

COURS DE COLLEGE DES MALADIES INFECTIEUSES

MICROBIOLOGIE – PARASITOLOGIE



Diagnostic biologique du paludisme

01 Mars 2012 Faculté de Médecine de Sousse

Principes des techniques utilisées dans le diagnostic biologique du paludisme

Pr.Ag Fathallah Akila

Faculté de Médecine de Sousse

CHU F. Hached de Sousse

01 Mars 2012 Faculté de Médecine de Sousse

SIGNES D'ORIENTATION

▶ Orientation clinique:

- ♣ **Paludisme:** urgence diagnostique et thérapeutique
- ♣ Toute suspicion clinique de paludisme doit faire pratiquer en urgence une recherche de *Plasmodium* avec un délai de résultat inférieur à 2 heures.
- ♣ Toute fièvre au retour d'une zone d'endémie est un paludisme jusqu' à preuve du contraire

► Orientation biologique:

- ♣ Anémie hémolytique
- ♣ Hyper leucocytose initiale suivie d'une leuconeutropénie au cours des accès répétés
- ♣ Thrombopénie, parfois majeure
(10 000 plaquettes/mm³.)
- ♣ Perturbations biochimiques (cytolyse modérée, hypoalbuminémie, hypocholestérolémie, hypocalcémie, hypertriglycéridémie)

Le diagnostic de certitude =

Dg parasitologique direct

L'observation de *Plasmodium* dans les GR sur un prélèvement de sang

Le résultat doit être obtenu dans un délai maximal de 2 heures

Le sang prélevé au moment d'un pic fébrile et avant tout traitement .

Diagnostic parasitologique direct

But

- ♣ Mise en évidence du parasite
- ♣ Identification de l'espèce
- ♣ Numération (Appréciation de la densité parasitaire)
- ♣ Suivi du traitement

Techniques classiques:

Le frottis mince = examen rapide

La goutte épaisse = examen de concentration différé.

Ne nécessite **qu'un microscope optique**
et des **colorants** d'un coût modéré

Mais

La qualité du résultat dépend beaucoup de
l'expérience de la personne réalisant cet examen.



Frottis et goutte épaisse

Se font:

- ♣ Soit par prélèvement capillaire au bout du doigt, lobe de l'oreille ou talon (enfant) avec confection immédiate du frottis et de la goutte épaisse
- ♣ Soit par ponction veineuse avec prélèvement dans un tube contenant un anticoagulant (**EDTA** , **l'héparine est à proscrire**: déformation des GR)

Frottis mince (FS)

Avantages

- ♣ Lecture aisée
- ♣ Technique rapide → diagnostic d'urgence
- ♣ Diagnostic d'espèce

Inconvénients

-Peu sensible → problème pour les parasitémies faibles Seuil = 160 parasites/ μ l

Goutte épaisse (GE)

Avantages:

Sensible GE → une concentration parasitaire d'environ **20 fois** celle d'un frottis et peut détecter des parasites au taux extrêmement faible **5 parasites/ μ l**, soit une parasitémie de 0.0001%

Inconvénients:

Diagnostic d'espèce difficile

Lente

Technique du frottis mince:

- ♣ Le frottis doit être fait **immédiatement**, sinon il faut conserver le prvt à 4°C (maximum pendant une nuit car le parasite peut évoluer et même donner des formes atypiques)
- ♣ Le frottis doit être **mince** de manière à ne comporter qu'une couche cellulaire.
- ♣ Le frottis, après coloration au Giemsa, sera lu avec la plus grande attention, à l'immersion, **pendant 30 minutes** environ, avant de rendre un résultat négatif.

Technique du frottis mince

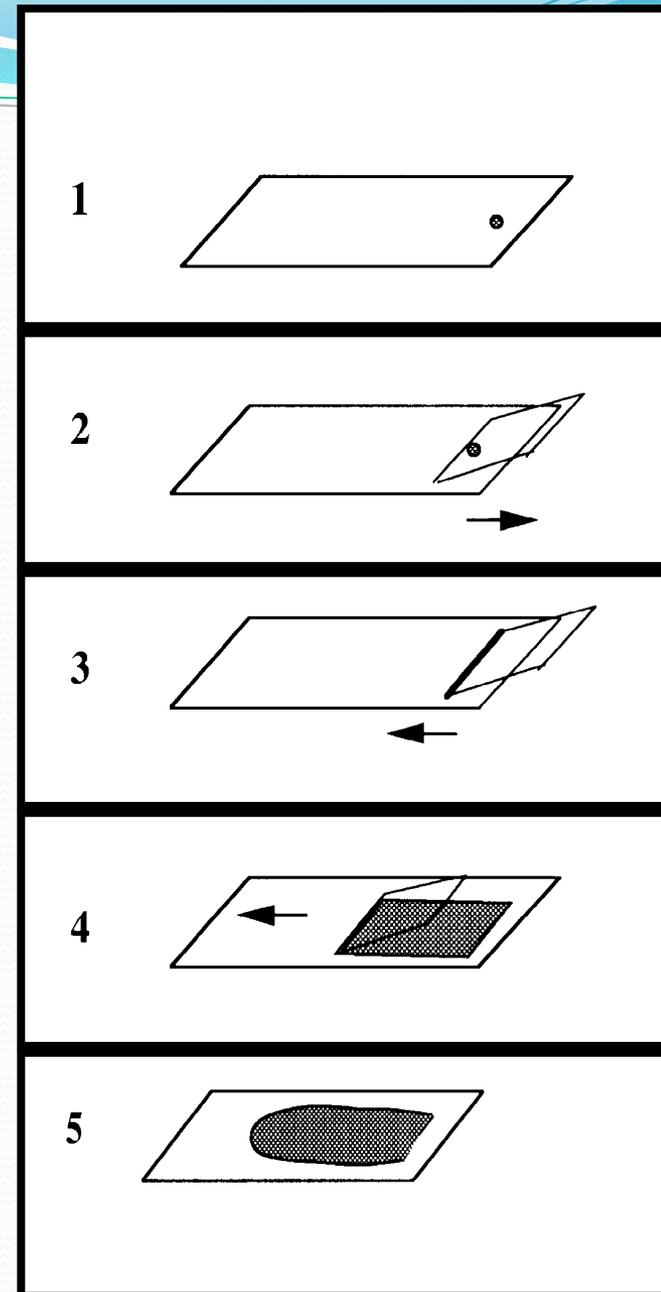
1- La goutte de sang doit être plus petite la moitié que celle utilisée pour la goutte épaisse.

2- Appliquer le tranchant d'une autre lame de verre sur la goutte de sang à **un angle de 45°** laisser le sang s'étaler par capillarité tout au long du tranchant de la lame.

3- pousser la lame en avant tout en la gardant au même angle.

4- Il est essentiel de pousser la lame d'un seul coup et sans s'arrêter ni se reprendre; le sang doit suivre la lame et ne doit pas être poussé par elle.

5- Un frottis bien fait devrait consister d'une couche de sang mince et uniforme, sans que la pointe du frottis ne touche le bord de la lame. Sécher le frottis immédiatement en agitant la lame ou en la plaçant devant un ventilateur.



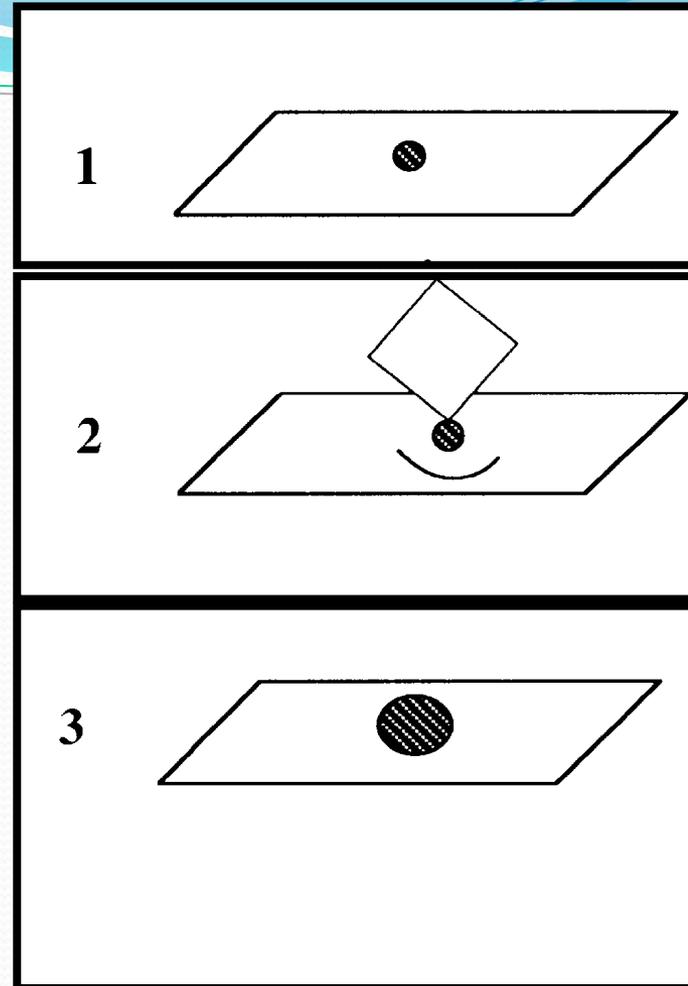
Technique de la goutte épaisse

1- Dépôt du sang: déposer une grosse goutte de sang (2 fois le volume utilisé pour un frottis).

2- Défibrination : pour empêcher la coagulation, avec le coin d'une autre lame , étaler régulièrement le sang sur une surface de 1 cm de diamètre, en tournant régulièrement pendant 2 minutes.

3- Sécher 24h à temp ambiante ou 2h à 37°C .

Ne jamais fixer à la chaleur ou à l'alcool responsable d'une fixation des hématies.



Coloration du frottis

- ♣ Doit être **fixé 3 à 5mn** dans le méthanol ou le May Grunwald
- ♣ La coloration se fait par une solution de **Giemsa 1/10 à 1/20**
(Giemsa : 1 ml, eau tamponnée qsp : 10 ml) **pendant 20 mn** pour le Giemsa lent, **10 mn** pour le Giemsa rapide.
- ♣ Rincer à l'eau (neutre) ou tamponnée.
- ♣ Le **pH** du colorant doit être légèrement alcalin/ **(7.2- 7.4)**

Une coloration acide pourrait empêcher la mise en évidence des parasites.

Coloration de la goutte épaisse

♣ **Lyse des GR et libération de l'Hb** : recouvrir abondamment la goutte épaisse du mélange Giemsa : (3 gouttes, 2 ml eau neutre) (ou tremper la GE dans de l'eau distillée)

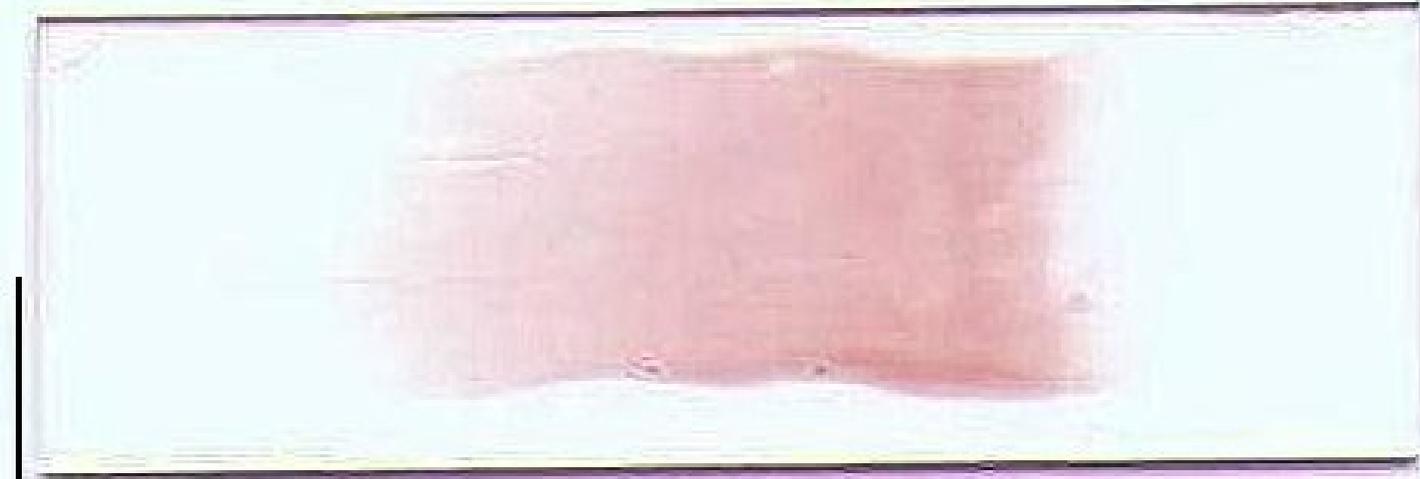
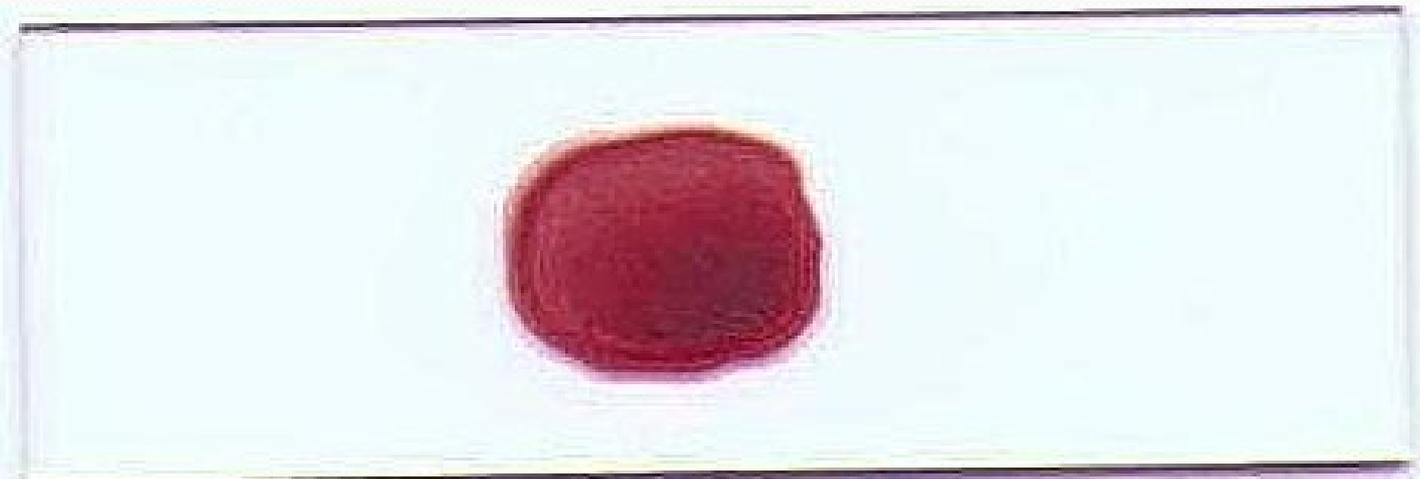
Laisser agir pendant 5 à 10 minutes jusqu'à décoloration complète les parasites, restent intacts sur la lame.

♣ Fixer ensuite à l'alcool méthylique.

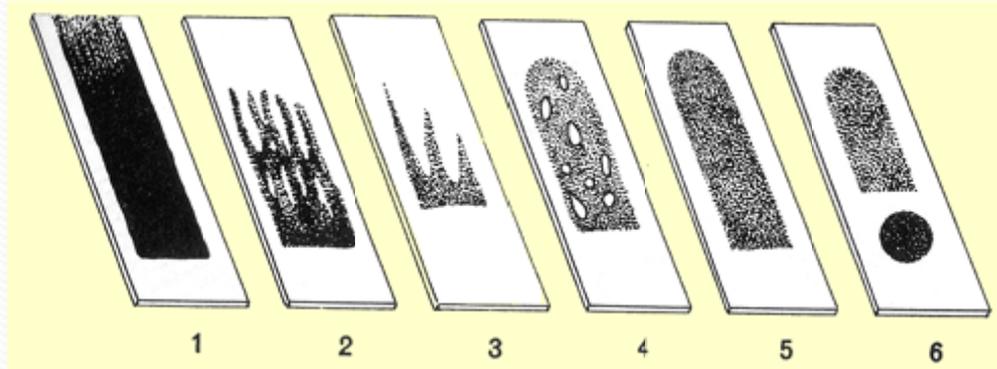
♣ Coloration : Giemsa : 1 ml, eau neutre qsp : 10 ml. Laisser agir **20 minutes**

♣ Laver à l'eau du robinet

♣ Sécher à l'air.



Erreurs fréquentes dans la préparation de frottis :



- 1- Trop de sang: la marge du frottis est perdue et le frottis est trop épais
- 2- sang coagulé au moment de faire le frottis
- 3- Contact irrégulier entre la lame d'étalement et le frottis .
- 4- Lame mal dégraissée
- 5- Bon frottis
- 6- Frottis et goutte épaisse sur la même lame

NUMERATION

Nbr total de GR parasités dans 100 champs

$$\text{(FS)Parasitémie (\%)} = \frac{\text{Nbr total de GR parasités dans 100 champs}}{\text{Nbr moyen de GR /champ x 100 champs}} \times 100$$

GE: nombre de parasites dans **20 μ l** de sang

Intérêts

- ♣ apprécier la gravité de la maladie
- ♣ permet d'apprécier l'efficacité thérapeutique
- ♣ permet de détecter une éventuelle résistance

DECLARATION

le paludisme est une maladie à
déclaration obligatoire

➔ En cas de diagnostic positif :
déclaration au ministère de la santé
(direction régionale de la santé)

Le diagnostic d'espèce repose :

☐ Sur la morphologie du parasite.

