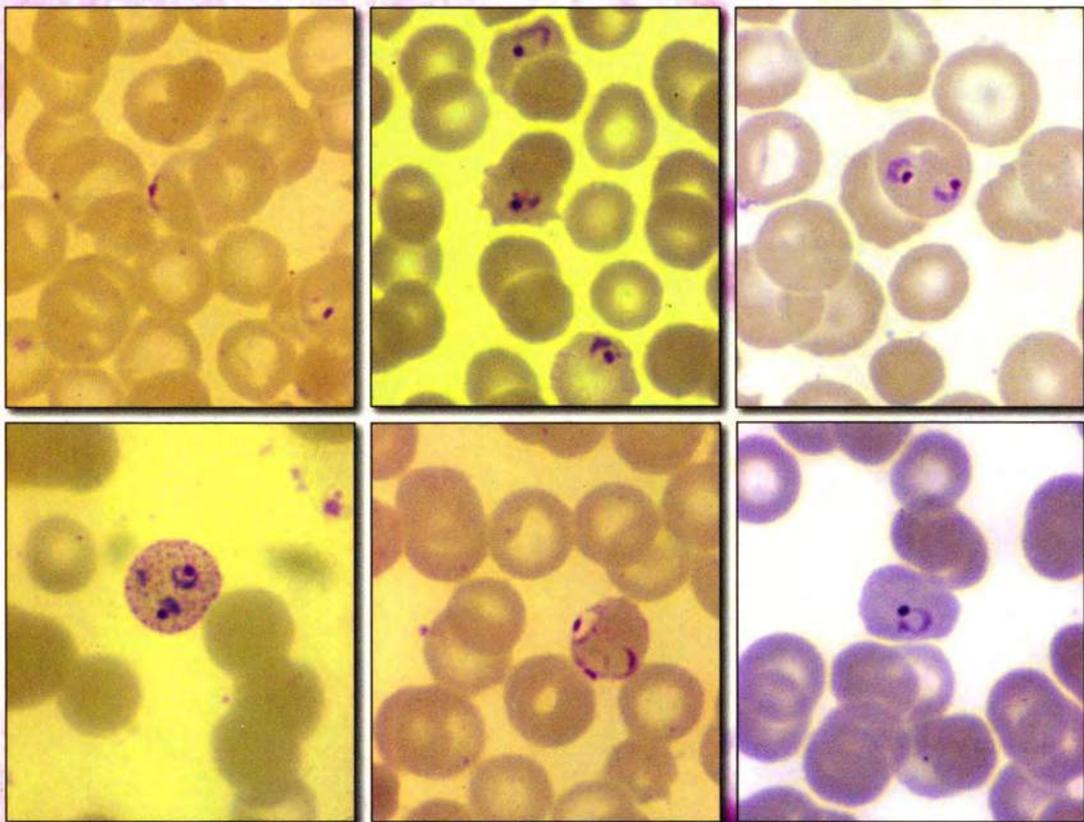


WC 750
2011BE-1

Planches pour le diagnostic **MICROSCOPIQUE** **DU PALUDISME**



Organisation
mondiale de la Santé

bc HQ

WC 750
2011 BE-1

Catalogage à la source : Bibliothèque de l'OMS

Planches pour le diagnostic microscopique du paludisme.

1.Paludisme - diagnostic. 2.Plasmodium - cytologie. 3.Techniques et procédés laboratoire.
4.Microscopie. 5.Manuel. 6.Matériel enseignement. I.Organisation mondiale de la Santé.

ISBN 978 92 4 254786 3

(Classification NLM: WC 750)

Book aids for malaria microscopy.



La présente édition des *Planches pour le diagnostic microscopique du paludisme* a été compilée par John Storey, sur la base des observations faites par un grand nombre de professionnels et d'experts qui ont utilisé la seconde édition des *Planches pour le diagnostic des infections palustres (OMS 2000)*, conçue et produite par le professeur Lawrence Ash et le professeur Thomas Orihel. Le processus de révision des Planches a été coordonné par le Bureau régional OMS du Pacifique occidental, pour le Programme mondial de lutte antipaludique de l'OMS.

Remerciements

L'Organisation mondiale de la Santé remercie l'Agence australienne pour le développement international (AusAid) et l'Agence internationale de développement des États-Unis d'Amérique (USAID), qui ont apporté leur soutien financier à la préparation de ces *Planches*.

L'OMS tient également à remercier les nombreux experts pour leurs suggestions et leurs contributions techniques à la nouvelle édition : Dr Kalpana Baruah, Dr Andrew Beljaev, Dr David Bell, Dr Andrea Bosman, Dr Jane Carter, Mme Leigh Dini, Mme Cecil Hugo, Dr Derryck Karlowski, Dr Ken Lilley, Dr Earl Long, Dr Peter Obare, Dr Kevin Palmer, Mme Arlene Leah Santiago et Dr Raman Velayudhan.

© Organisation mondiale de la Santé 2010

Tous droits réservés.

Il est possible de se procurer les publications de l'Organisation mondiale de la Santé auprès des Editions de l'OMS, Organisation mondiale de la Santé, 20 avenue Appia, 1211 Genève 27 (Suisse) (téléphone : +41 22 791 3264; télécopie : +41 22 791 4857; adresse électronique : bookorders@who.int). Les demandes relatives à la permission de reproduire ou de traduire des publications de l'OMS – que ce soit pour la vente ou une diffusion non commerciale – doivent être envoyées aux Editions de l'OMS, à l'adresse ci dessus (télécopie : +41 22 791 4806; adresse électronique : permissions@who.int).

Les appellations employées dans la présente publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'Organisation mondiale de la Santé aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les lignes en pointillé sur les cartes représentent des frontières approximatives dont le tracé peut ne pas avoir fait l'objet d'un accord définitif.

La mention de firmes et de produits commerciaux ne signifie pas que ces firmes et ces produits commerciaux sont agréés ou recommandés par l'Organisation mondiale de la Santé, de préférence à d'autres de nature analogue. Sauf erreur ou omission, une majuscule initiale indique qu'il s'agit d'un nom déposé.

L'Organisation mondiale de la Santé a pris toutes les précautions raisonnables pour vérifier les informations contenues dans la présente publication. Toutefois, le matériel publié est diffusé sans aucune garantie, expresse ou implicite. La responsabilité de l'interprétation et de l'utilisation dudit matériel incombe au lecteur. En aucun cas, l'Organisation mondiale de la Santé ne saurait être tenue responsable des préjudices subis du fait de son utilisation.

Design et mise en page par WHO Graphics
Imprimé en Inde

Bibliographie

Diagnosis of malaria.

Lopez-Antuñano FJ, Schmunis G, eds.
Washington, DC, Organisation panaméricaine de la Santé, 1990
(Publications scientifiques de l'OPS, n°512).

Malaria Microscopy Quality Assurance Manual

World Health Organization, Regional Office for the Western Pacific, 2009

Malaria: principles and practice of malariology. Vol. 1. Vol. 2.

Wernsdorfer WH, McGregor I, eds.
Edinburgh, Churchill Livingstone, 1988.

Manuel de sécurité biologique en laboratoire, 3e éd.

Genève, Organisation mondiale de la Santé, 2004

1ère page de couverture, fond : Goutte épaisse colorée au Giemsa d'une infection mixte à *Plasmodium falciparum* - *Plasmodium vivax* montrant des trophozoïtes et un gamétocyte de *P. falciparum* et un grand trophozoïte de *P. vivax*.

1ère page de couverture : Photomicrographies de frottis sanguins colorés au Giemsa montrant, en partant du haut à gauche et en allant dans le sens des aiguilles d'une montre : des trophozoïtes jeunes (formes en anneau) de 1) *Plasmodium falciparum*, 2) *Plasmodium vivax*, 3) *Plasmodium malariae*, 4) *Plasmodium ovale*, et des trophozoïtes à maturité de 5) *Plasmodium falciparum* et 6) *Plasmodium vivax*.

4ème de couverture, fond : Goutte épaisse colorée au Giemsa d'une infection mixte à *Plasmodium falciparum* - *Plasmodium vivax* montrant un gamétocyte et de nombreux trophozoïtes annulaires de *P. falciparum* et un trophozoïte de *P. vivax*.



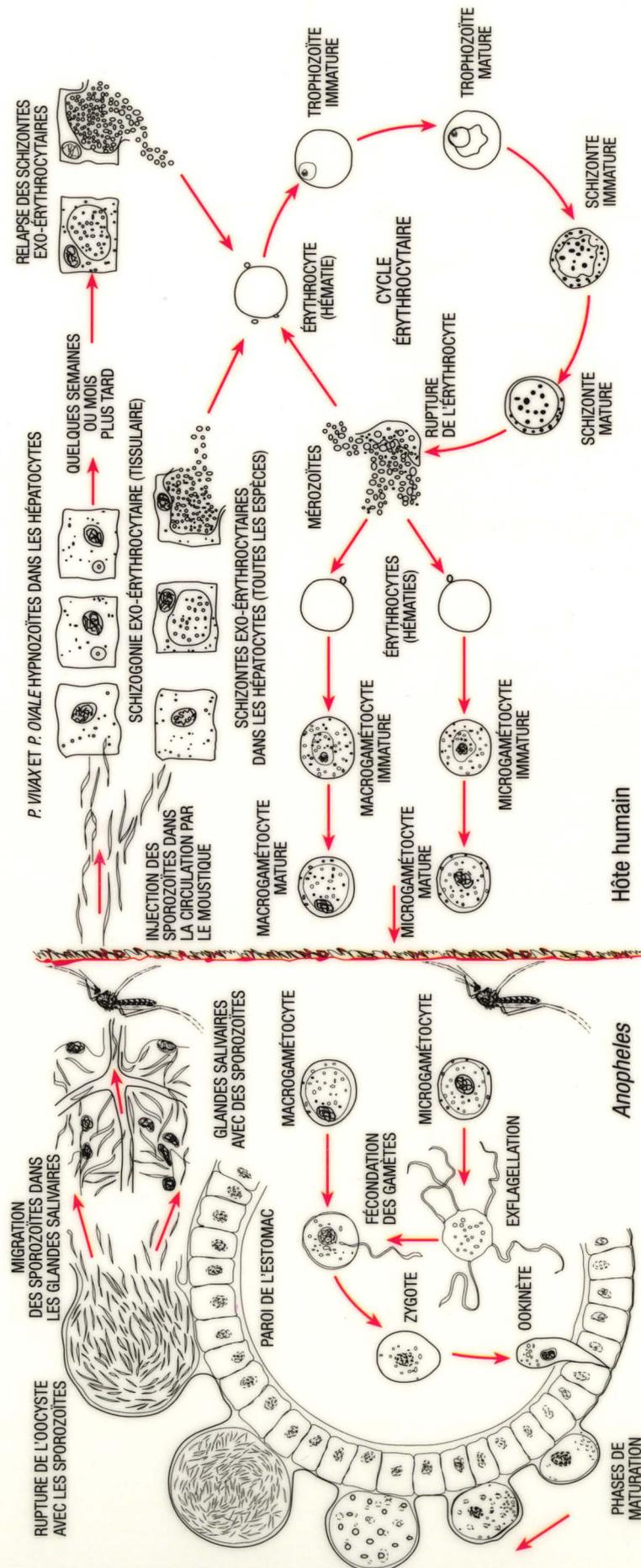
00082961

Liste des planches

Liste des planches	Planche 1a
Cycle parasitaire	Planche 1b
Introduction ; paludisme et cycle parasitaire	Planche 2a
Éléments cellulaires, anomalies courantes et contaminations dans le frottis	Planche 2b
Sécurité biologique ; préparation d'une goutte épaisse et d'un frottis	Planche 3a
<i>Plasmodium falciparum</i> dans le frottis	Planche 3b
Entretien des lames ; erreurs fréquentes dans la préparation des frottis sanguins	Planche 4a
<i>Plasmodium falciparum</i> dans la goutte épaisse	Planche 4b
Utilisation et entretien du microscope	Planche 5a
<i>Plasmodium vivax</i> dans le frottis	Planche 5b
Solutions tampons pour la coloration des parasites du paludisme ; effet du pH sur la coloration	Planche 6a
<i>Plasmodium vivax</i> dans la goutte épaisse	Planche 6b
Coloration de Giemsa des parasites du paludisme dans les frottis sanguins	Planche 7a
<i>Plasmodium malariae</i> dans le frottis	Planche 7b
<i>Plasmodium falciparum</i> ; <i>Plasmodium vivax</i>	Planche 8a
<i>Plasmodium malariae</i> dans la goutte épaisse	Planche 8b
Examen en routine des frottis sanguins ; deux méthodes de numération des parasites dans la goutte épaisse	Planche 9a
<i>Plasmodium ovale</i> dans le frottis	Planche 9b
Coloration rapide des frottis sanguins pour la recherche des parasites du paludisme	Planche 10a
<i>Plasmodium ovale</i> dans la goutte épaisse	Planche 10b
<i>Plasmodium malariae</i> ; <i>Plasmodium ovale</i>	Planche 11a
Infections mixtes ; anticoagulants et difficultés du diagnostic des infections mixtes	Planche 11b
Tableau récapitulatif des stades parasitaires et des espèces	Planche 12a
Autres éléments dans les frottis de sang périphérique ; babésiose	Planche 12b

Cycle parasitaire

Figure reproduite, avec quelques modifications mineures, à partir de *Bruce-Chwatt's essential malariaology*, Londres, Arnold, 1993, avec la permission de H.M. Gilles et D.A. Warrell, éditeurs.



Introduction

Cet ensemble de *Planches pour l'examen du paludisme au microscope* a été conçu pour guider les personnes travaillant dans les laboratoires et sur le terrain qui sont chargées de diagnostiquer le paludisme au microscope par la technique de Giemsa. Ces planches seront également utiles aux enseignants et aux étudiants qui travaillent sur ce sujet.

On trouvera sur ces planches des photographies, prises au microscope, de frottis sanguins, avec un texte explicatif sur les quatre espèces parasitaires de l'homme et sur leur morphologie. Elles fournissent des descriptions complètes de chaque espèce, ainsi que des instructions sur la préparation des frottis sanguins, l'utilisation des solutions tampons, les méthodes de coloration de Giemsa, l'examen des lames et les procédures pour estimer la densité des parasites.

Elles décrivent aussi les autres éléments figurés du sang, ainsi qu'un certain nombre de contaminants courants que l'on peut confondre avec des parasites du paludisme. Il y a également une description des autres parasites que l'on peut observer dans les frottis de sang périphérique.

Les planches énoncent clairement les règles de sécurité biologique pour la manipulation des échantillons sanguins.

Certains agents de santé pensent que leurs compétences cliniques leur permettent à elles seules de poser un diagnostic de paludisme avec certitude. Pourtant, on sait bien que, pour être fiable, ce diagnostic doit être confirmé par un professionnel expérimenté, qui a observé au microscope les parasites sur un frottis sanguin coloré du patient.

Correctement préparée, la goutte épaisse colorée est utilisée généralement par des professionnels expérimentés pour identifier les stades parasitaires et les espèces du paludisme humain. En cas de doute, un bref examen du frottis correspondant confirme en général le diagnostic. L'exactitude est essentielle, le traitement et la prise en charge du patient pouvant varier en fonction de l'espèce, du profil de pharmacorésistance et de la gravité de l'infection. Une erreur de diagnostic, notamment en ce qui concerne *Plasmodium falciparum*, peut rapidement provoquer une urgence médicale engageant le pronostic vital.

Pour pouvoir s'y référer plus facilement, les planches et le texte correspondant sont organisés, autant que possible, dans l'ordre logique du travail de routine au laboratoire.

Pour approfondir le sujet, l'utilisateur trouvera des références bibliographiques à la fin de la publication.

Paludisme et cycle parasitaire

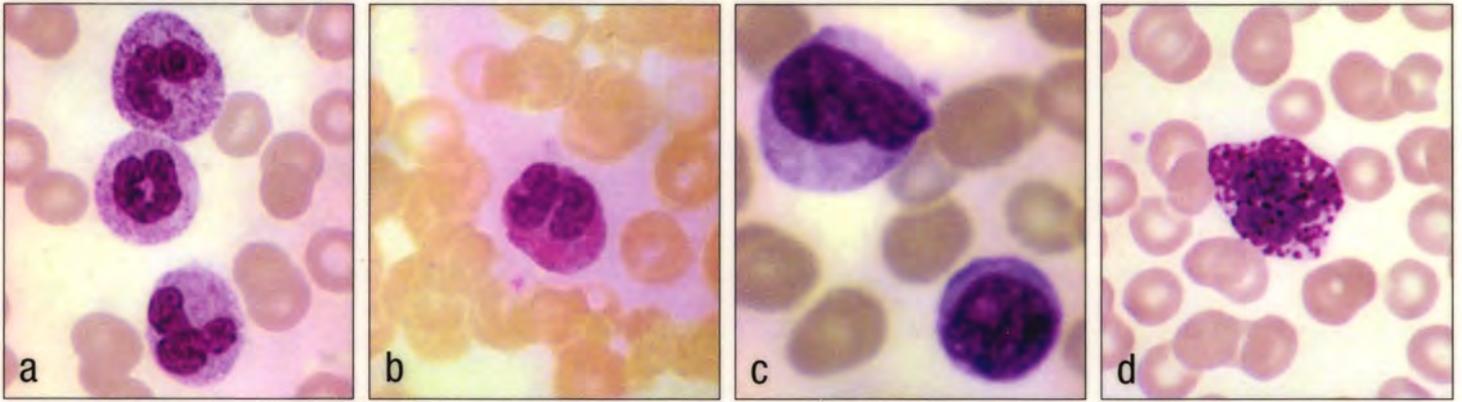
Chaque année, on estime environ 243 millions de cas de paludisme dans le monde, et plus de 860 000, pour la plupart des enfants, en meurent. Sa prévalence est la plus forte dans les pays en développement d'Afrique et d'Asie. Il est provoqué par un protozoaire parasite du genre *Plasmodium*, dont quatre espèces sont importantes pour l'homme : *Plasmodium falciparum* (la plus dangereuse), *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. En plus d'envahir et de détruire les hématies, les parasites peuvent aussi entraîner des lésions dans des organes vitaux, comme le cerveau. La plupart des décès résultent du paludisme cérébral provoqué par *P. falciparum*.

Le paludisme est transmis à l'homme par des moustiques femelles du genre *Anopheles*. Sur les 70 espèces susceptibles de le transmettre dans le monde, 40 sont des vecteurs importants. Les moustiques s'infectent en ingérant le sang d'une personne contenant des **gamétocytes**, la forme sexuée du parasite. Les gamétocytes femelles ou **macrogamétocytes** et mâles ou **microgamétocytes**, atteignent le stade mature des **gamètes** dans l'intestin moyen de l'insecte. La fécondation d'un **macrogamète** (femelle) par un **microgamète** (mâle) donne un **ookynète** mobile qui migre dans la paroi intestinale et se développe en **oocyste**. On observe alors une division asexuée pouvant donner jusqu'à 10 000 **sporozoïtes** fusiformes qui, après la rupture de l'oocyste, migrent vers les glandes salivaires du moustique. Le développement et la multiplication du plasmodium dans l'organisme du vecteur dépend de la température ambiante : le délai entre le repas de sang infectant et la première piqûre infectante peut être de 7 à 14 jours entre 25 et 30 °C mais il augmente à des températures plus basses. Une fois que les sporozoïtes ont pénétré dans la circulation sanguine, ils sont transportés vers le foie de l'hôte humain, où ils envahissent les cellules du **parenchyme** et se développent en **schizontes exo-érythrocytaires**.

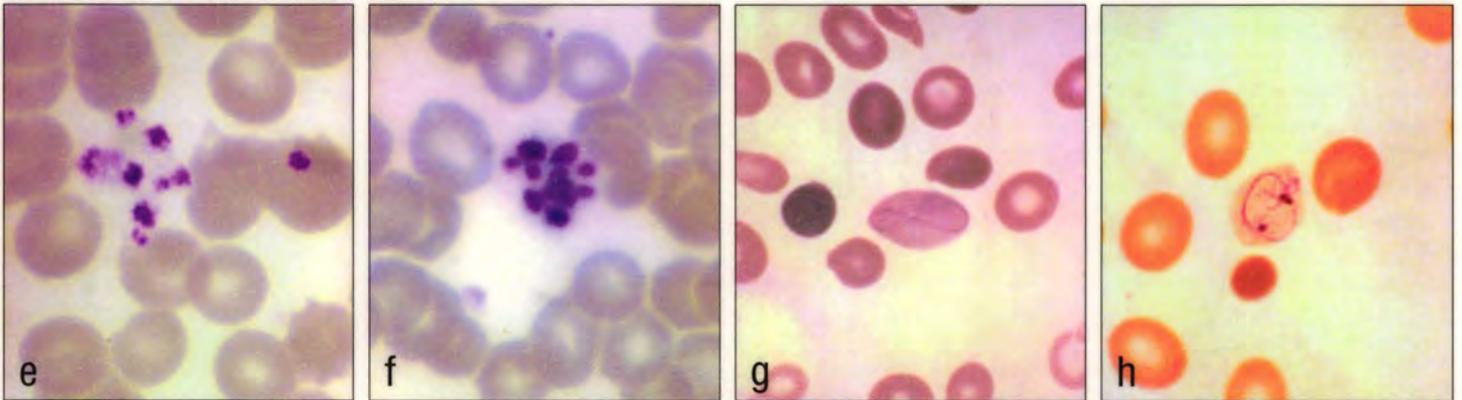
Il s'ensuit une phase de multiplication de 5,5 à 15 jours après quoi, selon les espèces, les **schizontes** matures éclatent en libérant des milliers de **mérozoïtes** dans la circulation. Dans le cas de *P. vivax* et de *P. ovale*, certains sporozoïtes ne se développent pas immédiatement en schizontes et restent à l'état dormant pendant plusieurs mois. On parle alors d'**hypnozoïtes**. C'est cette période de latence avant leur développement ultérieur qui explique les rechutes que l'on observe avec ces deux espèces. On a proposé les termes de **schizontes exo-érythrocytaires « précoces » et « tardifs »** pour mieux décrire l'activité de ces deux espèces. En revanche, *P. falciparum* et *P. malariae* ne forment pas d'hypnozoïtes, bien que les recrudescences à partir des érythrocytes ne soient pas rares si le paludisme n'est pas traité.

