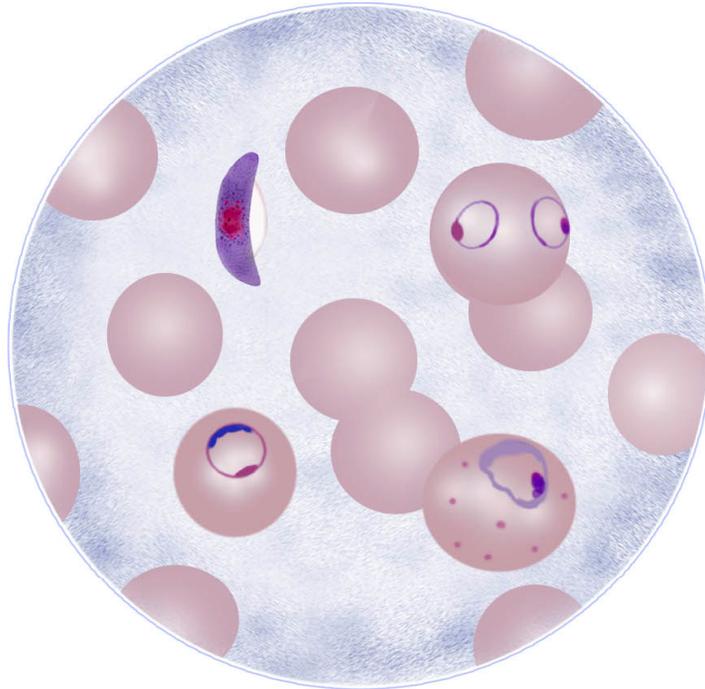


Institut national
de santé publique

Québec



Laboratoire de santé publique
du Québec



Identification morphologique des parasites de la malaria

Stage

par

Louise Trudel

2011

Outre les personnes qui, de bien des façons, ont prêté leur concours à la parution de ce cahier, nous remercions celles qui nous ont fait part de leurs suggestions et commentaires constructifs.

Nous remercions, pour leur précieuse collaboration, les membres suivants du personnel du Laboratoire de santé publique du Québec :

- monsieur Dominique St-Pierre, photographe médical, pour la conception originale des dessins et des cycles biologiques;
- madame Guylaine Meloche, secrétaire, pour la préparation et la mise en page du document.

Les tableaux, la distribution géographique de la malaria et les notes techniques (Annexe 2) ont été tirés, en tout ou en partie, des références suivantes :

- 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.
- Comité consultatif de la médecine tropicale et de la médecine des voyages (CCMTMV). 2009. Recommandations canadiennes pour la prévention et le traitement du paludisme (malaria) chez les voyageurs internationaux. *Rel. Mal. Transm. Can.* 35S1 : 1-82.
- Kokoskin, E. 2005. Dépistage du paludisme – Manuel pour le laboratoire d’aujourd’hui. Centre des maladies tropicales de l’Université McGill, Montréal.
- MMWR. 2010. Malaria Surveillance-United States, 2008. *MMWR* 59 (SS-7) : 1-15.
- MMWR. 2011. Malaria Surveillance-United States, 2009. *MMWR* 60 (SS-3) : 1-15.
- 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.

PARASITES.....	9
PROTOZOAIRES.....	9
SPOROZOAIRES SANGUINS.....	10
<i>PLASMODIUM SP.</i>	10
<i>BABESIA SP.</i>	10
MALARIA.....	10
TABLEAU CLINIQUE.....	10
TRANSMISSION DE LA MALARIA.....	10
DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE.....	11
DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES.....	12
PRÉVENTION.....	13
PROTECTION INDIVIDUELLE CONTRE LES PIQÛRES DE MOUSTIQUES.....	13
CHIMIOPROPHYLAXIE APPROPRIÉE.....	13
DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE.....	14
COLORATION DES FROTTIS SANGUINS : TECHNIQUE STANDARD.....	14
FROTTIS MINCE.....	14
GOUTTE ÉPAISSE.....	14
TESTS RAPIDES (DÉTECTION D'ANTIGÈNES).....	14
PCR.....	14
CARACTÈRES DISTINCTIFS DES PARASITES HUMAINS DE LA MALARIA.....	15
ANNEXE 1 CYCLES VITAUX.....	21

ANNEXE 2 MALARIA – NOTES TECHNIQUES.....	27
PRÉPARATION DES FROTTIS SANGUINS.....	29
COLORATION GIEMSA.....	32
COLORATION DE FIELD.....	34
TECHNIQUE DE DÉCOLORATION/RECOLORATION DES FROTTIS SANGUINS...	36
ESTIMATION DU NIVEAU DE LA PARASITÉMIE.....	37
NOTES.....	39

PARASITES

- **PROTOZOAIRES**
 - unicellulaires (eucaryotes)
 - formes : trophozoïte (active)
intermédiaire
kyste (oocyste) (dissémination)
spore (dissémination)

- **HELMINTHES**
 - pluricellulaires (métazoaires)
 - formes : oeuf (dissémination)
larve (transmission)
ver adulte (active)

PROTOZOAIRES

- **AMIBES**
 - pseudopodes
- **FLAGELLÉS**
 - flagelles
- **CILIÉS**
 - cils
- **SPOROZOAIRES**
 - immobiles (intracellulaires)
- **MICROSPORIDIES**
 - immobiles (intracellulaires)

SPOROZOAIRES SANGUINS

- *PLASMODIUM* SP. (MADO)
- *BABESIA* SP. (MADO)

***PLASMODIUM* SP.**

Sporozoaire sanguin intracellulaire

Vecteur : moustique (*Anopheles* sp.)