☐ Sur la morphologie du GR qui le porte.

P.f. { GR de tout âge, taille normale
+ **tâches de Maurer.**

P.v. et P.o. { GR jeunes, taille agrandie
+ **granulations de Schüffner**

P.o. ovalisation, extrémité frangée

P.m. → Vieux GR, taille normale ou ↘
granulations = 0

Plasmodium falciparum

Critères de diagnostic

Plasmodium falciparum : critères de diagnostic

1- Parasite le GR de tout âge ,
taille normale



2- Trophozoïtes (formes en anneau)
bague à chaton (1/4 à 1/5 de
l'hématie) fins et fragiles



3- Polyparasitisme fréquent.



4- Certains trophozoïtes peuvent
avoir deux grains de chromatine.



5- formes marginales ou
appliquées.



6- Schizonte et rosace absents
ds sang périphérique
(16 à 24Nx).

Frottis monotone

7- Les gamétocytes formes en
croissant ou faux.

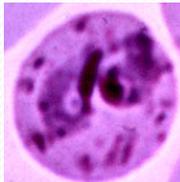
gamétocyte **mâle**: cytoplasme
lilas, extrêmités arrondies

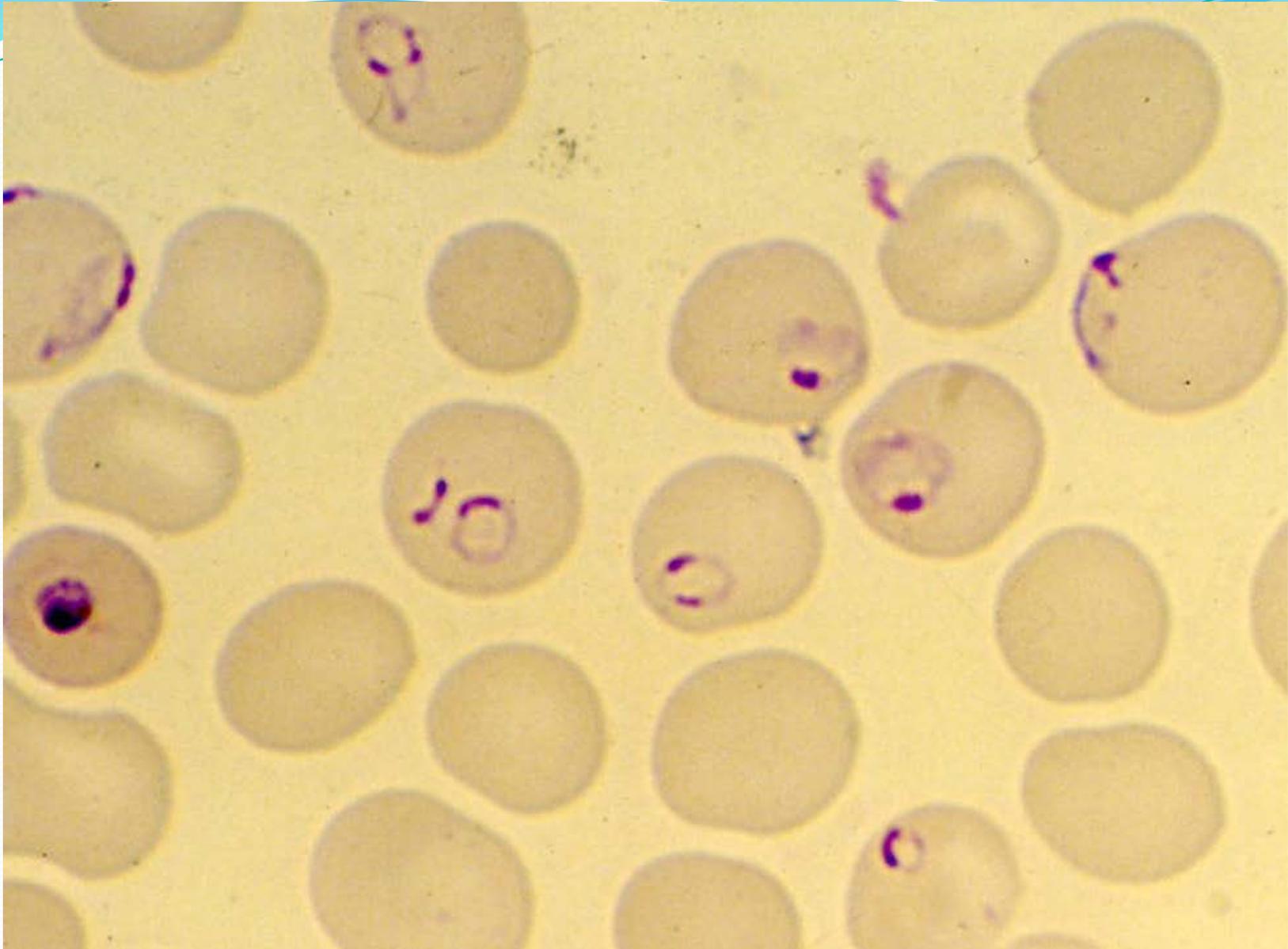


gamétocyte **femelle**:
cytoplasme bleu, extrêmités
pointues (corps en croissant)



8- Des tâches de Maurer
peuvent être présentes.

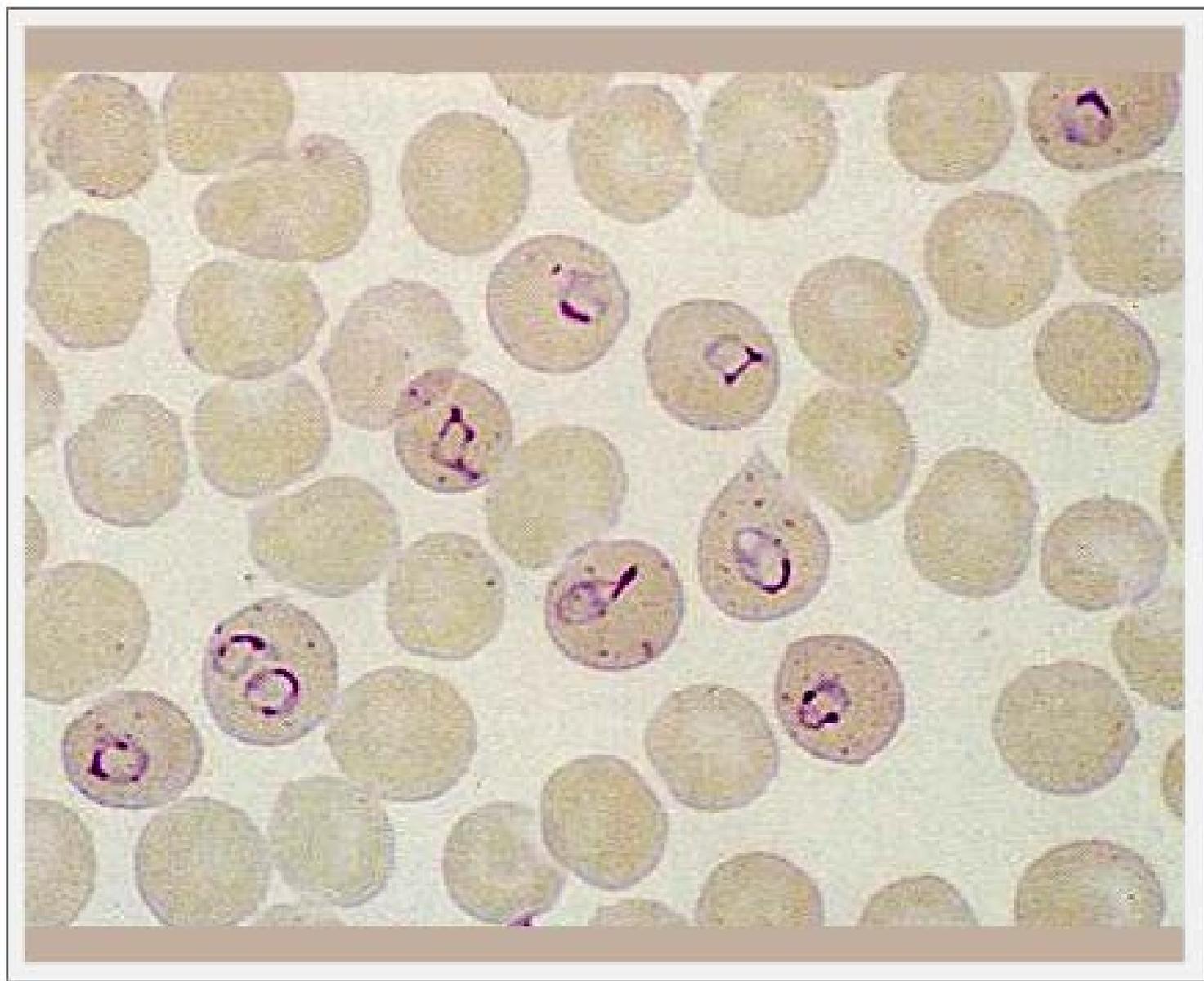




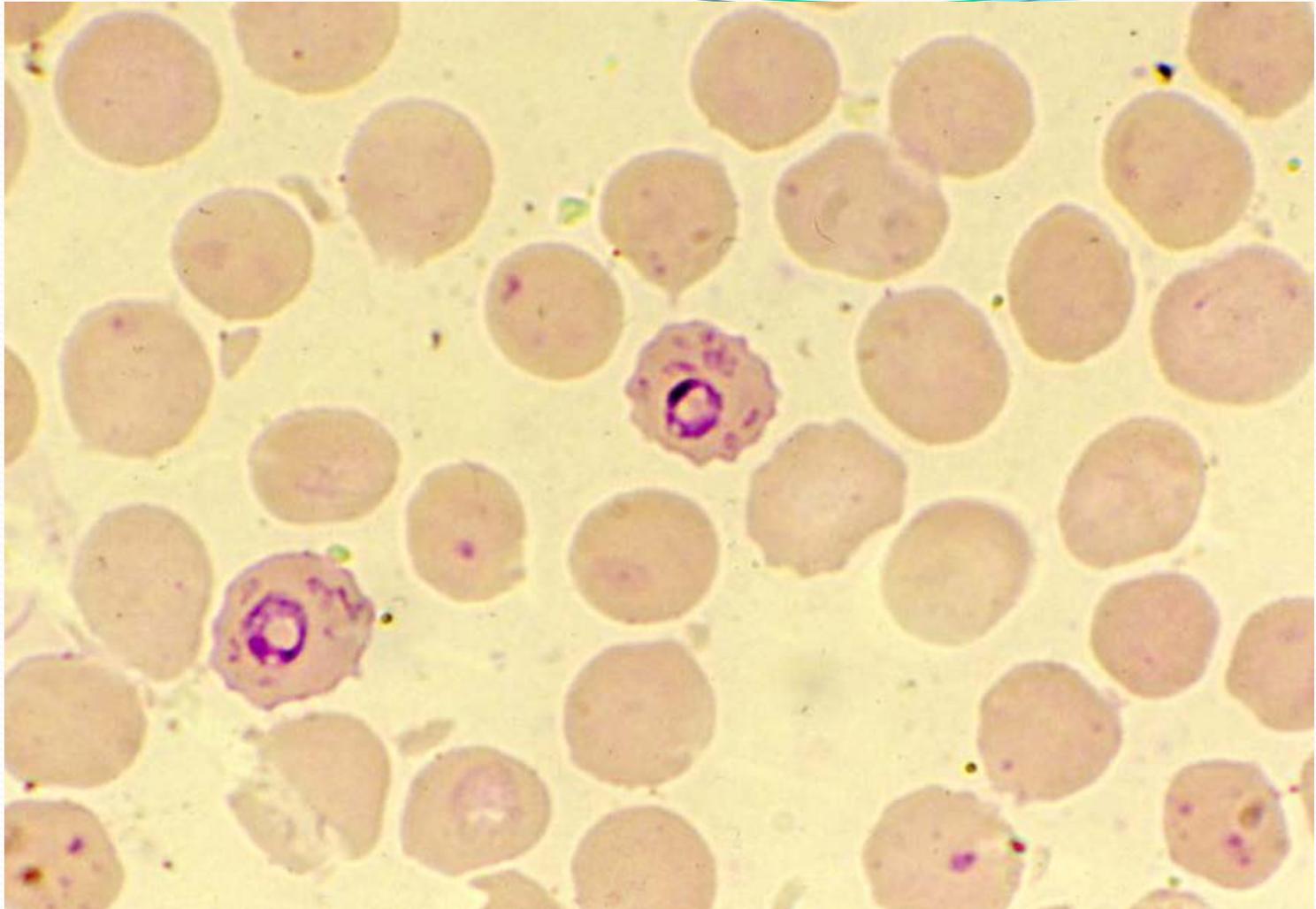
Plasmodium falciparum :trophozoïtes en anneau . Frottis monotone



Plasmodium falciparum : polyparasitisme et formes marginales



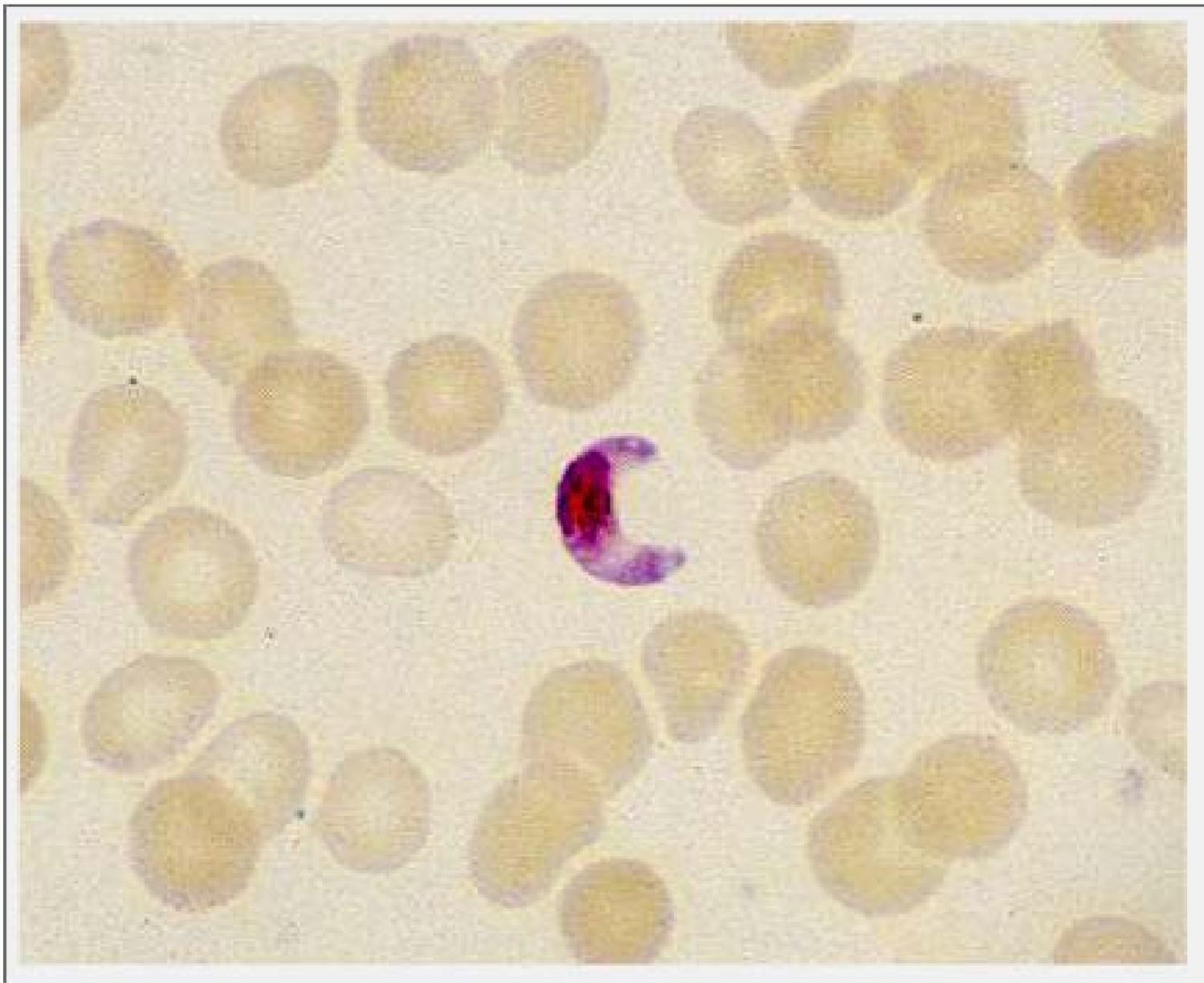
Plasmodium falciparum : trophozoïtes en anneau et des tâches de Maurer