Les **mérozoïtes** envahissent les hématies et se nourrissent de l'hémoglobine pour se développer en **trophozoïtes**. Ceux-ci se développent en **schizontes** au cours de cette **phase érythrocytaire**, produisant le **pigment malarique**, sous-produit du métabolisme. La reproduction se fait par division asexuée (**schizogonie érythrocytaire**). Suivant les espèces, les schizontes mûrs comptent de 6 à 24 **mérozoïtes**. La rupture des hématies infectées libère les **mérozoïtes** dans la circulation, où ils peuvent infecter de nouveaux érythrocytes et le cycle recommence. La fièvre survient au moment de la rupture des hématies et la répétition de ce cycle provoque une augmentation de la parasitémie. Après plusieurs cycles de schizogonie érythrocytaire, certains mérozoïtes se différencient en micro- ou en macrogamétocytes qui, lorsqu'ils sont ingérés par une femelle anophèle au cours de son repas de sang, vont enclencher un nouveau cycle de transmission (voir la planche 1b).

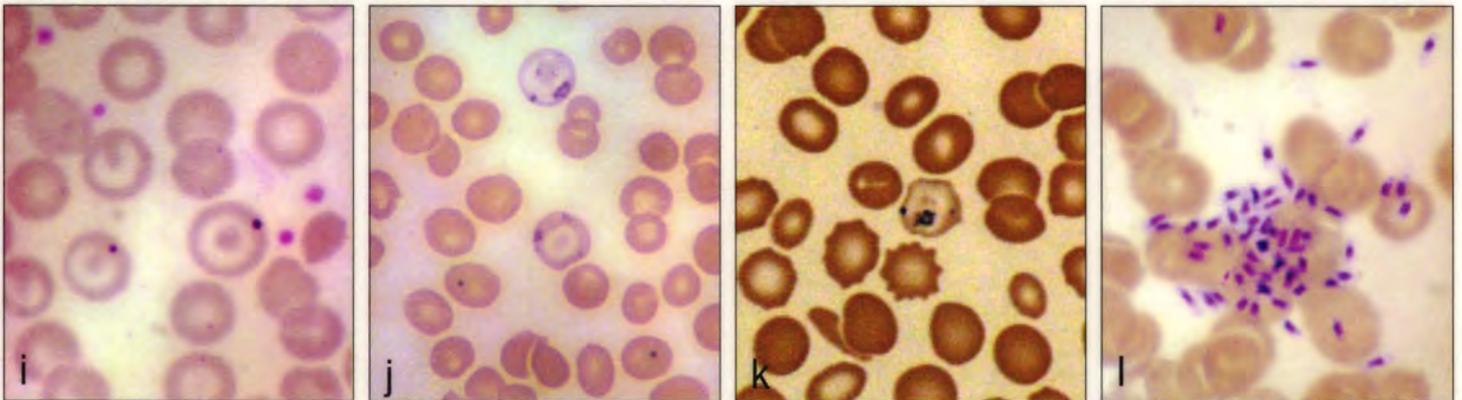
Éléments cellulaires, anomalies courantes et contaminations dans le frottis



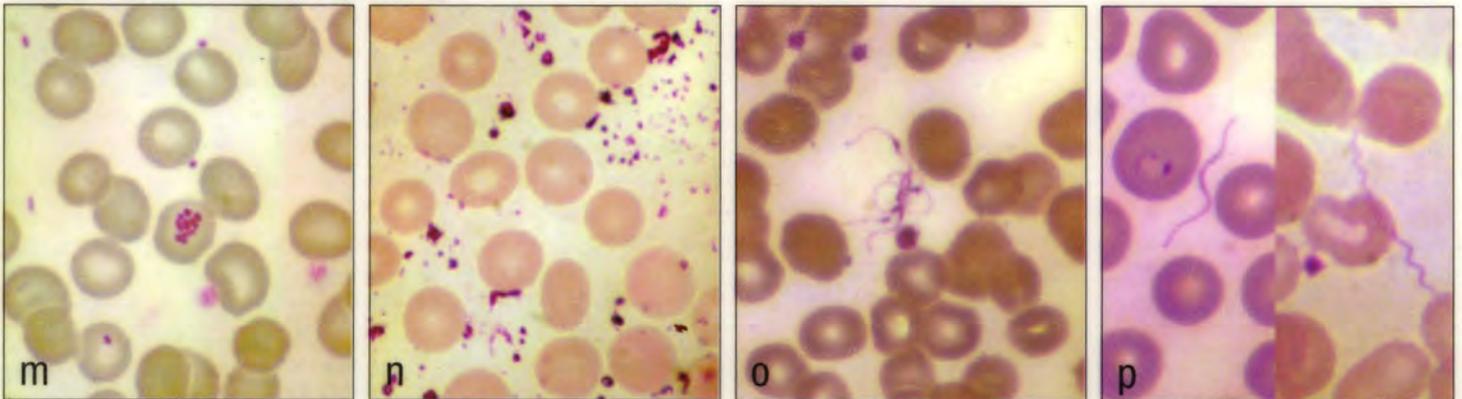
Leucocytes (globules blancs) dans les frottis. On trouve couramment dans ce type de frottis des neutrophiles (a), des éosinophiles (b), des lymphocytes (cellules plus petites), des monocytes (c) et des basophiles (d).



Plaquettes isolées entre les hématies. Quand les plaquettes se superposent aux érythrocytes (e) ou forment des amas (f), elles ressemblent superficiellement à des schizontes et on peut alors les confondre. On observe les anneaux de Cabot (g, h), inclusions cellulaires prenant souvent la forme d'un anneau ovale, en cas d'anémie sévère et on pense qu'ils sont des reliquats des fuseaux mitotiques.



Corps de Jolly. (i, j) ce sont des fragments (d'ADN) colorés en mauve, que l'on prend parfois à tort pour les tâches de chromatine associées aux parasites du paludisme. Les corps de Papanheimer sont de petits dépôts basophiles irréguliers dans les érythrocytes ; on peut les trouver en association avec des corps de Jolly (j) ou seuls dans un érythrocyte (k coloration de Wright, photographie offerte par Mme Christiane Wahl). D'autres objets pas facilement identifiables (l) sont souvent confondus avec des parasites du paludisme par les microscopistes inexpérimentés.

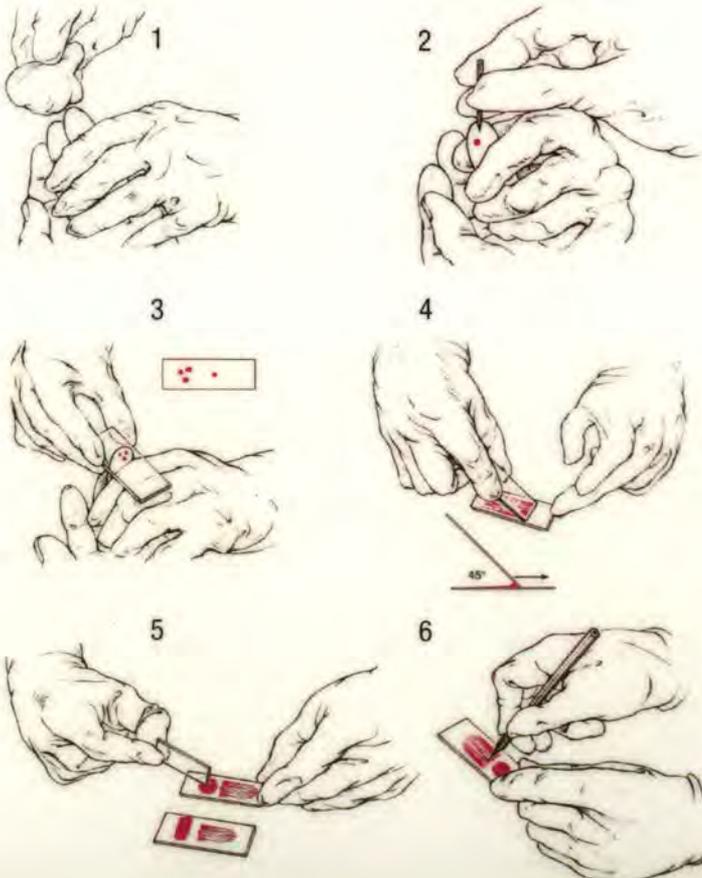


Contaminations des frottis sanguins. Des amas de bactéries peuvent contaminer les frottis sanguins et se superposer à un érythrocyte (m). Il arrive que les frottis mal rincés après la coloration retiennent des dépôts de colorant (n). On voit souvent dans du sang infecté par le paludisme, prélevé sur anticoagulant et conservé à température ambiante des microgamétocytes en cours d'exflagellation et des microgamètes (o). Dans l'image scindée en deux (p), on voit un microgamète isolé avec un noyau central en position adjacente à une hématie infectée. Sur la droite, il y a un spirochète typique de l'espèce *Borrelia*. Bien que le spirochète ressemble en apparence à un microgamète du paludisme, il est plus long, plus épais et n'a pas de noyau.

Règles de sécurité biologique pour la manipulation des échantillons sanguins

Les laboratoires doivent appliquer les directives nationales de sécurité, fondées sur les normes internationales établies. Les échantillons de sang doivent être considérés comme potentiellement infectieux et le personnel de laboratoire doit être formé à l'élaboration et à la mise en œuvre de modes opératoires normalisés, ainsi qu'à l'application des directives de sécurité biologique :

1. Garder des modes opératoires normalisés, rédigés dans un langage clair, qui couvrent toutes les procédures mises en œuvre.
2. Former le personnel du laboratoire à l'exécution de ces procédures.
3. Toujours porter des vêtements de protection au laboratoire.
4. Porter des gants de protection en latex pour prendre et manipuler les échantillons sanguins.
5. Éviter de se toucher les yeux, le nez ou la bouche avec les gants.
6. Enlever les gants dès que le travail est achevé. Ne pas quitter le poste de travail avec les gants de protection toujours sur les mains.
7. Jeter les gants que l'on estime contaminés ou qui ont été portés, se laver les mains et mettre de nouveaux gants.
8. Se laver les mains à l'eau et au savon immédiatement après toute contamination et après la fin du travail.
9. Laver soigneusement à l'eau et au savon les blessures par perforation, coupure et la peau contaminée par du sang qui s'est renversé ou a jailli accidentellement.
10. Signaler immédiatement au responsable du laboratoire tout renversement accidentel, toute piqûre accidentelle, ainsi que toute exposition potentielle ou avérée à du matériel infectieux.
11. Jeter les lancettes usagées, les aiguilles et le matériel contaminés dans un conteneur de sécurité.
12. Nettoyer les surfaces de travail à la fin de chaque journée avec un désinfectant universel, comme une solution d'hypochlorite de sodium (Javel) à une concentration de 0,1 % de chlore actif (1 g/l).
13. Ne pas manger ni boire en dehors des zones réservées à cet effet ; il doit être strictement interdit de fumer.
14. L'accès au laboratoire sera réservé au seul personnel autorisé.



Préparation d'une goutte épaisse et d'un frottis sur la même lame pour l'examen microscopique de routine

D'ordinaire on n'examine que la goutte épaisse; le frottis sert au marquage de la lame et à la confirmation de l'espèce, lorsque l'identification de celle-ci s'avère difficile.

Matériel nécessaire: lames propres et emballées ; lancettes stériles ; éthanol à 70 %, eau ; coton hydrophile ; gants de protection en latex ; chiffon de coton propre et anti-peluche ; boîte à lames ou couvercle pour protéger les frottis des mouches et de la poussière ; formulaires d'enregistrement ; crayon à mine grasse ; stylo à bille.

1. En tenant la main gauche du patient, la paume tournée vers le haut, saisir le majeur (troisième doigt à partir du pouce). On peut utiliser le gros orteil chez le nourrisson, mais jamais le pouce, ni pour un adulte, ni pour un enfant.

Enlever la graisse et la saleté de la pulpe du doigt à l'aide d'un tampon de coton légèrement imbibé d'alcool (éthanol) à 70 %.

Essuyer le doigt avec un chiffon de coton propre en exerçant plusieurs pressions fermes pour stimuler la circulation du sang.

2. Avec une lancette (ou vaccinostyle) stérile, piquer la pulpe du doigt en faisant un mouvement de rotation rapide.

En comprimant le doigt, faire sortir la première goutte de sang et l'essuyer avec un tampon de coton sec. S'assurer qu'il ne reste pas, sur le doigt, des fibres de coton susceptibles de se mélanger ensuite avec le sang.

3. En tenant les lames propres uniquement par les bords, procéder rapidement au recueil du sang comme suit : appuyer doucement sur le doigt pour recueillir une seule goutte de sang, de cette taille environ ●, au milieu de la lame.

Prélever et déposer ensuite trois gouttes de sang plus grosses, à peu près de cette taille ●, et les mettre à environ 1 cm de la première goutte devant servir pour le frottis.

Essuyer le sang restant sur le doigt avec un coton et exercer une pression sur le point de la piqûre pour arrêter le saignement.

4. **Frottis**. Prendre la lame de microscope avec la goutte de sang et mettre en contact le bord d'une seconde lame propre avec cette petite goutte de sang et laisser celle-ci se répartir le long du bord de la seconde lame. Pousser fermement et sans à-coups la seconde lame, en la tenant inclinée à 45°, le long de la première lame avec les gouttes de sang. Bien s'assurer que la deuxième lame reste en contact avec la surface de la première lame pendant qu'on procède à l'étalement.

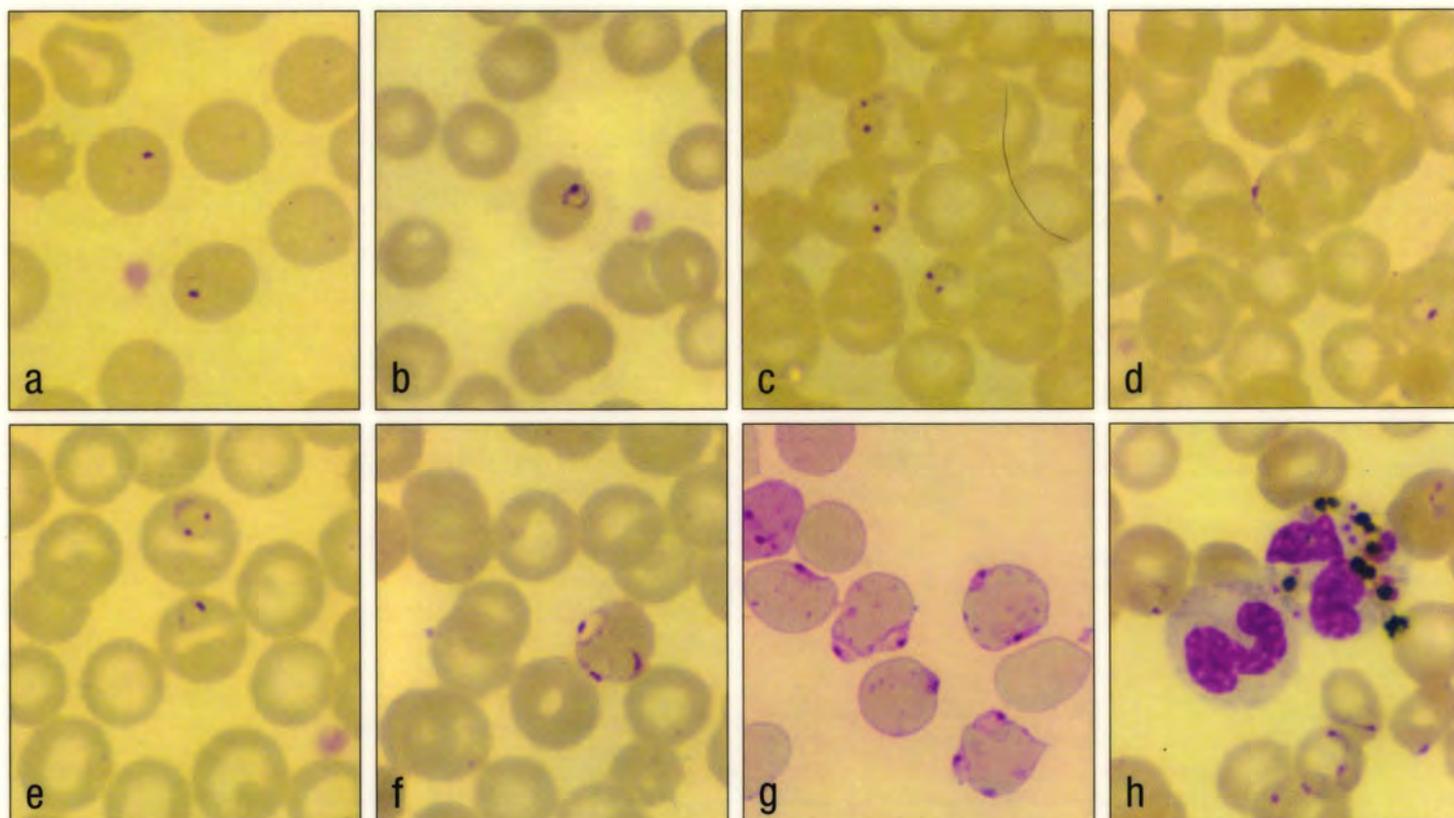
5. **Goutte épaisse**. Pour la goutte épaisse, toujours tenir la seconde lame par les bords ou par un coin. Avec le coin de cette seconde lame, réunir rapidement les trois gouttes de sang et les étaler pour former une couche épaisse uniforme. En évitant de trop mélanger, étaler le sang en cercle ou en rectangle en trois à six mouvements continus. La goutte épaisse de forme circulaire doit avoir environ 1 cm de diamètre.

6. Quand le frottis est sec, le marquer à l'aide du crayon à mine grasse en inscrivant les détails pour identifier le patient (numéro et date par exemple). Ne pas utiliser de stylo à bille. Laisser sécher la goutte épaisse en position horizontale, à l'abri des mouches, de la poussière, de la chaleur et de la lumière du soleil.

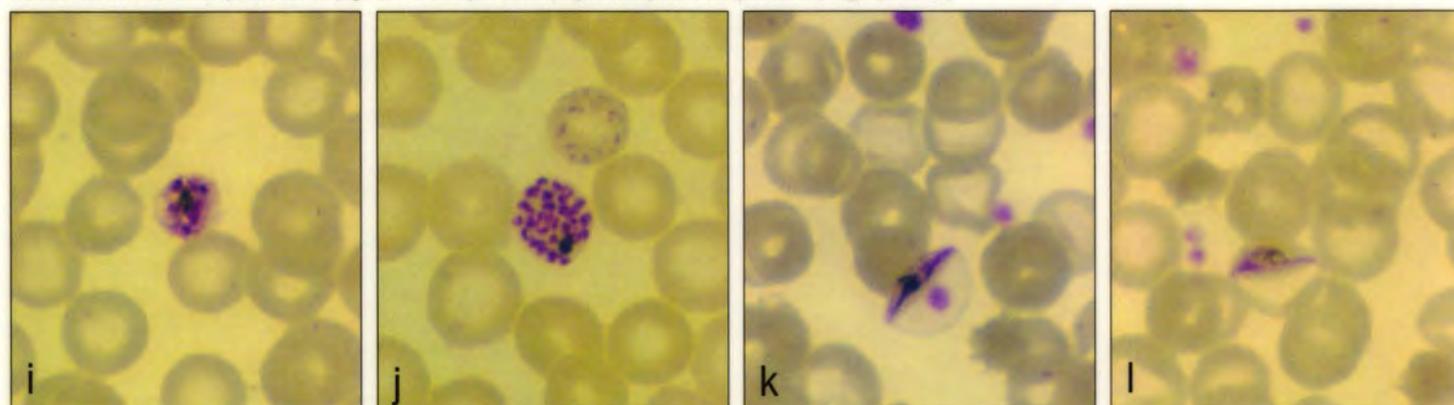
La seconde lame sert pour le patient suivant, tandis qu'on prend une nouvelle lame propre du paquet pour l'étalement suivant.

Les lames sèches doivent être expédiées rapidement au laboratoire avec le formulaire d'enregistrement sur lequel les détails du patient ont été consignés.

