



information



formation



recherche



*coopération
internationale*



IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE DES PARASITES DE LA MALARIA

INSTITUT NATIONAL DE SANTÉ PUBLIQUE DU QUÉBEC

CAHIER DE STAGE

IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE DES PARASITES DE LA MALARIA

LABORATOIRE DE SANTÉ PUBLIQUE DU QUÉBEC

AVRIL 2005

AUTEURE

Louise Trudel, M. Sc.
Laboratoire de santé publique du Québec
Institut national de santé publique du Québec

SOUS LA COORDINATION DE

Michel Couillard, Ph. D.
Coordonnateur scientifique de l'unité A
Laboratoire de santé publique du Québec
Institut national de santé publique du Québec

SECRÉTARIAT

Christine Delcourt

Nos remerciements vont à Monsieur Dominique St-Pierre, photographe médical au Laboratoire de santé publique du Québec, pour la conception originale des dessins et du cycle biologique de *Plasmodium* sp.

Nos remerciements vont également à madame Evelyne Kokoskin du Centre des maladies tropicales de l'Université McGill, Hôpital général de Montréal (CUSM), pour toute la portion des techniques de laboratoire et la description morphologique des parasites.

Ce document est disponible en version intégrale sur le site Web de l'Institut national de santé publique du Québec : <http://www.inspq.qc.ca>.

Reproduction autorisée à des fins non commerciales à la condition d'en mentionner la source.

CONCEPTION GRAPHIQUE
MARIE PIER ROY

DOCUMENT DÉPOSÉ À SANTÉCOM ([HTTP://WWW.SANTECOM.QC.CA](http://www.santecom.qc.ca))
COTE : INSPQ-2005-022

DÉPÔT LÉGAL – 2^e TRIMESTRE 2005
BIBLIOTHÈQUE NATIONALE DU QUÉBEC
BIBLIOTHÈQUE NATIONALE DU CANADA
ISBN 2-550-44326-8
©Institut national de santé publique du Québec (2005)

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUXIII

LISTE DES FIGURES.....III

1. INTRODUCTION..... 1

2. SPOROZOAIRES SANGUINS3

 2.1. *Plasmodium* sp. 3

 2.2. *Babesia* sp. 3

3. MALARIA.....5

 3.1. Tableau clinique..... 5

 3.2. Transmission de la malaria 5

4. DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE7

5. DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES9

6. PRÉVENTION 11

 6.1. Protection individuelle contre les piqûres de moustiques..... 11

 6.2. Chimio prophylaxie appropriée 11

7. DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE 13

 7.1. Coloration des frottis sanguins : technique standard 13

 7.1.1. Frottis mince 13

 7.1.2. Goutte épaisse..... 13

 7.2. Tests rapides (détection d'antigènes)..... 13

 7.3. PCR 13

8. PRÉPARATION DES FROTTIS SANGUINS21

9. COLORATION GIEMSA 23

 9.1. Méthode de coloration des frottis minces 23

 9.1.1. Notes 23

 9.2. Méthode de coloration des gouttes épaisses 24

10. COLORATION DE FIELD.....25

 10.1. Composition des réactifs..... 25

 10.2. Méthode de coloration des gouttes épaisses 25

 10.3. Méthode de coloration des frottis minces (méthode inversée) 26

 10.4. Notes 26

11. TECHNIQUE DE DÉCOLORATION/RECOLORATION DES FROTTIS SANGUINS27

 11.1. Méthode A : Frottis minces seulement 27

 11.2. Méthode B : Frottis minces et gouttes épaisses 27

12. ESTIMATION DU NIVEAU DE LA PARASITÉMIE29

 12.1. Importance 29

 12.2. Méthode (frottis minces) 29

13. BIBLIOGRAPHIE 31

14. NOTES 33

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Répartition annuelle des cas de malaria selon l'espèce – États-Unis, 2001-2002 9

Tableau 2 : Répartition des espèces de *Plasmodium* selon la zone d'acquisition – États-Unis, 2002 9

Tableau 3 : Schémas chimioprophylactiques de la malaria pour les personnes à risque selon les régions 11

Tableau 4 : Caractères distinctifs des parasites humains de la malaria sur frottis sanguins minces colorés..... 14

Tableau 5 : Cellule hôte..... 15

Tableau 6 : Parasite..... 16

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Distribution géographique de *P. falciparum* en fonction de la résistance aux antimalariques 7

Figure 2 : Cycle biologique de *Plasmodium* sp..... 12

Figure 3 : *P. falciparum* et *P. malariae*..... 18

Figure 4 : *P. vivax* et *P. ovale* 19

Figure 5 : Préparation des frottis sanguins 20

1. INTRODUCTION

Dans le cadre des programmes de stages offerts par le Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ), nous avons produit ce cahier dans le but de fournir aux stagiaires un document de référence à utiliser pour l'identification de routine des parasites de la malaria en laboratoire médical.

La malaria est une maladie tropicale de grande importance qui peut être très sévère et même fatale. L'incidence de cette maladie augmente au Québec avec l'arrivée d'immigrants ou de réfugiés provenant de régions endémiques et la popularité croissante des voyages en zones tropicales. Ce cahier s'adresse aux professionnels de la santé impliqués dans le diagnostic de laboratoire de cette parasitose importante. Le tableau clinique, la distribution géographique, les données épidémiologiques, les méthodes de prévention de la maladie, de même que le cycle biologique du parasite y sont brièvement présentés. Les critères d'identification des organismes, ainsi que les principales techniques de laboratoire y sont décrits. Des illustrations en couleurs de ces parasites complètent ces informations.

Nous espérons que ce document facilitera la tâche du personnel appelé à identifier ces organismes parfois déroutants.

2. SPOROZOAIRES SANGUINS

2.1. *PLASMODIUM* SP.