Plasmodium falciparum :trophozoïtes en anneau et des tâches de Maurer



Plasmodium falciparum : polyparasitisme



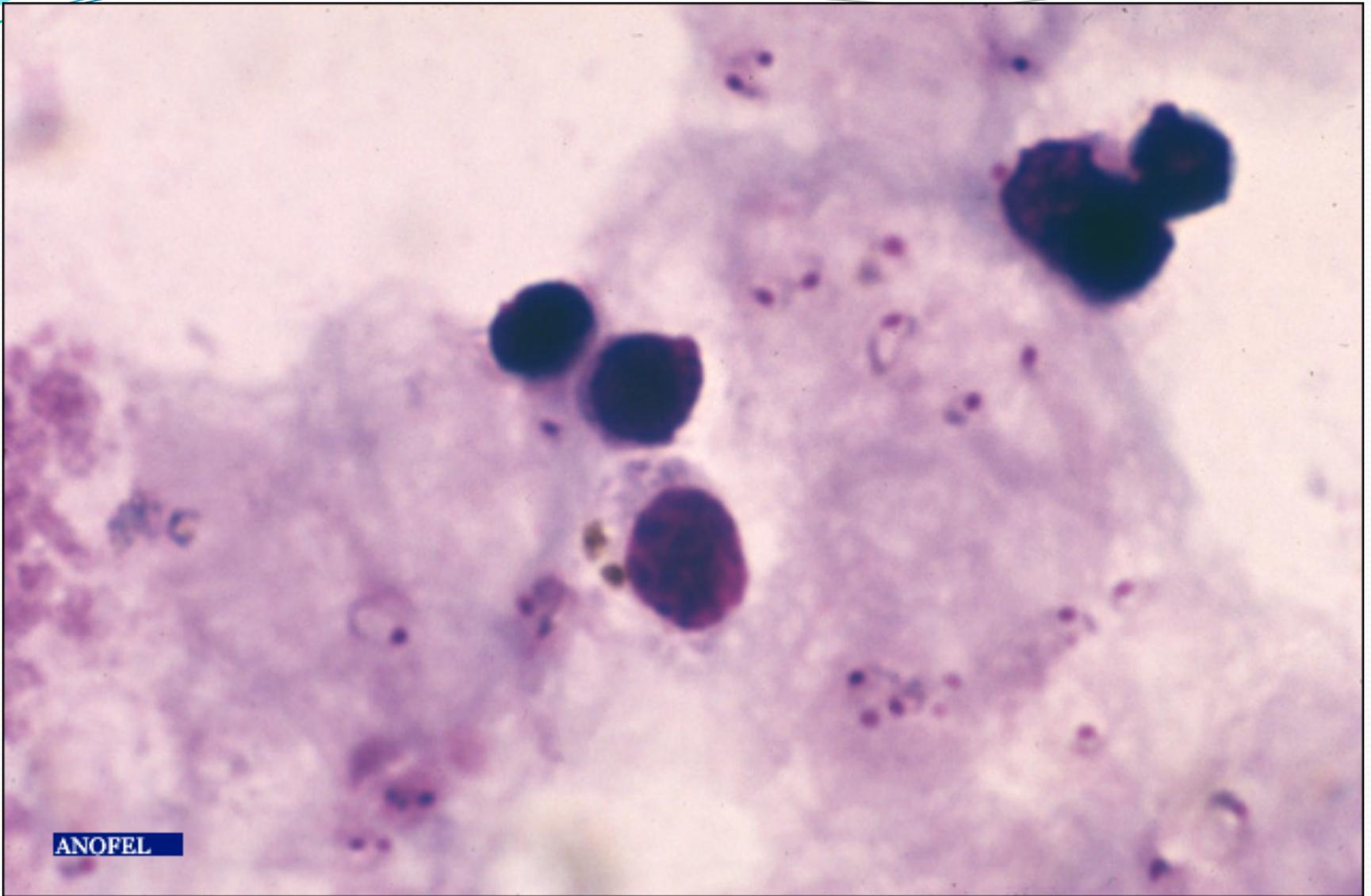
Plasmodium falciparum : Gamétocyte



Plasmodium falciparum : Gamétocyte mâle

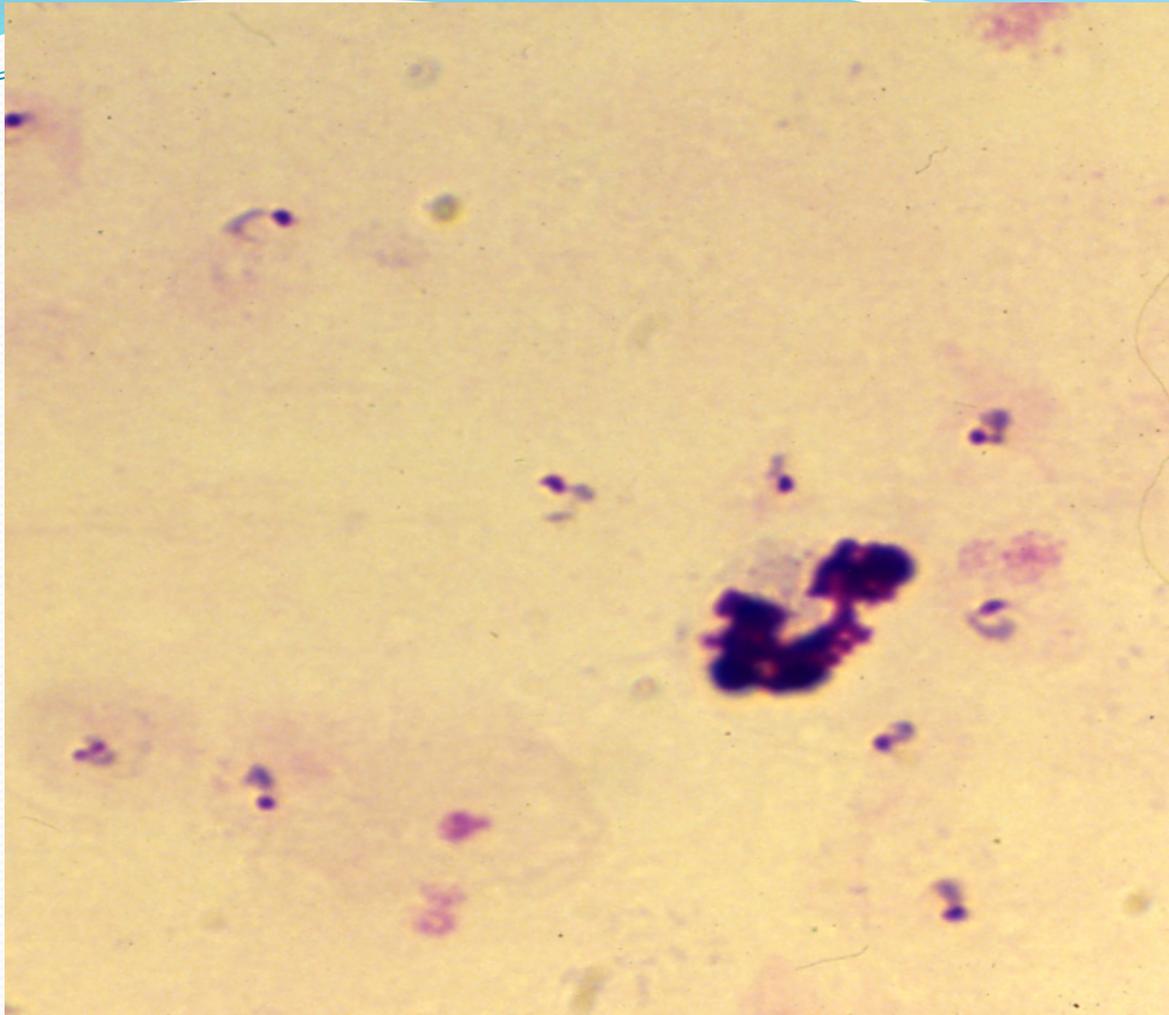


Plasmodium falciparum : Schizonte absent du sang périphérique :
16 à 24 noyaux



ANOFEL

Plasmodium falciparum : goutte épaisse



Plasmodium falciparum : goutte épaisse



Plasmodium vivax

Critères de diagnostic

Plasmodium vivax : critères de diagnostic

- 1- Hématies parasitées jeunes augmentées de volume
- 2- Présence de granulations de Schüffner tardif
- 3- Frottis panaché avec tous les stades évolutifs
- 4- Trophozoïte jeune bague à chaton ($1/3$ à $1/4$ de l'hématie)
pas de granulations de Schüffner = 0



- 5- Trophozoïte âgé et g Schüffner +
larges et grossiers
Corps amiboïde

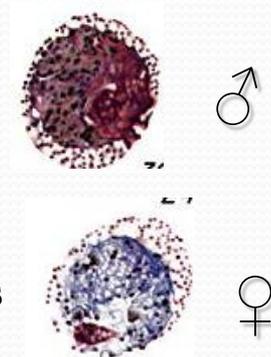


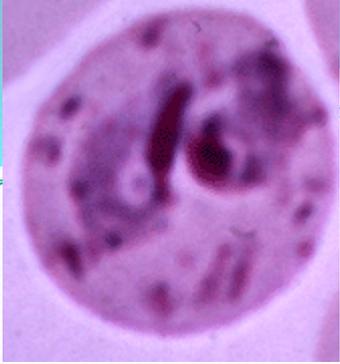
- 6- Schizonte âgé (rosace) à 16-24 noyaux Schüffner +



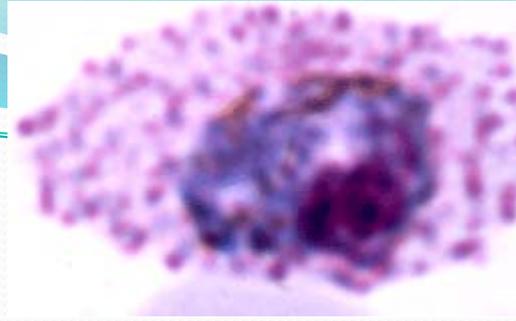
- 7- Gamétocyte arrondis ou ovalaires remplit le cytoplasme
Schüffner

cytoplasme → rose g mâles
bleus g femelles



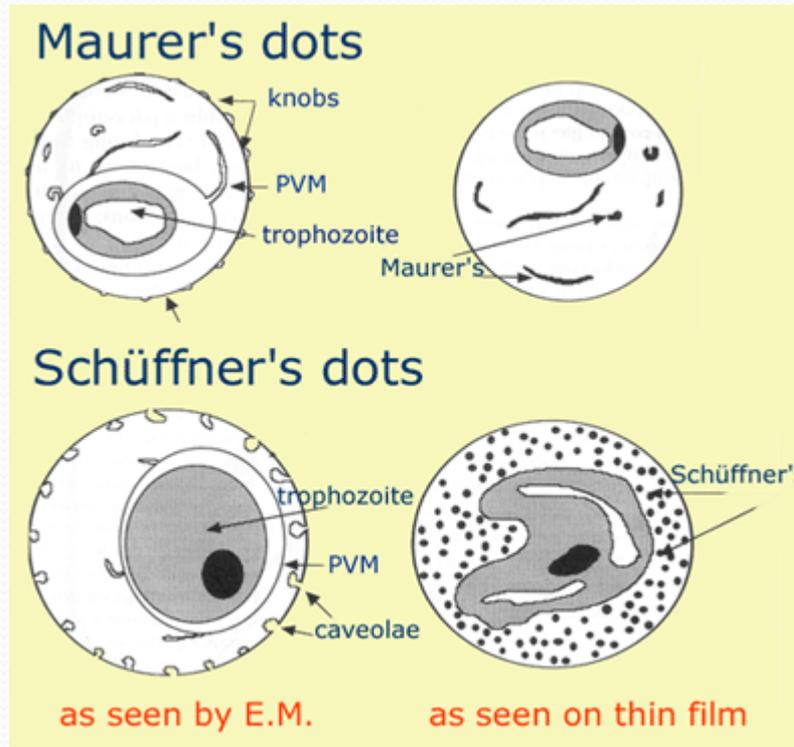


Tâches de Maurer



Granulations de Schüffner

Les tâches de Maurer sont des expansions du système membranaire parasitophore qui prennent le colorant



les granulations de Schüffner représentent des cavéoles à la surface du réticulocyte

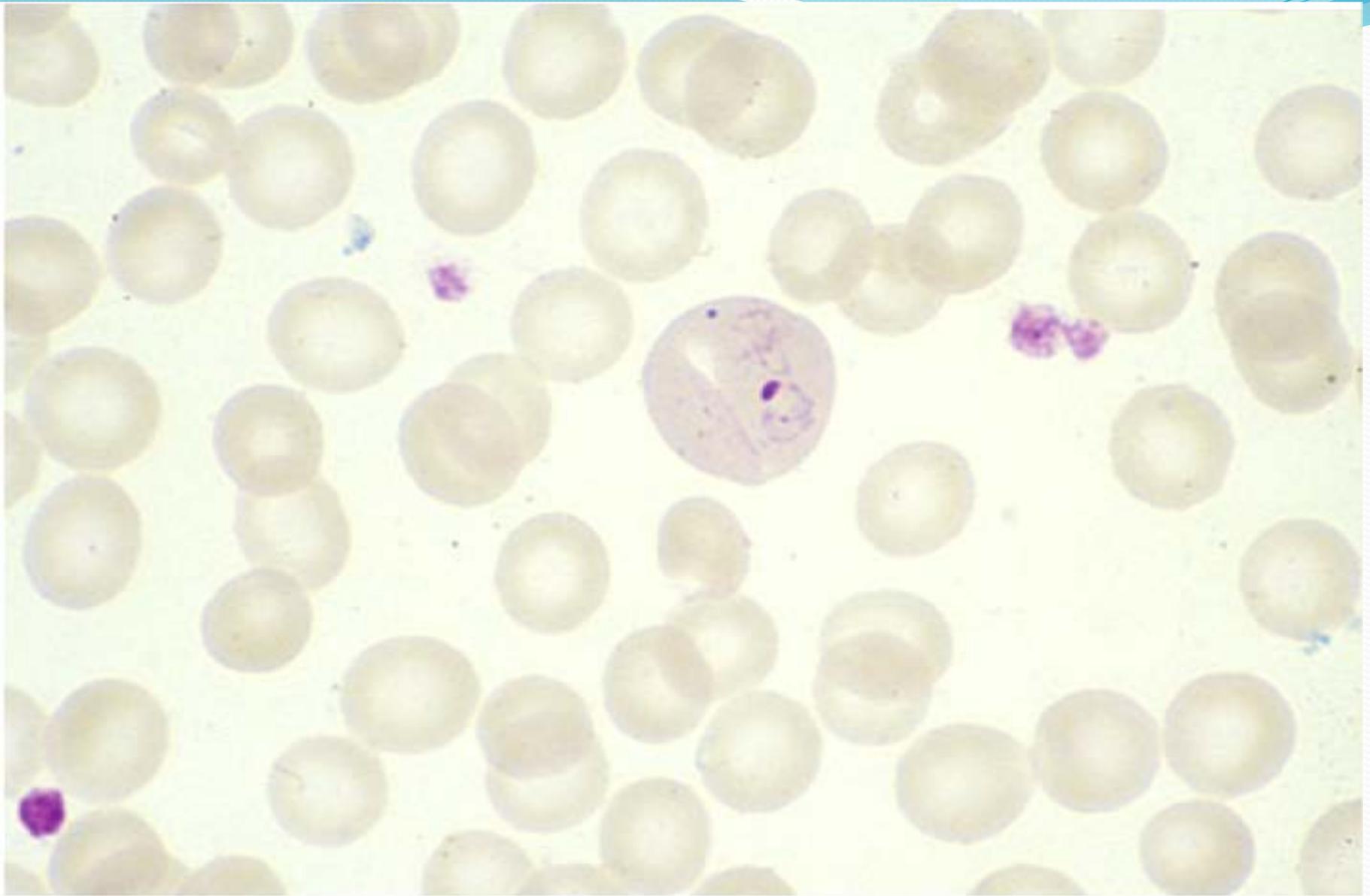
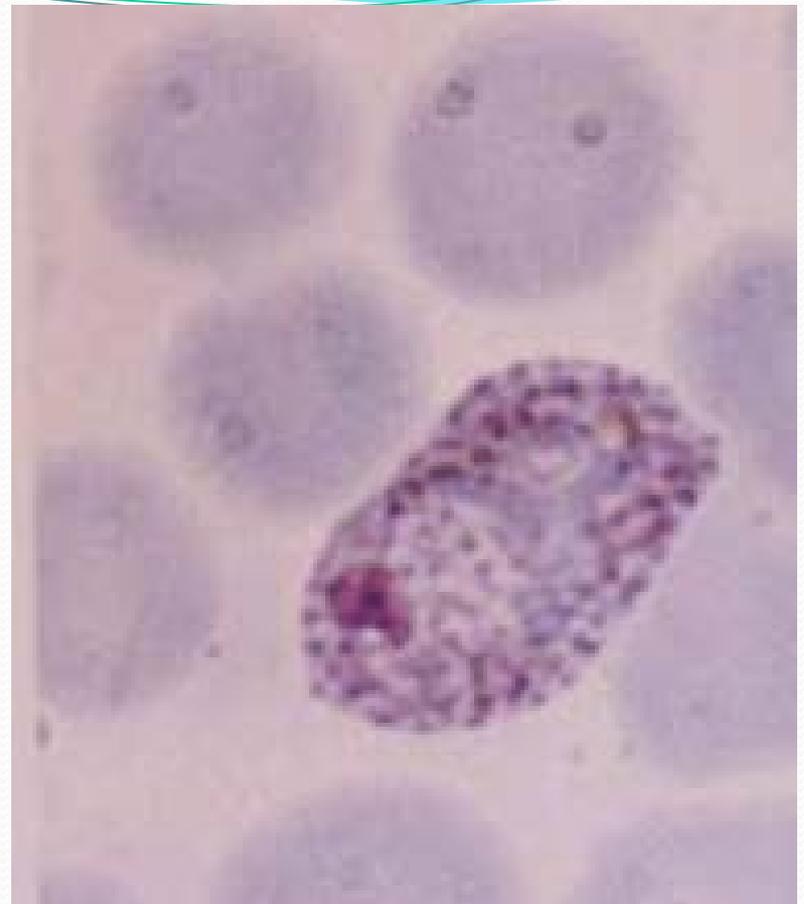