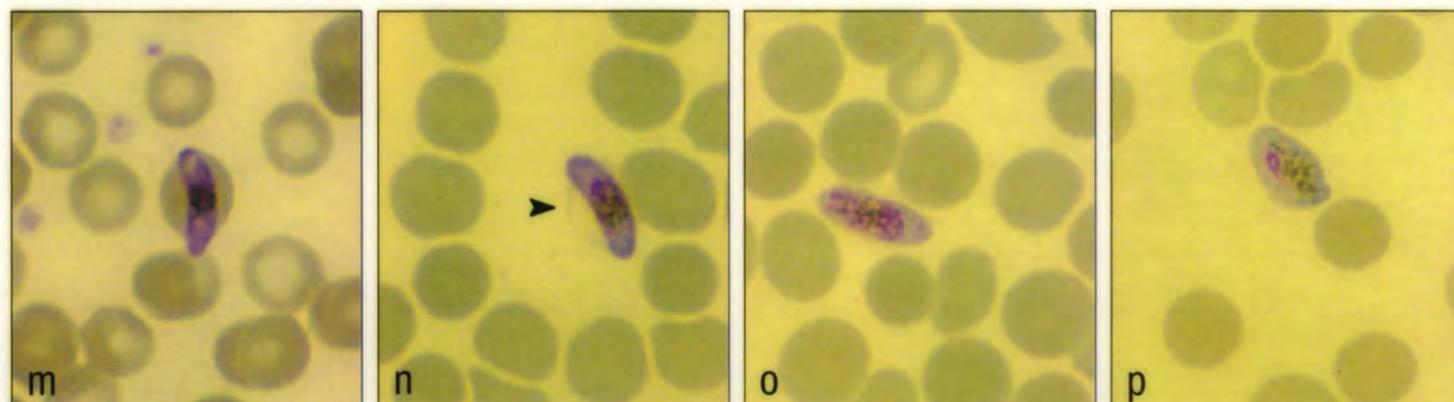
Il faut toujours observer rigoureusement les règles de sécurité tout au long de cette manipulation.

***Plasmodium falciparum* dans le frottis**


Trophozoïtes. « L'anneau » de cytoplasme fin et bleu typique des trophozoïtes de *falciparum* est plus petit que celui des trois autres espèces avec une tâche, ou souvent deux, de chromatine rouge rubis (a-e). Les mérozoïtes envahissent les hématies à tout âge et on observe fréquemment des invasions multiples dans les érythrocytes (f-h). Les formes appliquées donnent l'impression que les parasites se trouvent en dehors de l'hématie plutôt qu'à l'intérieur (f, g). Les hématies infectées ne sont pas hypertrophiées, et l'on n'observe les tâches de Maurer que dans les films bien colorés (g). Il n'y a pas de trophozoïtes de *falciparum* en phase de croissance ou matures, sauf dans les infections sévères. La présence de pigment malarique dans les granulocytes témoigne de la phagocytose (h).



Schizontes. On les observe rarement dans le sang périphérique. En général, les schizontes matures sont compacts et renferment de 16 à 24 mérozoïtes (pouvant aller de 8 à 40). Le pigment a habituellement fusionné en une ou deux masses et peut se trouver n'importe où dans l'hématie (i, j).



Gamétocytes. Reconnaisables d'abord à leur corps fusiforme, la membrane de l'hématie est souvent difficile à voir (k, n, flèche). Ils développent rapidement des formes caractéristiques, en « banane » ou en « saucisse », avec des extrémités arrondies (m-o). Les macrogamétocytes ont un cytoplasme bleu et la chromatine se présente sous la forme d'une masse violette ; le pigment est plus sombre et plus concentré que dans les microgamétocytes (m, n). Le cytoplasme du microgamétocyte est violet-rosâtre, la chromatine est plus diffuse et les granules de pigment sont dispersés dans le micro-organisme (o). Certains macrogamétocytes prennent des formes bizarres (p), ce qui rend le diagnostic difficile.

Entretien des lames et erreurs fréquentes dans la préparation des frottis sanguins

Nettoyage et conservation des lames de microscope

Avec des lames mal nettoyées ou sales, on ne prépare pas des frottis de qualité satisfaisante et les examens au microscope deviennent imprécis, ce qui met le patient en danger. Pour des examens fiables, veiller à bien choisir les lames et à les nettoyer, les envelopper et les conserver correctement.

Utiliser des lames de qualité « supérieure » aux bords en verre rodé ; certains préfèrent des lames avec une des extrémités en verre dépoli pour le marquage. Dans les régions tropicales, les lames de mauvaise qualité s'opacifient rapidement ; elles sont « embuées » et inutiles. Il faut quand même laver les lames « prénettoyées » et les sécher avant de les utiliser.

Lames pour les laboratoires des hôpitaux

- Laisser tremper les lames neuves toute une nuit dans de l'eau additionnée de détergent en prenant soin de bien les séparer les unes des autres.
- Avec un tissu en coton placé entre le pouce et l'index, nettoyer chaque lame des deux côtés.
- Rincer soigneusement chaque lame à l'eau courante pour éliminer le détergent.
- Retirer de chaque lame l'eau qui reste et les conserver dans un flacon d'alcool fermé avec un bouchon à vis.

- Au moment de l'utilisation, essuyer chaque lame avec un tissu en coton propre et non pelucheux. Il faut toujours manipuler les lames en les tenant seulement par les bords.

Lames pour les enquêtes et les collections

- Pour être réutilisées, les lames qui ont déjà servi doivent être mises à tremper toute une nuit dans de l'eau additionnée de détergent ; comme ci-dessus, nettoyer chaque lame séparément, pour enlever toute trace du précédent frottis et d'huile à immersion.
- Une fois qu'elles sont propres, rincer soigneusement les lames pour enlever le détergent.
- Essuyer chaque lame avec un tissu en coton non pelucheux ; mettre de côté les lames ébréchées ou rayées et les réserver à d'autres tâches de laboratoire.
- Avec un papier propre découpé en feuilles de 11 cm x 15 cm de côté, envelopper les lames sèches par paquets de dix ; replier les extrémités du papier vers le bas et fermer le tout avec du ruban adhésif transparent.
- Remettre dix paquets de lames dans chaque boîte d'origine et les conserver dans une armoire à air chaud jusqu'à leur utilisation.

Erreurs fréquentes dans la préparation des frottis sanguins

Certaines erreurs sont couramment commises lors de la préparation des frottis sanguins et elles peuvent avoir des conséquences négatives pour le marquage, la coloration et l'examen.

Frottis trop épais, réalisé dans la mauvaise direction ; goutte épaisse au mauvais endroit

Lorsqu'ils sont mal positionnés sur la lame, les frottis peuvent être enlevés par frottement sur les bords des cuves de coloration et des râteliers ; par ailleurs, il est alors difficile d'aligner l'objectif du microscope pour l'examen.

Trop de sang

Après coloration, la goutte épaisse sera trop colorée et il y aura de trop nombreux leucocytes, empêchant de voir les parasites ; les nombreuses couches d'hématies fixées rendront impossible l'examen du frottis.



Trop peu de sang

L'examen standard du frottis ne sera pas possible ; le frottis sera trop petit pour servir au marquage de la lame.



Frottis préparés sur une lame avec des traces grasses

Des lambeaux de la goutte épaisse se détacheront pendant la

coloration ; le frottis sera parcellaire et inégal, ce qui rendra l'examen difficile et peu fiable.



Bord ébréché de la seconde lame (pour l'étalement des frottis)

Le frottis présentera de nombreuses trainées, tandis que la goutte épaisse sera d'épaisseur inégale.

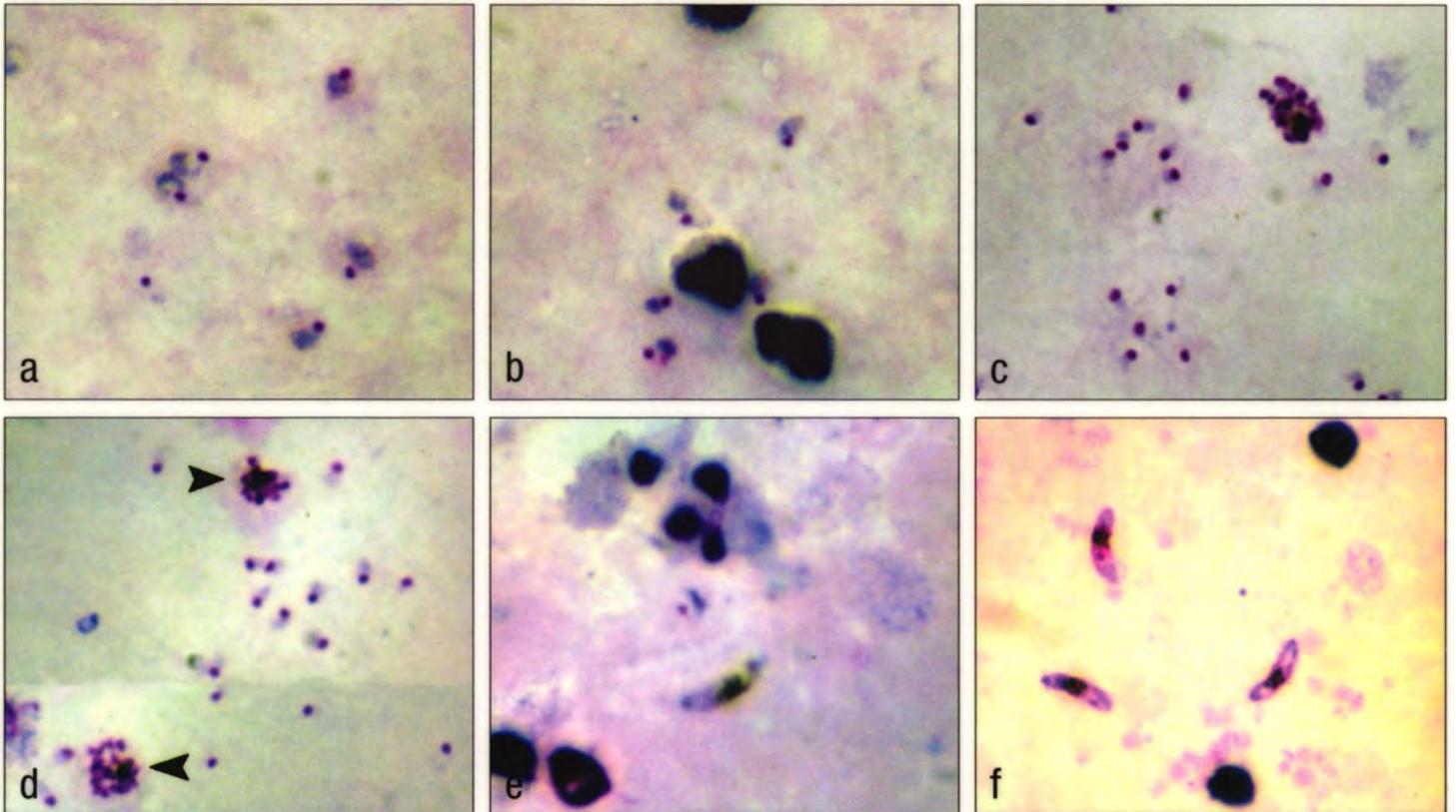


Lorsqu'on tarde à faire la coloration dans une atmosphère chaude et humide, il arrive que la goutte épaisse se fixe d'elle-même, ce qui nuira à sa coloration et la rendra opaque.

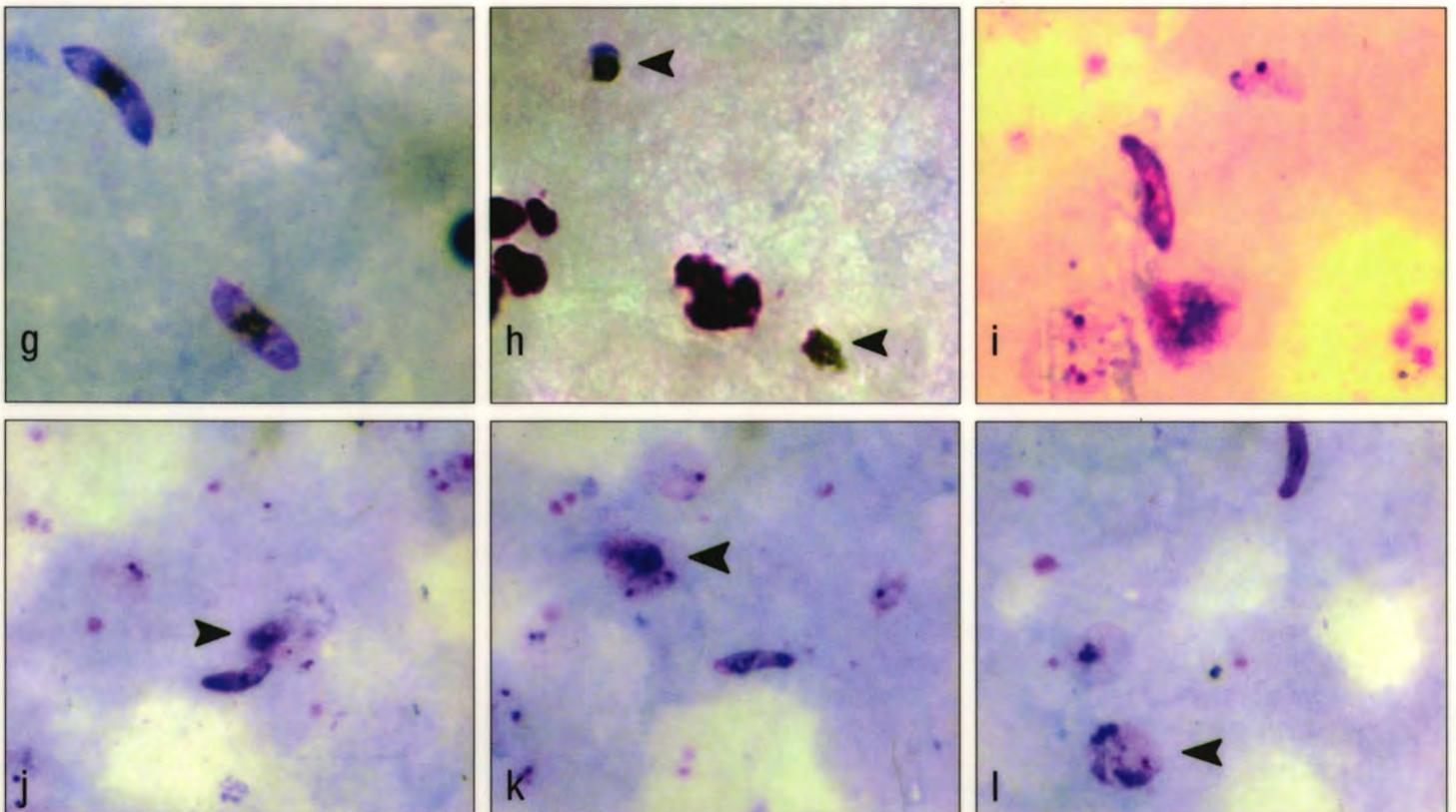
Autres problèmes courants

D'autres incidents arrivent couramment dans la préparation des frottis sanguins :

- le frottis est mangé par des mouches, des blattes ou des fourmis, ce qui l'endommage ;
- les frottis sont préparés sur des lames très rayées, d'aspect « givré » ou à la surface irisée ;
- La goutte épaisse a séché irrégulièrement ;
- auto-fixation de la goutte épaisse à cause du temps écoulé, de l'exposition à la chaleur, ce qui rend sa coloration difficile et pas satisfaisante ;
- emballage des lames avant que les frottis ne soient tout à fait secs, de sorte que les lames collent les unes aux autres.

***Plasmodium falciparum* dans la goutte épaisse**

Les formes en anneau sont petites, fines, nombreuses et ont peu de cytoplasme (**c, d**) ; les formes en virgule sont abondantes, de même que les anneaux déformés par l'hémolyse pendant la coloration. Les tâches doubles de chromatine sont courantes. Les trophozoïtes plus âgés ont davantage de cytoplasme, mais les autres stades sont en général absents (**a, b**). On observe rarement les schizontes, sauf en cas d'infection massive (**d**, flèches). La présence d'un grand nombre de formes en anneau, sans autres stades parasitaires, permet le diagnostic de cette espèce, de même que les infections dans lesquelles on observe des anneaux et des gamétocytes typiques en forme de banane (**c, e**).



Dans certains champs, il ne semble y avoir que des gamétocytes (**f, h**). Une manipulation brutale du sang pendant la préparation du frottis ou, plus fréquemment, le séchage lent de la goutte épaisse provoque des modifications morphologiques des gamétocytes qui rendent difficile le diagnostic définitif de ce stade (**i**). Les infections mixtes sont plus fréquentes pendant la saison de transmission. Dans les deux photographies (**j**) et (**k**), on observe un gamétocyte de *P. falciparum*, de nombreux anneaux de *P. falciparum* et, indiqué par une flèche, un trophozoïte de *P. vivax* ; la photo (**l**) met en évidence un gamétocyte de *P. falciparum* et un trophozoïte de *P. vivax*.

Utilisation et entretien du microscope

Le microscope

Pour le diagnostic du paludisme, on utilise un microscope binoculaire à deux éléments. Avec une paire d'oculaires x10 et un objectif à immersion x100, on obtient un grossissement x1000. Il n'est pas recommandé de se contenter de la lumière du jour et d'un miroir comme sources lumineuses pour l'examen des lames. Pour être efficace, il faut avoir une source lumineuse artificielle avec un condenseur en dessous de la platine. On aura de préférence recours à un système de diode électroluminescente (DEL) fonctionnant à pile ou à l'énergie solaire pour les microscopes devant être utilisés dans des zones isolées, où l'alimentation électrique est insuffisante. Une lampe de ce type n'est pas chère et devra être prévue dans le budget dès la planification. Un filtre bleu « lumière du jour » convertit la lumière jaune (électrique) en lumière naturelle blanche, qui aide à réduire le plus possible les variations de coloration des parasites et facilite le diagnostic.

Réglage de la lumière du microscope

Pour régler le microscope, allumer la lampe sous la platine, relever au maximum le condenseur et ouvrir le diaphragme à iris aux deux tiers de l'ouverture maximale. Enlever un oculaire et, tout en regardant dans le tube, aligner le condenseur et la lampe, de sorte que la lumière la plus forte soit au centre du condenseur. Remettre l'oculaire. Relever l'objectif loin de la platine et mettre une goutte d'huile à immersion sur le frottis à examiner. En regardant par le côté, faire baisser doucement l'objectif avec la vis macrométrique jusqu'à ce que la lentille soit en contact avec l'huile à immersion. Régler l'intensité de la lumière pour qu'elle soit confortable et faire la mise au point fine à l'aide de la vis micrométrique. Examiner le frottis en appliquant la procédure standardisée.

À la fin de la séance de travail, enlever doucement l'huile à immersion de l'objectif à l'aide d'un papier spécial pour lentilles. Enlever également l'huile à immersion des frottis examinés avec du papier doux (type mouchoir en papier).

Entretien du microscope

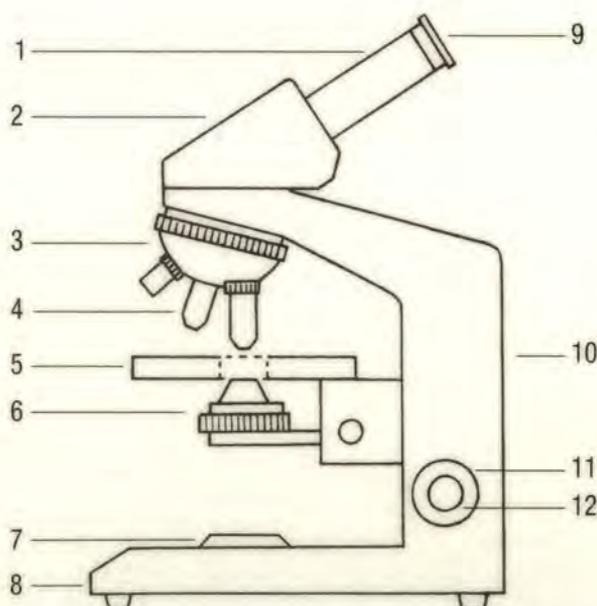
Il faut protéger les lentilles et les prismes des microscopes de la poussière et des moisissures. Lorsque le microscope est inutilisé sur la paillasse, on le protégera de la poussière avec une housse en tissu ou en plastique. En climat humide, l'appareil doit être gardé dans une boîte ou une armoire à air chaud, de façon à protéger les lentilles contre le développement des moisissures. L'air à l'intérieur de la boîte ou de l'armoire est asséché et réchauffé au moyen d'une lampe de 15 à 25 W allumée en permanence. Quand il n'y a pas d'électricité, chaque microscope doit être rangé dans une boîte en plastique avec un couvercle étanche. Un flacon ouvert contenant du gel de silice activé permet alors de garder le taux d'humidité au minimum. Le gel de silice doit comporter un témoin colorimétrique : bleu quand il est actif, rose quand il faut le recharger. On peut le recharger en le chauffant dans un four ou sur un réchaud, en général deux fois par mois. En protégeant ainsi les microscopes, les lentilles, les caméras et les projecteurs, on peut éviter en permanence le développement de moisissures.

Veiller à :

- rappeler le numéro de référence du modèle et de la pièce (avec son nom) pour la commande de pièces détachées; et
- nettoyer tous les jours l'objectif à immersion pour enlever l'huile à immersion.