- Sporozoaire sanguin intracellulaire
- Vecteur : *Anopheles* sp.
- 4 espèces : *Plasmodium falciparum*
Plasmodium vivax
Plasmodium malariae
Plasmodium ovale

2.2. *BABESIA* SP.

- Sporozoaire sanguin intracellulaire
- Vecteur : tique (*Ixodes scapularis*)
- Forme caractéristique : en tétrade (peu fréquente)
- Autres caractéristiques : pléomorphes
souvent en forme de larmes
parasites multiples dans un seul érythrocyte (fréquent)

Ne pas confondre avec *Plasmodium falciparum*.

3. MALARIA

3.1. TABLEAU CLINIQUE

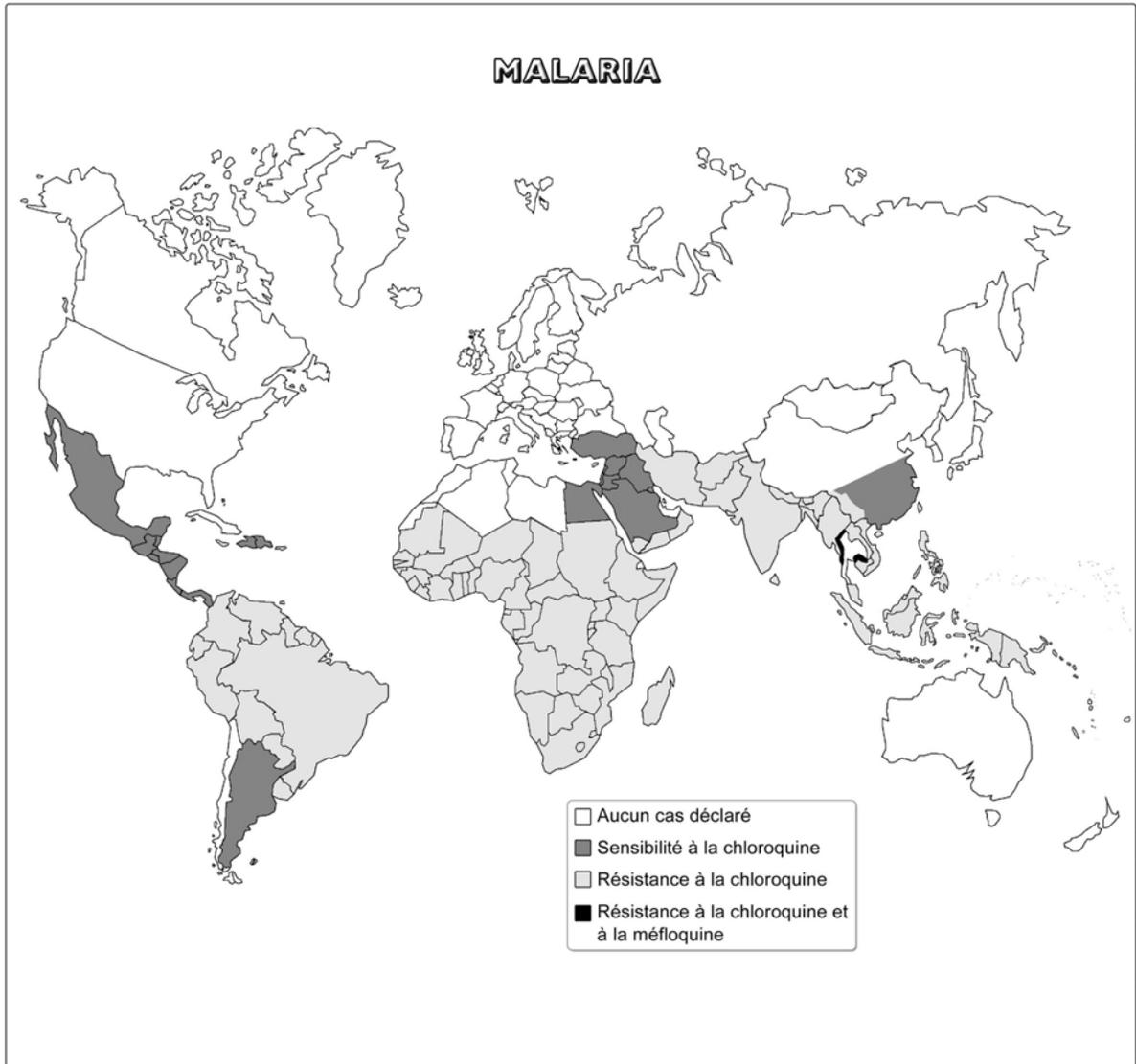
- **Fièvre** (cyclique ou non)
- Syndrome grippal
- Frissons et transpiration

- Complications (*P. falciparum*)
 - atteinte cérébrale
 - insuffisance rénale
 - insuffisance respiratoire

3.2. TRANSMISSION DE LA MALARIA

- Lieu de résidence ou voyage dans une région endémique
- Autres possibilités :
 - transfusion sanguine
 - aiguilles contaminées (seringues hypodermiques)
 - transmission congénitale
 - transmission occasionnelle dans une région non endémique (ex. : « malaria d'aéroport »)

4. DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE



Source : Recommandations canadiennes pour la prévention et le traitement du paludisme (malaria) chez les voyageurs internationaux. Santé Canada.

Relevé des maladies transmissibles au Canada [30S1](#) : 1-66, 2004.

Adapté et reproduit avec la permission du Ministre des Travaux publics et Services gouvernementaux Canada, 2005.