Photo n° 63 : Plasmodium vivax. Frottis. Trophozoïte jeune dans une très grande hématie ou commencent à apparaître les granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



P. vivax : Corps amiboïde granulations de Schüffner

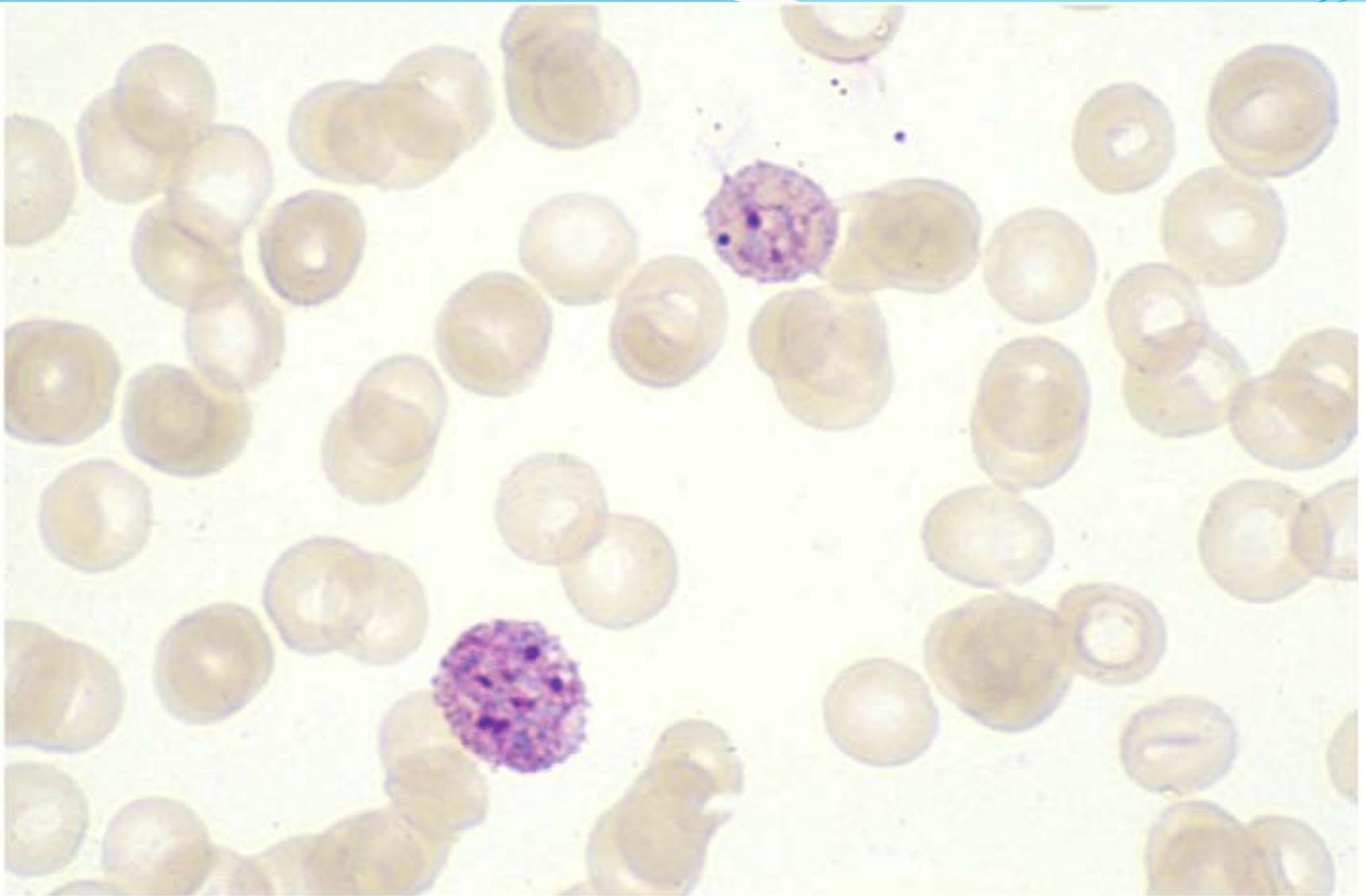
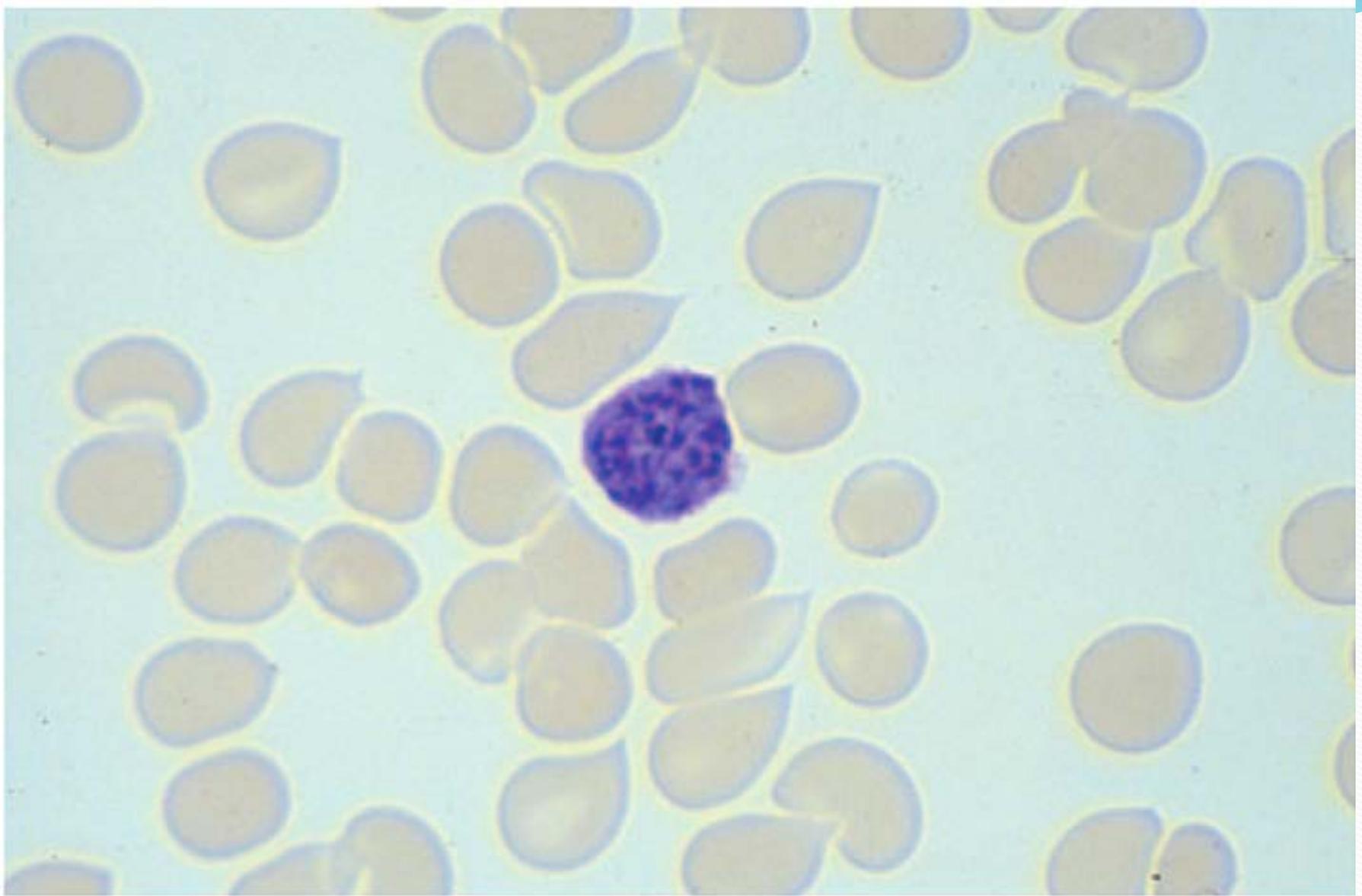
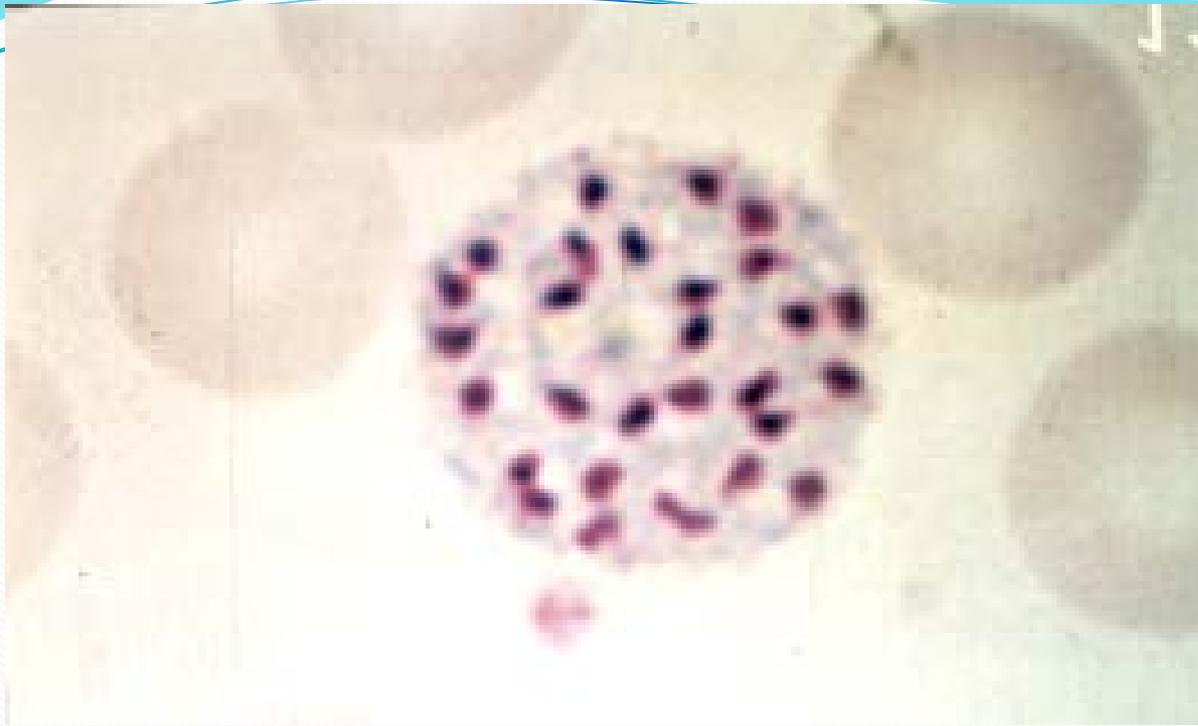


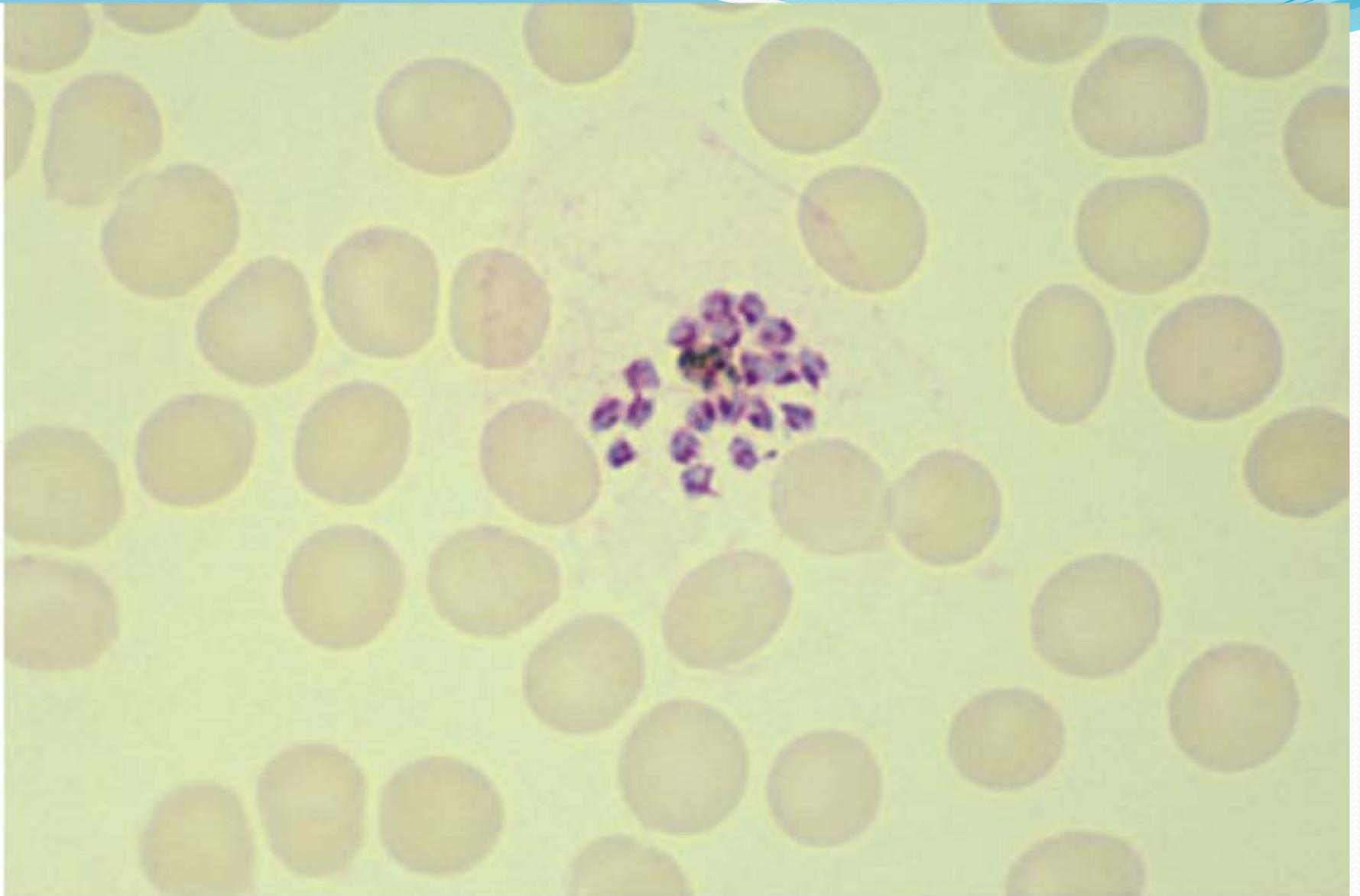
Photo n° 75 : Plasmodium vivax. Frottis. Une hématie à peine augmentée de volume contenant un corps amiboïde et des granulations de Schüffner. Une autre de grande taille contenant un schizonte à 6 noyaux. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



*Photo n° 78 : Plasmodium vivax. Frottis. Corps en rosace contenant 24 mérozoïtes.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



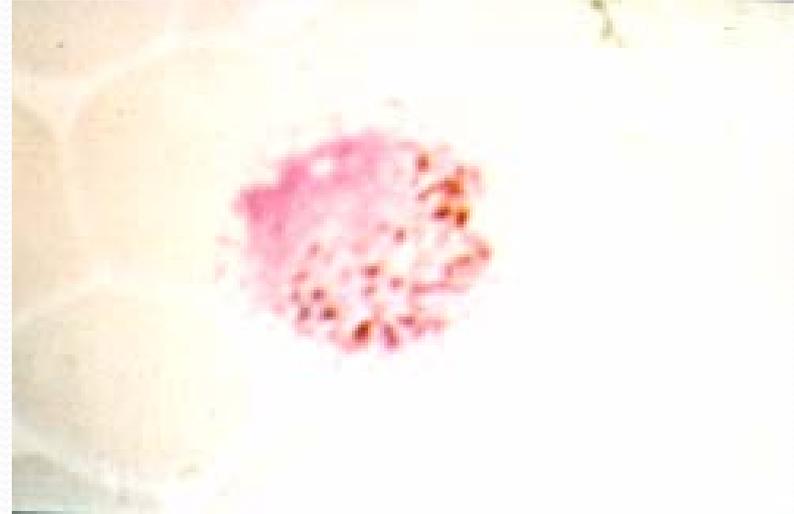
Corps en rosace de *P. vivax*



*Photo n° 79 : Plasmodium vivax. Frottis. Rosace éclatée libérant 20 mérozoïtes.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