Ce qu'il ne faut pas faire :

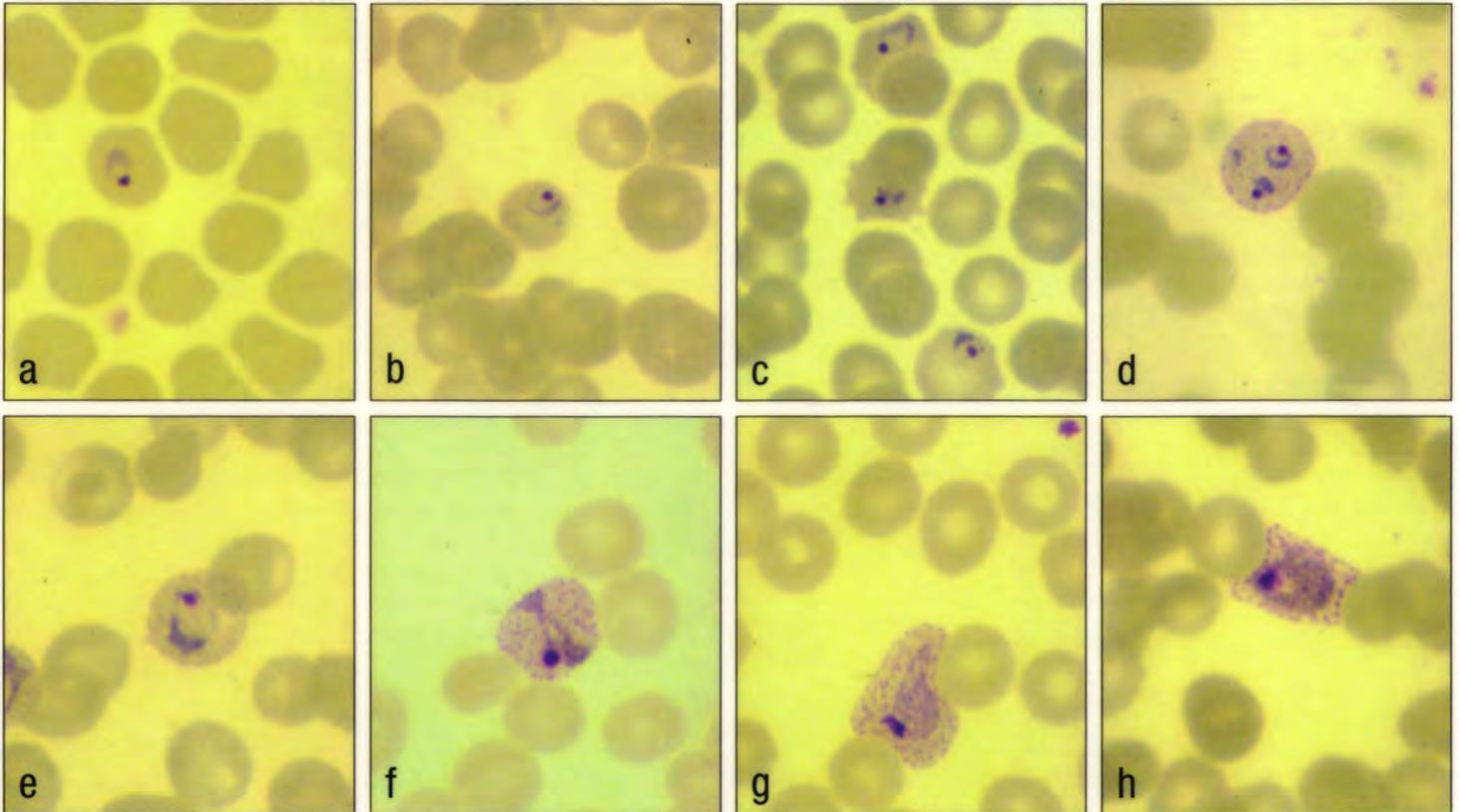
- démonter le microscope, si vous n'avez pas la formation nécessaire ;
- utiliser de l'alcool pour nettoyer le microscope ;
- laisser vides les supports destinés à recevoir les lentilles ; remettre le capuchon prévu à cet effet ou de l'adhésif ;
- intervertir les lentilles et les pièces détachées appartenant à d'autres microscopes ;
- transporter un microscope sans avoir vérifié que la vis de fixation est bien serrée.



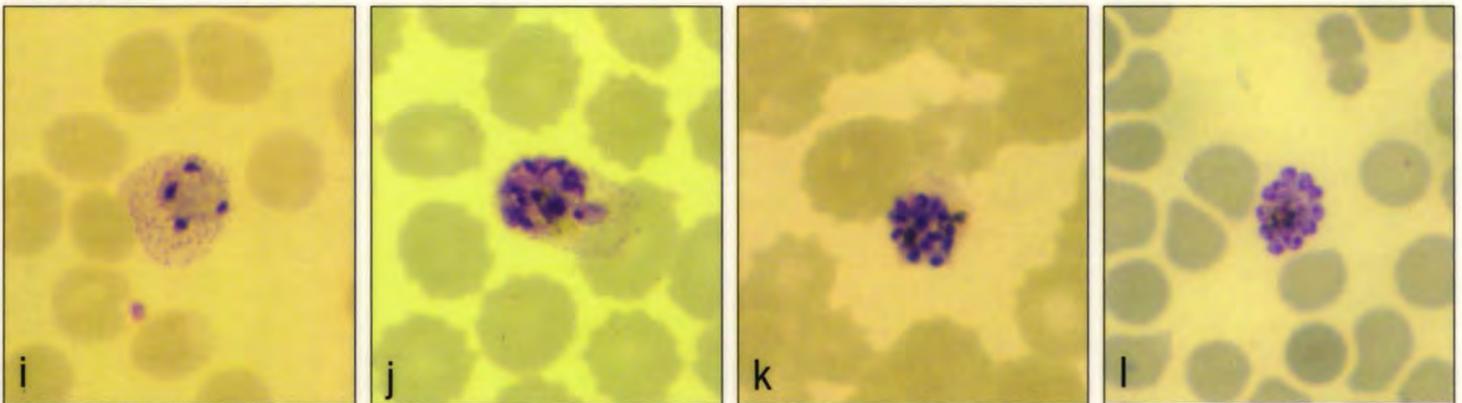
Pièces d'un microscope classique à deux éléments

1. Tube principal
2. Corps optique (prisme) Tête inclinée
3. Révolver porte-objectifs
4. Objectif
5. Platine (platine mécanique)
6. Groupe condenseur avec diaphragme à iris
7. Source de lumière
8. Pied
9. Oculaire
10. Potence
11. Vis macrométrique (mise au point rapide)
12. Vis micrométrique (mise au point fine)

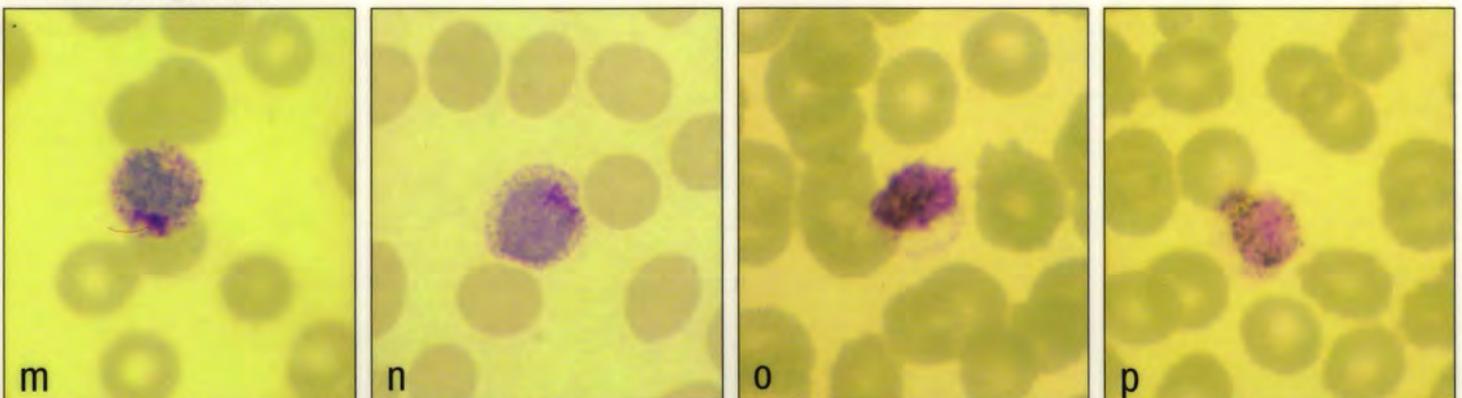
Plasmodium vivax dans le frottis



Trophozoïtes. Il est difficile de différencier les espèces quand on ne voit que le stade en anneau. Dans chacune des photos (a), (b) et (c), les hématies infectées ne sont pas hypertrophiées, il n'y a pas de granulations de Schüffner et il n'y a pas de formes amiboïdes, alors que toutes ces caractéristiques aident à diagnostiquer une infection à *P. vivax*. La confirmation impose de continuer l'examen du frottis et d'identifier d'autres stades de *P. vivax*. D'autres stades et la présence d'anneaux, comme dans (a), (b) et (c), pourraient évoquer une infection mixte à *P. falciparum* et *P. vivax*. La double infection d'hématies avec *P. vivax* est moins courante et, dans le cas de la photo (d), la personne examinant la lame voudra s'assurer qu'il s'agit bien de *P. vivax* et pas de *P. ovale*, en poursuivant l'examen du frottis. Les trophozoïtes de formes amiboïdes, l'hypertrophie cellulaire importante et les granulations de Schüffner caractéristiques sont fortement évocatrices d'une infection à *P. vivax*, lorsque ces observations sont associées (e-h).



Schizontes. De grande taille et d'aspect amiboïde, le schizonte typique se divise rapidement en une masse irrégulière et forme de 12 à 24 mérozoïtes. Chacun d'eux comporte une petite masse de cytoplasme coloré en bleu et une tâche rouge discrète de chromatine. Les granulations de Schüffner sont bien visibles et le pigment forme un à deux amas irréguliers (i-l).



Gamétocytes. Souvent difficiles à distinguer des trophozoïtes matures, les gamétocytes ont en général un bord arrondi et régulier. L'hématie contenant un gamétocyte est typiquement hypertrophiée, avec des granulations de Schüffner bien visibles (m, n). Les macrogamétocytes (m, n) sont grands avec un cytoplasme bleu, une masse petite et compacte de chromatine colorée en rouge très foncé. Les microgamétocytes (o, p) présentent une grande masse diffuse de chromatine d'un rouge brique avec un cytoplasme bleu clair semblant renfermer des granulations dispersées de pigment.

Solutions tampons pour la coloration des parasites du paludisme

Une solution de tampon phosphate à pH 7,2 est indispensable pour des examens précis avec la coloration de Giemsa. Il existe des comprimés, mais ils sont chers et ils se gâtent rapidement en climat tropical.

Solution tampon pour un usage quotidien

1. Dissoudre 1,0 g d'hydrogénophosphate disodique anhydre (Na_2HPO_4) et 0,7 g d'hydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) dans un litre d'eau distillée ou déionisée.
2. Contrôler le pH à l'aide d'un pH-mètre, d'un indicateur coloré ou d'un papier pH à zone étroite.
3. Si le pH est en dessous de 7,2, on peut le remonter avec de petites quantités de Na_2HPO_4 en solution à 2 %. S'il est au dessus de 7,2, on peut l'abaisser avec du KH_2PO_4 en solution à 2 %.
4. Une fois le pH équilibré à 7,2, verser la solution tampon dans un flacon en verre teinté avec un bouchon étanche, à l'abri de la lumière solaire.

La solution se conserve quelques semaines, mais il faudra vérifier périodiquement que des micro-organismes (bactéries, moisissures) ne s'y développent pas. Pour cela, on agite la solution et on la remplace si elle est trouble.

Solution-mère pour les déplacements sur le terrain ou l'envoi dans des antennes éloignées

1. Dissoudre 3,0 g d'hydrogénophosphate disodique anhydre (Na_2HPO_4) et 2,1 g d'hydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) dans 25 ml d'eau distillée ou déionisée.
2. Si le pH est en dessous de 7,2, on peut le remonter avec de petites quantités de Na_2HPO_4 en solution à 2 %. S'il est au dessus de 7,2, on peut l'abaisser avec du KH_2PO_4 en solution à 2 %.
3. Verser la solution tampon dans un flacon en verre teinté avec un bouchon étanche, à l'abri de la lumière solaire ; vérifier régulièrement qu'il n'y a pas de moisissures.
4. Pour préparer une solution de travail, diluer 1 ml de la solution concentrée dans 20 ml d'eau distillée ou déionisée.

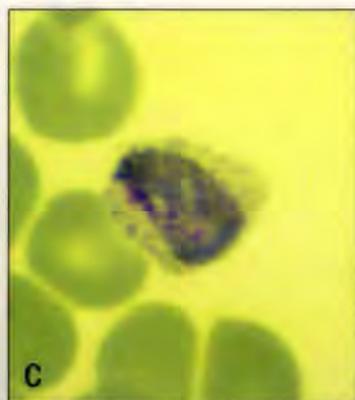
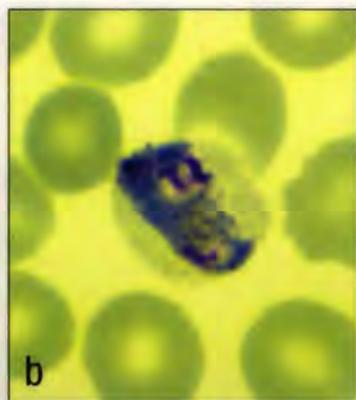
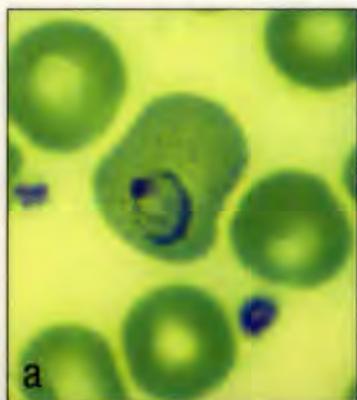
Effet du pH sur la coloration

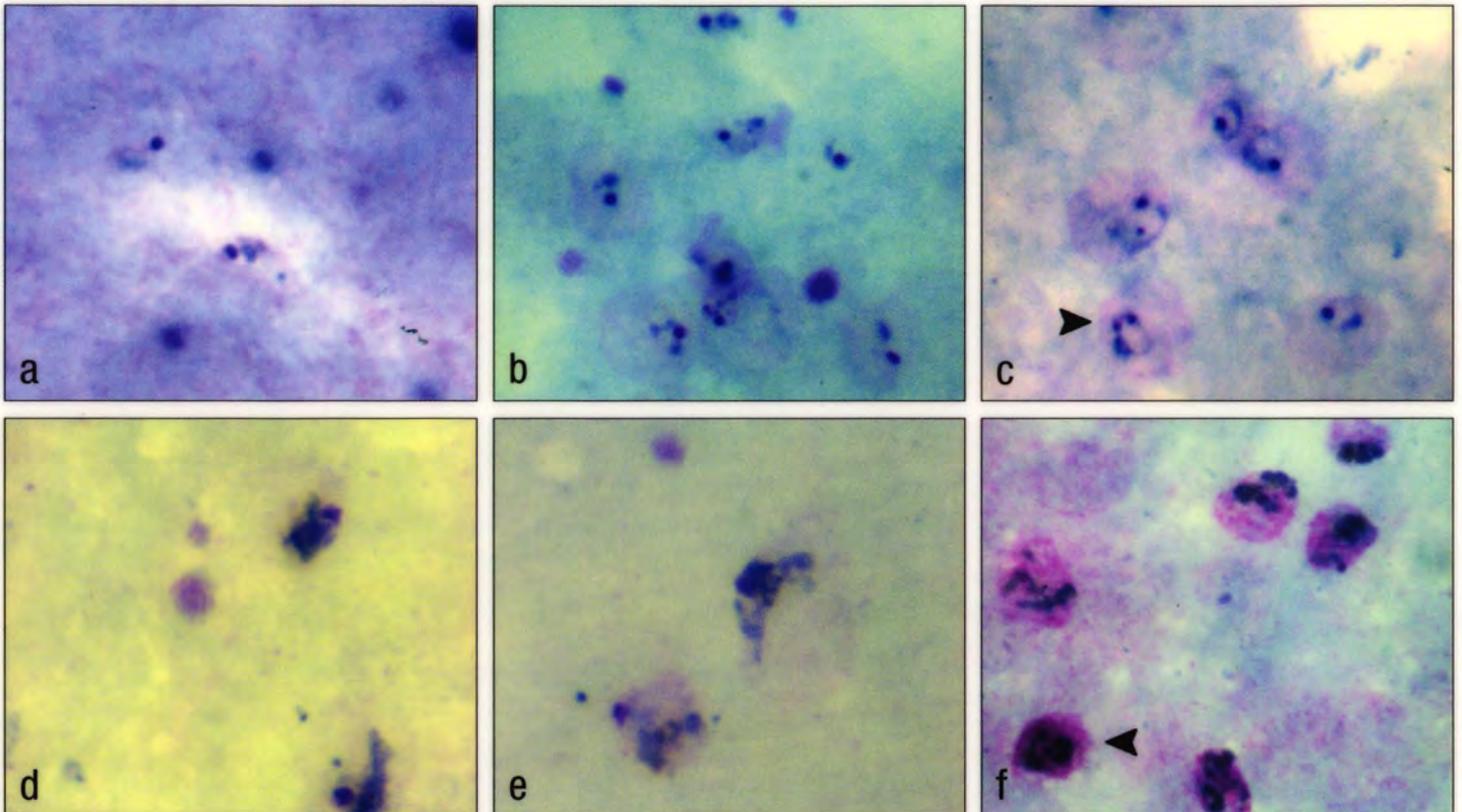
Pour un diagnostic toujours fiable au microscope, l'eau utilisée pour diluer le colorant doit être tamponnée à un pH de 7,2. L'eau utilisée doit être déionisée ou distillée ; l'eau de pluie est trop acide et l'eau des rivières ou des puits peut être contaminée par des bactéries et d'autres micro-organismes. Si l'on doit néanmoins utiliser de l'eau potentiellement contaminée, il faut d'abord la faire bouillir, la laisser refroidir, puis la filtrer. Ces observations s'appliquent également à l'eau utilisée pour rincer le colorant à la fin de la coloration. Si l'eau utilisée à cet effet est trop acide, elle décolorera les lames. Une coloration parfaitement réalisée peut être abimée si, par exemple, la teinte délicate des granulations de Schüffner s'estompe par « délavage » à cause d'une eau acide. On recommande fortement un pH d'au moins 7,0 pour l'eau utilisée pour rincer les lames après coloration. Dans les régions calcaires, l'eau du robinet a en général un pH de 7,2 environ et on peut sans crainte l'utiliser directement pour le rinçage.

Le diagnostic précis des stades parasitaires et de l'espèce repose sur une association de couleurs, de formes, de tailles et la présence de pigment et des formes parasitaires dans la goutte épaisse ou, à une étape ultérieure, dans le frottis, si le diagnostic à partir de la goutte épaisse s'avère trop difficile ; quand la coloration ressemble à une photo en noir et blanc, on commet

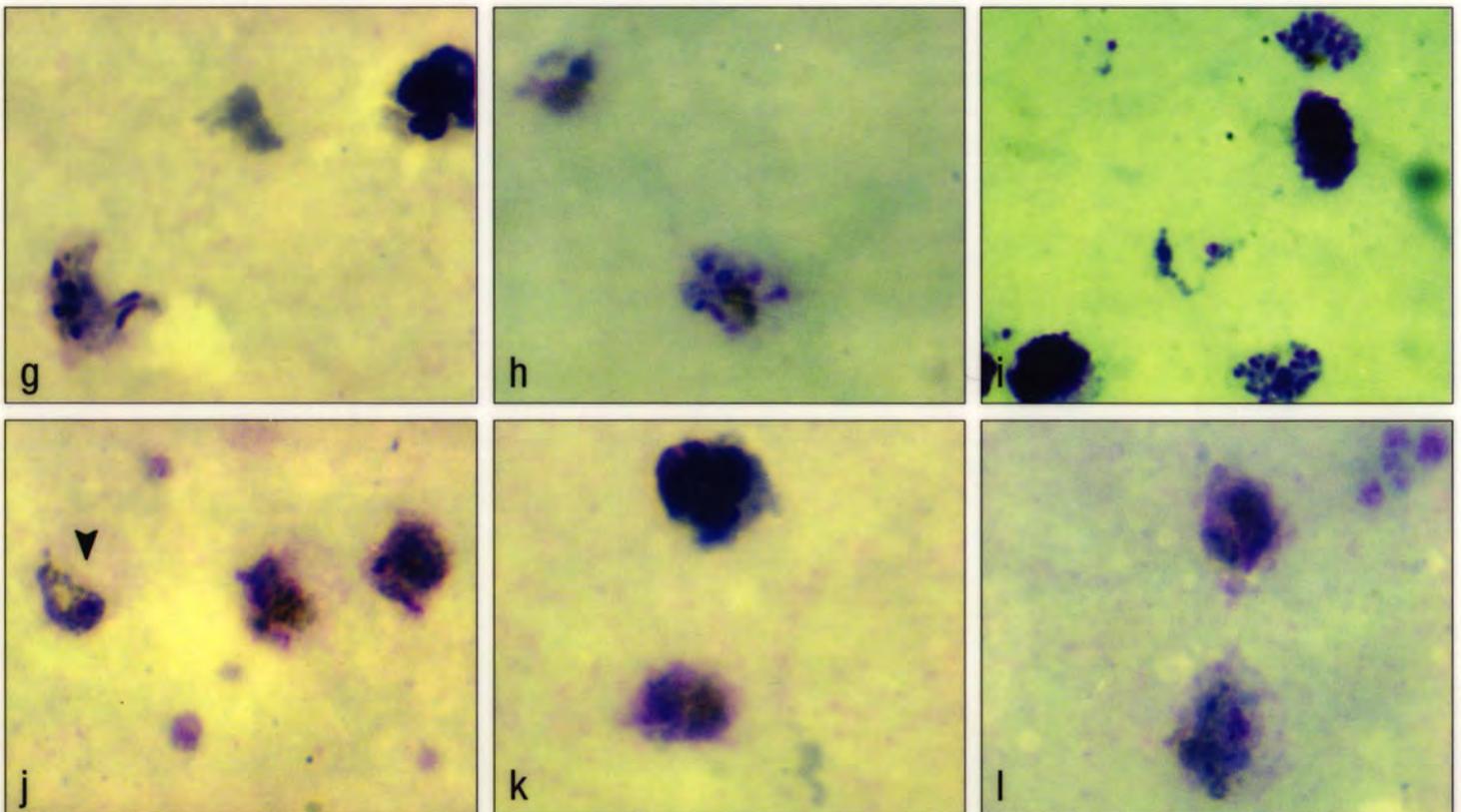
des erreurs de diagnostic qui, bien souvent, sont dues à un pH déviant de la norme de 7,2.