5 espèces : *Plasmodium falciparum*
Plasmodium vivax
Plasmodium malariae
Plasmodium ovale
Plasmodium knowlesi

***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)
- formes extracellulaires

Ne pas confondre avec *Plasmodium falciparum*

MALARIA

TABLEAU CLINIQUE :

FIÈVRE (cyclique ou non)
Syndrome grippal
Frissons et transpiration

Complications (*P. falciparum*) :

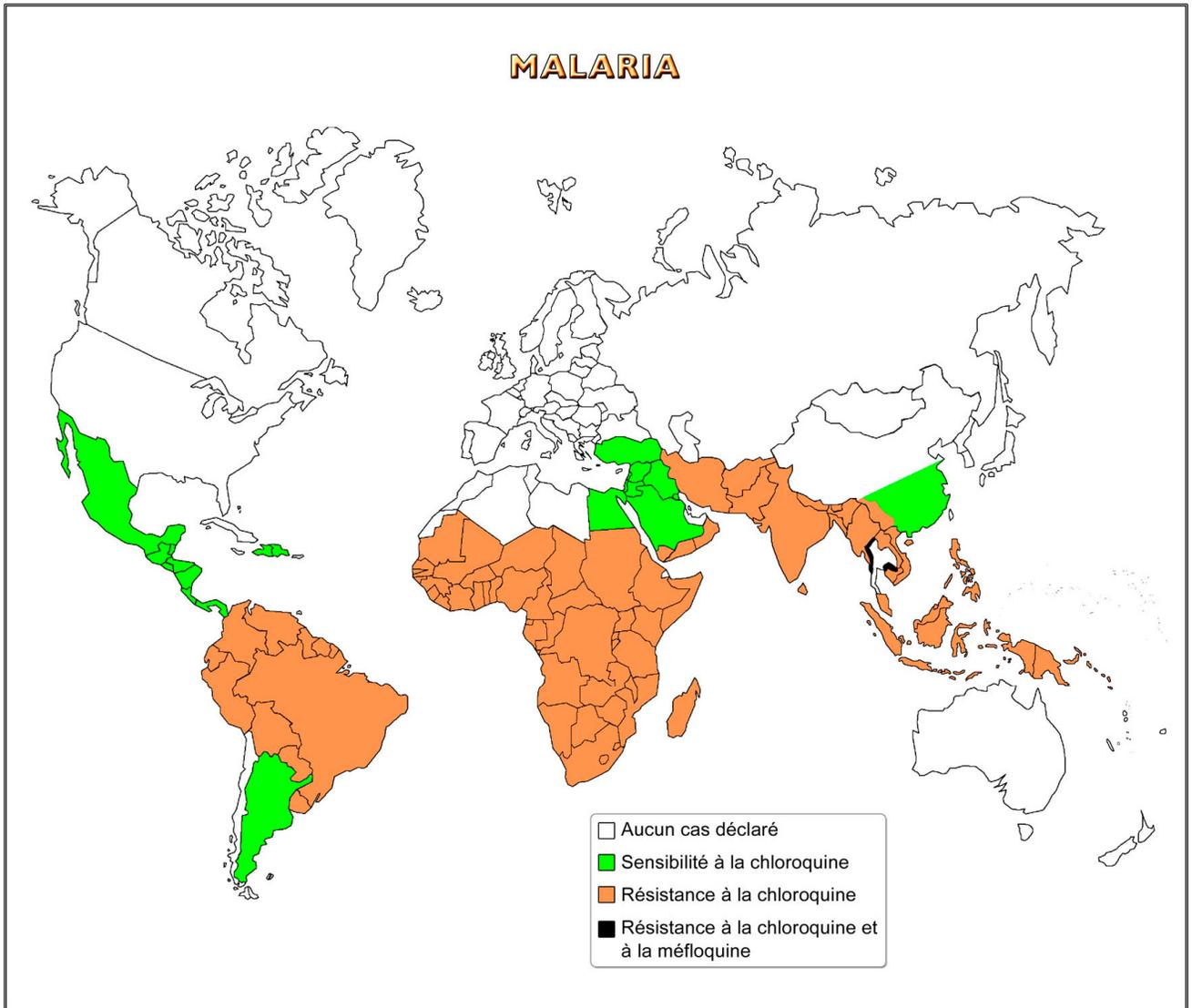
- atteinte cérébrale
- insuffisance rénale
- insuffisance respiratoire

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 »)

DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE :

Source : Relevé des maladies transmissibles au Canada 30S1 :1-66, 2004.

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

DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES :

Répartition annuelle des cas de malaria selon l'espèce – États-Unis, 2008-2009

Nombre de cas de malaria				
Espèces de <i>Plasmodium</i>	États-Unis - 2008 ¹		États-Unis – 2009 ²	
	Nombre	(%)	Nombre	(%)
<i>P. falciparum</i>	527	(40,6)	687	(46,3)
<i>P. vivax</i>	190	(14,6)	166	(11,2)
<i>P. malariae</i>	19	(1,5)	32	(2,1)
<i>P. ovale</i>	18	(1,4)	29	(2,0)
<i>P. knowlesi</i>	1 ³	(0,1)	0	(0,0)
Mixte	8	(0,6)	13	(0,9)
Indéterminé	535	(41,2)	557	(37,5)
TOTAL	1298	(100,0)	1484	(100,0)

¹ Source : MMWR 59 (SS-7) : 1-15, 2010.