P.vivax: gamétoocyte femelle
Cytoplasme bleu
Pigments malariques



P.vivax: gamétoocyte mâle
Hématie plus grande que la normale
Cytoplasme lilas



Plasmodium ovale

Critères de diagnostic

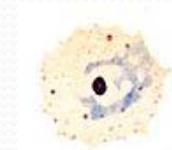
Plasmodium ovale : critères de diagnostic

1- Hématies parasitées jeunes augmentées de volume parfois frangées



2- Frottis panaché avec tous les stades évolutifs

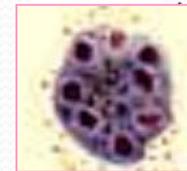
3- **Granulations de Schüffner** d'apparition précoce dès le stade de trophozoïte jeune



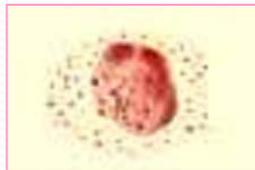
4- Trophozoïte à cytoplasme large et grossiers 1/3 de l'hématie



5- Schizonte mûr ou rosace à 8-10 noyaux pigment malarique central



6- Gamétocytes ressemblent à ceux de *P.vivax* mais plus petits



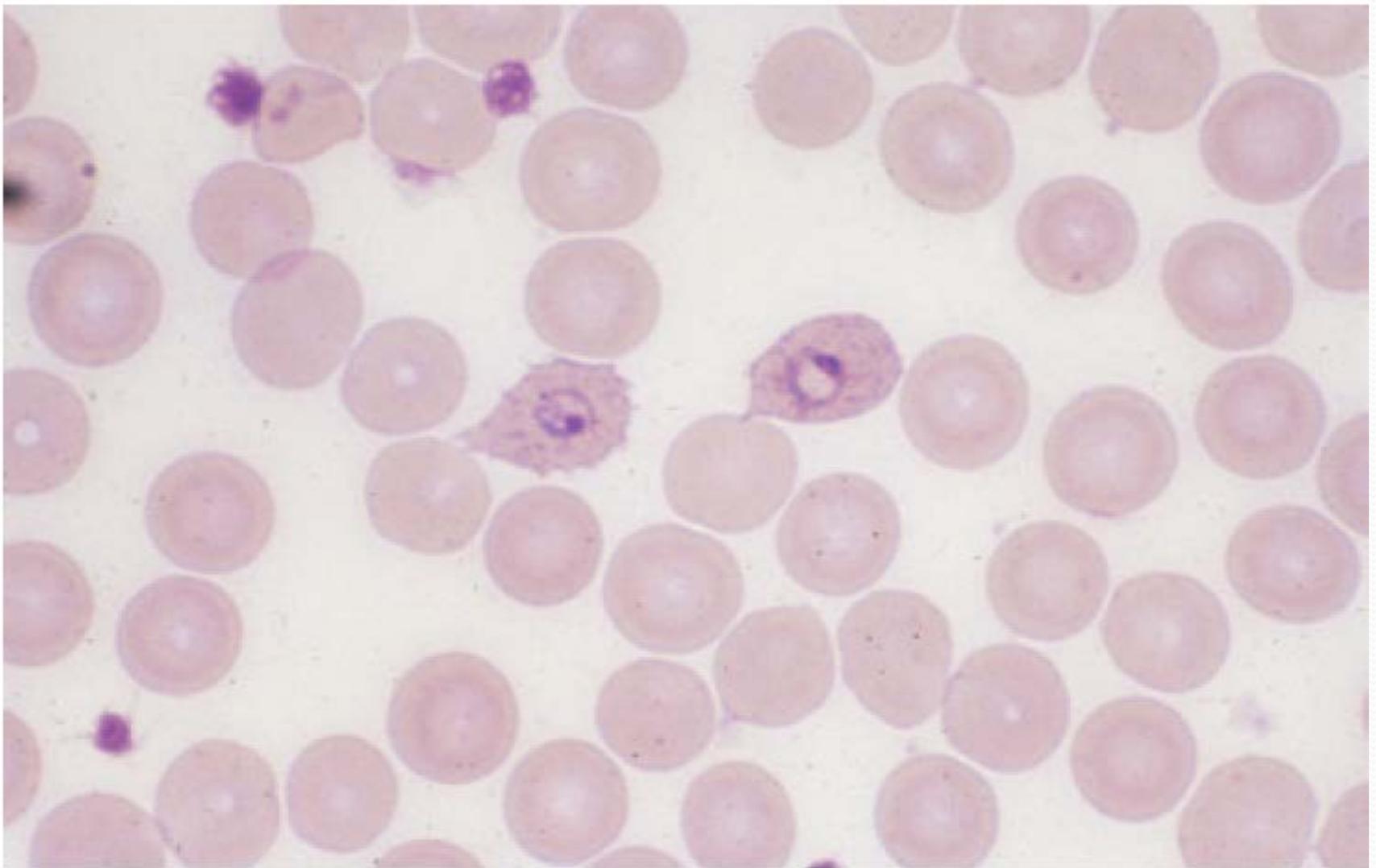


Photo n° 90 : Plasmodium ovale. Frottis. Une hématie ovale à extrémité pointue, crénelée sur le bord, une autre ovale avec de nombreuses granulations de Schüffner, contenant chacune un trophozoïte. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

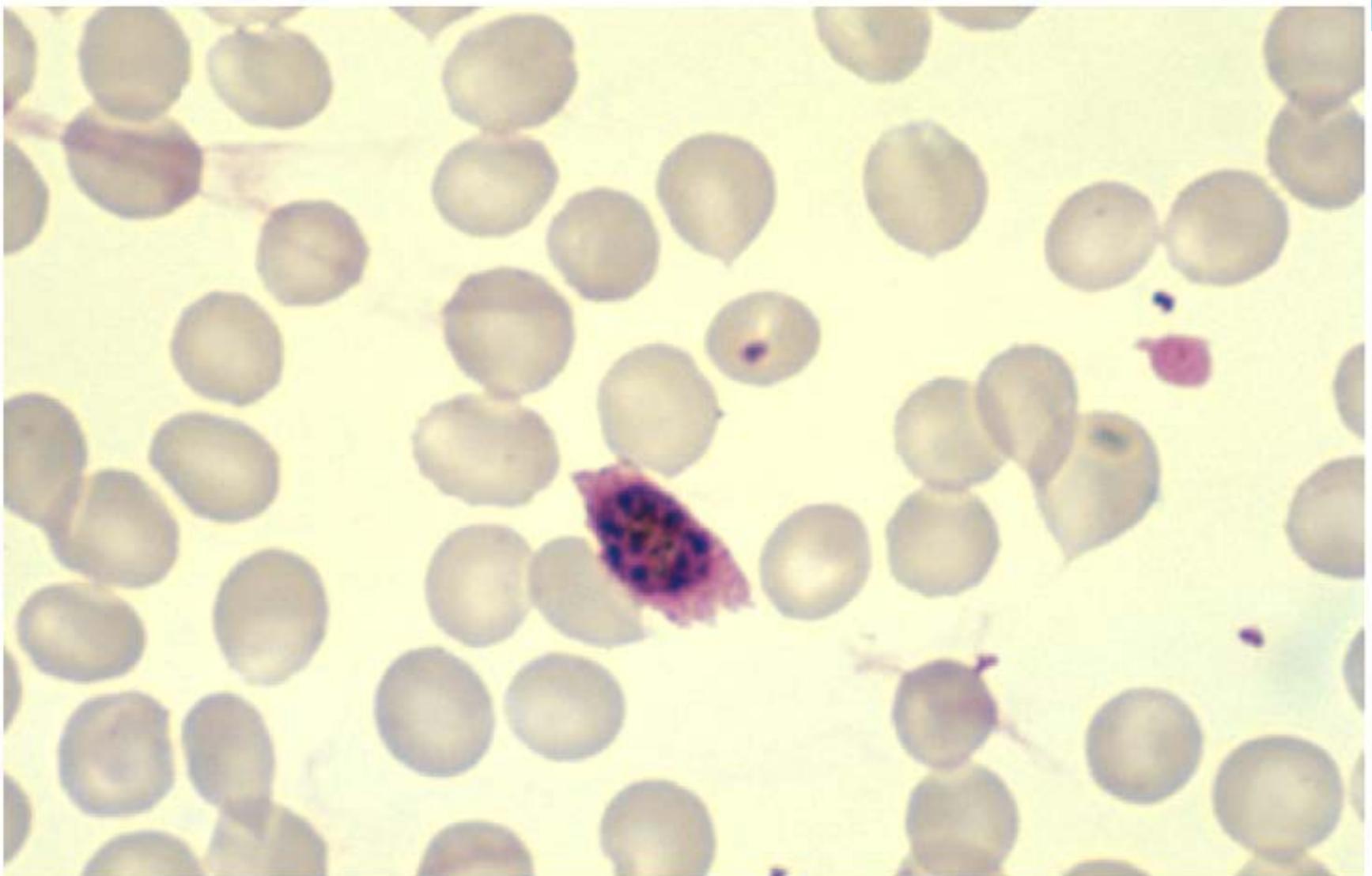


Photo n° 98 : Plasmodium ovale. Frottis. Une hématie frangée aux deux extrémités, contenant un corps en rosace avec 8 noyaux et un amas de pigment central et quelques granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

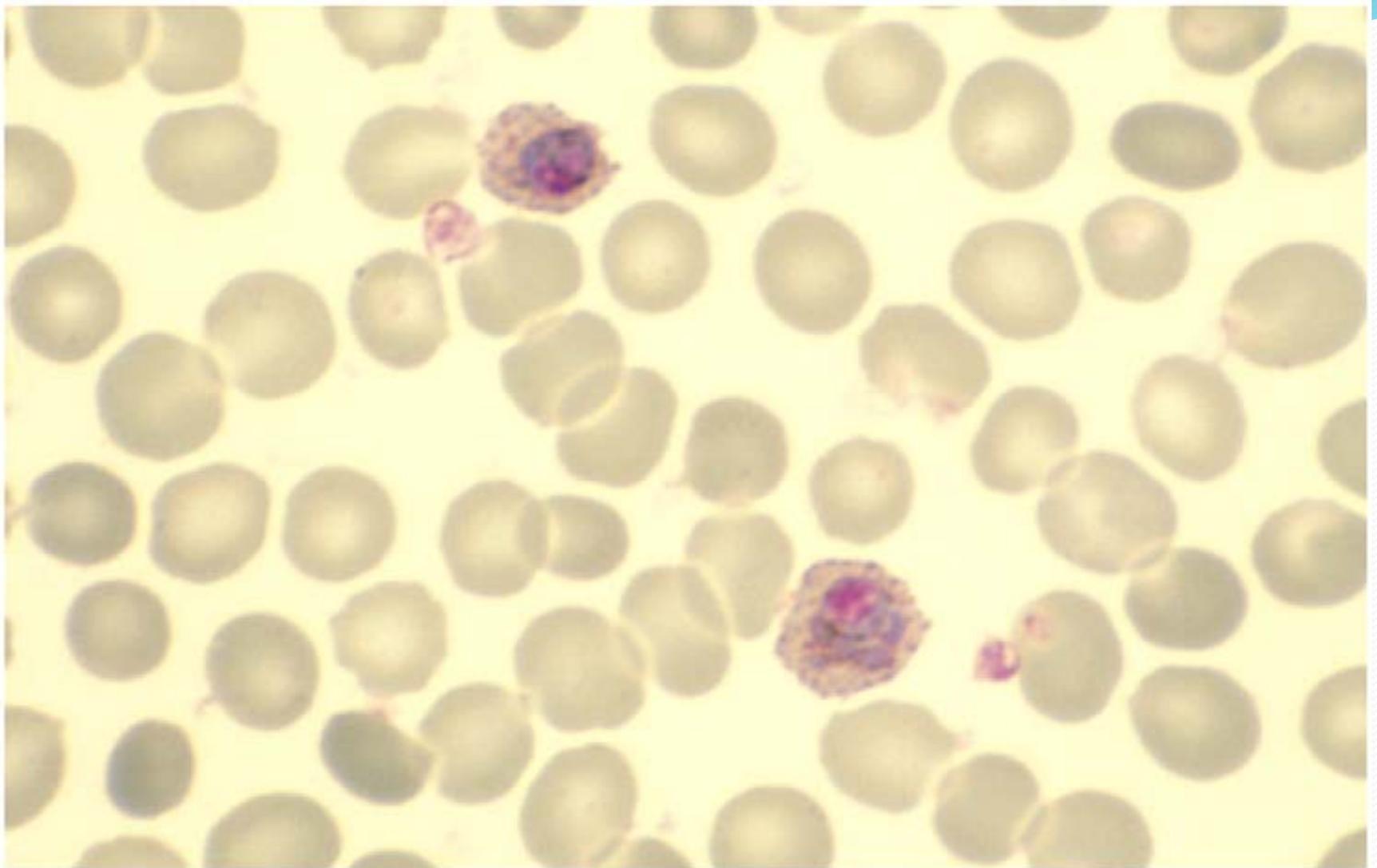


Photo n° 100 : Plasmodium ovale. Frottis. Une hématie de taille normale arrondie contenant un très jeune gamétocyte et des granulations de Schüffner. Une autre hématie d'assez grande taille contenant un jeune gamétocyte, granulations de Schüffner et pigment. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

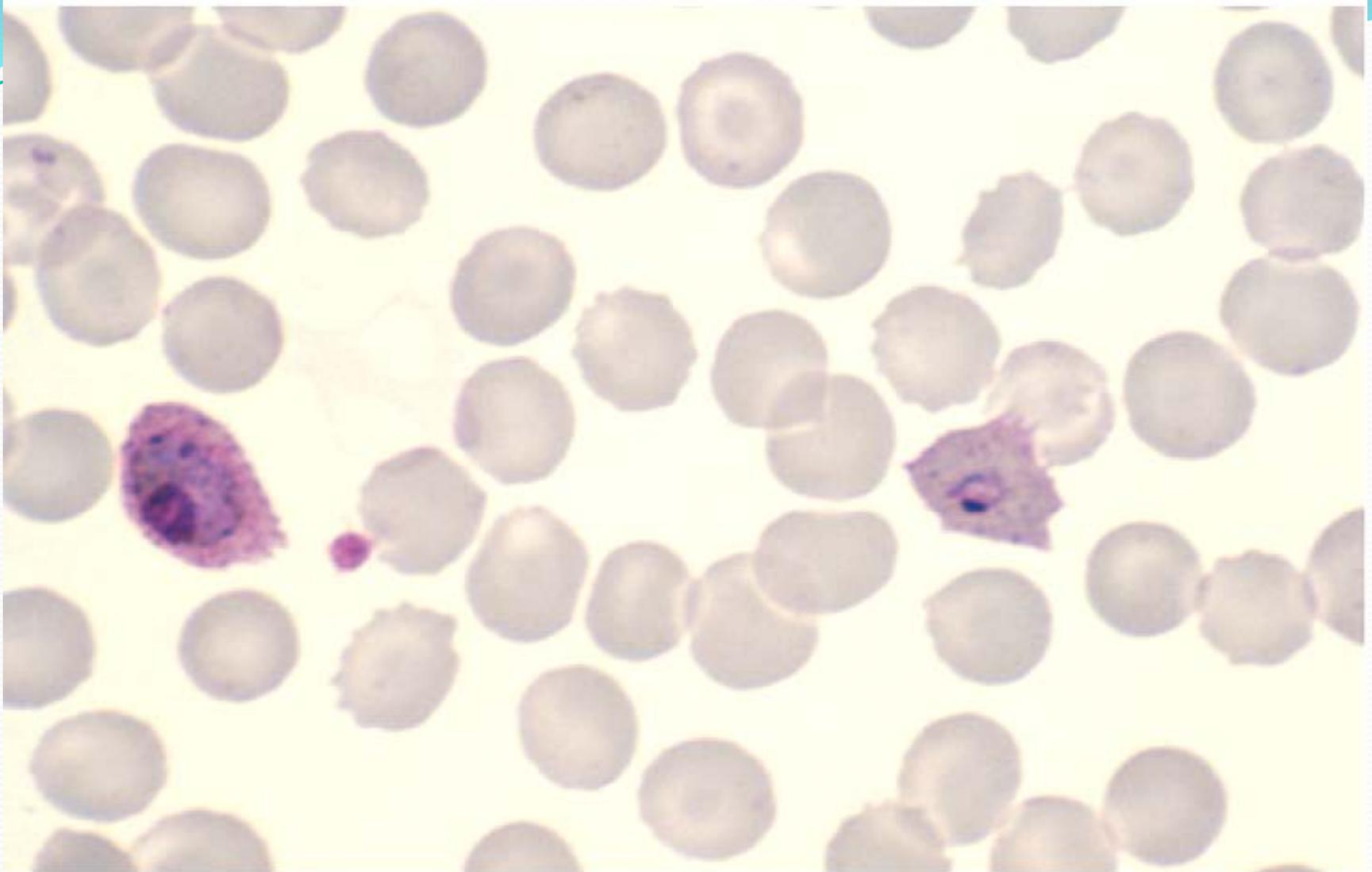


Photo n° 102 : Plasmodium ovale. Frottis. Une hématie ovalisée contenant un gamétocyte avec noyau excentré, cytoplasme bleu, gros grains de pigment. Une deuxième hématie contient un trophozoïte avec des granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



