

Paludisme : complémentarité de deux méthodes de détection de plasmodium en pratique hospitalière

C Pinel, O Faure, P Ambroise-Thomas

Département de parasitologie-mycologie médicale et moléculaire,
faculté de médecine, université Joseph-Fourier, Grenoble I, 38700 La Tronche, France

(Reçu le 9 juin 1992 ; accepté le 13 septembre 1992)

Résumé — Le nombre de cas de paludisme recensés chaque année en France est estimé à près de 5000. La pertinence et la rapidité diagnostiques sont indispensables dans le cas de paludisme à *Plasmodium falciparum* où tout retard ou erreur du diagnostic biologique peut conduire à une évolution sévère et rapidement mortelle chez un sujet non immun. Le biologiste doit affirmer la présence du parasite, préciser son identification, ainsi que le pourcentage d'hématies parasitées. Les examens ont parfois une sensibilité insuffisante (frottis mince) ou sont de réalisation longue et délicate (goutte épaisse) dans un contexte d'urgence en zone non endémique. Dans ce cadre, en pratique hospitalière lors du diagnostic ou du suivi thérapeutique, la démarche entreprise, couplant la détection des formes plasmodiales sur tube capillaire QBC^R et sur frottis minces, a été évaluée sur 569 recherches dont 158 ont été positives avec les deux méthodes, 5 ont été positives sur frottis seulement et 7 sur QBC^R seulement. Ainsi, l'association des deux lectures offre le double avantage d'être performante et rapide.

diagnostic du paludisme / frottis mince / tube capillaire QBC^R

Summary — **Malaria : two complementary methods for efficient plasmodium detection.** In non-endemic areas, malaria diagnosis must be reliable and sensitive. Using acridine orange staining of centrifuged parasites (QBC^R) and Giemsa-stained thin blood films, we detected *Plasmodium* in 170 blood samples (158 samples were positive with both methods; 7 were positive with the QBC^R technique only and 5 were positive with the thin smear only). The QBC^R technique is useful for rapid screening and thin smear is necessary for *Plasmodium* identification and parasitaemia determination. The two complementary methods provide rapid and efficient diagnosis of malaria in non-endemic areas as well as control of parasitaemia following therapy.

malaria / diagnosis

Introduction

Le diagnostic du paludisme repose conventionnellement sur la détection des formes plasmodiales dans le prélèvement sanguin après observation de la goutte épaisse et du frottis mince (conformément à la législation).

Cette recherche nécessite une connaissance morphologique parfaite des quatre espèces de *Plasmodium*. Elle exige de la rigueur et une solide expérience pour interpréter les différentes observations.

Si la détection est aisée lors de parasitémie supérieure ou égale à 250 parasites/ μ l, elle est en revanche délicate pour des parasitémies très faibles.

Dans un contexte hospitalier en France, cette recherche peut être effectuée soit à titre systématique lors d'un retour d'une zone d'endémie, motivée ou non par des signes cliniques évocateurs, soit lors d'un bilan médical plus large dans un contexte de fièvre inexplicite, accompagnée ou non de troubles de la conscience.

Ainsi, dans de nombreux cas, la parasitémie est faible ou nulle. La grande sensibilité de la méthode de centrifugation en tubes capillaires : quantitative buffy coat (QBC^R) décrite par

Spielman *et al* [1] nous a incités à utiliser systématiquement cette méthode plutôt que la goutte épaisse, couplée à la lecture et à l'identification faite sur frottis mince pour la détection des formes plasmodiales et définir ainsi l'intérêt de cette démarche dans le diagnostic du paludisme et dans la surveillance de l'efficacité thérapeutique en routine hospitalière.

Matériels et méthodes

Pour chaque prélèvement sanguin, un tube QBC^R, ainsi que trois frottis minces sont examinés. Ces examens sont effectués en deux temps, tout d'abord la lecture du tube, puis des frottis minces pour confirmer la lecture, déterminer la présence ou non d'hématozoaires, identifier l'espèce plasmodiale, et établir la parasitémie.