² Source : MMWR 60 (SS-3) : 1-15, 2011.

³ Acquis aux Philippines.

Répartition des espèces de *Plasmodium* selon la zone d'acquisition – États-Unis, 2009

Nombre de cas de malaria - États-Unis, 2009 ¹								
Zone d'acquisition	Espèces de <i>Plasmodium</i>							
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. knowlesi</i>	Mixte	Indéterminé	TOTAL
Afrique	579	23	22	23	0	11	77	735
Asie	13	106	6	6	0	1	10	142
Amérique centrale et Caraïbes	62	12	2	0	0	0	5	81
Amérique du Sud	10	8	0	0	0	1	3	22
Océanie	1	6	0	0	0	0	0	7
Inconnu	19	9	2	0	0	0	461	491
TOTAL	684	164	32	29	0	13	556	1478

¹ Source : MMWR 60 (SS-3) : 1-15, 2011.

PRÉVENTION**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

2) Chimio prophylaxie appropriée

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

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 Hydroxychloroquine	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 : Relevé des maladies transmissibles au Canada 35S1 :1-82, 2009.

DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

➤ Coloration des frottis sanguins : technique standard

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

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

➤ Tests rapides (détection d'antigènes) (quelques exemples) :

- OptiMAL (*P. falciparum* et non-*P. falciparum*)
- OptiMAL-IT (*P. falciparum* et non-*P. falciparum*)
- Makromed (*P. falciparum*)
- Binax NOW® Malaria (*P. falciparum* et non-*P. falciparum*)
(seul test approuvé par la FDA)

➤ PCR

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>
Erythrocyte infecté agrandi	-	-	+	±
Erythrocyte infecté avec granulations de Schüffner	-	-	+	+
Erythrocyte 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
Erythrocyte infecté avec taches de Maurer	+	-	-	-
Parasite, formes accolées *	+	-	rare	-
Parasite, gamétocytes en forme de saucisses	+	-	-	-
Parasite, formes en bande *	rare	+	rare	rare
Nombre de mérozoïtes dans un schizonte érythrocytaire	8-24	6-12	12-24	8-12

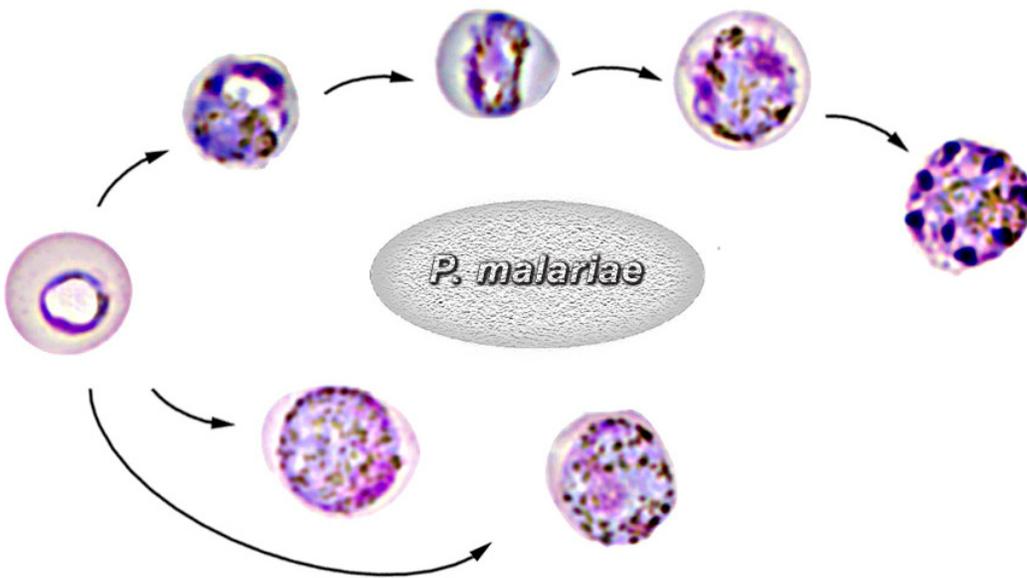
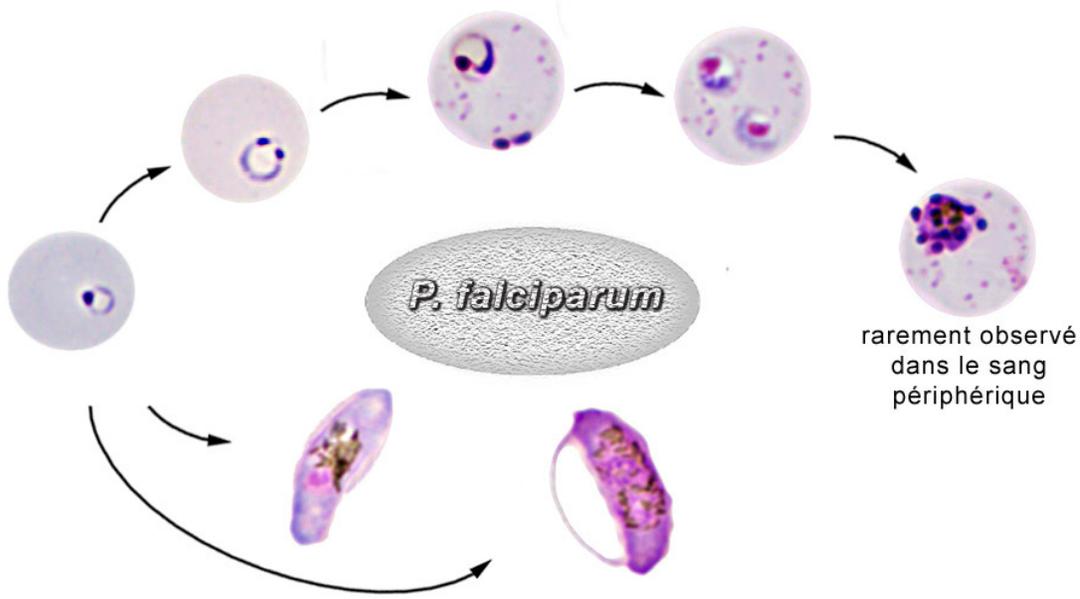
* Non spécifique mais suggestif si observé