Les quatre photos de *P. vivax* ci-dessous illustrent les effets du pH sur la coloration de Giemsa au niveau des parasites et des éléments figurés du sang. Dans la photo (a), on remarque la coloration d'un bleu-verdâtre marquée des érythrocytes à un pH de 7,6. On reconnaît un trophozoïte, mais les granulations de Schüffner dans le cytoplasme érythrocytaire sont délavées. À un pH de 7,4 (b), l'érythrocyte contenant un trophozoïte a une teinte bleu-verdâtre et, de nouveau, les granulations du Schüffner dans le cytoplasme sont pâles et à peine reconnaissables. Le pH de la solution tampon utilisée pour la coloration des parasites de la photo (c) était d'environ 7,0 : la chromatine et le cytoplasme ont bien pris la coloration, les granulations de Schüffner apparaissent clairement, ce qui facilite le diagnostic de *P. vivax*, en particulier parce qu'on y associe une hypertrophie des hématies infectées. Lorsqu'un frottis est préparé à partir de sang prélevé sur anticoagulant, le pH sanguin peut avoir changé et il peut alors s'avérer nécessaire d'ajuster le pH de la solution tampon, à tâtons et au prix d'erreurs. À un pH idéal de 7,2, les hématies ont un aspect rosé, les trophozoïtes prennent bien le colorant et les granulations de Schüffner sont bien visibles (d).



Plasmodium vivax dans la goutte épaisse

Les formes annulaires de *P. vivax* sont classiquement plus grandes que celles de *P. falciparum* (a-c, avec une double chromatine dans la photo c, flèche) et on observe sur la lame les « fantômes » rosâtres des hématies hypertrophiées (hémolysées) (b et c). Dans cette espèce, les trophozoïtes ont une taille et une forme très variables ; lorsque la coloration est de bonne qualité, les granulations de Schüffner délimitent clairement la place occupée par chaque hématie infectée (e et f). Dans la goutte épaisse, les parasites peuvent prendre une coloration intense et les formes de *P. vivax* peuvent avoir une taille assez grande (d et e). La présence du parasite à divers stades dans le frottis sanguin indique en général une infection à *P. vivax*, mais la personne qui examine la lame doit rester vigilante aux signes d'une infection mixte.



Même les schizontes immatures (g, h) sont plus grands que dans les autres espèces. À maturité (i), les schizontes contiennent de 12 à 24 mérozoïtes. On observe les différences habituelles de coloration entre les microgamétocytes (k) et les macrogamétocytes (l) matures bien que, pour l'observateur, il soit souvent difficile de faire la distinction entre des gamétocytes immatures et des trophozoïtes matures (j, flèche). Ce point n'a cependant pas beaucoup d'importance dans la pratique courante du diagnostic du paludisme au microscope.

Coloration de Giemsa pour mettre en évidence le paludisme dans le frottis

Cette technique est celle la plus utilisée dans le monde pour mettre en évidence les parasites du paludisme dans les frottis et la goutte épaisse.

Résultats de la coloration

Avec quelques variations entre les espèces, la chromatine des parasites prend une teinte d'un rouge rubis profond, le cytoplasme est bleu clair à mauve et les granulations de Schüffner dans les hématies infestées par *P. vivax* ou *P. ovale* apparaissent comme des points roses ou un « fantôme » rosé autour des parasites dans la goutte épaisse. La coloration des noyaux des leucocytes va d'une teinte presque noire à un violet intense, en fonction du type. Le frottis ne devrait comporter qu'une seule couche d'hématies colorées en gris-rose, tandis que la goutte épaisse idéale doit avoir une teinte entre blanc et gris clair, avec une vingtaine de leucocytes par champ.

Le colorant de Giemsa existe sous forme de solutions prêtes à l'emploi ou en poudre et, pour avoir un produit de qualité, il faut se le procurer auprès d'un fabricant reconnu. Comme la qualité du produit varie, il faut tester chaque nouveau lot de solution-mère (avec des lames positives) avant de l'employer.

Préparation d'une solution-mère de Giemsa

- Préparer 3,8 g de poudre de Giemsa, 250 ml de méthanol et 250 ml de glycérol.
- Mettre 50 billes de verre pleines dans un flacon en verre sec et chimiquement propre, verser la poudre de Giemsa et le méthanol.
- Bien fermer le flacon et bien l'agiter pendant 3 à 5 minutes.
- Ajouter le glycérol et remuer de nouveau le flacon ; agiter de nouveau six fois le flacon, toutes les 30 minutes.
- Les deux ou trois jours suivants, agiter le flacon trois ou quatre fois par jour pour obtenir un mélange homogène.
- Vous disposez maintenant d'une solution-mère de Giemsa ; versez-en 25 ml environ dans un autre flacon pour l'utilisation courante.
- Étiqueter la solution-mère en inscrivant la date de la préparation et le nom de la personne qui s'en est chargée.

Chacun des nouveaux lots de colorant doit être testé pour établir la dilution optimale et le temps de coloration. Les bouteilles de solution-mère doivent être bien fermées et conservées à l'abri de la lumière ; si elles sont en verre blanc, il faudra les recouvrir d'un papier sombre et épais.

Coloration d'une goutte épaisse et d'un frottis sur la même lame

Pour les examens microscopiques de routine, on a le choix entre deux méthodes. Chacune d'entre elle a pour but de permettre un examen efficace de la goutte épaisse correctement colorée ; le frottis sert à la fois pour le marquage de la lame et pour identifier les stades et/ou les espèces, lorsque ce n'est pas possible à partir de la goutte épaisse. Ces deux méthodes sont les suivantes :

La méthode rapide (à 10 %), utilisée couramment dans les dispensaires et les laboratoires procédant à un grand nombre d'examens.

La méthode lente (à 3 %), pour colorer un grand nombre de lames à des fins d'évaluation épidémiologique, d'enseignement et de recherche.

La méthode rapide (à 10 %)

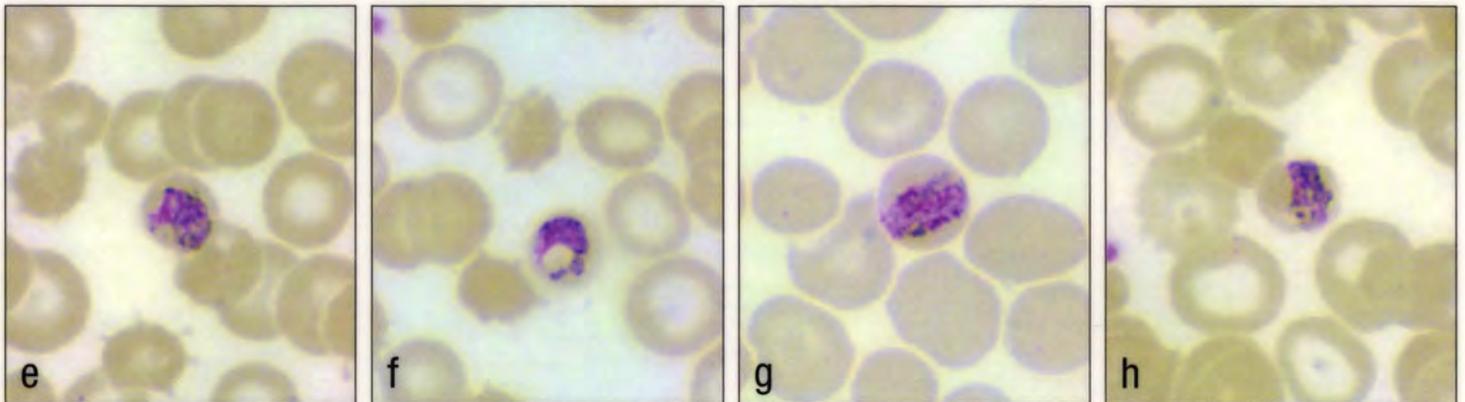
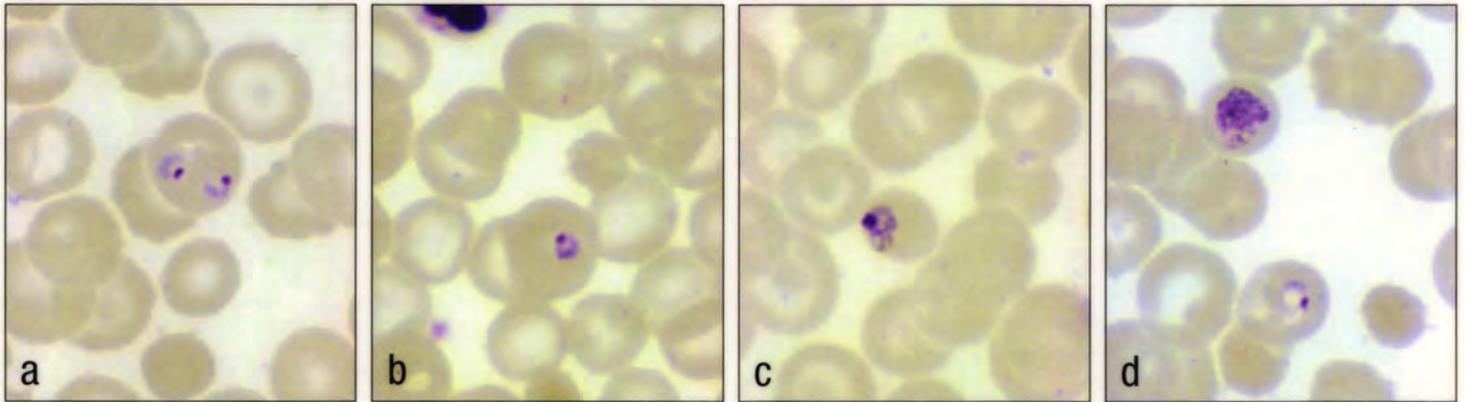
Elle convient aux laboratoires qui veulent un résultat rapide. Elle demande davantage de colorant que la méthode lente.

- Fixer le frottis en le recouvrant de quelques gouttes de méthanol au moyen d'une pipette de Pasteur ; laisser sécher. Éviter d'exposer la goutte épaisse au méthanol ou aux vapeurs de ce produit.
- Préparer une solution de Giemsa à 10 % dans de l'eau tamponnée à pH 7,2. Pour de petites quantités, verser trois gouttes de solution de Giemsa par ml de solution tampon pour obtenir la bonne concentration.
- La face de la lame portant le frottis vers le haut, verser doucement le colorant sur la lame. Autre solution, la lame peut être placée avec la face du frottis vers le bas, dans un plateau concave. On introduit alors doucement le colorant entre la lame et le plateau.
- Laisser colorer pendant une dizaine de minutes environ.
- Rincer doucement le colorant en ajoutant des gouttes d'eau pure. *Ne pas évacuer le colorant* en renversant la lame car des restes de colorant se déposent alors sur le frottis et rendent l'examen difficile.
- Laisser les lames sécher, la face portant le frottis vers le bas, sur un râtelier à lames.

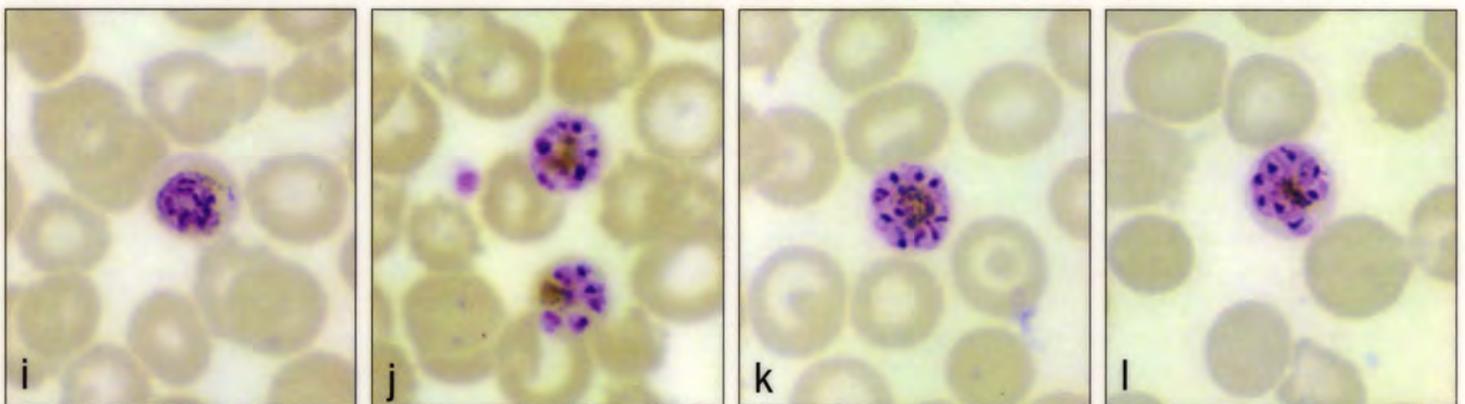
La méthode lente (à 3 %)

Elle sert à colorer des lots de 20 lames ou plus. Les frottis séchent en général pendant la nuit dans un dessiccateur, de sorte qu'ils adhèrent mieux à la lame et que la coloration est de meilleure qualité.

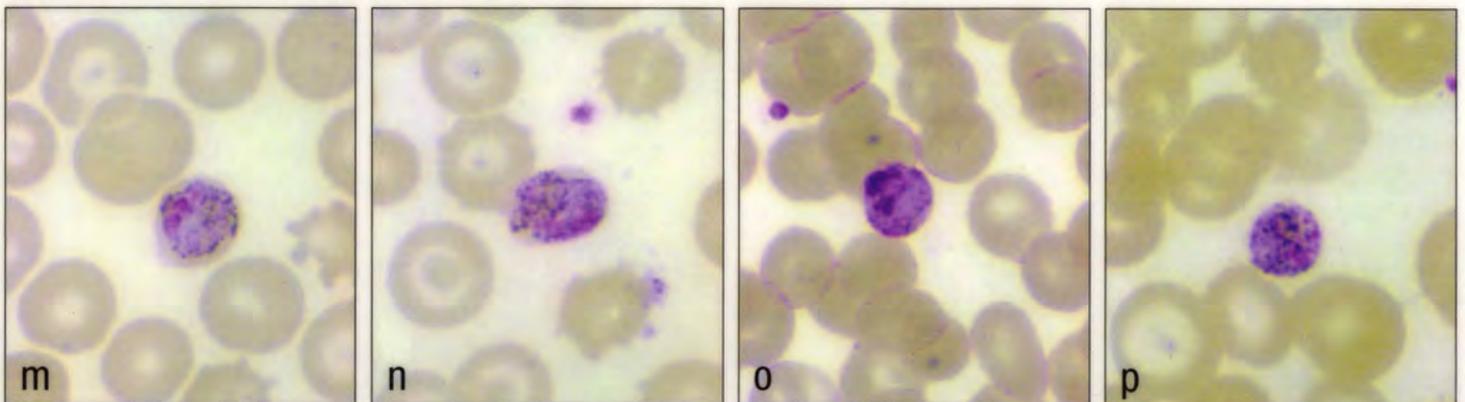
- Fixer les frottis au méthanol, comme d'habitude ; après séchage, mettre les lames dos à dos dans une cuve pour coloration, les frottis d'un côté et la goutte épaisse de l'autre.
- Préparer une solution de Giemsa à 3 % dans de l'eau tamponnée à pH 7,2 en ajoutant 3 ml de la solution-mère dans 97 ml d'eau tamponnée dans une éprouvette graduée. Bien mélanger.
- Verser le colorant dans la cuve sur les frottis en prenant soin de recouvrir entièrement les lames. Mettre la cuve à l'abri de la lumière solaire.
- Laisser colorer pendant 45 à 60 minutes. La goutte épaisse s'hémolyse rapidement avec cette méthode.
- En travaillant rapidement du côté des frottis, verser doucement de l'eau pure dans la cuve pour évacuer l'écume verdâtre et irisée ; ajouter de l'eau jusqu'à ce qu'elle ait complètement remplacé le colorant.
- Vider doucement l'eau.
- Retirer les lames avec soin et les placer sur un râtelier, la face portant les frottis vers le bas. Vérifier que les frottis ne sont pas en contact avec le râtelier.

***Plasmodium malariae* dans le frottis**

Trophozoïtes. On trouve *P. malariae* dans les hématies matures. Les formes en anneau sont plus distinctes que pour les autres espèces et le cytoplasme, plus compact, prend une teinte bleue plus foncée ; des granules de pigment brun foncé à noir apparaissent aussi rapidement (**d, e**). Il n'y pas d'hypertrophie des hématies. Les trophozoïtes ont des formes typiques en « œil d'oiseau », dans lesquelles la chromatine se localise au centre de la vacuole, en « panier » (**f**) ou en « bandes » (**g, h**), considérées comme caractéristiques de l'espèce. La coloration de Giemsa ne permet pas de mettre en évidence des granulations de Ziemann sans une prolongation importante du temps de coloration ; on ne les voit alors que que dans les grandes formes en anneau. Les trophozoïtes matures remplissent presque complètement l'hématie parasitée.



Schizontes. On observe dans les schizontes immatures peu de divisions de la chromatine (**i**), mais les schizontes matures renferment de 8 à 12 mérozoïtes, dont la disposition caractéristique prend la forme d'une « rosette » entourant une masse pigmentaire de couleur brun foncé (**k**). En général, les schizontes remplissent l'hématie et il arrive d'observer la masse pigmentaire à la périphérie du parasite (**j, l**).



Gamétocytes. Comme pour *P. vivax* et *P. ovale*, il est souvent difficile de faire la distinction entre les trophozoïtes matures et les gamétocytes. Les macrogamétocytes (**m, n**) ont un cytoplasme bleu clair avec une masse chromatique rouge plus compacte que pour les microgamétocytes (**p, o**). Le pigment noir ou brun foncé est dispersé dans tout le cytoplasme de tous les gamétocytes (**m-p**) et peut donner l'impression que le cytoplasme est d'un bleu plus foncé que dans les trois autres espèces.

Plasmodium falciparum

P. falciparum est la plus importante des quatre espèces provoquant le paludisme chez l'homme et il est très largement répandu dans toutes les régions tropicales et subtropicales d'Afrique et d'Asie. En Afrique subsaharienne, il est à l'origine de pratiquement tous les cas de paludisme notifiés, y compris sous la forme d'infections mixtes. Avec la rougeole, la malnutrition, les diarrhées et la pneumonie, il est l'une des principales causes de mortalité des enfants de moins de 5 ans. Dans les zones de forte endémie, il s'accompagne souvent d'anémies sévères et il est une cause importante de mortalité fœtale. Dans les zones de faible transmission, les populations sont exposées au risque à tous les âges et les épidémies de paludisme à *P. falciparum* font des milliers de morts. Lorsque l'immunité contre le paludisme est faible, une infection peut évoluer rapidement en forme aiguë, provoquant des lésions sévères dans le cerveau et d'autres organes. Le paludisme cérébral se caractérise par un coma aboutissant souvent au décès ; en cas de guérison, certains patients gardent des séquelles neurologiques. Comme *P. falciparum* ne produit pas d'hypnozoïtes, il n'y a qu'une seule génération de schizogonie tissulaire. On peut observer des recrudescences pendant une période allant jusqu'à 18–24 mois après l'infection initiale, mais ce point est difficile à surveiller dans les zones de transmission constante.

Plasmodium vivax

Cette espèce est présente dans toutes les régions tropicales et subtropicales et dans quelques zones tempérées. Avec les millions de journées d'absentéisme qu'elle entraîne au travail et dans les écoles, elle est un facteur déterminant et aggravant de la pauvreté. Elle est rarement mortelle. En Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale, elle est rare, à cause du nombre important de sujets Duffy-négatifs qui semblent être résistants à *P. vivax*. Dans ces régions, celui qui observe une infection de type *P. vivax* doit tout d'abord exclure l'infection à *P. ovale* avant de poser le diagnostic.