Figure 1 : Distribution géographique de *P. falciparum* en fonction de la résistance aux antimalariques

5. DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Tableau 1 : Répartition annuelle des cas de malaria selon l'espèce – États-Unis, 2001-2002

Nombre de cas de malaria				
Espèces de <i>Plasmodium</i>	États-Unis - 2001 ¹		États-Unis - 2002 ²	
	Nombre	(%)	Nombre	(%)
<i>P. vivax</i>	385	(27,8)	339	(25,4)
<i>P. falciparum</i>	693	(50,1)	699	(52,3)
<i>P. malariae</i>	62	(4,5)	38	(2,8)
<i>P. ovale</i>	50	(3,6)	37	(2,8)
Indéterminé	179	(12,9)	213	(15,9)
Mixte	14	(1,0)	11	(0,8)
TOTAL	1383	(100,0)	1337	(100,0)

1 Source : MMWR 52 (SS-5) : 1-16, 2003.

2 Source : MMWR 53 (SS-1) : 21-34, 2004.

Tableau 2 : Répartition des espèces de *Plasmodium* selon la zone d'acquisition – États-Unis, 2002

Nombre de cas de malaria - États-Unis, 2002 ¹							
Zone d'acquisition	Espèces de <i>Plasmodium</i>						
	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	Mixte	Indéterminé	TOTAL
Afrique	71	613	30	30	6	153	903
Asie	130	18	3	3	3	14	171
Amérique Centrale et Caraïbes	62	23	1	1	0	9	96
Amérique du Nord	7	2	0	0	0	1	10
Amérique du Sud	19	8	2	1	0	5	35
Océanie	23	5	1	1	0	7	37
Inconnu	24	29	0	1	2	24	80
TOTAL	336	698	37	37	11	213	1332

1 Source : MMWR 53 (SS-1) : 21-34, 2004.

6. PRÉVENTION

6.1. PROTECTION INDIVIDUELLE CONTRE LES PIQÛRES DE MOUSTIQUES

- Utiliser un insectifuge (ex. : DEET).
- Porter des vêtements qui limitent la surface de la peau exposée.
- Demeurer dans des locaux climatisés ou protégés par des grillages sinon, dormir sous une moustiquaire, de préférence imprégnée de perméthrine.

6.2. CHIMIOPROPHYLAXIE APPROPRIÉE

- Région visitée
- Risque d'exposition
- Facteurs liés à la santé personnelle

Tableau 3 : Schémas chimioprophylactiques de la malaria pour les personnes à risque selon les régions

Région	Médicament(s) de choix	Médicament(s) de remplacement
Sensibilité à la chloroquine	Chloroquine	Atovaquone-proguanil Doxycycline Méfloquine
Résistance à la chloroquine	Atovaquone-proguanil Doxycycline ou Méfloquine	Primaquine
Résistance à la chloroquine et à la méfloquine	Doxycycline	Atovaquone-proguanil

Source : Recommandations canadiennes pour la prévention et le traitement du paludisme (malaria) chez les voyageurs internationaux. Santé Canada. Relevé des maladies transmissibles au Canada 30S1 : 1-66, 2004.

Adapté et reproduit avec la permission du Ministre des Travaux publics et Services gouvernementaux Canada, 2005.

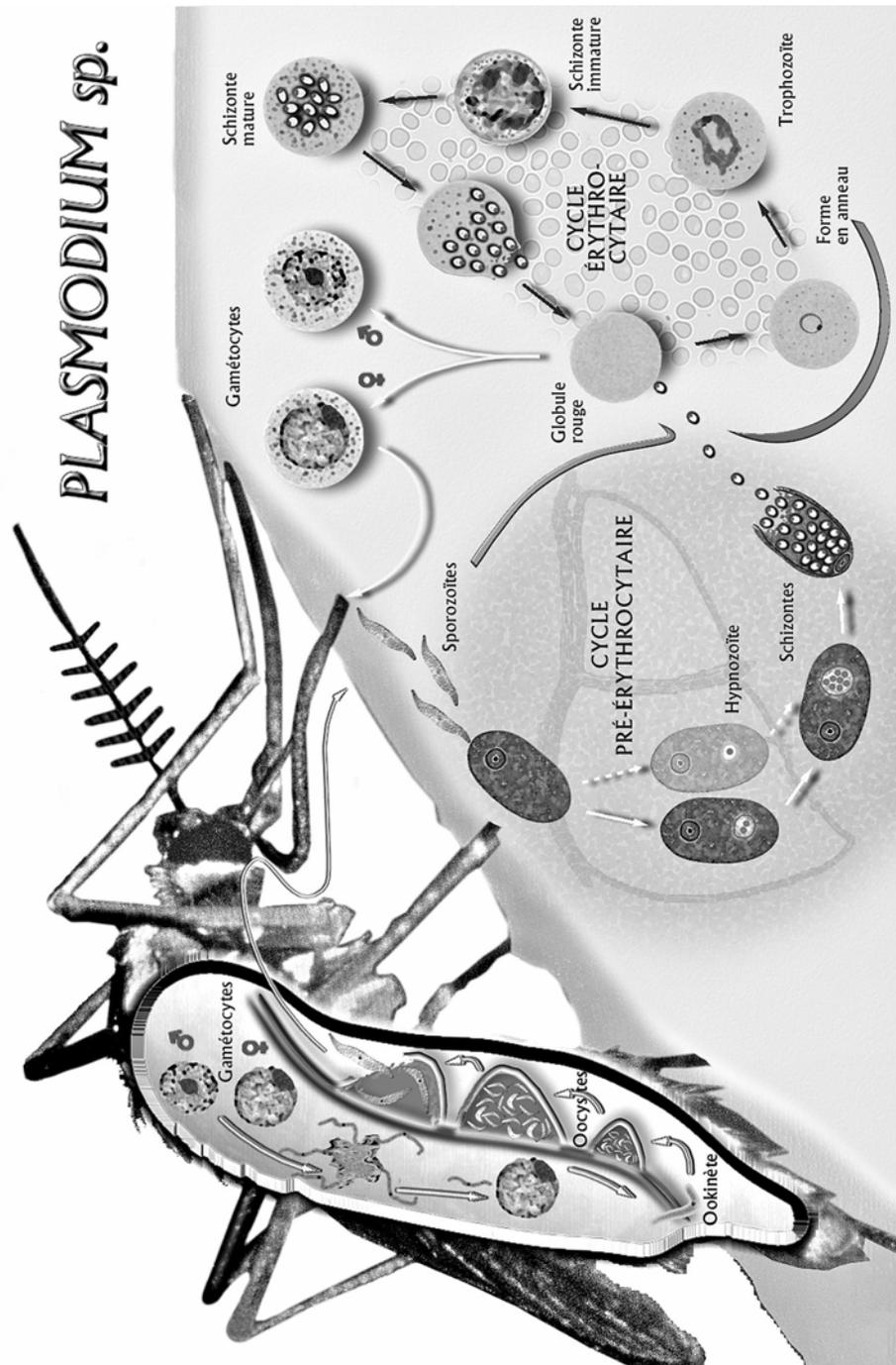


Figure 2 : Cycle biologique de *Plasmodium* sp.

7. DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

7.1. COLORATION DES FROTTIS SANGUINS : TECHNIQUE STANDARD

7.1.1. Frottis mince

Avantages :

- Détermination de l'espèce de *Plasmodium*
- Estimation du niveau de parasitémie
- Conservation de frottis permanents pour dossiers, enseignement, etc.

Désavantages :

- Pas aussi sensible que la goutte épaisse pour détecter les faibles parasitémies

7.1.2. Goutte épaisse

Avantages :

- Meilleure sensibilité pour détecter les faibles parasitémies
 - très utile pour le dépistage des parasites

Désavantages :

- Difficile de déterminer l'espèce de *Plasmodium*
- Requier plus d'expertise pour détecter les parasites

7.2. TESTS RAPIDES (DÉTECTION D'ANTIGÈNES)

- ParaSight F (*P. falciparum*)
- ICT Malaria *P.f* ou *P.f/P.v*
- OptiMAL (*P. falciparum* et non-*P. falciparum*)
- Makromed (*P. falciparum*)

7.3. PCR

Amorces spécifiques à chacune des espèces.

Tableau 4 : Caractères distinctifs des parasites humains de la malaria sur frottis sanguins minces colorés

CARACTÈRES	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
Érythrocyte infecté agrandi	-	-	+	±
Érythrocyte infecté avec granulations de Schüffner	-	-	+	+
Érythrocyte infecté effiloché et/ou ovale*	rare	rare	rare	fréquent
Parasite, trophozoïtes plus amiboïdes	-	-	+	-
Parasite, toutes formes présentes dans sang périphérique	-	+	+	+
Parasite, anneaux larges	- (+)	+	+	+
Parasites multiples dans un seul érythrocyte*	+	rare	rare	rare
Parasite, double chromatine*	+	rare	rare	rare
Érythrocyte infecté avec taches de Maurer	+	-	-	-
Parasite, formes accolées*	+	-	rare	-
Parasite, gamétocytes en forme de saucisses	+	-	-	-
Parasite, formes en bande*	rare	+	-	rare
Nombre de mérozoïtes dans un schizonte érythrocytaire	8-24	6-12	12-24	8-12

* Non spécifique, mais suggestif si observé.

Tiré et adapté de : Strickland, G.T. 2000. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases, 8th ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

Tableau 5 : Cellule hôte

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
TAILLE	<ul style="list-style-type: none"> • Normale 	<ul style="list-style-type: none"> • Normale 	<ul style="list-style-type: none"> • Agrandie 	<ul style="list-style-type: none"> • Agrandie, mais pas autant que <i>P. vivax</i>.
FORME	<ul style="list-style-type: none"> • Ronde, parfois crénelée. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ronde 	<ul style="list-style-type: none"> • Ronde, ovoïde, parfois déformée par le parasite. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ronde, ovale. • Extrémités souvent effilochées (20-30 % des cellules infectées).
COULEUR	<ul style="list-style-type: none"> • Normale ou plus foncée. 	<ul style="list-style-type: none"> • Normale 	<ul style="list-style-type: none"> • Normale ou plus pâle. 	<ul style="list-style-type: none"> • Normale
GRANULATIONS	<ul style="list-style-type: none"> • Taches de Maurer (grains violacés) habituellement peu nombreuses. Pas aussi nombreuses que les grains de Schüffner. • S'observent plus facilement dans les frottis bien colorés. 	<ul style="list-style-type: none"> • Grains de Ziemann (rares et délicats lorsque présents). • Le frottis doit être trop coloré (inhabituel). 	<ul style="list-style-type: none"> • Grains de Schüffner (pH important). • Petits grains rouges dont le nombre augmente au fur et à mesure du développement du parasite. • Nombreux. 	<ul style="list-style-type: none"> • Grains de Schüffner (pH important). • Petits grains rouges dont le nombre augmente au fur et à mesure du développement du parasite.
% CELLULES INFECTÉES	<ul style="list-style-type: none"> • Toutes les cellules peuvent être infectées. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cellules plus âgées infectées. • Rarement plus de 1 % de cellules infectées. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cellules jeunes infectées. • Rarement plus de 2 % de cellules infectées. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cellules jeunes infectées. • Rarement plus de 2 % de cellules infectées.

Source : Kokoskin, E. 1997. Guide pour l'atelier sur la malaria – cahier de travail. Centre des maladies tropicales de l'Université McGill, Montréal.