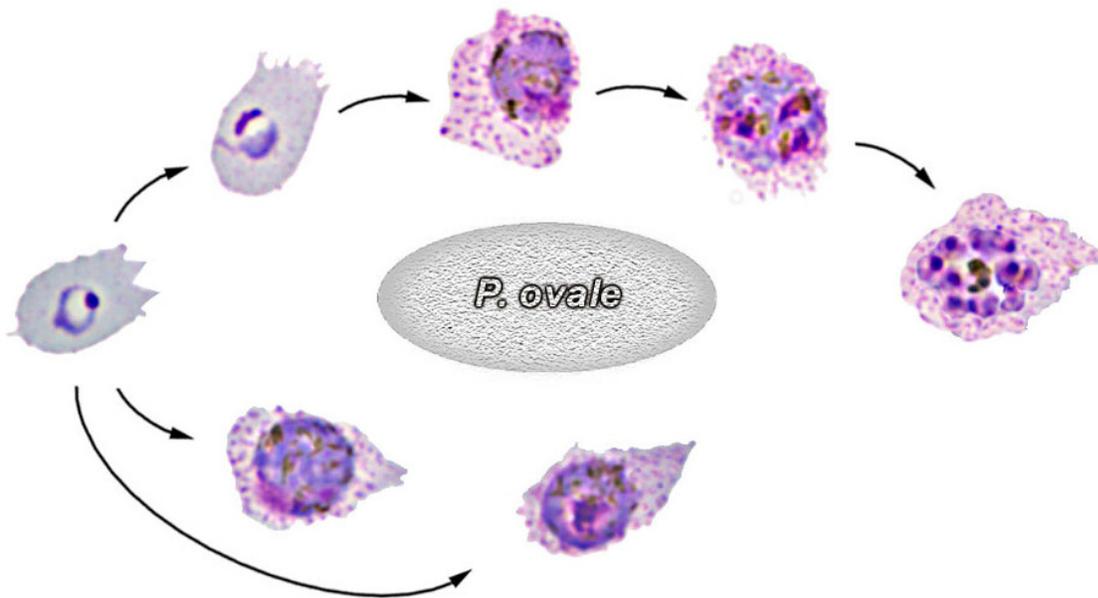
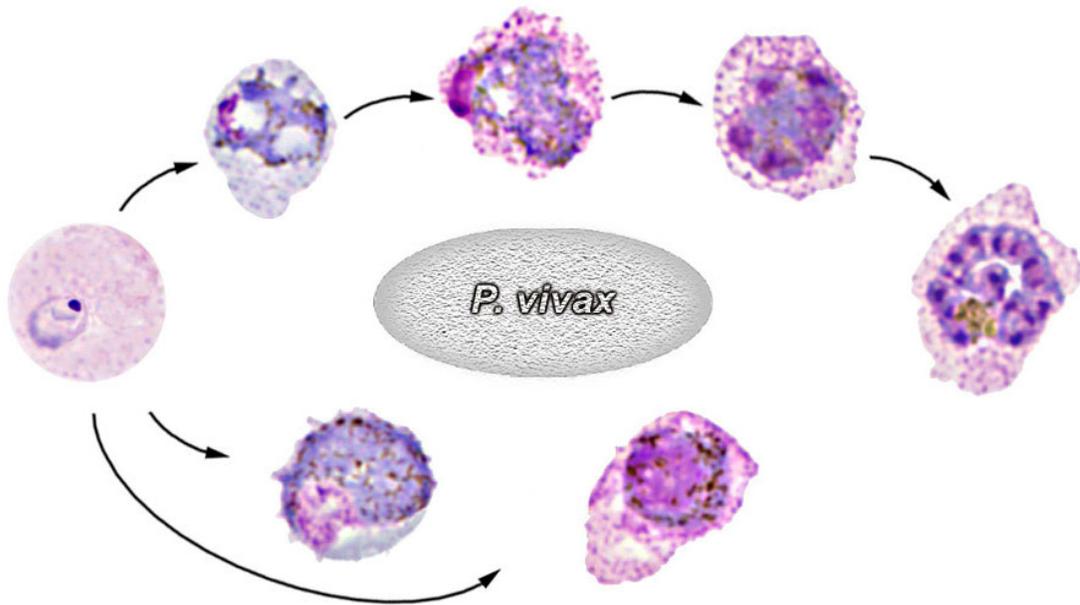
Tiré et adapté de : Strickland, G.T. 2000. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases, 8th ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