Plasmodium malariae

Critères de diagnostic

Plasmodium malariae critères de diagnostic

- 1- Hématies parasitées âgées de taille normale ou ↘
- 2- Frottis panaché avec tous les stades évolutifs

3- Pigment malarique +++ dès le stade de trophozoïte jeune



4- Les formes en bande caractérisent cette espèce dite en plaque équatoriale Pigment intracytoplasmique noir en grains volumineux



5- Les schizontes matures peuvent avoir des formes typiques **corps en marguerite** à 8 noyaux (max 10)



6- Gamétocytes Sphériques ou ovoïdes

- Pigment grossier et abondant

- Cytoplasme grisâtre ou verdâtre G mâles

bleu intense pour les G femelles



24

25

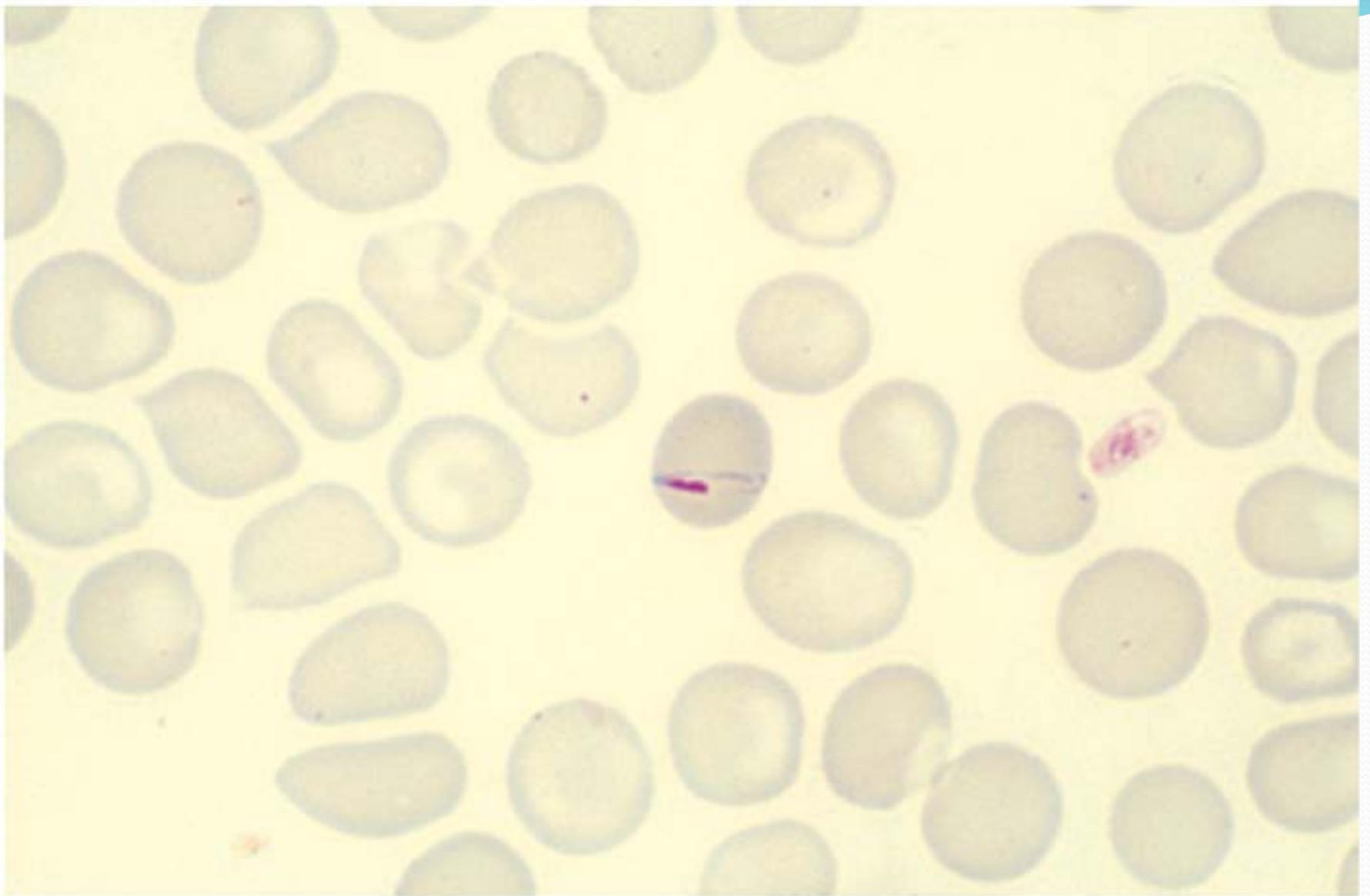


Photo n° 108 : Plasmodium malariae. Frottis. Hématie de taille surnormale. Trophozoïte jeune, sans pigment, allongé transversalement. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

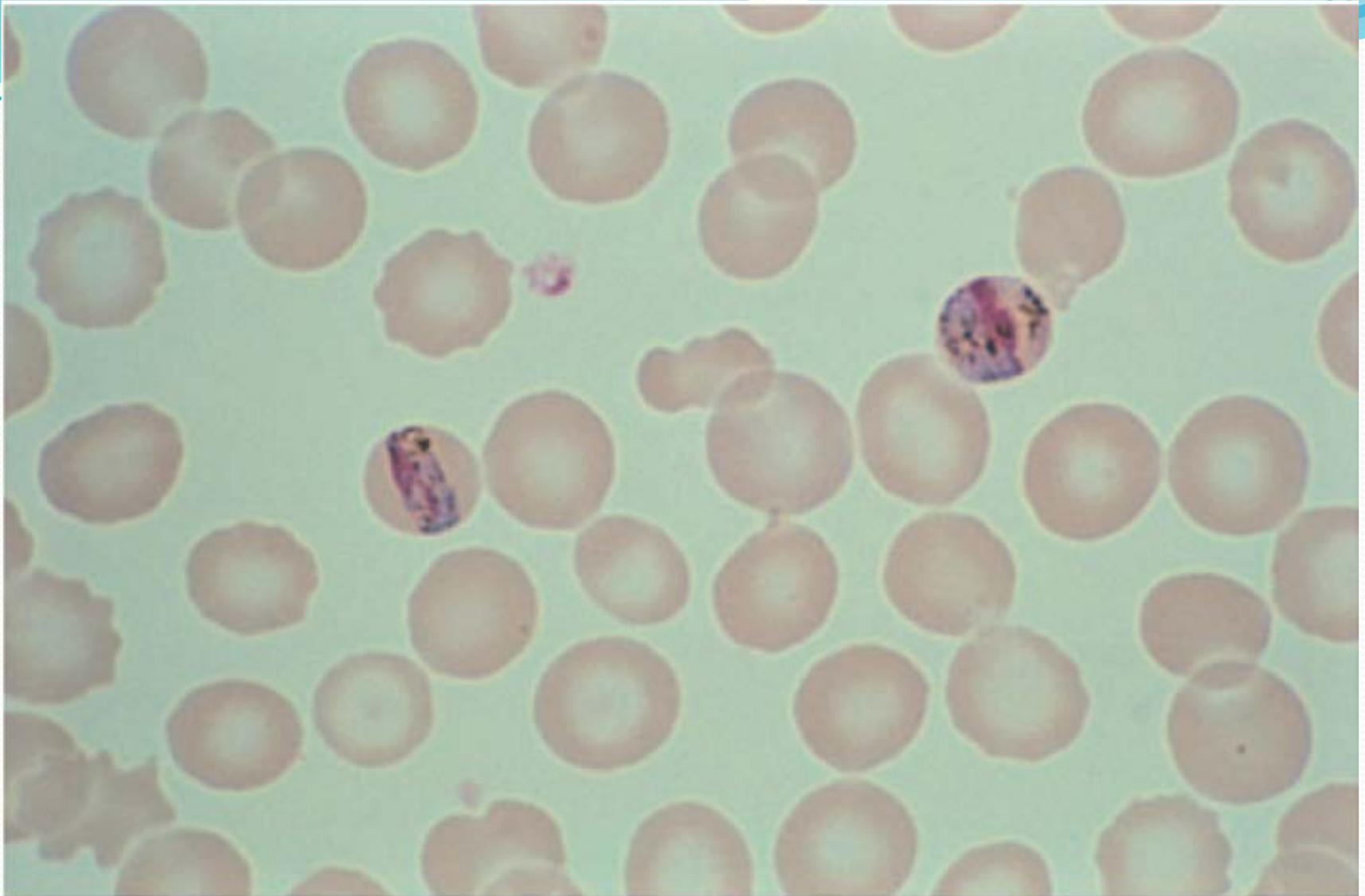
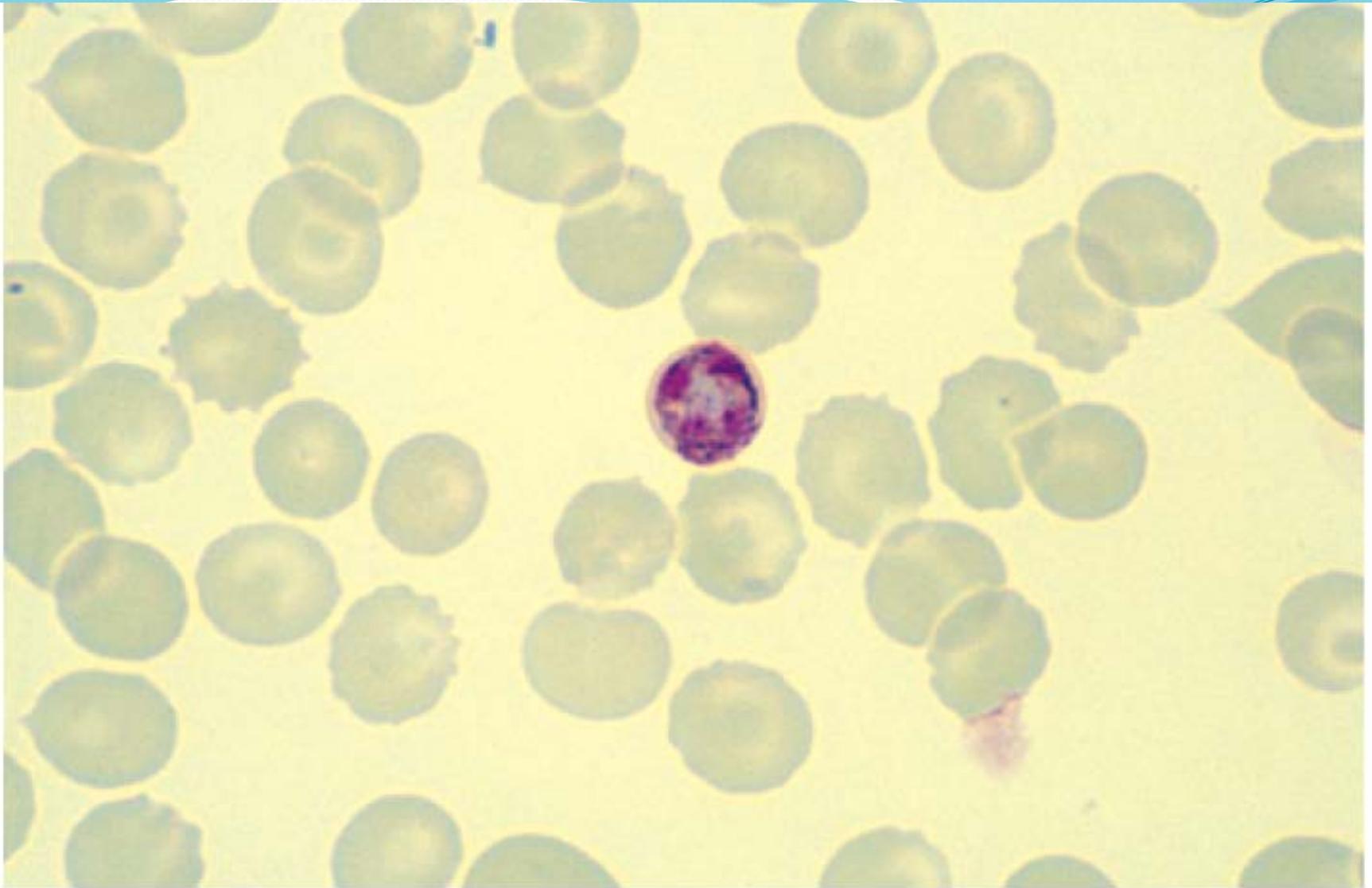
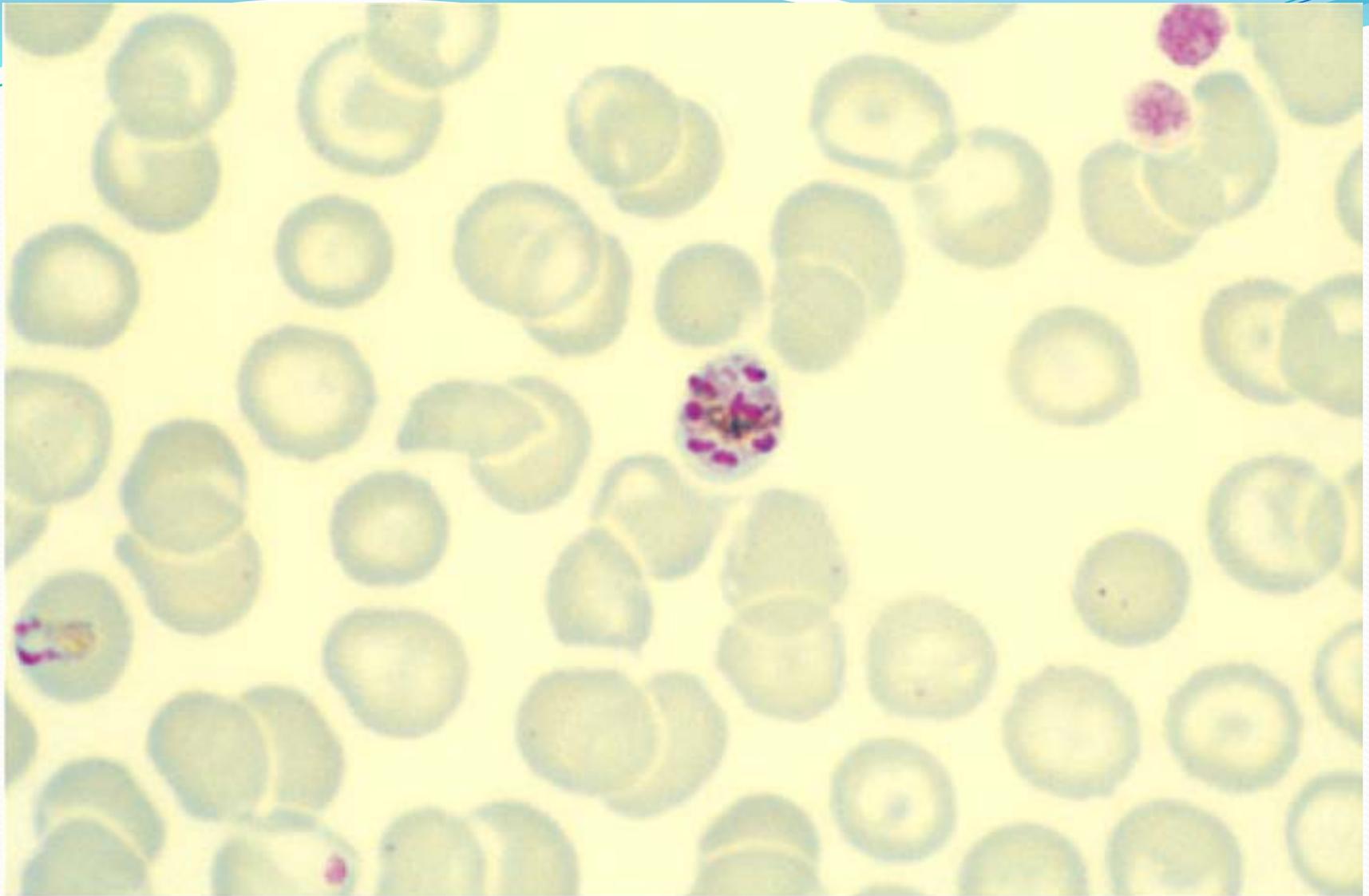


Photo n° 111 : Plasmodium malariae. Frottis. Dans deux hématies de taille surnormale, trophozoïtes âgés en bande équatoriale avec pigment abondant. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



*Photo n° 118 : Plasmodium malariae. Frottis. Hématie de taille normale. Schizonte à 4 noyaux.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



*Photo n° 119 : Plasmodium malariae. Frottis. Hématie de taille normale.
Schizonte mûr = corps en rosace à 8 noyaux. Gros amas de pigment central.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