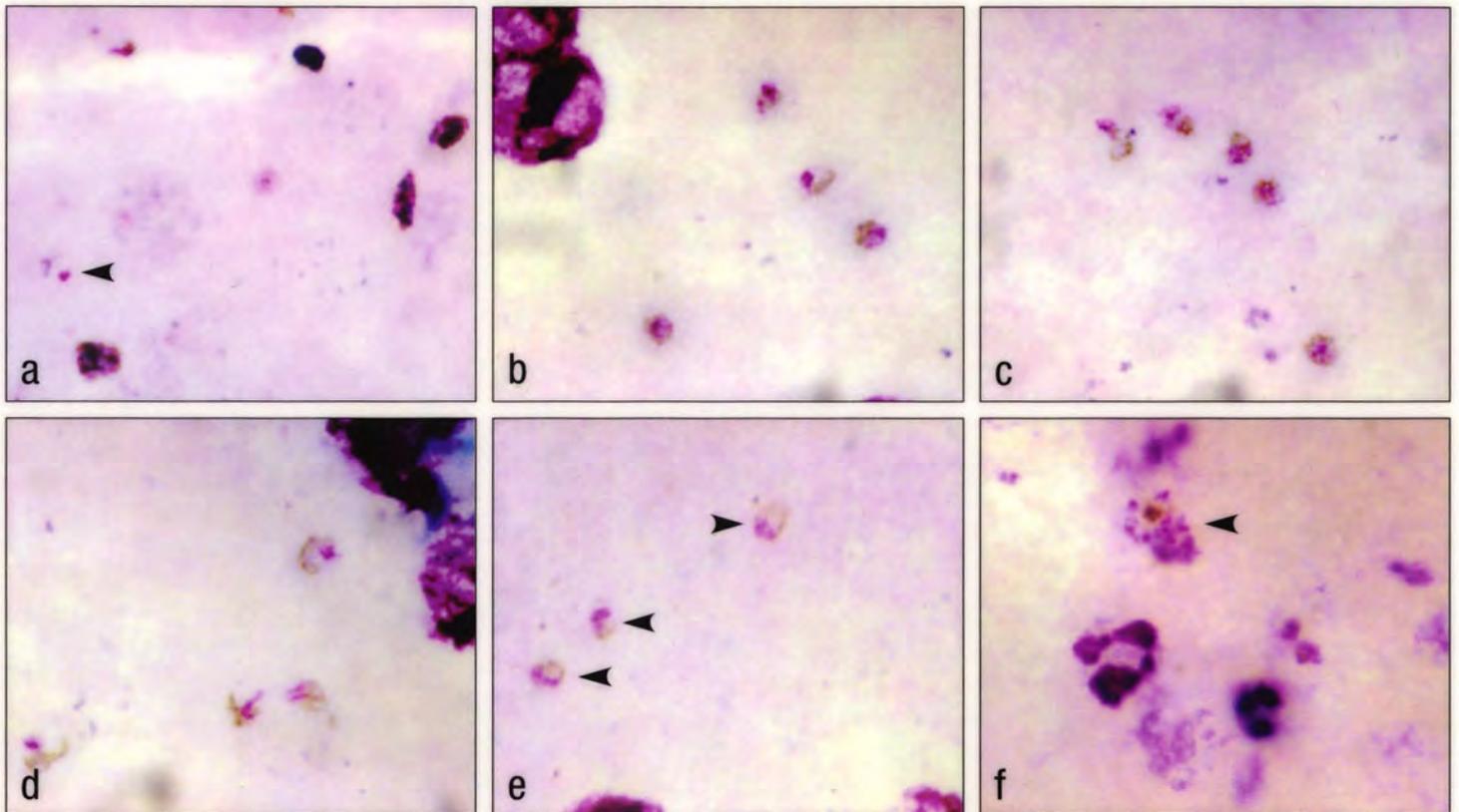
La durée d'incubation va de 13 à 17 jours, mais elle peut atteindre, pour certaines souches, de 6 à 12 mois, bien que cette période de latence soit difficile à mettre en évidence dans les régions tropicales. L'une des caractéristiques importantes de l'espèce est la présence persistante dans le foie « d'hypnozoïtes », un stade exo-érythrocytaire à l'origine des rechutes pouvant survenir plusieurs mois, voire plusieurs années après.

On observe en général de nombreuses formes jeunes en anneau dans la goutte épaisse ; les gamétoytes apparaissent dans les infections plus anciennes. Dans cette espèce, les trophozoïtes matures et les schizontes sont séquestrés profondément dans les principaux organes et on les voit rarement. La présence de schizontes caractéristiques dans les frottis de sang périphérique est en général un indice de gravité de l'état médical du patient. On peut observer du pigment malarique dans le cytoplasme des phagocytes qui ont ingéré des cellules parasitées. Il arrive de voir chez des patients asymptomatiques, des gamétoytes qui peuvent infecter les moustiques.

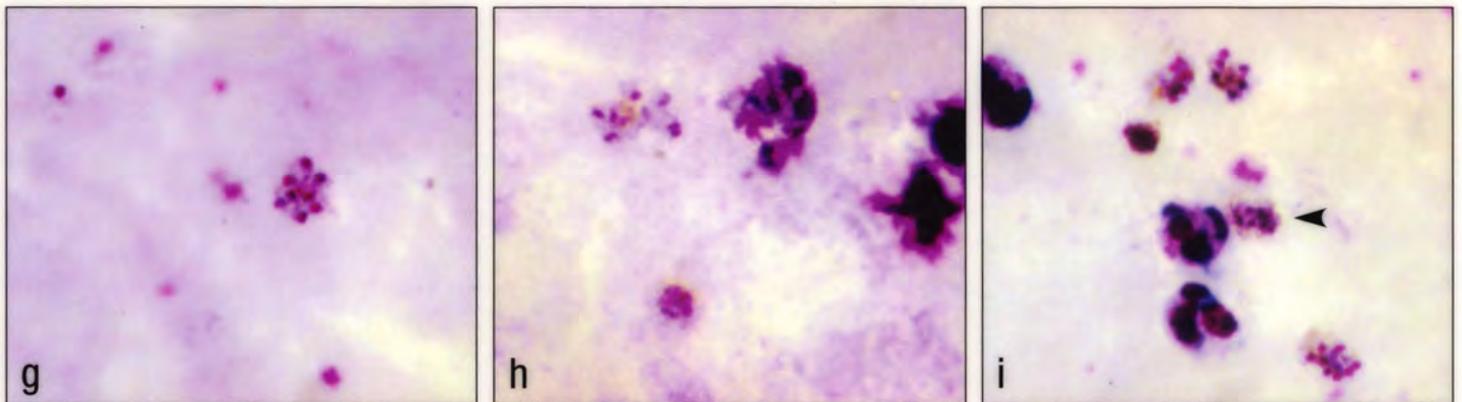
La présence uniquement de formes en anneau en grand nombre est très évocatrice d'un paludisme à *P. falciparum*. Quand on ne voit que quelques anneaux, l'identification de l'espèce peut s'avérer difficile. Dans les frottis, les formes marginales (« accolées » ou « appliquées ») sur le bord des érythrocytes, des infections multiples dans les hématies et de nombreux petits anneaux avec une double tâche de chromatine étayent le diagnostic de paludisme à *P. falciparum*.

Le cycle érythrocytaire est d'environ 48 heures. Il n'est pas rare de trouver des trophozoïtes, des schizontes et des gamétoytes dans les frottis de sang périphérique.

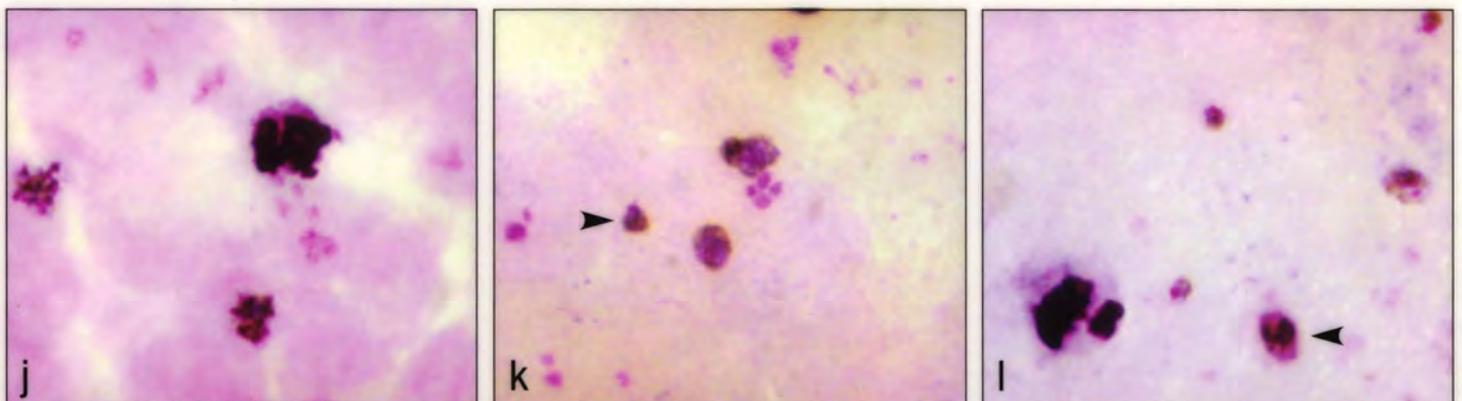
Il est difficile de poser un diagnostic quand on ne voit que quelques anneaux dans un frottis et il peut s'avérer nécessaire d'approfondir l'examen à d'autres stades parasitaires et de rechercher des granulations de Schüffner dans les hématies infectées et hypertrophiées. L'examen courant de la goutte épaisse met généralement en évidence divers stades parasitaires. L'examen attentif des bords de la goutte épaisse permet souvent de voir des parasites entourés par le « fantôme » rosé des hématies et d'autres signes de granulation.

***Plasmodium malariae* dans la goutte épaisse**

Trophozoïtes. Ils sont petits, avec un cytoplasme compact ; l'anneau est parfois incomplet ou il n'y a pas de vacuole (a-c) et on voit en général une grande tâche de chromatine. On observe dans le même champ des trophozoïtes de petite et grande taille (e). Des granules de pigment brun foncé ou noir se forment rapidement et colorent le cytoplasme en bleu encore plus foncé. Tous les stades sont présents, mais il peut n'y avoir que peu de trophozoïtes (f, schizonte indiqué par la flèche et trophozoïtes).



Schizontes. On voit dans les photos (g-i) des schizontes matures, chacun avec 8 mérozoïtes ; à la photo (h), les mérozoïtes semblent être sur le point de commencer à se séparer mais l'état des leucocytes indique que le délai prolongé pour traiter le sang a affecté la morphologie. La teinte bleutée du fond du champ peut ajouter une nuance générale grisâtre compliquant la reconnaissance de certains parasites.



Gamétocytes. Bien qu'on observe en général tous les stades de développement dans un frottis, même avec une faible densité parasitaire, leur reconnaissance peut s'avérer difficile. Sur la photo (k), on aperçoit deux gamétocytes plus grands que le trophozoïte indiqué par la flèche tandis que, sur la photo (l), on voit un gamétocyte (flèche), avec de petits trophozoïtes en anneau et en phase de croissance. Comme pour *P. vivax* et *P. ovale*, il est parfois difficile de faire la distinction entre les trophozoïtes matures et les gamétocytes.

Examen habituel des frottis sanguins

Examen de la goutte épaisse

On procède généralement à cet examen dans la mesure où les frottis ont été correctement préparés et colorés, l'identification des stades et des espèces ne devrait pas poser beaucoup de problèmes.

Méthode

- Posez la lame sur la platine et mettez la goutte épaisse sous l'objectif x10 (X dans la figure 1).
- Mettez une goutte d'huile à immersion sur le frottis et réglez le microscope pour vérifier que vous êtes bien au bon endroit du frottis.
- Passez à l'objectif à immersion x100 et baissez-le jusqu'à ce que la lentille vienne en contact avec l'huile. Ajustez le réglage et vérifiez que vous avez bien sélectionné la partie du frottis qui convient le mieux pour l'examen, avec 15 à 20 leucocytes par champ.
- En suivant le parcours tel que représenté sur le schéma, examinez au minimum 100 champs avant de déclarer qu'une lame est négative ; si vous n'êtes pas sûr de l'espèce, examinez 100 autres champs pour détecter une infection mixte éventuelle.

Un compteur manuel vous aidera à compter les champs examinés. Pour une personne expérimentée, l'examen de 100 champs à l'objectif à immersion prend une dizaine de minutes environ.

Examen du frottis

L'examen d'une quantité équivalente de sang prend beaucoup plus de temps pour un frottis que pour une goutte épaisse. Le seul avantage du frottis est de faciliter l'identification de la morphologie parasitaire quand on manque d'expérience.

Méthode

- Comme pour la goutte épaisse, on met une goutte d'huile à immersion sur le frottis (X dans la figure 1).
- Avec l'objectif x10 puis l'objectif à immersion x 100, on vérifie que la partie du frottis est bien celle qui convient et on examine la lame en suivant le parcours indiqué dans la figure 2.

Figure 1. Examen d'une goutte épaisse

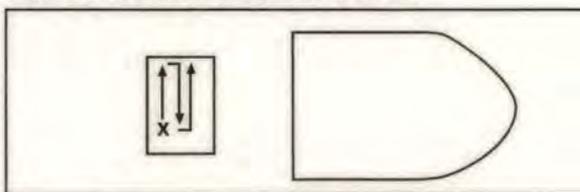
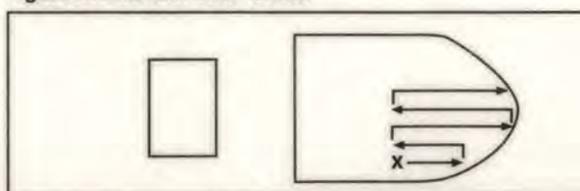


Figure 2. Examen d'un frottis



Numération des parasites dans la goutte épaisse

Il peut s'avérer nécessaire de déterminer la densité parasitaire pour :

- établir et surveiller le degré de gravité de l'infection, ainsi que l'effet du traitement ;
- tester la sensibilité du parasite aux médicaments ou les effets de nouveaux traitements ;

Remarque : Les étapes ci-après ne s'appliquent qu'après avoir achevé le premier examen et posé le diagnostic.

Matériel supplémentaire requis :

- deux compteurs manuels,
- une calculette électronique,
- une minuterie de laboratoire.

La pratique normale consiste à compter toutes les formes asexuées. S'il faut faire une numération des gamétocytes de *P. falciparum*, celle-ci doit être faite et enregistrée séparément.

Méthode 1

- Sélectionner la meilleure partie du frottis (voir planche 4b). Puis, champ après champ, compter le nombre de parasites observés sur l'un des compteurs et le nombre de leucocytes sur le second compteur.
- On calcul le nombre de parasites par microlitre en comptant leur nombre par rapport au nombre standard de leucocytes (8000). Si on a besoin d'une plus grande précision, on calculera la densité parasitaire à partir du chiffre exact de la numération leucocytaire.
- Si, après avoir compté 200 leucocytes, on a trouvé au moins 100 parasites, le résultat sera inscrit sur le formulaire sous la forme : nombre de parasites/200 leucocytes. Si le nombre des parasites est de 99 ou moins, on poursuivra la numération jusqu'à avoir compté 500 leucocytes.
- Une fois la numération terminée, on peut calculer le nombre de parasites par rapport au nombre de leucocytes et exprimer le résultat en nombre de parasites par microlitre de sang en appliquant la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de parasites comptés}}{\text{Nombre de leucocytes comptés}} \times 8000 = \text{nombre de parasites}/\mu\text{l de sang}$$

On ne compte normalement que les formes asexuées.

Méthode 2

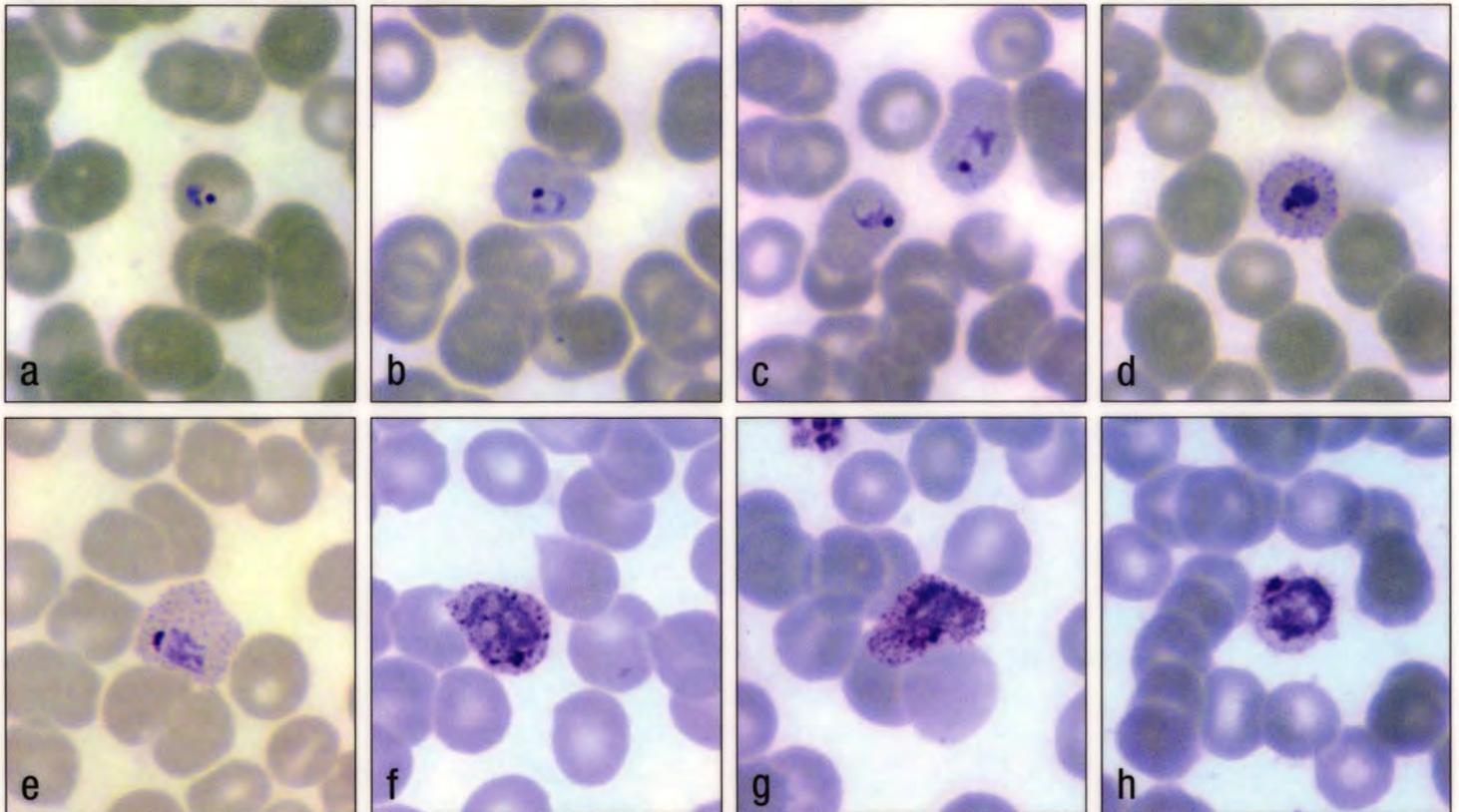
La plupart des personnels de laboratoire considèrent cette méthode comme désuète en raison de son manque de fiabilité. On ne l'appliquera que quand la méthode 1 est impossible à mettre en œuvre.

Le système repose sur un code allant de 1 à 4 + comme suit :

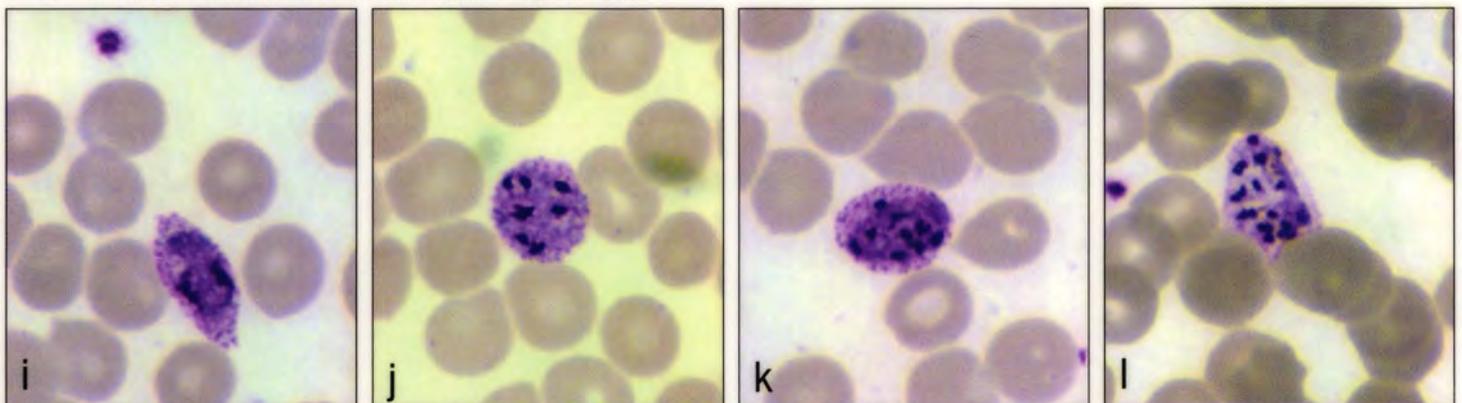
- + = 1 à 10 parasites par 100 champs de la goutte épaisse
- ++ = 11 à 100 parasites par 100 champs de la goutte épaisse
- +++ = 1 à 10 parasites par champ de la goutte épaisse
- ++++ = à partir de 11 parasites par champ de la goutte épaisse.

Plasmodium ovale dans le frottis

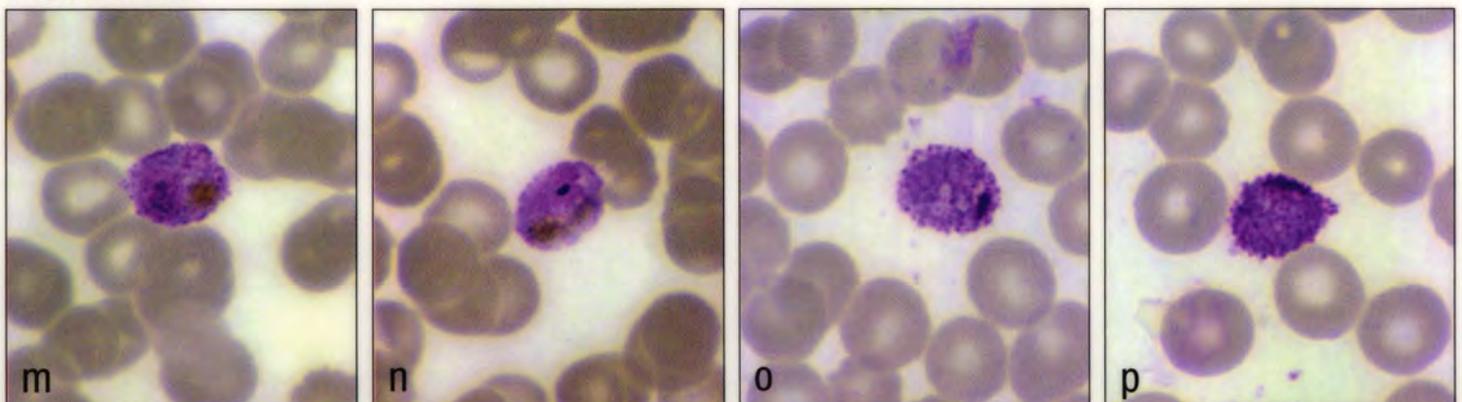
La bonne qualité générale des colorations montrées sur cette planche illustre bien la facilité avec laquelle on peut poser un diagnostic. La description de *P. ovale* indiquant que c'est « un parasite ressemblant à *P. malariae* dans une hématie semblable à celle infestée par *P. vivax* » est utile (voir **d–g, i, j**), bien qu'on insiste rarement sur l'hypertrophie modérée des hématies dans le cas de *P. ovale*.