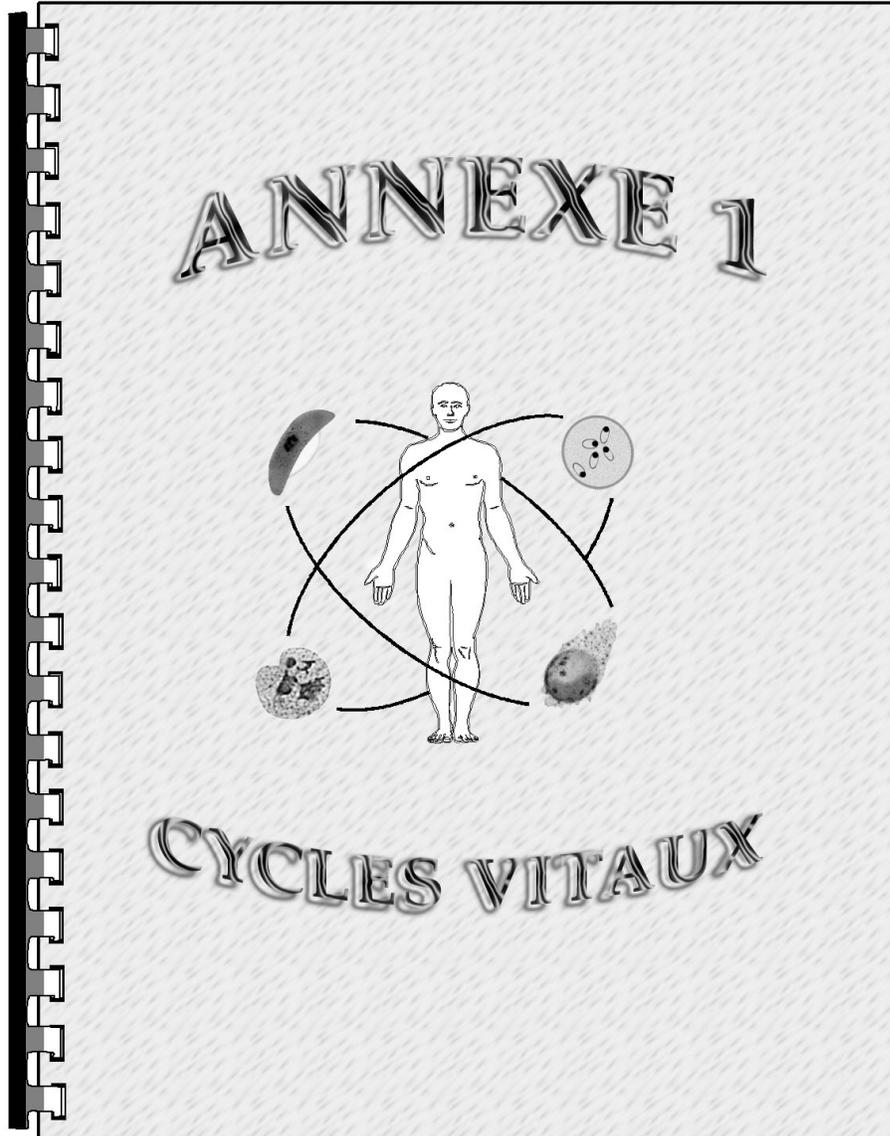
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
CELLULE HÔTE				
TAILLE	<ul style="list-style-type: none"> • Normale 	<ul style="list-style-type: none"> • Normale 	<ul style="list-style-type: none"> • Agrandie 	<ul style="list-style-type: none"> • Agrandie, mais pas autant que <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.
PARASITE				
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. • Vacuoles présentes ou absentes. • 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.