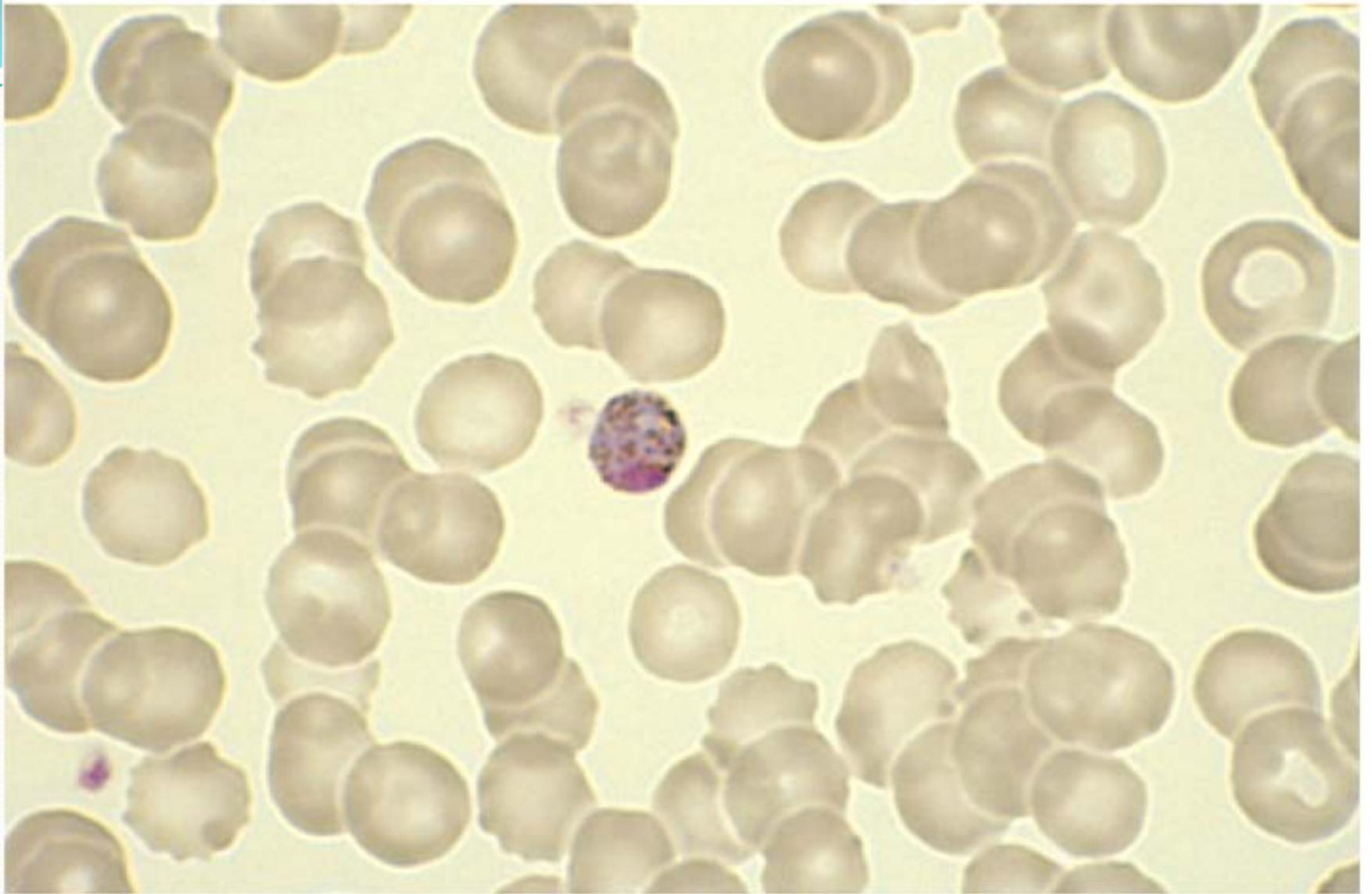


Photo n° 122 : Plasmodium malariae. Frottis. Gamétoocyte, pigment abondant et dispersé, noyau excentré. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



Plasmodium knowlesi

♣ *Plasmodium knowlesi* Asie du Sud Est (primates)
5^{ème} espèce responsable du paludisme humain

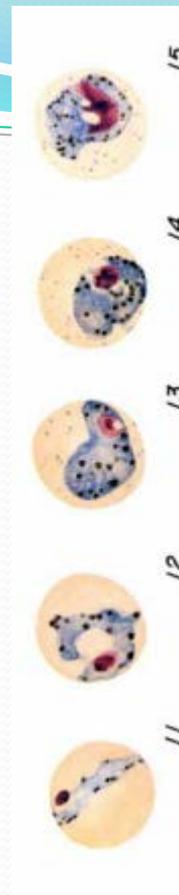
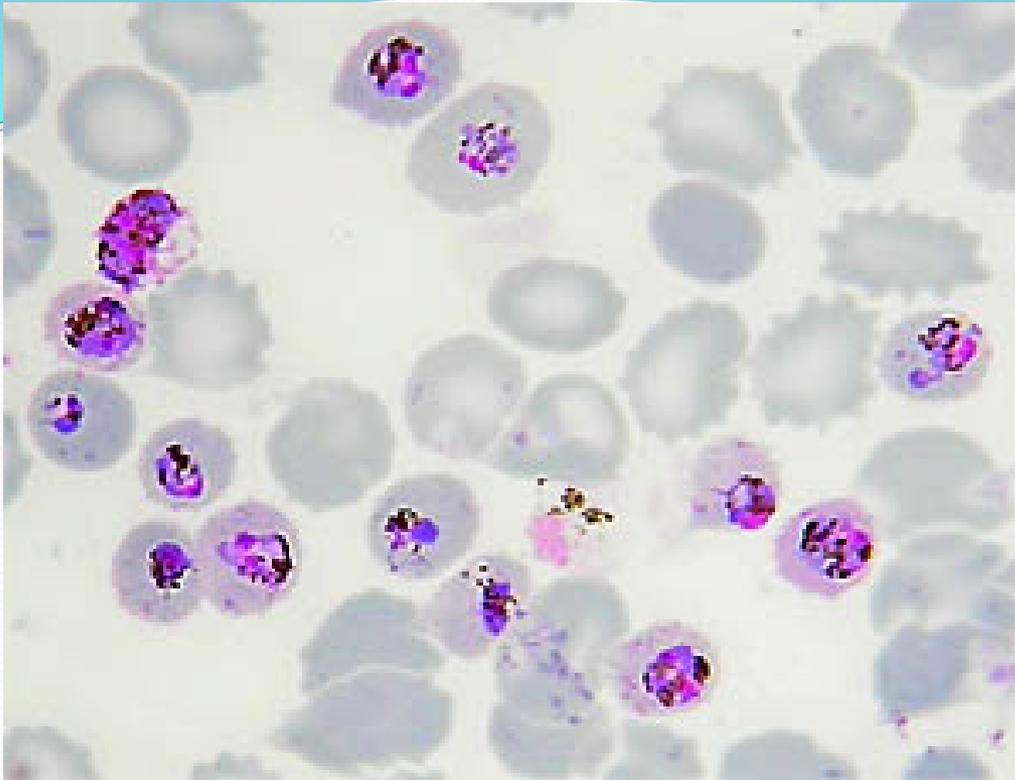
♣ Les throphozoïte jeunes de *P. knowlesi*
ressemblent à ceux de *P. falciparum*

♣ Confondu avec *P. Malariae* :
throphozoïtes âgés svt en plaque équatoriale
abondance du pigment malarique

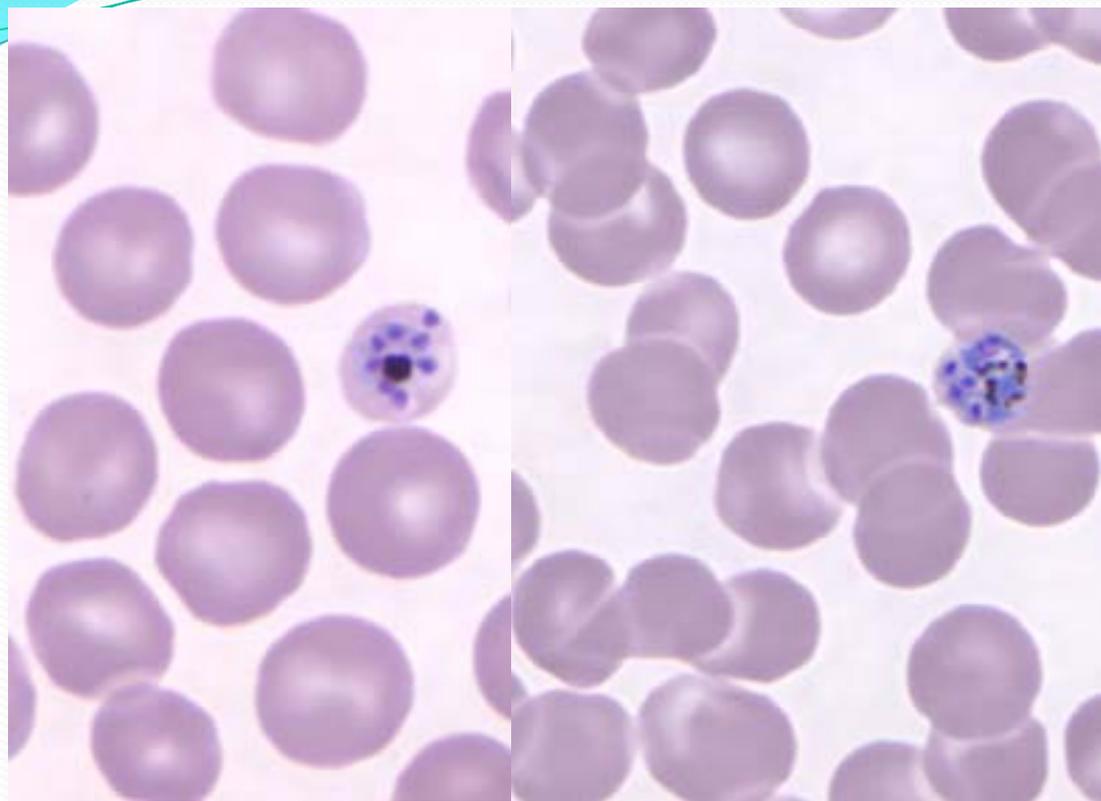
♣ Mais sa rosace peut comporter jusqu'à 16 noyaux



P. knowlesi throphozoïtes jeunes Idem *P. falciparum*

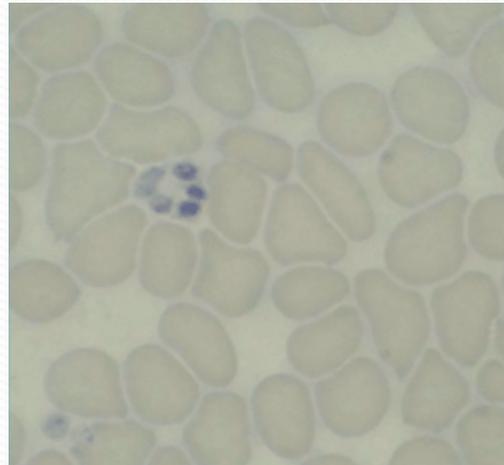
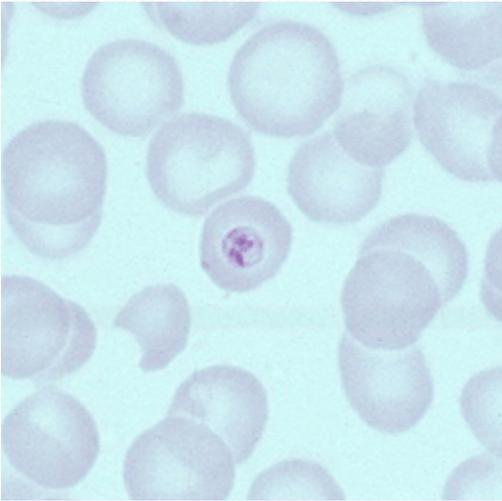


P. knowlesi trophozoites âgés Idem *P. malariae*

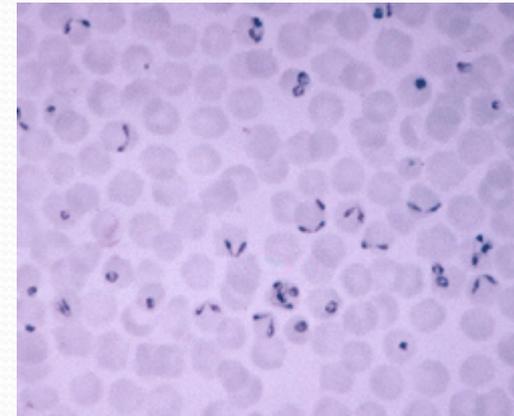


P. knowlesi Schizonte Idem *P. malariae* mais max 16 Nx

Artéfacts identifiés comme parasites



Eléments infectieux Dg ≠



Crédits : Wendi Bailey

Crédits : Wendi Bailey, LSTM

Crédits : Wendi Bailey, LSTM

Plaquette
superposée sur un
globule rouge

Groupe de
plaquettes pouvant
être pris pour un
schizonte

GR infectés avec des
piroplasmes (Babesia)
peuvent être pris pour
des plasmodies



QBC Malaria Test

Quantitative Buffy Coat_QBC Malaria®

Recherche de plasmodies par fluorescence directe

Des **tubes QBC*** en verre (tubes capillaires)sont tapissés **d'acridine orange** = fluorochrome qui a une affinité pour le matériel nucléique

Le sang est prélevé dans un **tube QBC***

Après centrifugation:

-la sédimentation se fait en plusieurs couches:

***Les plaquettes, * les GB , * les GR parasités * ensuite et enfin les GR non parasités**

-la couche intermédiaire est observée au microscope en UV et les GR colorés à l'acridine orange sont facilement repérés

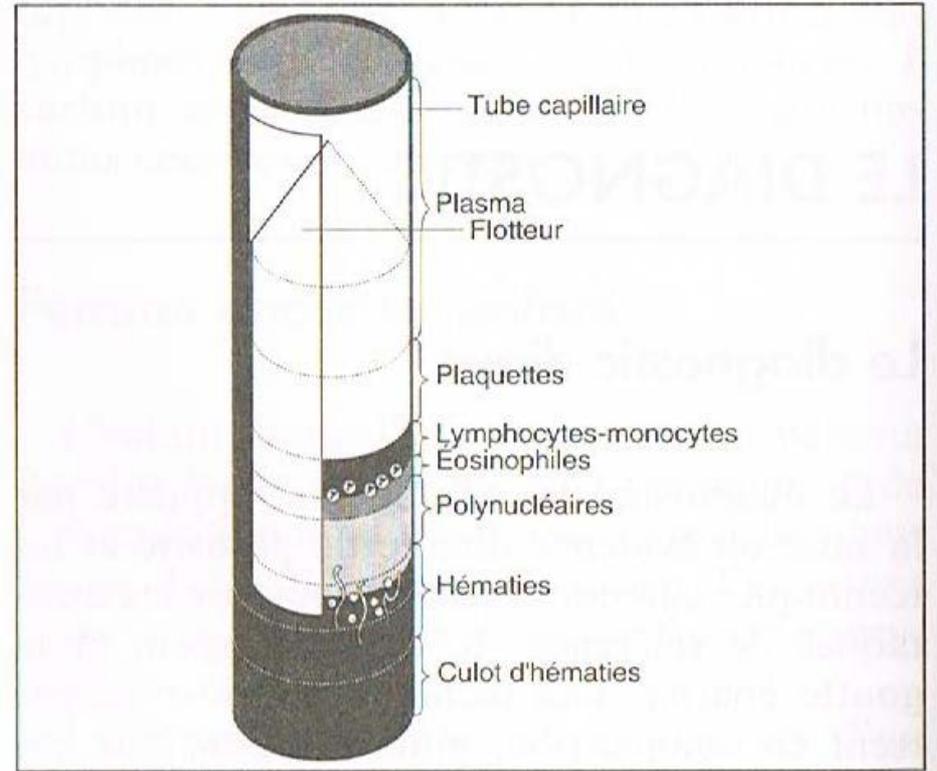
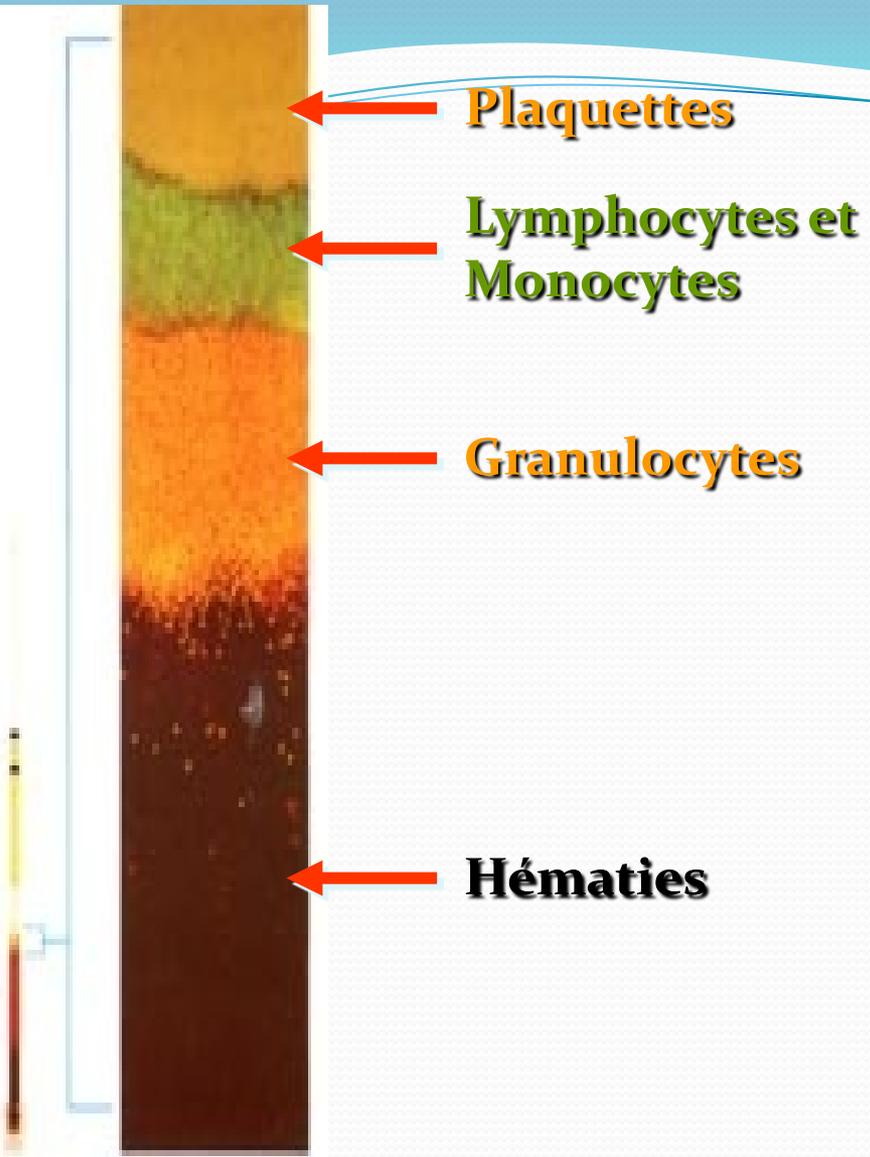
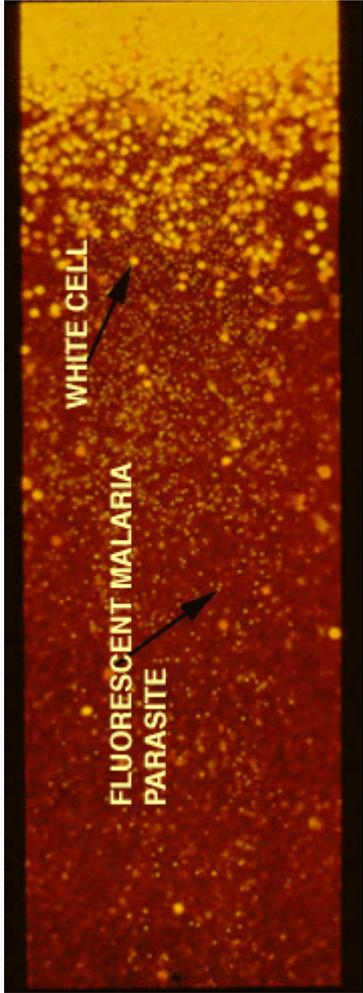