Détection par la méthode QBC^R : elle est effectuée selon les normes du fabricant (Becton Dickinson) sur un volume de sang compris entre 40 et 60 μ l dans des tubes capillaires (QBC Malaria Becton Dickinson) pré-imprégnés d'oxalate de potassium, d'héparine, d'EDTA et d'acridine orange. Un flotteur est inséré dans le tube avant centrifugation. Les hématies parasitées sont concentrées à la partie supérieure du culot après centrifugation (5 min à 14 000 g) dans une centrifugeuse à microhématocrite type 2 010 (Hettich) et écrasées en monocouche entre la paroi de verre et le flotteur. La lecture est faite à 500 à l'immersion au microscope à fluorescence (Leitz, lampe HBO50, émission 380 nm) avec un objectif plan (SP 50)

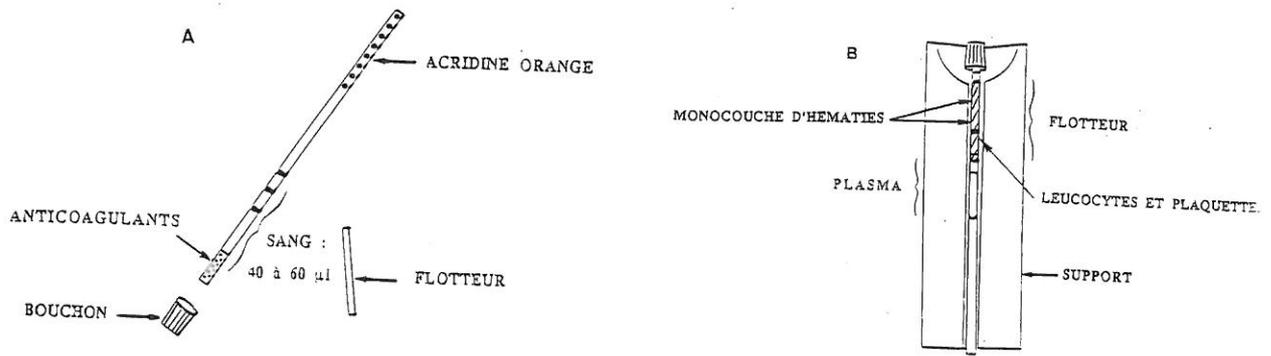


Fig 1. Présentation du tube QBCR; A) avant le prélèvement; B) après centrifugation.

non directement raccordable au système d'optique. Le tube est examiné sur toute la longueur correspondant à la présence du flotteur au cours de 3 rotations successives (fig 1).

Les frottis minces fixés 2 min par le méthanol, sont colorés 10 mn par une solution aqueuse de Giemsa (10%), rincés à l'eau neutre, séchés et observés à l'immersion ($G \times 1000$).

Ainsi 569 recherches ont été effectuées de mai 1989 à décembre 1991 en utilisant en parallèle et de façon complémentaire ces deux méthodes de détection.

Résultats

Parmi les 569 recherches, 170, correspondant à 98 malades, ont été positives, soit par les deux méthodes simultanément, soit par l'un ou l'autre des examens :

- 158 recherches ont été positives avec les deux méthodes ;
- 5 recherches ont été positives avec le frottis mince seulement (tableau I) ;
- 7 avec le QBCR seulement (tableau I).

Tous les faux négatifs sur frottis minces ont été obtenus au cours du suivi après traitement. En revanche, dans un cas nous avons obtenu un faux négatif par la technique QBCR lors d'une suspicion de paludisme chez un malade (tableau I).

Nous n'avons pas, dans les 399 détections négatives, de cas de paludisme non diagnostiqué durant cette période.

Sensibilité de détection

La lecture au QBCR est d'une très bonne sensibilité dans les cas de paludisme à *Plasmodium falciparum* ; le temps moyen de lecture étant de 1 à 3 min lors de parasitémie faible ($\geq 0,001\%$), de 5 à 10 min lors de parasitémie très faible ou négative, ou lors de discordance avec le frottis mince imposant une relecture. Une forme plasmodiale par champ au QBCR correspond en moyenne à une parasitémie de 0,001%. Les résultats douteux ou très faiblement positifs au QBCR (1 à 5 formes par tube) ont imposé une lecture plus minutieuse des lames. Inversement, la présence de formes plasmodiales sur frottis uniquement a nécessité une relecture ou une nouvelle séparation sur tube.