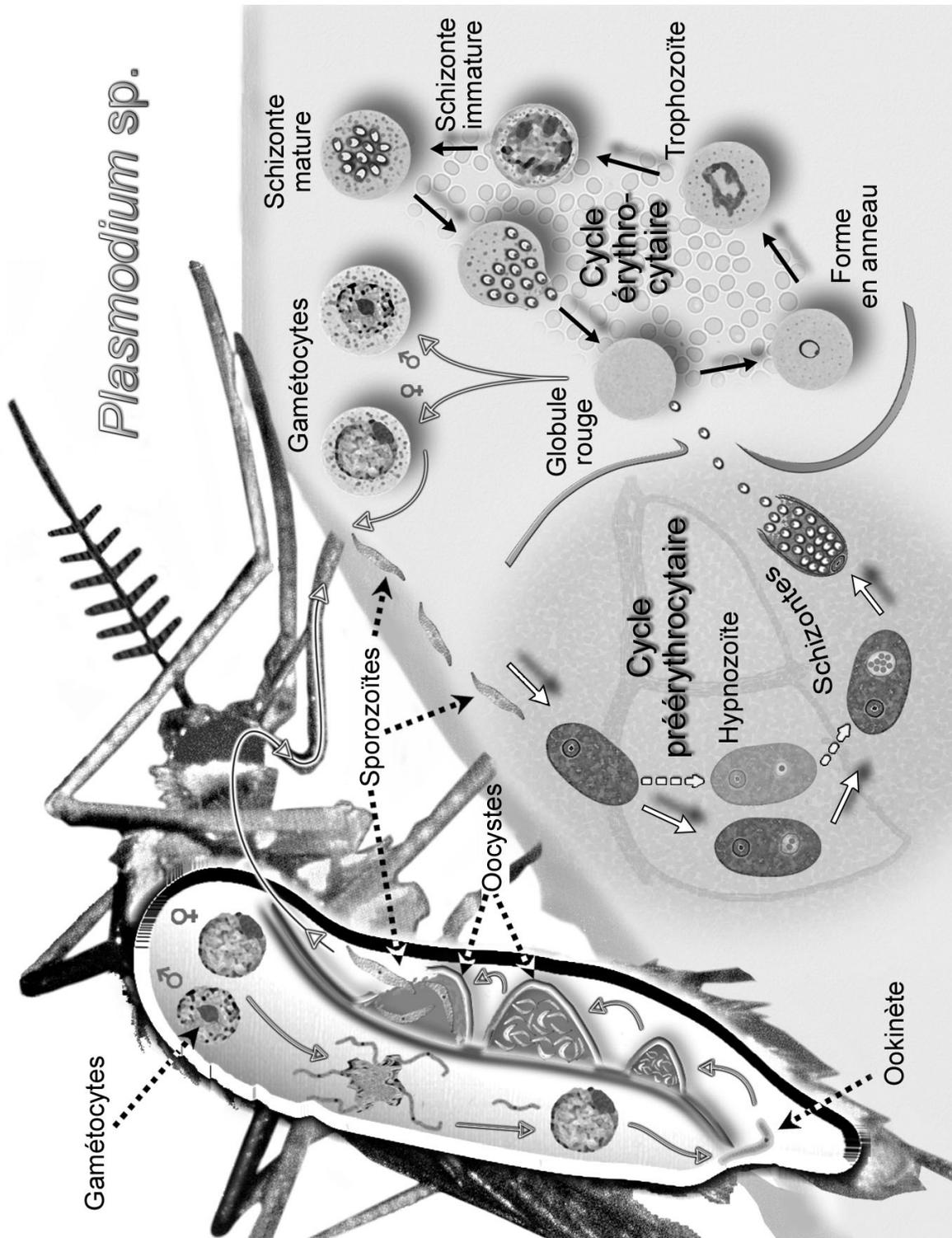
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>
SCHIZONTES	<ul style="list-style-type: none"> • Rarement observés. Leur présence indique une infection sévère. • Lorsque présents, petits et immatures, avec 2-4 mérozoïtes et des agrégats de pigment. • À maturité, les mérozoïtes 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.
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 gamétocytes 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 DES GAMÉTOCYTES DANS LE SANG	7-12 jours	7-14 jours	3-5 jours	12-24 jours

Source : Kokoskin, E. 2005. Dépistage du paludisme – Manuel pour le laboratoire d'aujourd'hui. Centre des maladies tropicales de l'Université McGill, Montréal.