Tableau 6 : Parasite

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
JEUNE TROPHOZOÏTE	<ul style="list-style-type: none"> • Petits anneaux délicats. • Petit grain de chromatine relié à la bande de cytoplasme. • La chromatine peut être double ou triple. • Formes accolées. • On peut en retrouver plus d'un dans les globules rouges. 	<ul style="list-style-type: none"> • Petits anneaux compacts présentant ou non une petite vacuole. • Chromatine plus grosse. • Formes en bande occasionnelles. 	<ul style="list-style-type: none"> • Petits anneaux avec une vacuole claire et 1 ou 2 grains de chromatine. • Ont tendance à présenter une forme amiboïde. • Peuvent contenir de faibles granulations. 	<ul style="list-style-type: none"> • Petits anneaux réguliers avec une vacuole claire. • Ressemblent à <i>P. malariae</i>.
TROPHOZOÏTE EN CROISSANCE	<ul style="list-style-type: none"> • Anneaux semblables aux jeunes trophozoïtes mais plus gros. • Le cytoplasme forme un anneau complet et la chromatine se retrouve souvent dans la vacuole. 	<ul style="list-style-type: none"> • Forme régulière sauf pour les formes en bande. • Vacuole présente ou absente. • Le pigment peut être retrouvé dans le cytoplasme. 	<ul style="list-style-type: none"> • Nombreuses formes amiboïdes avec une grosse vacuole. • Cellules infectées agrandies et de forme bizarre • Granulations abondantes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Forme régulière. • Cellules infectées sensiblement agrandies. • Granulations abondantes.
TROPHOZOÏTE ÂGÉ	<ul style="list-style-type: none"> • Occupent souvent les 2/3 de la cellule. • Pigment noir évident. • Vacuole petite ou absente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Taille moyenne et de forme régulière. • Occupent toute ou presque toute la cellule. • Petite vacuole présente ou absente. • Pigment noir évident. • Granulations rarement visibles. 	<ul style="list-style-type: none"> • Occupent presque toute la cellule. • Vacuole importante ou presque absente. • Granulations et pigment noir évidents. 	<ul style="list-style-type: none"> • Légèrement plus gros que <i>P. malariae</i> au même stade. • Forme régulière. • N'occupent pas plus des 2/3 de la cellule agrandie. • Granulations et pigment noir évidents.
SCHIZONTES	<ul style="list-style-type: none"> • Rarement observés. Leur présence indique une infection sévère. • Lorsque présents, petits et immatures, avec 2-4 mérozoïtes et des agrégats de pigment. • À maturité, les mérozoïtes sont disposés de façon irrégulière: 8 à 40, généralement entre 16 et 24. • Pigment : masse noire ou brun doré unique. 	<ul style="list-style-type: none"> • Occupent souvent toute la cellule hôte. • Présence de 8 à 12 mérozoïtes, généralement 8 ou 10. • Formes en rosette fréquentes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Occupent généralement toute la cellule agrandie; des formes plus petites peuvent être observées. • Les formes à maturité ont 12 à 24 mérozoïtes, généralement 14 ou 20. • Pigment brun doré présent en amas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Plus gros que <i>P. malariae</i>. • N'occupent pas plus des 2/3 de la cellule agrandie. • Pigment brun doré présent généralement en amas. • Mérozoïtes disposés de façon irrégulière : 6 à 12, généralement 10. • Granulations abondantes.

Tableau 6 : Parasite (suite)

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
GAMÉTOCYTES IMMATURES	<ul style="list-style-type: none"> Rarement observés dans la circulation périphérique, seulement rencontrés dans les infections sévères. 	<ul style="list-style-type: none"> Ne peuvent se distinguer des trophozoïtes âgés. 	<ul style="list-style-type: none"> Semblables aux trophozoïtes âgés, mais absence de vacuole et chromatine plus grosse. 	<ul style="list-style-type: none"> Semblables aux trophozoïtes âgés.
GAMÉTOCYTES FEMELLES (macro)	<ul style="list-style-type: none"> Formes en croissant ou en saucisse. Coloration plus foncée ou plus bleue, noyau central plus compact, entouré de pigments. Cellule hôte étirée en forme de croissant. 	<ul style="list-style-type: none"> Difficiles à distinguer des trophozoïtes âgés. Occupent toute la cellule. Noyau en périphérie. Coloration plus foncée. 	<ul style="list-style-type: none"> Gros, occupent toute ou presque toute la cellule. Coloration plus foncée que pour le mâle, noyau compact en périphérie. 	<ul style="list-style-type: none"> Parasites plus petits, n'occupent pas toute la cellule agrandie. Souvent difficiles à distinguer de <i>P. vivax</i>.
GAMÉTOCYTES MÂLES (micro)	<ul style="list-style-type: none"> Formes similaires mais croissant moins accentué que pour la femelle. Chromatine diffuse dans le cytoplasme. Plus rouge que la femelle, bleu en périphérie. Pigment plus diffus. 	<ul style="list-style-type: none"> Chromatine diffuse retrouvée au centre. Couleur rouge brique au centre. 	<ul style="list-style-type: none"> Semblables aux gamétoocytes femelles mais chromatine diffuse, plus centrale. Rouge au centre, bleu en périphérie. 	<ul style="list-style-type: none"> Chromatine diffuse retrouvée au centre. Semblables à <i>P. vivax</i>.
APPARITION DANS LE SANG	7-12 jours	7-14 jours	3-5 jours	12-24 jours

Source : Kokoskin E. 1997. Guide pour l'atelier sur la malaria - cahier de travail. Centre des maladies tropicales de l'Université McGill, Montréal.