Trophozoïtes. Comme *P. vivax*, *P. ovale* préfère les jeunes hématies et il est pratiquement impossible de distinguer les jeunes trophozoïtes de ceux des autres espèces (**a, b**) ; l'hypertrophie cellulaire et les granulations permettent de mieux identifier l'espèce (**c–e**). Les trophozoïtes peuvent prendre rapidement la forme ovale qui a donné son nom à cette espèce mais elle est due en grande partie à l'état du frottis. Les parasites ont une chromatine dense, avec moins de formes amiboïdes (**f**). L'aspect frangé des contours de l'hématie est souvent un facteur décisif pour le diagnostic (**h, i**).



Schizontes. On les reconnaît facilement à la clarté de la coloration et à la séparation entre les mérozoïtes, l'hypertrophie cellulaire modérée, les formes ovales fréquentes de *P. ovale* et les granulations de Schüffner (**i–k, l**). Le nombre de mérozoïtes se situe entre 6 et 12 mais peut atteindre 18. Le pigment forme de petits amas au centre de la masse du schizonte.



Gamétocytes. Il y a la même différenciation entre les macrogamétocytes et les microgamétocytes que celle observée avec *P. vivax* et *P. malariae* (**m–p**). Le gamétocyte remplit l'hématie hypertrophiée, tandis qu'on distingue clairement les granulations de Schüffner sur les bords irréguliers (**o, p**). Le pigment se présente sous la forme de granules bruns dispersés dans tout le cytoplasme, formant à un stade ultérieur une masse brune foncée avec une teinte verdâtre. Dans les frottis bien colorés, les granulations de Schüffner apparaissent clairement sous la forme de granules ronds et roses.

Coloration rapide des frottis sanguins pour la recherche des parasites du paludisme

On considère que la coloration au Giemsa est la référence pour le diagnostic des infections palustres au microscope, mais les colorations rapides peuvent également jouer un rôle utile lorsqu'il faut examiner d'urgence une goutte épaisse. Dans la plupart des cas, les colorations rapides sont à base d'eau et ont une propension au développement des moisissures. Une filtration régulière aide à lutter contre cet inconvénient. En général, la coloration est très satisfaisante et de nombreux laboratoires utilisent couramment ces méthodes. Nous allons décrire ici la coloration de Field, mais il existe d'autres techniques, comme JSB et Wright (voir les références bibliographiques).

Préparations des solutions-mères pour la coloration de Field

On utilise ces solutions pour la détection rapide des parasites du paludisme dans la goutte épaisse : le cytoplasme se colore en bleu, la chromatine en rouge, les granulations de Schüffner n'apparaissent pas toujours clairement et la qualité de la coloration peut être inégale d'une partie à l'autre du frottis, en partie à cause des différences d'épaisseur. Les solutions A et B utilisées pour cette méthode peuvent être préparées à partir de poudres prêtes à l'emploi.

Solution-mère du colorant A de Field:

- Mettre 5,9 g de poudre de colorant A de Field dans 600 ml d'eau distillée chaude (à 60 °C).
- Mélanger jusqu'à dissolution.
- Filtrer à froid.

Solution-mère du colorant B de Field

- Mettre 4,8 g de poudre de colorant B de Field dans 600 ml d'eau distillée chaude (à 60 °C).
- Mélanger jusqu'à dissolution.
- Filtrer à froid.

Coloration de Field de la goutte épaisse

Il ne faut pas fixer la goutte épaisse.

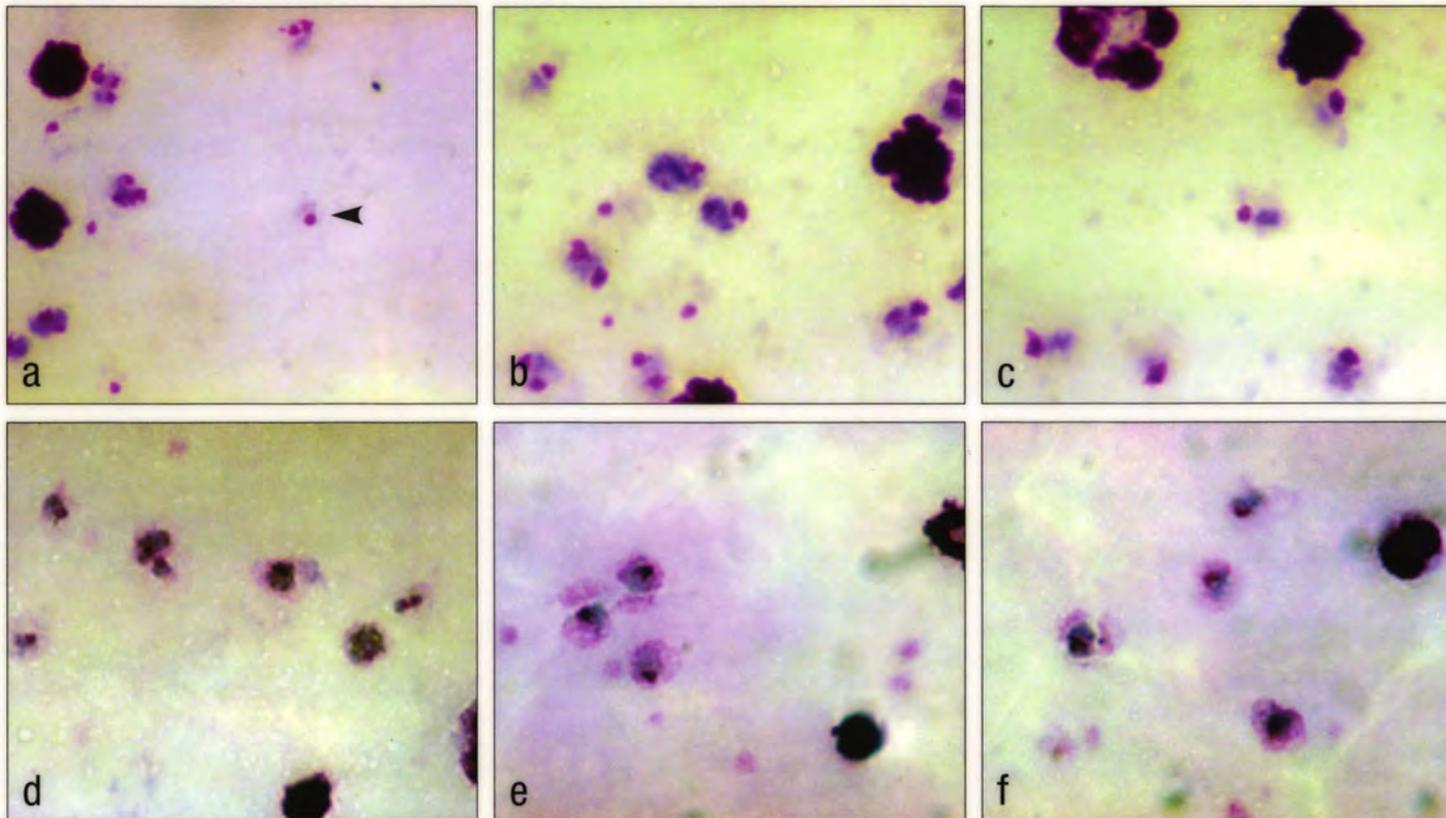
- Tremper le frottis pendant 4 secondes dans une cuve de Coplin remplie de colorant A de Field.
- Rincer doucement à l'eau propre pendant 5 secondes.
- Tremper la lame pendant 4 secondes dans la cuve remplie de colorant B de Field.
- Rincer doucement le frottis à l'eau propre pendant 5 secondes.
- Laisser sécher à l'air libre sur un râtelier.

Coloration de Field des frottis

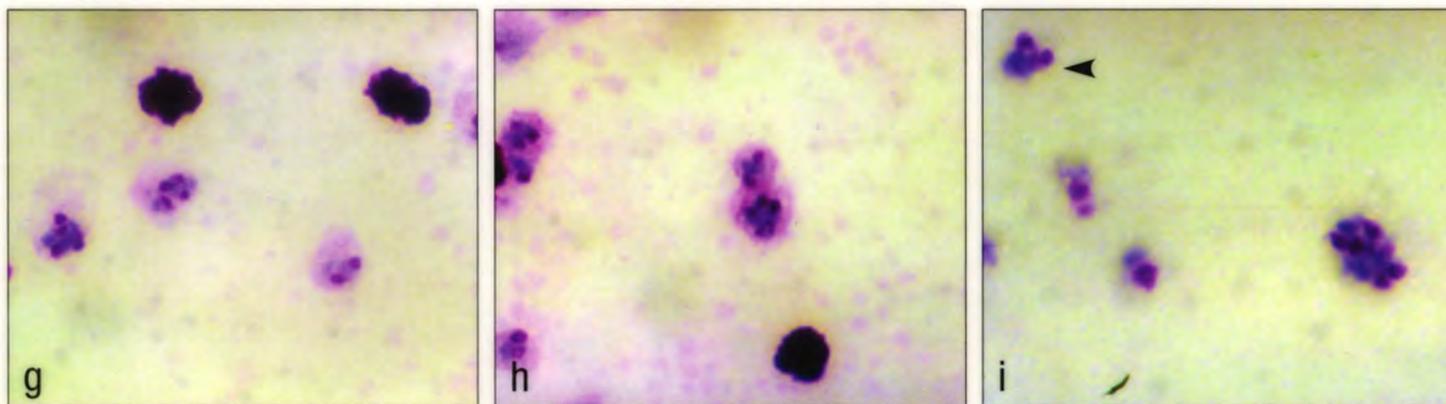
- Fixer le frottis au méthanol pendant une minute.
- Rincer à l'eau propre.
- Couvrir le frottis de colorant B de Field dilué (1 volume de solution-mère dans quatre volumes d'eau tamponnée à pH 7,2).
- Ajouter immédiatement un volume égal de colorant A de Field et bien mélanger le tout en remuant la lame.
- Laisser colorer une minute.
- Rincer le colorant avec de l'eau propre.
- Laisser sécher à l'air libre sur un râtelier.

Plasmodium ovale dans la goutte épaisse

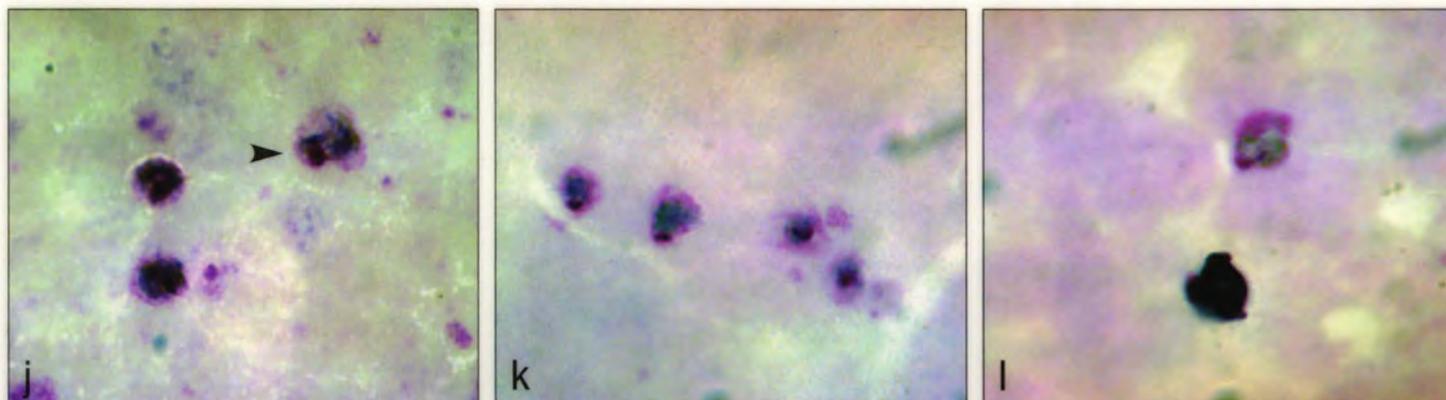
On observe en général dans les frottis tous les stades parasitaires, mais les schizontes peuvent être moins nombreux



Trophozoïtes. Les formes en anneau ressemblent à celles de *P. vivax*, avec une tâche de chromatine bien visible et une masse cytoplasmique bleue dont la taille varie avec l'âge du trophozoïte (a, jeune trophozoïte indiqué par la flèche) ; les trophozoïtes plus âgés peuvent être amiboïdes (e, f), avec des granulations de Schüffner formant une auréole rosée autour du parasite (d-h).



Schizontes. Il peut y avoir quelques schizontes, de taille comparable à ceux de *P. malariae*. On observe dans le même champ un trophozoïte immature (i, flèche) avec des schizontes qui se sont probablement séparés précédemment d'un schizonte mature. Il y a de 6 à 12 mérozoïtes et le pigment se localise au centre, dans une masse brunâtre (h).



Gamétocytes. Il peut s'avérer difficile de les différencier des trophozoïtes matures et ils sont d'une taille comparable à ceux de *P. vivax* (k, deux gamétocytes sur la gauche, deux trophozoïtes sur la droite). Le pigment est généralement brun, avec de gros grains et une répartition uniforme dans tous le parasite (j, flèche).

Plasmodium malariae

La distribution géographique de cette espèce est étendue, mais parcellaire, surtout dans les régions tropicales et subtropicales du monde et sa prévalence est plus faible que celles de *P. falciparum* et *P. vivax*.

La durée d'incubation est longue, allant de 23 à 69 jours et le développement est lent, que ce soit chez l'homme ou chez le vecteur, *Anopheles*. On n'a pas mis en évidence de stade hypnozoïte, mais bien que cette espèce n'ait qu'un cycle de schizogonie exo-érythrocytaire, elle vit plus longtemps que les trois autres. On a signalé des persistance de plus de 50 ans à partir de l'infection initiale. En l'absence d'hypnozoïtes, quelques rares parasites asexués persistent dans les tissus profonds de l'organisme et provoquent des recrudescences quand les conditions sont favorables. Dans certaines régions tropicales de l'Afrique de l'Est, de l'Ouest, d'Amérique centrale et du Pacifique (Papouasie-Nouvelle-Guinée), on considère que les accès répétés et chroniques de paludisme à *P. malariae* chez les enfants de moins de 15 ans sont à l'origine du syndrome néphrotique, une affection rénale grave de mauvais pronostic.

Le cycle érythrocytaire dure 72 heures. Les infections mixtes avec *P. malariae* et une ou plusieurs autres espèces sont assez courantes. On observe tous les stades parasitaires dans le sang périphérique, mais la densité parasitaire peut rester faible. Il n'y a pas d'hypertrophie des hématies infectées. La mise en évidence de tâches de Ziemann roses caractéristiques de cette espèce suppose une coloration prolongée ou particulière, et l'on estime

qu'elle a une valeur diagnostique limitée.

Le parasite est petit, avec un cytoplasme se colorant en bleu foncé, parfois presque noir, paraissant souvent encore plus sombre du fait de la présence précoce de granules de pigment brun à noir et dispersés. La chromatine est d'un rouge rubis profond. Dans les frottis, on observe en général la forme « en bande » que l'on considère comme une forme distinctive de l'espèce. Il arrive d'observer des formes comparables avec *P. vivax* et *P. ovale* dans les frottis. Certains microscopistes font valoir que l'absence apparente de cette forme dans la goutte épaisse pourrait indiquer qu'il s'agit d'un artéfact créé lors de la préparation du frottis. Le diagnostic de l'espèce dans la goutte épaisse n'est pas difficile pour autant. Il faut faire attention de ne pas la confondre avec *P. ovale*, qui ne présente pas de granulations de Schüffner avec une coloration normale. Dans les frottis comme dans la goutte épaisse, le schizonte de *P. malariae*, souvent appelé « rosette » à cause de sa forme distinctive et de son petit nombre de mérozoïtes (8 à 12), est caractéristique de l'espèce.

Dans certaines régions isolées de l'Asie du Sud-Est, on a montré récemment par PCR que quelques cas, attribués à *P. malariae* suite à un examen au microscope, étaient en fait dus à *P. knowlesi*, un parasite naturel du macaque. On pense que les cas d'infections humaines sont rares et surviennent à l'occasion de nuits passées dans des habitats forestiers sans aucune protection.

Plasmodium ovale

À l'échelle mondiale, *P. ovale* semble avoir une distribution géographique plus limitée que les trois autres espèces. On le trouve principalement en Afrique tropicale, où *P. vivax* est moins courant, mais on l'a aussi signalé en Chine, en Papouasie-Nouvelle-Guinée, aux Philippines, en Thaïlande et au Viet Nam et des rapports isolés ont été reçus en provenance de Malaisie et du Vanuatu. Comme les observateurs moins expérimentés risquent de confondre *P. ovale* avec *P. vivax*, la distribution pourrait être plus étendue que celle qu'on connaît actuellement. Comme *P. vivax*, sa période d'incubation est de 16 à 18 jours, le cycle asexué de 50 heures environ et il y a des stades persistants dans le foie sous la forme d'hypnozoïtes exo-érythrocytaires, entraînant des rechutes de temps à autres.

On peut observer tous les stades dans les frottis de sang périphérique. L'hypertrophie cellulaire des hématies est typique, mais elle est moindre que pour *P. vivax*. Les granulations de Schüffner (aussi appelées granulations de James) apparaissent plus tôt chez les jeunes trophozoïtes qu'avec *P. vivax* ; les granulations roses sont plus visibles, plus arrondies et, parfois, masquent presque le parasite.

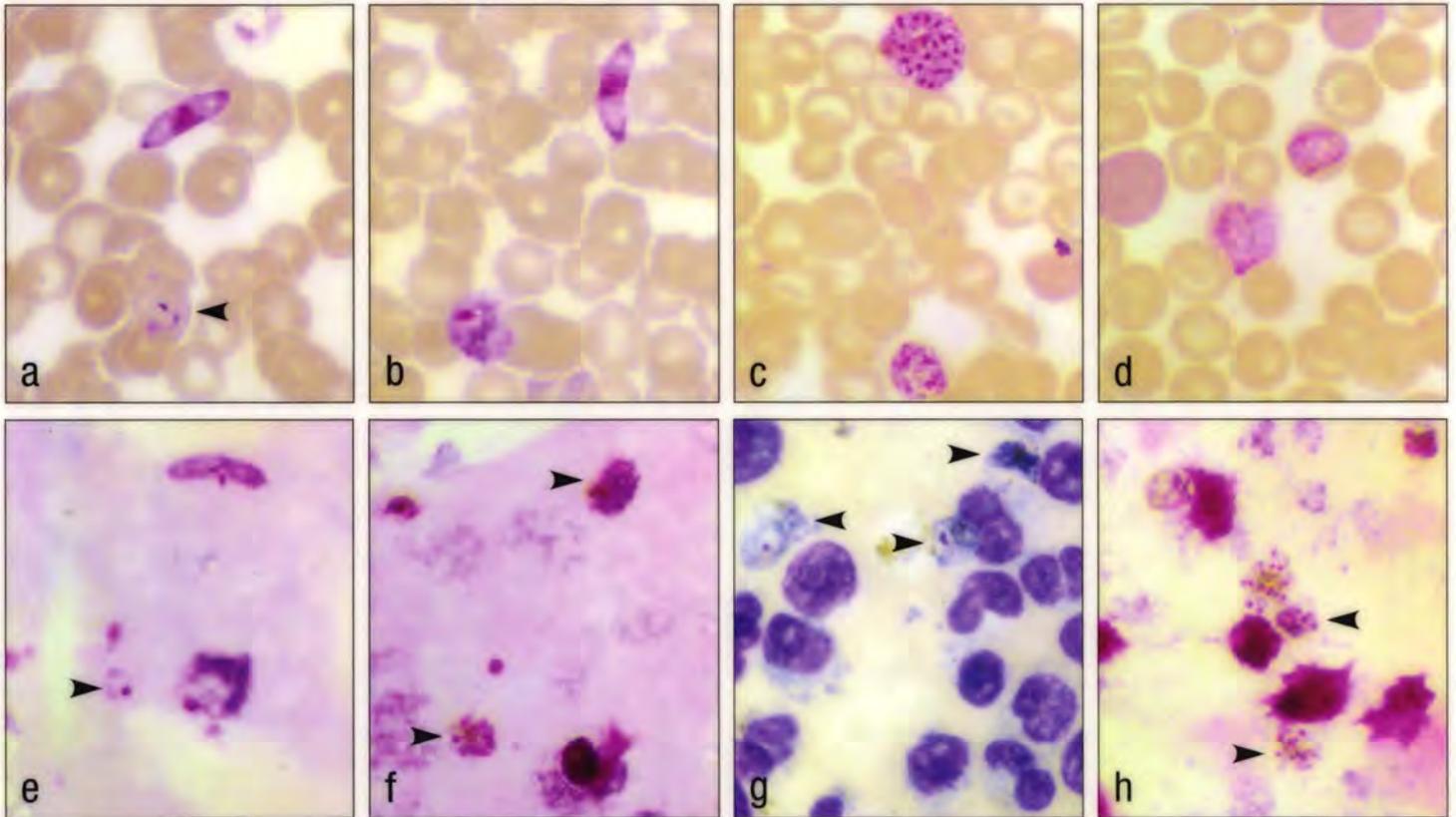
Fréquemment décrite comme « un parasite ressemblant à *P. malariae* dans une hématie semblable à celles infestées par *P. vivax* », cette espèce est la plus difficile à identifier en raison de ses ressemblances morphologiques avec *P. malariae* comme avec *P. vivax*. Il arrive de voir des hématies infectées ovales ou allongées dans les frottis et cet élément peut être considéré comme décisif, même si on sait que ce phénomène se produit aussi dans les infections à *P. vivax*, mais moins fréquemment. On trouve davantage de formes ovales quand les frottis sont préparés dans un milieu avec un faible taux d'humidité. Les antécédents du patient peuvent être une aide précieuse au diagnostic : on sait que *P. ovale* persiste dans de petites communautés isolées, à l'instar de *P. malariae* et il faudra donc être prudent avant de poser le diagnostic définitif. On observe fréquemment *P. ovale* dans les infections mixtes.