Spécificité de détection

L'identification d'espèce a toujours été faite après observation du frottis mince. Chez deux malades,

des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* ont été retrouvés sur frottis et par lecture en fluorescence, permettant ainsi une identification formelle de l'espèce sur le test QBCR.

Les lectures des lames exigent très souvent un examen minutieux, en particulier lors de poly-parasitisme, lors de très faibles parasitémies ou d'examen négatifs (30 min maximum dans ce cas pour les 3 lames lues conjointement par un parasitologue et une technicienne ou un interne).

Certaines identifications n'ont pu cependant être effectuées dans les cas de parasitisme trop peu important (rares formes sur frottis) chez des malades ayant suivi une chimioprophylaxie mal conduite ou mal adaptée et présentant de rares formes dégradées.

Conservation des prélèvements

Les détections par QBCR sont souvent plus faciles et la dégradation est moins prononcée ou moins visible que sur les frottis, lorsque le sang est conservé à température ambiante plus de 12, 24 ou 48 h. La relecture des tubes ou la comparaison des formes plasmodiales après traitement peut être faite sur les différents tubes correspondant aux prélèvements longitudinaux. Les tubes conservés à 4°C et à l'abri de la lumière sont lisibles avec des formes plasmodiales peu altérées dans un délai de 8 jours après le stockage.

Difficulté de lecture rencontrée au QBCR

La sensibilité de cette méthode est excellente (97%). Nous avons cependant obtenu des concentrations anormales de formes plasmodiales, soit dans la zone leucocytaire (1 cas), soit dans la zone plaquettaire ou à la frange entre plasma et plaquettes pour deux cas de paludisme à *P ovale*.

Quatre fois au cours de ces analyses (178 examens), nous avons eu une lecture impossible par manque de séparation des granulocytes formant une traînée dans toute la couche d'hématies.

Nous ne pouvons expliquer l'examen faussement négatif obtenu avec *P vivax* (parasitémie 0,03%) présentant de nombreux schizontes.

Dans certains cas, la présence de granulations fluorescentes (corps de Jolly, granulations leucocytaires, artefacts divers) de même taille que les trophozoïtes rendent l'interprétation difficile.

Tableau I. Analyse des résultats divergents entre QBC^R et frottis mince.

Cas	Espèces	Circonstances de l'examen
QBC positif - Frottis négatif		
1	<i>Plasmodium falciparum</i>	1 forme/30 champs
2	<i>Plasmodium falciparum</i>	1 forme/30 champs
3	<i>Plasmodium vivax</i>	1 forme/15 champs
4 } 5 }	<i>Plasmodium falciparum</i>	2 formes/QBC (même malade)
6	<i>Plasmodium falciparum</i>	1 forme/QBC
7	<i>Plasmodium falciparum</i>	rare formes
QBC négatif - Frottis positif		
1	<i>Plasmodium falciparum</i>	1 forme altérée sur une lame
2	<i>Plasmodium ovale</i>	rare formes sur lames
3	<i>Plasmodium</i>	1 forme sur une lame
4	<i>Plasmodium falciparum</i>	rare gamétocytes
5	Schizontes de <i>Plasmodium vivax</i>	Parasitémie 0,03%

Discussion

Cette démarche diagnostique effectuée depuis plus de deux ans nous a permis d'éviter les faux négatifs. Effectivement, pour les examens rendus négatifs aucune forme plasmodiale n'a été retrouvée lors d'un 2^e ou d'un 3^e prélèvement. Parallèlement, l'évolution clinique n'a jamais infirmé ces résultats.

L'observation des tubes avant la lecture du frottis assure dans la majorité des cas une orientation très rapide et la lecture est en règle générale aisée, comme l'ont souligné Spielman *et al* [1, 2], Levine *et al* [3], elle peut rapidement être confiée à un interne ou aux techniciennes. Les hésitations ou les difficultés rencontrées dans certains cas sont alors signalées, ce qui impose une lecture plus minutieuse des lames et un contrôle des tubes.