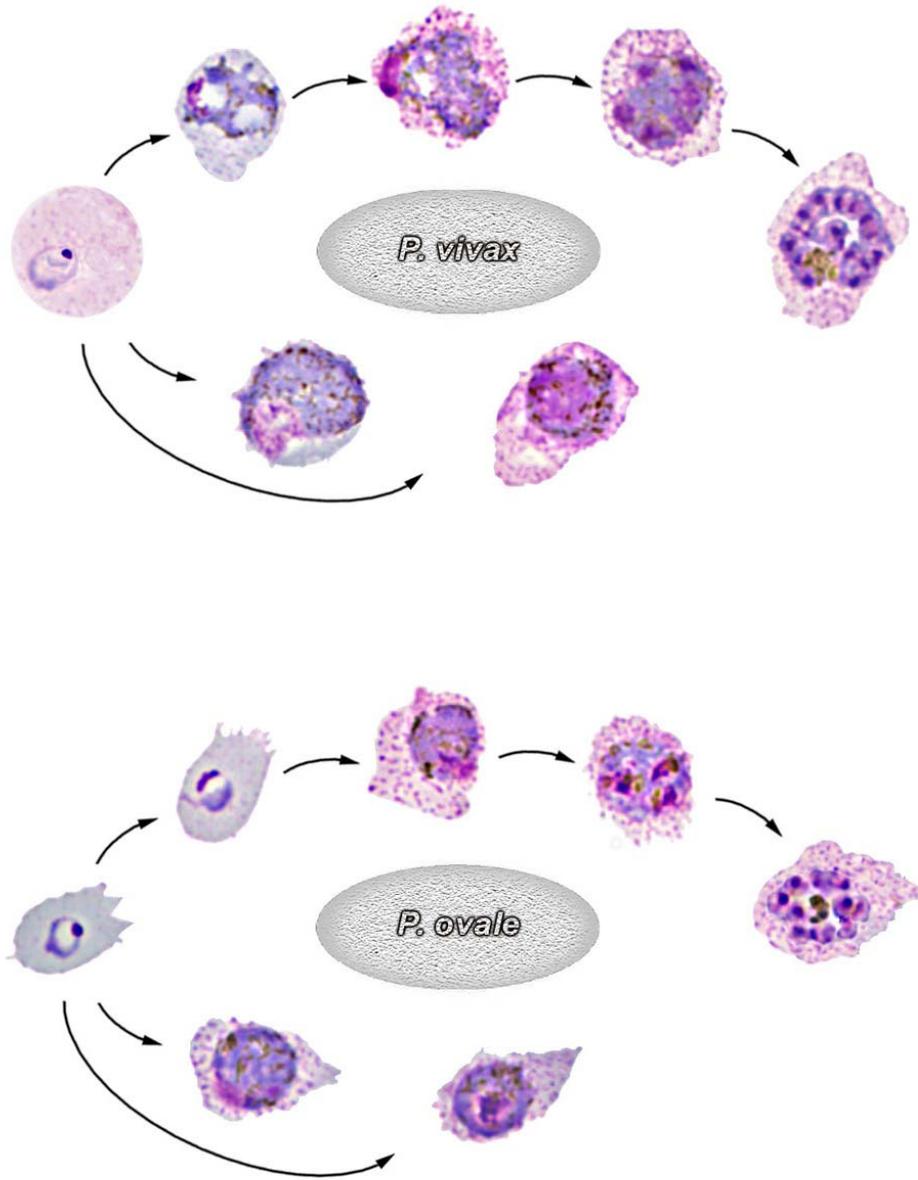
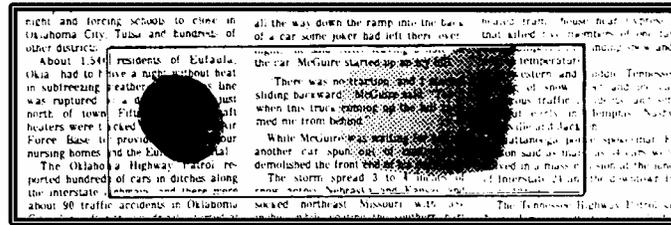
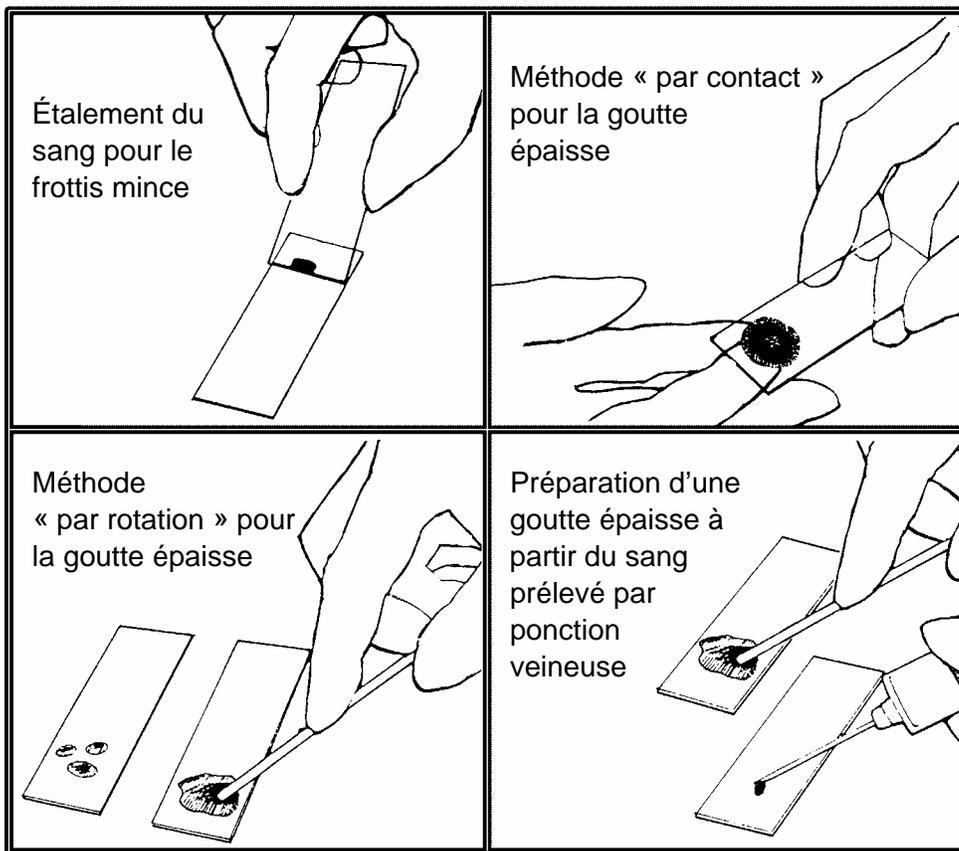


Figure 4 : *P. vivax* et *P. ovale*



Préparation adéquate d'un frottis mince et d'une goutte épaisse



Reproduit avec permission de NCCLS, publication M15-A, 2000. *Laboratory diagnosis of blood-borne parasitic diseases; Approved Guideline* (ISBN 1-56238-401-5). Des copies de l'édition courante peuvent être obtenues en s'adressant au NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

Figure 5 : Préparation des frottis sanguins

8. PRÉPARATION DES FROTTIS SANGUINS

Toujours suivre les précautions universelles de laboratoire pour la manipulation des spécimens sanguins.

