

CAHIER DE

Formation

N° 23

Biologie médicale

Décembre 2001

PARASITES SANGUINS



CAHIER DE

Formation

Biologie médicale



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués à l'ensemble des LABORATOIRES D'ANALYSES de BIOLOGIE MEDICALE en FRANCE.

]

TOUT LE CONTENU DE CE FICHER RESTE LA PROPRIETE DE BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

]

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schèmes et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

]

Seule une impression pour une copie personnelle (étudiant, interne, biologiste de labm) est permise.





Cher Confrère,

Les parasites sanguicoles reviennent en force sur le devant des préoccupations de santé publique du fait de la multiplication des voyages dans les zones d'endémie et de la venue en France de populations en provenance de ces contrées.

Il nous a paru utile, à la lumière de l'énorme travail de recherche fondamentale qui a été effectué sur ce sujet, de demander au Docteur PETITHORY et à ses collaborateurs de présenter aux biologistes, dans le cadre de la formation continue conventionnelle conduite par Bioforma, un document pédagogique pratique et très illustré.

Le résultat que nous vous présentons ci-contre va au-delà de nos espérances.

C'est un véritable Traité de Parasitologie appliquée qui non seulement cerne dans ses moindres détails le parasite étudié mais aussi les données cliniques, thérapeutiques, épidémiologiques nécessaires à l'identification et à la caractérisation de l'hôte indésirable. C'est encore un vade-mecum précis et complet des techniques de laboratoire à mettre en œuvre pour maîtriser ces recherches.

Le Directeur de Laboratoire d'Analyse sera ainsi à même de dialoguer efficacement avec le clinicien et suivra aisément le processus de guérison.

Préfacé par un membre éminent de l'Académie de Médecine ce cahier rend hommage à d'illustres anciens qui, sans les moyens de la technologie moderne, avaient accompli des avancées scientifiques et techniques de tout premier plan.

Nous vous souhaitons une bonne réception de cet ouvrage et espérons que le texte et les documents iconographiques vous seront précieux.

Nous vous prions d'agréer, Cher Confrère, nos cordiales et confraternelles salutations.

Adrien BEDOSSA
Président

PARASITES SANGUINS DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

J.C. PETITHORY

Membre correspondant de l'Académie Nationale de Médecine

F. ARDOIN-GUIDON

Ho Thi Sang et L.C. Brumpt *In memoriam*

Préface de J. EUZÉBY

membre de l'Académie de Médecine

de l'Académie Vétérinaire de France

Avec la collaboration de :

A. Paugam – G. Galeazzi – S. Le Ponner

Toute reproduction, même partielle, ne peut être faite
qu'après autorisation des auteurs et de Bioforma.

2001

REMERCIEMENTS

Nous remercions de leurs apports à cet ouvrage :

M. Antoine - Gonesse	R. Himy - Strasbourg
L.R. Ash - Los Angeles (U.S.A.)	V. Lavarde - Paris
F. Berthelot - Gonesse	A. Leblanc - Paris
M. Burlandy - Gonesse	M. Milgram - Gonesse
C. Chaumeil - Paris	M. Miller - Gonesse
C. Dao - Courbevoie	T. Orihel (U.S.A.)
J. De Loye - Gonesse	J-F. Pays - Paris
F. De Marval - Genève (Suisse)	F. Poujade - Gonesse
M. Dufour - Gonesse	J. Rousselot - Gonesse
M. Fontrouge - Gonesse	J-J. Rousset - Paris
M. Fromage - Saint-Denis	C. Sarfati - Paris
T. Giacomini - Le Raincy	P.G. Sargeant - Londres (G.B.)
S. Gatti - Pavie (Italie)	M. Scaglia - Pavie (Italie)
N. Godineau - Saint-Denis	E. Vandemeulebroucke - Gonesse