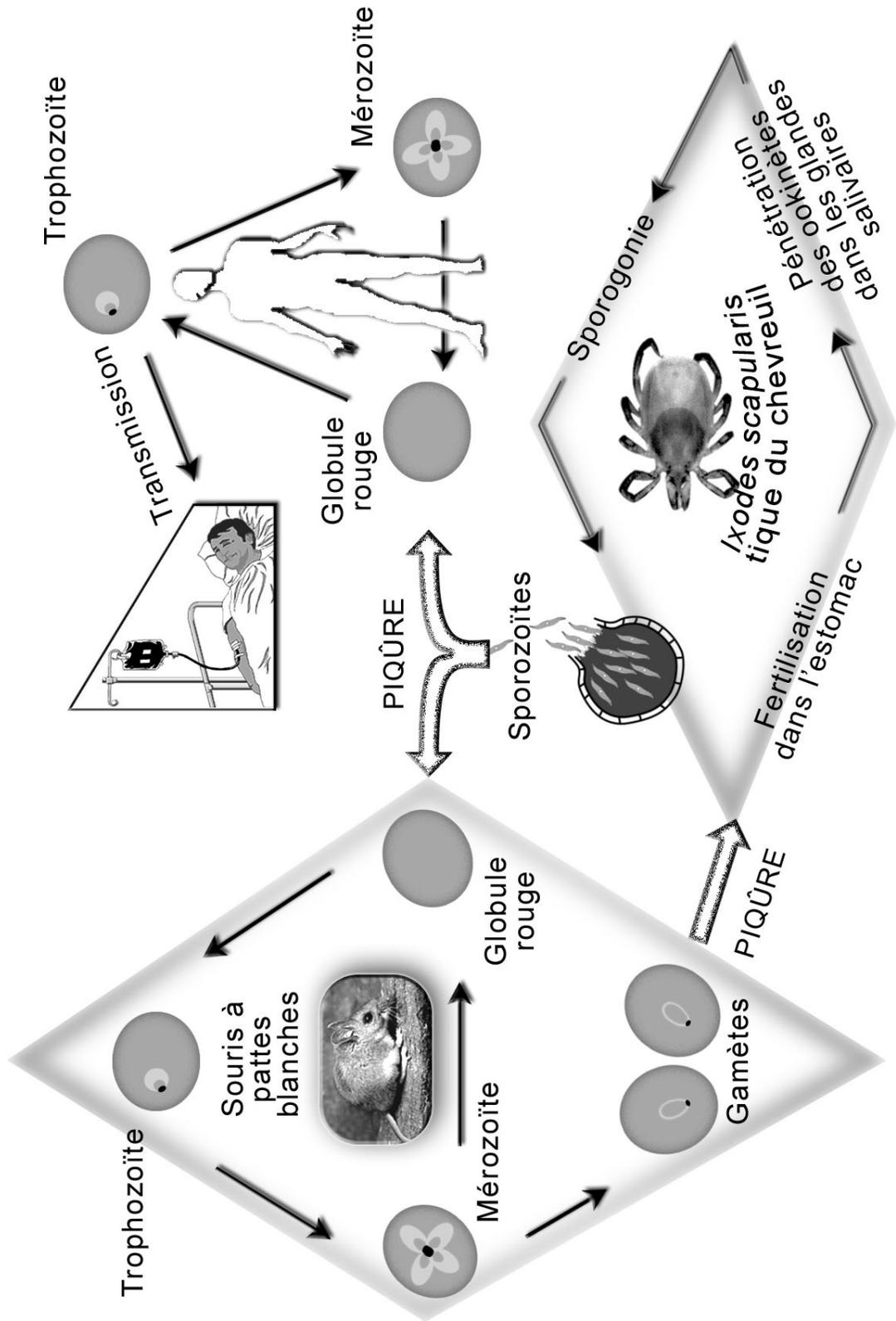


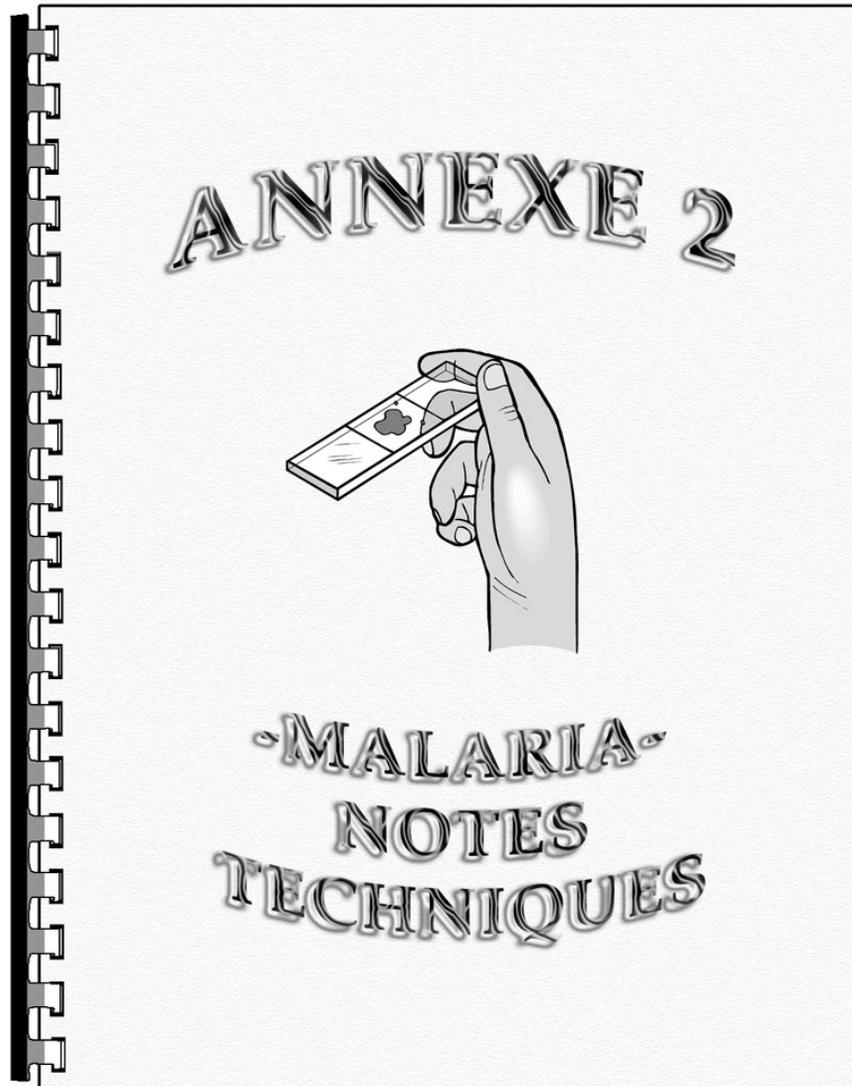




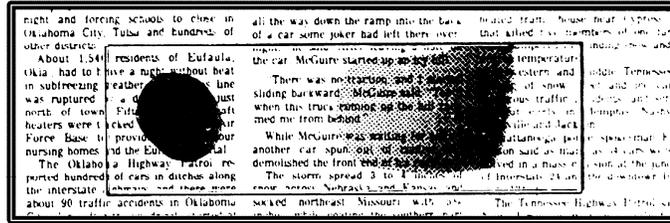


BABESIA sp.