Il en est tout autrement pour la réalisation et la lecture de la goutte épaisse facilement abandonnée au profit du QBC^R. Sa préparation est de 1 heure au maximum, la lecture est beaucoup plus délicate. La démarche est en général inverse ; les frottis minces sont lus avant, la goutte épaisse permet de confirmer les recherches négatives (White *et al*) [4].

La technique QBC^R doit cependant toujours être associée à la lecture sur frottis mince car malgré sa sensibilité, elle peut être en défaut comme le montrent nos résultats même en se plaçant dans les meilleures conditions de lecture (oculaire 10, objectif 50) avec un appareillage de qualité [3, 5, 6].

Les détections difficiles ou négatives (1 cas) des schizontes de *P vivax* signalées aussi par Poggensee *et al* [7], les migrations anormales d'hématies parasitées par *P ovale* (2 cas) observées par Makler [8], ne permettent pas d'utiliser cette technique comme seul substitut aux méthodes classiques en accord avec White *et al*, Rickman *et al*, Wongrichanalai *et al* [4, 9, 10]. Cependant, contrairement à Rickman *et al* [9] qui ont obtenu une excellente spécificité à la lecture des tubes QBC^R, nous avons eu des difficultés d'interprétation dans 12 cas, la lecture étant considérée comme douteuse, puis positive ou négative selon les résultats du frottis mince.

De plus, l'identification d'espèce ne peut être correctement assurée par la seule technique QBC^R [9, 10]. De même, la détection n'est pas entièrement fiable dans les cas de très faible parasitémie puisque dans notre étude, nous avons eu un cas de paludisme non diagnostiqué par QBC^R et visualisé par de très rares formes sur frottis minces. Baird *et al* [5], Rickman *et al* [9], Wongrichalanai *et al* [10] ont aussi signalé de faux négatifs par QBC^R lors de très faibles parasitémies.

Ainsi la recherche de *Plasmodium* par les deux méthodes est impérative dans un contexte hospitalier en France où les sujets atteints de paludisme ont, dans la majorité des cas, déjà suivi une chimioprophylaxie plus ou moins bien conduite. Les anomalies de structure des formes plasmodiales, la fragilisation des hématies, les altérations possibles des éléments figurés du sang sont autant de facteurs concourant à la difficulté d'interprétation jointe à la plus faible précision de la lecture permise en immunofluorescence [4, 11, 12].

La technique QBC présente cependant un intérêt indéniable dans la mise en évidence de formes plasmodiales du fait de sa sensibilité et de sa rapidité d'exécution. Un tube par examen est suffisant et représente, hors équipement, un coût moyen de 29 FF TTC ; il sera alors complété par la lecture des frottis minces.

Conclusion

La lecture des frottis couplée à la centrifugation en tubes capillaires permet un diagnostic rapide et performant du paludisme d'importation rencontré en pratique hospitalière. Le test QBC^R d'excellente sensibilité ne peut cependant pas se substituer à la lecture du frottis mince indispensable à l'identification de *Plasmodium* mais constitue une méthode complémentaire rapide de détection. L'association de la recherche des formes plasmodiales sur frottis minces et par fluorescence avec le test QBC^R permet ainsi au biologiste d'être conforté dans la qualité de son résultat tant au niveau de sa sensibilité qu'au niveau de l'identification formelle lors du diagnostic d'urgence du paludisme d'importation.

Remerciements

Nous tenons à remercier la société Becton Dickinson Europe pour le prêt de l'appareillage qui nous a permis de réaliser cette étude, ainsi que les internes et les techniciennes qui ont participé à ce travail.