Infections mixtes

On doit s'attendre en permanence à trouver des infections avec plusieurs espèces, même dans les zones où le paludisme est rare. Cette attitude permet alors aux microscopistes de mieux se préparer à distinguer les différents stades et espèces dans un même frottis. Les infections mixtes à *P. falciparum* et *P. vivax* sont probablement les plus courantes, mais il n'est pas rare de voir, dans des zones fortement impaludées, trois espèces dans le frottis d'un seul patient. Les infections mixtes pourraient avoir un caractère saisonnier et sont plus fréquentes en période de forte transmission. La densité d'une espèce peut être plus forte et masquer la présence de l'autre espèce. Il peut y avoir une alter-

nance de cette prédominance au cours du temps chez le patient. Les microscopistes expérimentés arrivent à diagnostiquer les infections mixtes dans la goutte épaisse, mais ceux qui ont moins d'expérience doivent parfois examiner aussi le frottis à côté de la goutte épaisse pour parvenir à un diagnostic définitif : *P. falciparum* et *P. vivax* (a, b) ; *P. vivax* et *P. malariae* (c).

Trophozoïte de *P. malariae*, en forme de bande, dans un érythrocyte de taille normale et trophozoïte beaucoup plus grand de *P. vivax* dans une hématie hypertrophiée avec des granulations de Schüffner (d).



Anticoagulants et difficultés du diagnostic des infections mixtes

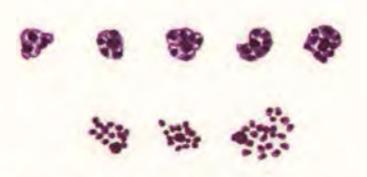
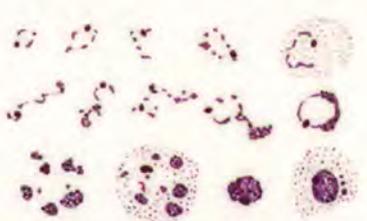
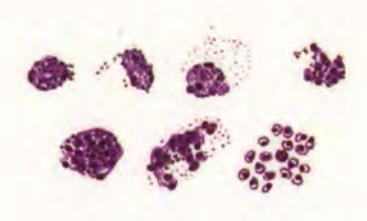
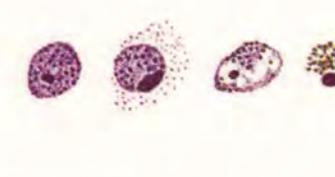
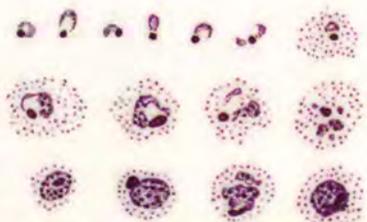
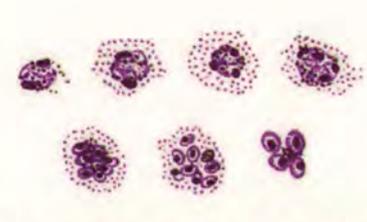
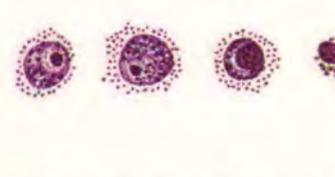
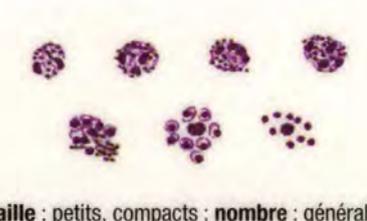
L'identification du stade et des espèces dépend d'un certain nombre de facteurs :

- l'état du sang au moment où les frottis sont préparés,
- la qualité des frottis réalisés à partir de ce sang,
- la qualité de la coloration,
- l'état du microscope,
- les conditions d'utilisation du microscope,
- l'expérience du microscopiste.

Ces facteurs sont interdépendants et chacun influe sur l'issue du diagnostic. L'utilisation d'un anticoagulant ajoute un problème supplémentaire, car il peut modifier le pH du sang, ce qui peut avoir des répercussions sur la qualité de la coloration. On préférera l'EDTA quand on doit faire une coloration de Giemsa, bien qu'il altère légèrement celle-ci. Des modifications morphologiques peuvent survenir, tant au niveau des parasites que des éléments cellulaires du sang, quand l'échantillon reste un certain temps sur une paillasse ou dans un réfrigérateur. Ces modifications interviennent rapidement quand le sang se refroidit (voir la planche 2b, photos (o) et (p), à gauche montrant des micro-

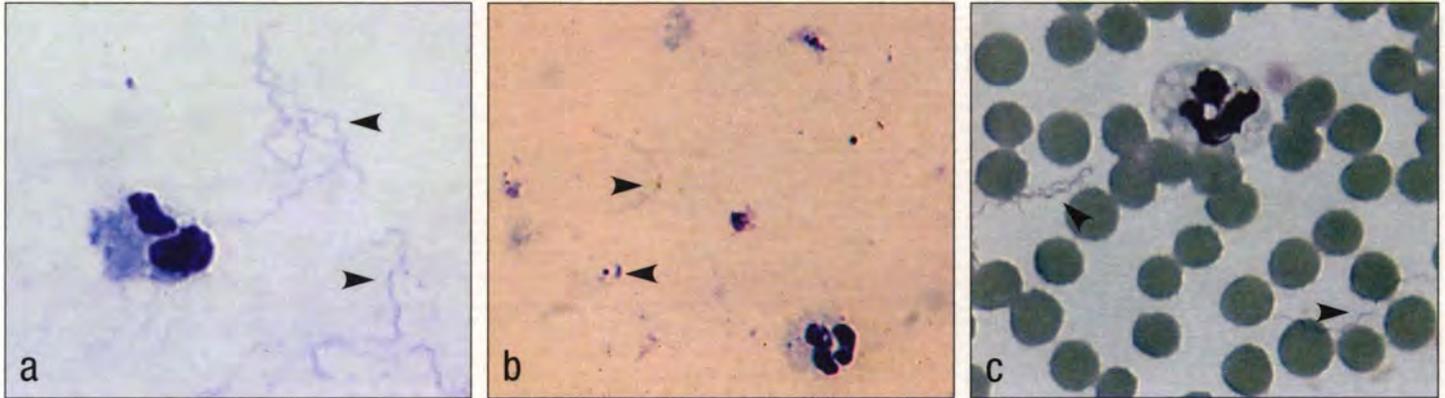
gamétocytes en exflagellation) et les parasites commencent à se déformer à cause de la baisse de la température. L'identification du stade et de l'espèce se complique donc rapidement et finit par devenir impossible. Dans ce type de situation, ceux qui procèdent à l'examen doivent décider s'ils observent **plusieurs stades de différentes espèces** et non pas **plusieurs stades d'une même espèce qui ont subi une altération morphologique**, et qui ne sont donc plus caractéristiques. Il en résulte que le microscopiste doit avoir les renseignements de base avant de poser un diagnostic définitif. Ainsi, (f) et (h) pourraient indiquer des infections mixtes à *P. vivax* et *P. malariae*, mais le mauvais état des leucocytes dans chacun de ces frottis indique que les échantillons sont restés en attente un certain temps avant la préparation des frottis ; les altérations morphologiques qui pourraient avoir eu lieu conduisent à poser un diagnostic hypothétique d'infection « mixte ? ». Les photos (e) et (g) sont plus convaincantes, bien que la vingtaine de leucocytes dans un champ si réduit à l'objectif à immersion (g) rende difficile l'identification de l'espèce et que la coloration soit beaucoup trop bleue.

Tableau récapitulatif des stades parasitaires et des espèces

Espèce	Stades parasitaires dans le sang périphérique		
	Trophozoïtes	Schizontes	Gamétocytes
<p>P. falciparum</p> <p>Trophozoïtes jeunes, en croissance, et/ou gamétocytes matures généralement visibles</p>	 <p>Taille : petits à moyens; nombre : souvent nombreux; forme : couramment formes en anneau ou en virgule; chromatine : souvent deux tâches; cytoplasme : régulier, fin à charnu; formes matures : quelque fois présentes dans le paludisme grave, compacts avec pigment en masse ou sous forme de quelques gros grains.</p>	 <p>Habituellement associés à de nombreuses formes annulaires jeunes. Taille : petits, compacts; nombre : peu nombreux, peu courants, en général dans le paludisme grave; formes matures : 12–30 mérozoïtes, voire plus, en amas compacts; pigment : une seule masse sombre.</p>	 <p>Formes immatures à extrémité en pointe peu courantes; formes matures : en forme de banane ou arrondies; chromatine : une seule tâche bien définie; pigment : dispersé, en gros grains en forme de grains de riz, avec parfois une excroissance rose. Présence fréquente de formes usées ne contenant que la chromatine et le pigment.</p>
<p>P. vivax</p> <p>Tous stades visibles : granulations de Schüffner nettement visibles dans les « fantômes » des érythrocytes de l'hôte, surtout sur les bords du trophite</p>	 <p>Taille : petits à grands; nombre : faible à moyen; forme : couramment anneaux ouverts ou forme irrégulière; chromatine : une tâche, parfois deux; cytoplasme : irrégulier ou fragmenté; formes matures : compactes, denses; pigment : dispersé, fin.</p>	 <p>Taille : grands; nombre : faible à moyen; formes matures : 12–24 mérozoïtes, généralement 16, en amas irréguliers; pigment : masse diffuse.</p>	 <p>Formes immatures difficiles à distinguer des trophozoïtes matures; formes matures : rondes, grandes; chromatine : une seule tâche bien définie; pigment : dispersé, fin. Présence de formes usées avec un cytoplasme rare ou absent et ne contenant que la chromatine et le pigment.</p>
<p>P. ovale</p> <p>Tous stades visibles : granulations de Schüffner nettement visibles dans les « fantômes » des érythrocytes de l'hôte, surtout sur les bords du trophite</p>	 <p>Taille : peuvent être plus petits que ceux de <i>P. vivax</i>; nombre : habituellement peu nombreux; forme : forme annulaire à arrondie et compacte; chromatine : une seule tâche nettement visible; cytoplasme : assez régulier et charnu; pigment : dispersé, en gros grains.</p>	 <p>Taille : voisine de <i>P. malariae</i>; nombre : peu nombreux; formes matures : 4–12 mérozoïtes, en général 8, en amas diffus; pigment : masse concentrée.</p>	 <p>Formes immatures difficiles à distinguer des trophozoïtes matures; formes matures : rondes, peuvent être plus petites que celles de <i>P. vivax</i>; chromatine : une seule tâche bien définie; pigment : dispersé, en gros grains. Présence de formes usées ne contenant que la chromatine et le pigment.</p>
<p>P. malariae</p> <p>Tous stades visibles</p>	 <p>Taille : petits; nombre : en général peu nombreux; forme : annulaire à arrondie et compacte; chromatine : une seule grosse tâche; cytoplasme : régulier, dense; pigment : dispersé, abondant, de nuance jaunâtre chez les formes âgées.</p>	 <p>Taille : petits, compacts; nombre : généralement peu nombreux; formes matures : 6–12 mérozoïtes, en général 8, en amas diffus; certaines formes apparemment sans cytoplasme; pigment : concentré.</p>	 <p>Formes immatures et certaines formes matures difficiles à distinguer des trophozoïtes matures; formes matures : rondes, compactes; chromatine : une seule tâche bien définie; pigment : dispersé, en gros grains, peut être réparti à la périphérie. Présence de formes usées ne contenant que la chromatine et le pigment.</p>

Autres éléments dans les frottis de sang périphérique

Spirochètes de *Borrelia* spp., trypanosomes et microfilaires

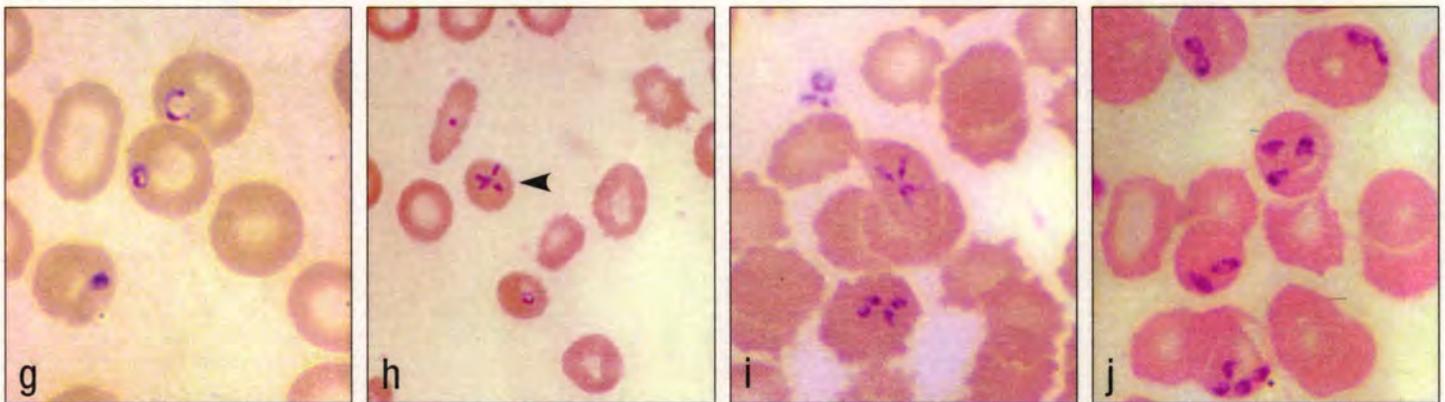


Dans certaines régions d'Afrique, il arrive d'observer dans le sang périphérique des spirochètes des fièvres transmises par les tiques ou les poux (a, flèche, goutte épaisse ; c, frottis), parfois avec des parasites du paludisme (b, flèche du bas montrant un trophozoïte de *falciparum*, flèche du haut *Borrelia*).



Les microfilaires peuvent être courantes dans la goutte épaisse (d, *Wuchereria bancrofti* a une distribution géographique couvrant toutes les régions tropicales) et l'on peut s'attendre à voir des trypanosomes de la maladie du sommeil (goutte épaisse, e, et frottis, f), en particulier dans certaines régions d'Afrique. Toutes les photos ci-dessus : coloration de Field, avec la permission du Dr Jane Carter.

Babésiose, un exemple de zoonose

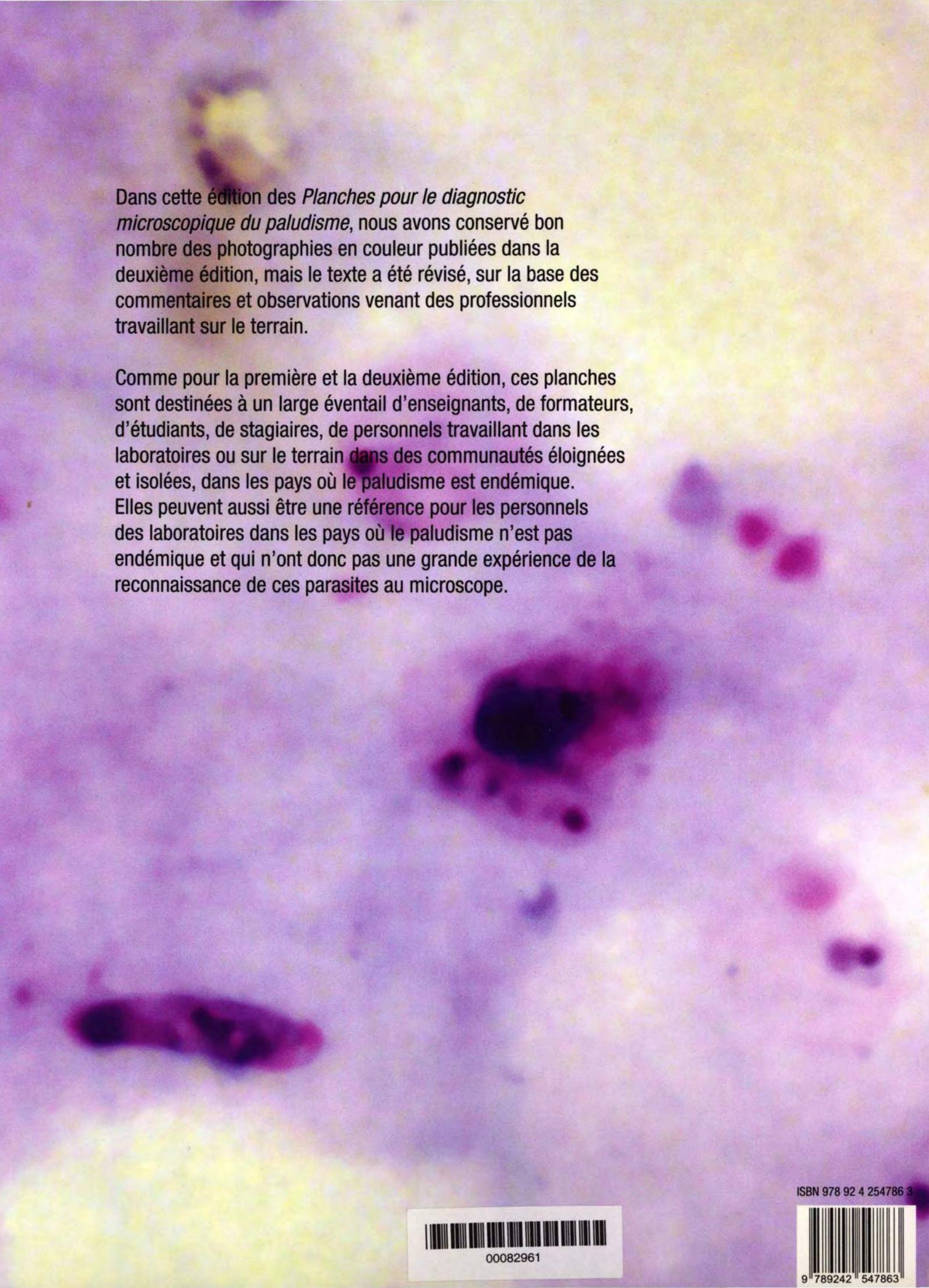


Il arrive parfois que des maladies affectant normalement les animaux se transmettent à l'homme. On parle alors de zoonoses. La babésiose (ou piroplasmose) en est un bon exemple et l'on a observé des cas d'infection humaine en Asie, en Europe et en Amérique du Nord, tandis que l'on a signalé la présence d'anticorps anti-*Babesia* chez l'homme en Afrique, ce qui indique que cette maladie survient aussi sur ce continent. La ressemblance morphologique de *Babesia* à certains stades de *P. falciparum* au cours du cycle érythrocytaire donne une importance particulière à cette infection. Le traitement actuel de la piroplasmose passe par une association de quinine et de clindamycine. La maladie est transmise par des tiques infectées ; il en résulte que les êtres humains en contact avec des tiques de chiens, de bovins ou de chevaux sont exposés au risque. En raison de sa rareté et de sa ressemblance visuelle avec les jeunes trophozoïtes de

plasmodies, le diagnostic des espèces de *Babesia* dans les frottis sanguins humains peut être inattendu et difficile. Il faut se souvenir des différences suivantes :

- Les espèces du genre *Babesia* ne produisent pas de pigment.
- Il n'y a pas de schizontes, ni de gamétocytes.
- La reproduction se fait par « bourgeonnement », avec quatre mérozoïtes disposés en « croix de Malte » (h, i).
- Les infections multiples des hématies sont plus courantes qu'avec les espèces du paludisme (j).

L'absence de réaction d'un patient à un traitement antipaludique justifie de réexaminer les frottis sanguins pour éliminer *Babesia* spp. des agents pathogènes possibles, en étant particulièrement attentif aux points décrits ci-dessus.



Dans cette édition des *Planches pour le diagnostic microscopique du paludisme*, nous avons conservé bon nombre des photographies en couleur publiées dans la deuxième édition, mais le texte a été révisé, sur la base des commentaires et observations venant des professionnels travaillant sur le terrain.

Comme pour la première et la deuxième édition, ces planches sont destinées à un large éventail d'enseignants, de formateurs, d'étudiants, de stagiaires, de personnels travaillant dans les laboratoires ou sur le terrain dans des communautés éloignées et isolées, dans les pays où le paludisme est endémique. Elles peuvent aussi être une référence pour les personnels des laboratoires dans les pays où le paludisme n'est pas endémique et qui n'ont donc pas une grande expérience de la reconnaissance de ces parasites au microscope.



00082961

ISBN 978 92 4 254786 3



9 789242 547863