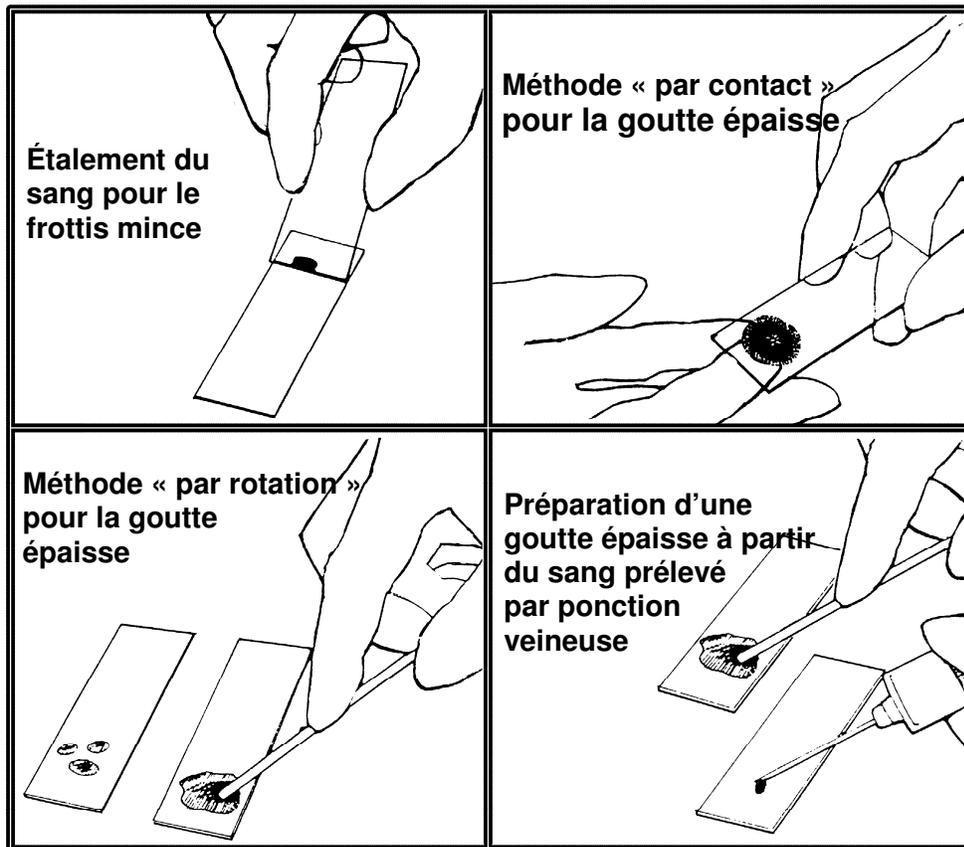




Préparation des frottis sanguins



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



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

PRÉPARATION DES FROTTIS 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 :

1. 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;
2. les granulations de Schüffner peuvent être inapparentes sur les frottis;
3. 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*;
4. 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.

COLORATION GIEMSA

TECHNIQUE UTILISÉE POUR LA COLORATION DES PARASITES SANGUINS

MÉTHODE

- Frottis minces**
- ✓ fixer les frottis au méthanol x 30-45 secondes
 - ✓ laisser sécher à l'air complètement
 - ✓ colorer au Giemsa 1:7 x 45 minutes (cf. notes 1 et 4)
 - ✓ 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)

Notes

Giemsa commercial (Acros Organics, n° cat. AC295595000, disponible chez Fisher)

1. 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).
2. 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.
3. Le Triton n'est pas essentiel mais il permet de donner plus de brillance aux structures colorées et de préciser certains détails morphologiques.
4. 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.

Gouttes épaisses

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

1. 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.
2. 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.

3. Elles ne doivent pas être fixées au méthanol.
4. Par la suite, la coloration se fait de la même façon que pour les frottis minces.

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.

Composition des réactifs

Solution A : bleu de méthylène, azur A et eau distillée tamponnée (pH 7,2)

Solution B : éosine et eau distillée tamponnée (pH 7,2)

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.**

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

Méthode de coloration des frottis minces (méthode inversée)

1. Fixer les frottis minces au méthanol pendant 30 secondes sur un support à coloration.
2. 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.
3. Ajouter immédiatement un volume égal de solution A et bien mélanger les colorants sur la lame avec une pipette pendant 10-15 secondes.
4. Colorer les frottis avec la solution mixte pendant 15-20 secondes.
5. Rincer les frottis avec de l'eau tamponnée ou de l'eau du robinet.
6. Laisser sécher les frottis en position verticale.

- 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.

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 :

MÉTHODE A : Frottis minces seulement

1. 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.
2. 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).
3. Rincer le frottis à l'eau du robinet ou avec du tampon Sorensen (pH 7,0-7,2) et laisser sécher.

MÉTHODE B : Frottis minces et gouttes épaisses

1. Décolorer le frottis avec une solution-tampon à pH 7,0-7,2 pendant une demi-journée.
Laisser sécher complètement.
2. Pour la recoloration, suivre la même procédure que pour la méthode A (étapes 2 et 3).

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

ESTIMATION DU NIVEAU DE LA PARASITÉMIE

IMPORTANCE

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

MÉTHODE (frottis minces)

Pour évaluer le pourcentage de parasitémie :

1. Déterminer le nombre moyen de globules rouges/champ microscopique à l'immersion, en évaluant trois zones contenant 150-300 globules rouges/champ. Faire la moyenne (globules rouges/champ).
2. Compter le nombre de globules rouges infectés dans 100 champs microscopiques d'une densité de globules rouges équivalente à celle du point 1 et en faire le total. NE PAS compter les gamétocytes.
3. Faire le calcul suivant :

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

EXEMPLE :

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

B. Nombre moyen de globules rouges/champ : 200

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

ESTIMATION DU NIVEAU DE LA PARASITÉMIE

Nombre de globules rouges/champ _____

Nombre moyen de globules rouges/champ _____

$$\frac{\text{Nombre total de G. R. infectés dans 100 champs}}{\text{Nombre moyen de G.R./champ} \times 100 \text{ champs}^1} \times 100 = \text{_____ \% parasitémie}$$

Exemple:

$$\frac{473 \text{ G. R. infectés dans 100 champs}}{(200 \text{ G.R./champ}) \times (100 \text{ champs})} \times 100 = 2,36 \% \text{ parasitémie}$$

Note : NE PAS compter les gamétocytes (*Plasmodium*), ni les formes extracellulaires (*Babesia*).

¹ Lorsque la parasitémie est élevée, on peut réduire le nombre de champs examinés. En tenir compte lors du calcul de la parasitémie.