Références

- 1 Spielman A, Perrone JB, Teklehaimanot A, Balcha F, Wardlaw SC, Levine RA (1988) Malaria diagnosis by direct observation of centrifuged samples of blood. *Am J Trop Med Hyg* 39, 337-342
- 2 Spielman A, Perrone JB (1989) Rapid diagnosis of Malaria. *Lancet* i, 727
- 3 Levine RA, Wardlaw SC, Patton CL (1989) Detection of haematoparasites using quantitative Buffy Coat Analysis Tubes. *Parasitol Today* 5, 132-134
- 4 White MJ, Silamut K (1989) Rapid diagnosis of Malaria. *Lancet* i, 435
- 5 Baird JK, Jones P, Jones TR (1992) Diagnosis of malaria in the field by fluorescence microscopy of QBC^R capillary tubes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86, 3-5
- 6 Zimmerman R, Gathecha E (1989) Rapid test for Malaria. *Lancet* i, 1013-1014
- 7 Poggensee U, Schuler D (1992) Rapid diagnosis of malaria with the QBC^R system in a hospital in Berlin Germany. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86, 6
- 8 Makler MT (1989) Haematoparasites and QBC analysis. *Parasitol Today* 5, 325
- 9 Rickman LS, Long GW, Oberst R, Cabanban A, Sangalang R, Smith JL, Chulay JD, Hoffman SL (1989) Rapid diagnosis of malaria by acridine orange staining of centrifuged parasites. *Lancet* i, 68-71
- 10 Wongrichanalai C, Webster HK, Brown AE (1989) Rapid diagnosis of malaria by acridine orange staining of centrifuged parasites. *Lancet* i, 967
- 11 Parzy D, Raphenon B, Martet G, Nicolas P, Touze J.E, Baudon D, Lecamus JL (1990) Quantitative Buffy Coat test (QBC) Test Monofluo Kit *falciparum*. Intérêt comparé dans le diagnostic rapide du paludisme. *Méd Trop* 50, 97-101
- 12 Coosemans M, Mangelschots E, Wery M (1991) Valeur du test « quantitative buffycoat » (QBC^R) comme méthode de diagnostic microscopique du paludisme. *Ann Soc belge Med Trop* 71, 325-328

25- Coloration de Giemsa en parasitologie et mycologie

Principe :

La technique de Giemsa est la méthode de coloration panoptique la plus utilisée en parasitologie, notamment dans le domaine des protozoaires sanguicoles et tissulaires. Elle peut être mise à profit en mycologie médicale et vétérinaire.

Le Giemsa colore en bleu les structures cytoplasmiques et en rouge pourpre les structures nucléaires et autres organites contenant de l'ADN (comme le kinétoplaste des trypanosomatidés).

Mode opératoire :

- Fixer le frottis dans du méthanol pendant 1 à 2 minutes après l'avoir séché à l'air.
- Rincer dans l'eau du robinet.
- Colorer dans une solution de Giemsa R diluée à 10% dans une solution Tampon pH=7.0 pendant 20 minutes.
- Rincer dans l'eau du robinet et sécher à l'air.

Résultats :

Cytoplasme des cellules eucaryotes parasites, fongiques ou de l'hôte : **bleu plus ou moins foncé** en fonction de sa richesse en ribosomes.

Noyau : **rouge pourpre**.

Remarques :

Le Colorant de Giemsa R solution permet de détecter et d'identifier :

- les parasites sanguicoles : *Plasmodium*, *Trypanosoma spp*, microfilaires.
- les protozoaires tissulaires (*Leishmania spp*), *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* (coccidie digestive), des flagelles (ceux de *Trichomonas spp* par exemple), les microsporidies.

Les structures pariétales des champignons et les formes kystiques de *Pneumocystis carinii* ne se colorent pas et apparaissent comme un halo clair.

Bibliographie :

BESSIS M., *Réinterprétation des frottis sanguins*, éd. Masson Springer, 1976, p. 9.

DATRY A., LESCO G., RICHARD-LENOBLE D., KOMBILA M., *Coloration rapide des plasmodies et des microfilaires par les colorants solubles dans l'eau*, Med. Trop., vol. 42, n°6, nov-dec. 1982, p. 673-675.

Pour vos commandes :

Colorant de Giemsa R en solution code 320310-volume : -0125, -0500, -1000 ou -2500 mL
Tampon pH=7.0 (6 doses) code 361600-0000 6 doses pour 6 x 1 litre

Mise à jour du 22/01/04