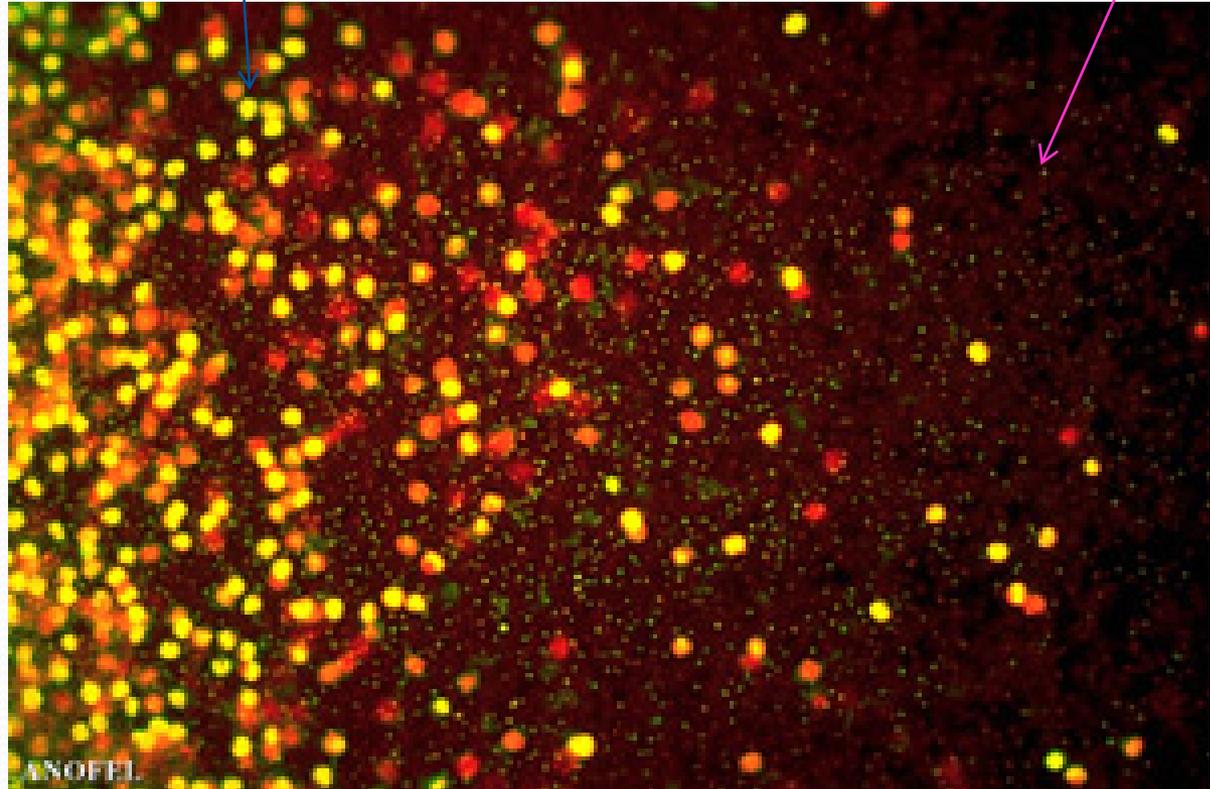
Figure 7.8 Schéma du tube QBC. D'après Lévine, Cahiers Santé, 1994

Tube de Quantitative Buffy Coat (QBC-Test) après centrifugation



Fluorescence des GB

Fluorescence des parasites



Avantages:

- ♣ Technique rapide (6mn entre le prélèvement et la lecture)
- ♣ Seuil de détection 10 parasites / μ l

Inconvénients :

- ♣ Diagnostic d'espèce difficile
- ♣ Nécessite un appareillage et des réactifs coûteux:
 - Tubes QBC* ,
 - Microcentrifugeuse ,
 - Microscope optique standard recevant latéralement une fibre optique alimenté par un UV parlens®
 - Porte-tube adaptateur sur j'objectif
- ♣ Demande une certaine expérience.

Autres techniques de diagnostic

- ♣ La recherche d'antigènes spécifiques = technique des bandelettes
- ♣ La PCR
- ♣ La sérologie

Détection d'antigènes = Tests de diagnostic rapide (TDR)

Détection d'antigènes

Tests de diagnostic rapide par chromatographie sur membrane de nitrocellulose

♣ Les Ag détectés :

- l'**Histidine Rich Protein 2 (HRP-2)**, glycoprotéine spécifique de *P. falciparum* (**Parasight F®** et **ICT Malaria Pf®**)
 - **pLDH (Plasmodium lactate déshydrogénase)** enzyme glycolytique produite par les 4 espèces (**OptiMal®**).
 - L'**Aldolase ICT Malaria Pf/Pv®**
- ♣ Des anticorps monoclonaux dirigés contre ces enzymes sont fixés sur la mbr
- ♣ Après la mise en contact avec le sang, la présence de l'antigène est visualisée par action d'un deuxième anticorps révélateur.
- ♣ Réponse rapide (- de **15 mn**), visuelle sous forme d'un trait sur la bandelette et ne nécessite donc pas de compétence particulière.

TDR

Très rapide mais **sa sensibilité et sa spécificité** sont moins bonnes que la technique de référence

faux (-) quand parasite est en quantité insuffisante

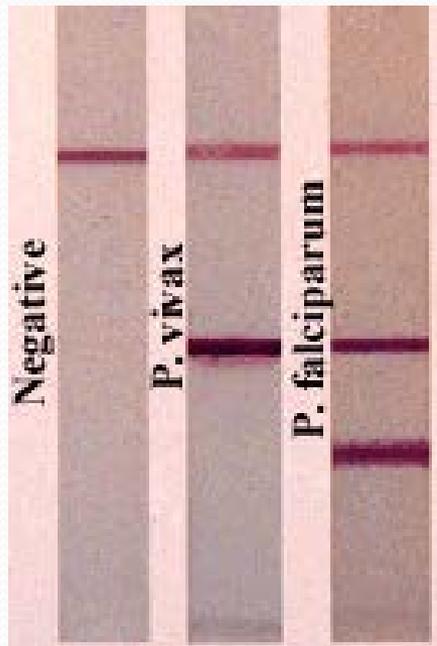
faux (+) test reste (+) jusqu'à **3 à 4 semaines après un accès de paludisme correctement traité**



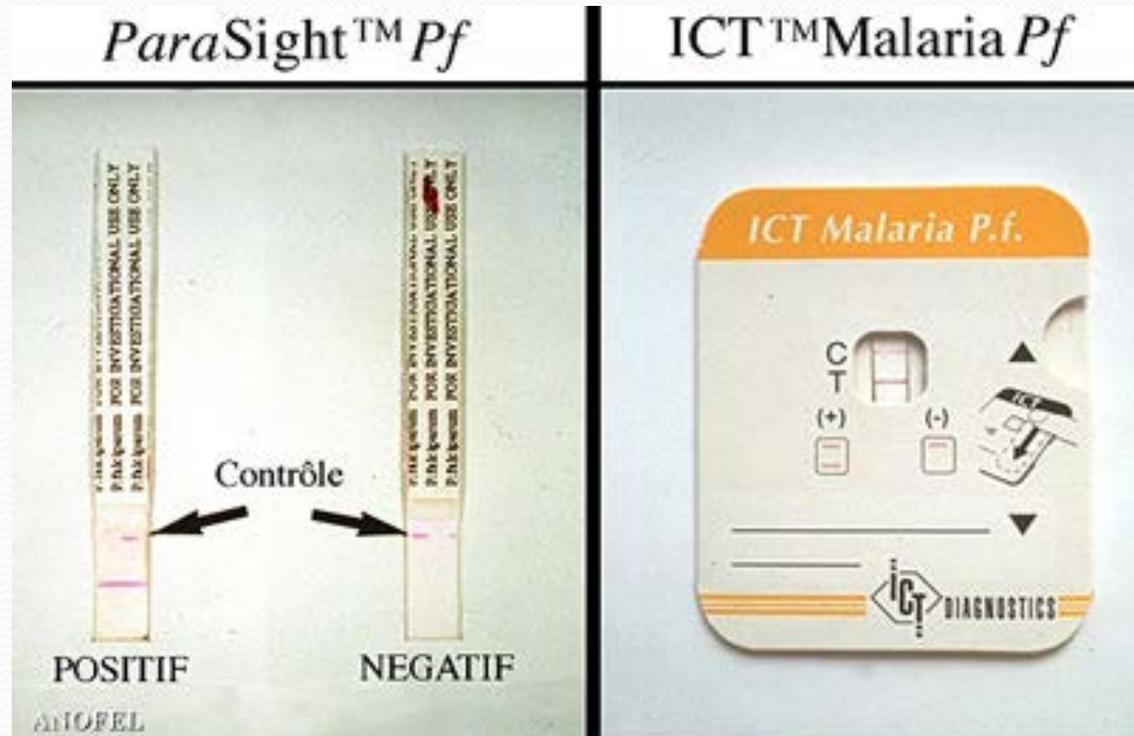
Il ne faut donc jamais se fier au résultat de cette technique utilisée seule, sans frottis sanguin – goutte épaisse associé.

Parasight F® et **ICT Malaria Pf®** ne mettent en évidence que *P. falciparum* (sensibilité: 93%; spécificité:99%)

les 4 espèces peuvent être retrouvées avec le test **OptiMal®**. Ce dernier présente l'intérêt d'une possibilité de suivi (l'enzyme n'étant présente que chez le parasite vivant).



OptiMal assay Result





Méthodes moléculaires

▶ Les techniques d'amplification génomique pour la détection des plasmodiums sont nombreuses :

- ♣ PCR classique ,
- ♣ Nested-PCR,
- ♣ PCR avec marquage à la digoxigénine (PCR-DIG) ,
- ♣ PCR multiplex,
- ♣ PCR en temps réel (Real Time PCR) , etc....

▶ Les cibles d'amplification sont variables les plus utilisées

♣ le gène de la **grande sous-unité de l'ARN ribosomal** est conservé chez toutes les espèces plasmodiales

♣ le gène répété codant pour la **petite sous-unité 18s** de l'acide ribonucléique (ARN) ribosomal

♣ le **gène du circumsporozoïte**

Apport de la PCR dans le diagnostic du paludisme

- ♣ LA PCR est plus précoce et plus sensible / tech conventionnelles Gain de 6 % de sensibilité
- ♣ La PCR indiqué si contexte clinique évocateur et examens mic négatifs
- ♣ Quand l'identification d' espèce a été difficile sur le frottis sanguin
- ♣ Elle est plus performante pour mettre en évidence des associations d'espèces possible par PCR quantitative ou PCR multiplex
- ♣ les premières études laissent espérer que la détermination de la charge parasitaire par PCR quantitative puisse devenir un critère d'évaluation de la gravité du paludisme et de l'efficacité du traitement



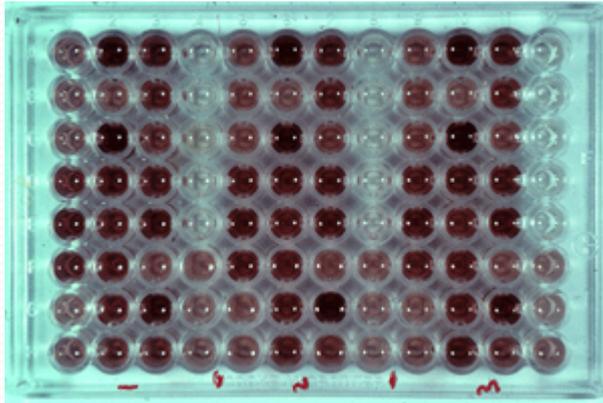
SEROLOGIE

SEROLOGIE

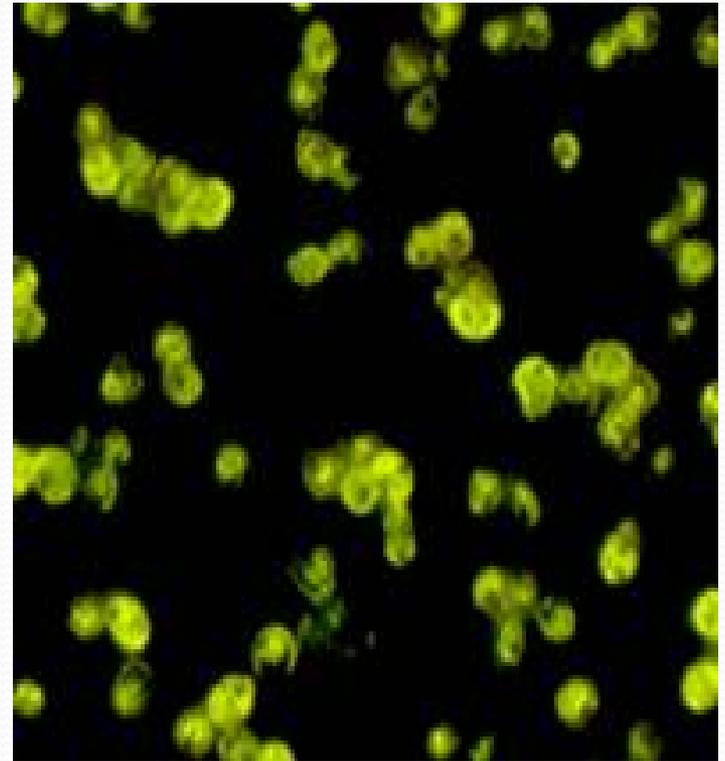
- ♣ Elle n'a pas d'intérêt pour un diagnostic d'urgence.
- ♣ La sérologie a un intérêt surtout **épidémiologique** (évaluer l'endémicité d'une région donnée)
- ♣ Paludisme viscéral évolutif, au cours duquel le taux d'anticorps est très élevé.
- ♣ Suivi de l'efficacité d'un programme de lutte anti-palustre
- ♣ Dépistage des donneurs de sang et prévenir un paludisme transfusionnel

♣ l'IFI en utilisant comme support des hématies parasitées seuil $>$ à 1/20

♣ ou ELISA.



ELISA



IFI

CONCLUSION

♣ La méthode de référence pour le diagnostic du paludisme demeure encore l'examen microscopique d'un frottis-goutte épaisse coloré par le Giemsa.

♣ Les TDR peuvent aider dans le dépistage

♣ La PCR est très performante mais n'est pas accessible à tous