Il est habituellement recommandé de préparer les frottis sanguins pour diagnostic de la malaria à partir d'un prélèvement du bout du doigt. Mais cette façon de faire n'est pas très pratique, dans la routine actuelle des centres hospitaliers.

Les frottis sanguins sont donc généralement préparés à partir d'un prélèvement de sang veineux. Dans ces conditions, l'EDTA devrait être utilisé comme anticoagulant, pour de meilleurs résultats; de plus, les frottis devraient être préparés si possible dans l'heure qui suit le prélèvement pour minimiser la distorsion des parasites et la réduction du nombre de parasites présents, qui pourraient survenir suite au contact avec l'anticoagulant.

Les principaux effets de la présence d'un anticoagulant sur les parasites sont les suivants :

- la morphologie des parasites peut être modifiée :
 - les gamétocytes de *P. falciparum* peuvent s'arrondir et ainsi être confondus avec ceux des autres espèces;
 - les trophozoïtes amiboïdes de *P. vivax* peuvent perdre leur apparence caractéristique;
- les granulations de Schüffner peuvent être inapparentes sur les frottis;
- les mérozoïtes peuvent être relâchés des schizontes et aller s'accoler en périphérie des globules rouges, ce qui pourrait entraîner la confusion avec les véritables formes « accolées », plus typiques de *P. falciparum*;
- les gamétocytes mâles pourraient libérer leurs microgamètes de façon plus hâtive. Ces formes filamenteuses libres sur les frottis peuvent aisément être confondues avec des bactéries spiralées comme les *Borrelia* et entraîner un mauvais diagnostic. Pour les distinguer, les gamètes mâles ne sont pas spiralés et ont un petit noyau visible dans le centre des gamètes.

La présence d'anticoagulant peut également interférer avec l'adhésion des frottis sur la lame, particulièrement s'il est présent en trop grande quantité. Il faut alors en éliminer une partie en centrifugeant le sang légèrement et en retirant une partie du plasma.

Il est préférable de conserver le sang à la température de la pièce plutôt qu'au réfrigérateur pour éviter également de modifier la morphologie des parasites.

9. COLORATION GIEMSA

Technique utilisée pour la coloration des parasites sanguins.

9.1. MÉTHODE DE COLORATION DES FROTTIS MINCES

- Fixer les frottis au méthanol pendant 30-45 secondes
- Laisser sécher à l'air complètement
- Colorer au Giemsa 1:7 pendant 45 minutes (cf. notes)
- Rincer rapidement avec du tampon Sorensen (pH 7,0-7,2) sans Triton
- Laisser sécher à l'air en position inclinée

(Méthode utilisée au Centre des maladies tropicales de l'Université McGill, Hôpital général de Montréal (CUSM))

9.1.1. Notes

Giemsa commercial (EM Science, n° cat. CA9204-4, disponible chez VWR)

- Dilution : 1 partie Giemsa
6 parties tampon Sorensen (pH 7,0-7,2) + Triton X-100 (conc. finale 0,01 %)
La solution de travail doit être fraîchement préparée et filtrée avant usage (filtre Whatman n° 1).
- Mettre une petite quantité de solution mère de Giemsa dans une bouteille brune bien hermétique pour usage courant, pour éviter de contaminer la solution commerciale originale.
- Le Triton n'est pas essentiel mais il permet de donner plus de brillance aux structures colorées et de préciser certains détails morphologiques.
- À noter que la dilution du colorant, de même que le temps de coloration doivent être déterminés pour chaque lot de colorant avec des frottis contrôles positifs ou des frottis sanguins courants. Les conditions mentionnées ci-haut peuvent vous orienter si vous utilisez le même colorant.

9.2. MÉTHODE DE COLORATION DES GOUTTES ÉPAISSES

Toujours suivre les précautions universelles de laboratoire pour la manipulation des frottis non fixés.

- De façon optimale, les gouttes épaisses doivent sécher de 8 à 12 heures avant coloration, à moins qu'elles n'aient été faites plus minces pour accélérer le processus.
- D'autre part, il est possible d'accélérer considérablement le séchage de ces frottis en les plaçant dans un incubateur à 37 °C pendant 10-15 minutes ou dans une enceinte de sécurité biologique pendant environ 5 minutes sans que les globules rouges ne se fixent sur les frottis.

Par contre, le risque de perdre des parasites à la coloration des frottis est plus élevé lorsque le temps de séchage est raccourci.

- Les gouttes épaisses ne doivent pas être fixées au méthanol.
- Par la suite, la coloration se fait de la même façon que pour les frottis minces.

10. COLORATION DE FIELD

Technique de coloration rapide.

Dans les situations où un diagnostic rapide est nécessaire, la coloration de Field peut être utilisée, particulièrement sur les gouttes épaisses. Cependant, celles-ci devraient être légèrement moins épaisses qu'à l'habitude pour de meilleurs résultats.

10.1. COMPOSITION DES RÉACTIFS

Solution A : bleu de méthylène, azur A et eau distillée tamponnée (pH 7,2)
(EM Science, n° cat. CAB 35056, disponible chez VWR)

Solution B : éosine et eau distillée tamponnée (pH 7,2)
(EM Science, n° cat. CAB 35057, disponible chez VWR)

10.2. MÉTHODE DE COLORATION DES GOUTTES ÉPAISSES

La coloration peut se faire en jarre de Coplin. Toujours suivre les précautions universelles de laboratoire pour la manipulation des frottis non fixés.

- Tremper les frottis dans la solution A pendant 5 secondes. Absorber l'excès de colorant avec un papier absorbant.
- Rincer délicatement les frottis pendant 1-2 secondes dans un b cher d'eau tamponnée en les agitant légèrement.
- Absorber l'excès d'eau avec un papier absorbant.
- Tremper les frottis dans la solution B pendant 3 secondes. Absorber l'excès de colorant.
- Rincer délicatement les frottis dans un b cher d'eau tamponnée.
- Laisser sécher les frottis en position verticale.

10.3. MÉTHODE DE COLORATION DES FROTTIS MINCES (MÉTHODE INVERSÉE)

- Fixer les frottis minces au méthanol pendant 30 secondes sur un support à coloration.
- Couvrir les frottis avec environ 1 mL de solution B diluée 1:4 dans une eau tamponnée (pH 7,0-7,2). Colorer les frottis pendant 15-20 secondes.
- Ajouter immédiatement un volume égal de solution A et bien mélanger les colorants sur la lame avec une pipette pendant 10-15 secondes.
- Colorer les frottis avec la solution mixte pendant 15-20 secondes.
- Rincer les frottis avec de l'eau tamponnée ou de l'eau du robinet.
- Laisser sécher les frottis en position verticale.

10.4. NOTES

- La coloration de Field pour les frottis minces permet d'obtenir un diagnostic rapide de malaria. Cependant, la coloration peut être variable et les granulations caractéristiques ne sont pas toujours visibles. Cette coloration doit donc toujours être suivie d'une coloration classique au Giemsa pour une meilleure identification à l'espèce.
- La méthode inversée de la coloration de Field peut également s'appliquer aux gouttes épaisses.

11. TECHNIQUE DE DÉCOLORATION/RECOLORATION DES FROTTIS SANGUINS

Lorsqu'un frottis sanguin est coloré au Giemsa à un pH inapproprié pour le diagnostic de la malaria (ex. : pH 6,8), certains caractères morphologiques importants comme les grains de Schüffner sont généralement absents. Pour le diagnostic de la malaria, le Giemsa doit contenir de l'azur B et le pH de la coloration doit être à 7,0-7,2.

Pour améliorer la qualité de coloration d'un frottis qui s'avère positif pour la malaria, mais qui n'a pas été coloré de façon idéale, on peut décolorer le frottis et le recolorer de la façon suivante:

11.1. MÉTHODE A : FROTTIS MINCES SEULEMENT

- Déposer le frottis sur un support à coloration et couvrir de méthanol. Laisser décolorer pendant 15 minutes. Ne pas laisser sécher le méthanol. Rincer à l'eau du robinet et laisser sécher le frottis complètement.
- Couvrir le frottis avec la solution de Giemsa appropriée. Réduire le temps de coloration de moitié par rapport au temps habituel (si le temps de coloration habituel est de 45 minutes, réduire le temps à environ 20-25 minutes).
- Rincer le frottis à l'eau du robinet ou avec du tampon Sorensen (pH 7,0-7,2) et laisser sécher.

11.2. MÉTHODE B : FROTTIS MINCES ET GOUTTES ÉPAISSES

- Décolorer le frottis avec une solution-tampon à pH 7,0-7,2 pendant une demi-journée. Laisser sécher complètement.
- Pour la recoloration, suivre la même procédure que pour la méthode A.

(Méthodes utilisées au Centre des maladies tropicales de l'Université McGill, Hôpital général de Montréal (CUSM))

12. ESTIMATION DU NIVEAU DE LA PARASITÉMIE

12.1. IMPORTANCE

- Évaluer la sévérité de l'infection, particulièrement pour *Plasmodium falciparum*
- Évaluer l'efficacité du traitement

12.2. MÉTHODE (FROTTIS MINCES)

Pour évaluer le pourcentage de parasitémie :

- Déterminer le nombre moyen de globules rouges/champ microscopique à l'immersion, en évaluant trois zones contenant 200-300 globules rouges/champ. Faire la moyenne (globules rouges/champ).
- Compter le nombre de globules rouges parasités dans 100 champs microscopiques d'une densité de globules rouges équivalente à celle du point précédent et en faire le total. NE PAS compter les gamétocytes.
- Faire le calcul suivant :

$$\% \text{ parasitémie} = \frac{\text{Nombre total de globules rouges parasités dans 100 champs}}{\text{Nombre moyen de globules rouges/champ} \times 100 \text{ champs}} \times 100$$

Exemple :

A. Nombre total de globules rouges parasités dans 100 champs : 473

B. Nombre moyen de globules rouges/champ : 200

C. Si on applique la formule : $\frac{473}{200 \times 100} \times 100 = 2,36\%$ ou 2,4 % de parasitémie

13. BIBLIOGRAPHIE

Comité consultatif de la médecine tropicale et de la médecine des voyages (CCMTMV). 2004. Recommandations canadiennes pour la prévention et le traitement du paludisme (malaria) chez les voyageurs internationaux. *Rel. Mal. Transm. Can.* 30S1 : 1-66.

Kokoskin E. 1997. Guide pour l'atelier sur la malaria - cahier de travail. Centre des maladies tropicales de l'Université McGill, Montréal.

MMWR. 2003. Malaria Surveillance-United States, 2001. *MMWR* 52 (SS-5) : 1-16.

MMWR. 2004. Malaria Surveillance-United States, 2002. *MMWR* 53 (SS-1) : 21-34.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Laboratory diagnosis of blood-borne parasitic diseases; Approved Guideline. NCCLS document M15-A. Pennsylvania.

Strickland, G.T. 2000. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*, 8th ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