Les technicien(ne)s des laboratoires d'hématologie - parasitologie CHG Gonesse

PRÉFACE

Le Docteur J.C. PETITHORY et ses collaborateurs, Mesdames F. ARDOIN-GUIDON et C. CHAUMEIL, ont doté, en 1998, les laboratoires d'analyses de biologie médicale d'un remarquable ouvrage de « Diagnostic Microscopique des Amibes et Flagellés intestinaux et des Amibes oculaires ». Toujours avec la collaboration de Madame F. ARDOIN-GUIDON, et avec celle d'autres spécialistes, il « récidive et signe », avec la publication d'un « Diagnostic Biologique des Parasites sanguins ». Commencant avec le rappel de la découverte, par Alphonse LAVERAN, en 1880, de « l'hématozoaire du Paludisme », cette véritable somme de diagnostic se poursuit avec l'exposé des méthodes et techniques générales d'étude de la parasitologie du sang, à laquelle les auteurs ajoutent fort logiquement celle des bactéries hématotropes : spirochètales et rickettsiales. Dès cette introduction, on perçoit la qualité du travail des auteurs, qui exposent, avec la précision de ceux qui ont véritablement « mis la main à la pâte », tous les éléments nécessaires à la confection des divers échantillons qui feront l'objet des examens microscopiques, n'hésitant pas à fournir les plus infimes, mais nécessaires, détails des opérations et révélant par là, leur profonde connaissance du sujet traité et leur souci d'informer efficacement ceux qui auront à pratiquer des analyses dont dépend une thérapeutique rationnelle. Les chapitres suivants ne s'éloignent pas de cette préoccupation, mais il ajoutent à la simple technique, des données d'ordre épidémiologique, clinique, physio-pathologique (immunologie) qui aident à situer les méthodes de laboratoire dans le cadre général du diagnostic, car, on le sait bien, le laboratoire n'est qu'un des éléments de ce diagnostic. Mais pour donner plus de valeur à cet élément, malgré tout essentiel, les auteurs illustrent leur propos par près de 300 clichés, dont 283 microphotographies polychromes d'une qualité égale à celle de leur premier ouvrage et inégalée ailleurs. Si PETITHORY et ses collaborateurs ont ajouté à la microscopie, l'exposé des méthodes immunologiques du diagnostic des parasitoses du sang, ils ont délibérément renoncé à traiter des apports de la Biologie moléculaire, très justement considérés comme encore insuffisamment fiables et dont le coût d'utilisation, très élevé, prohibe l'usage en routine. Tel qu'il est conçu, ce Traité diagnostic biologique des parasitoses du sang constituera le catéchisme des laboratoires d'analyses de biologie médicale, dont il permettra l'unification des méthodes et techniques, en vue d'une harmonisation de l'interprétation de leurs résultats. Ajouterai-je deux remarques ? J'ai apprécié l'évocation du souvenir du Professeur L.C. BRUMPT et celle du Professeur HO THI SANG, les savants élèves et collègues du Professeur Émile BRUMPT. Je suis heureux, aussi, de ce que les auteurs d'un ouvrage de la classe de celui que j'ai l'honneur de présenter ont eu la sagesse d'éviter l'anglomanie qui tue la littérature scientifique française ; en évitant ce grave défaut, ils se sont révélés héritiers de DESCARTES et d'Antoine (de) RIVAROL, lauréat, en 1874,

de l'Académie de Berlin, pour son discours sur l'« Universalité de la langue française » et auteur de la célèbre maxime : « ce qui n'est pas clair n'est pas français ». Ils ont montré que les « cannes anglaises », qui n'ont jamais guéri les paralytiques, ne sont pas indispensables à une marche assurée et le succès de leur travail confirmera le splendide défi que Victor HUGO mettait dans la bouche du roi Don CARLOS, candidat à l'Empire mais qui ignorait le latin :

« Il se contenteront d'un espagnol hautain
Car il importe peu, croyez-en le roi Charles
Quand la voix parle haut, quelle langue elle parle ».

Professeur Jacques EUZÉBY
**de l'Académie Nationale de médecine
et de l'Académie Vétérinaire de France**

INTRODUCTION

Les parasitoses sanguines sont rassemblées ici dans un même ouvrage en raison de la méthodologie la plus usuelle de leur diagnostic biologique : **la recherche microscopique des parasites dans le sang.**

Il s'agit le plus souvent de protozoaires :

– agents du paludisme et de la maladie du sommeil, actuellement en extension en Afrique subsaharienne non seulement pour les autochtones mais aussi pour les touristes ou autres voyageurs séjournant dans leurs zones d'endémie. Les migrants venant de ces régions et les voyageurs de retour participent à une importation croissante de ces deux maladies, en France en particulier. Le diagnostic de certitude en est assuré par l'ensemble des biologistes des laboratoires d'analyses de biologie médicale (L.A.B.M.). Le paludisme est à l'origine de plusieurs dizaines de mort par an en France et de 2,7 millions dans le monde : c'est pourquoi nous lui consacrons le tiers de cet ouvrage.

– agents de babésioses en progression due à l'accroissement du nombre des splénectomies, agents de la leishmaniose viscérale méditerranéenne et de la toxoplasmose en extension avec le continuels accroissement du SIDA.

– agent de la maladie de Chagas (trypanosomiase américaine) en régression.

Il peut s'agir de bactéries comme les agents des fièvres récurrentes et de la bartonellose. Elles sont étudiées ici car présentes dans le sang en quantité suffisante pour être trouvées à l'examen microscopique du sang.

Il s'agit aussi de nématodes, agents de filarioses sanguicoles, en régression.

L'évolution d'ensemble de ces maladies reste préoccupante, malgré des progrès dans la baisse de prévalence pour quelques unes d'entre elles, mais par contre l'augmentation de fréquence des 2 plus graves : paludisme et maladie du sommeil.

L'aspect épidémiologique de ces parasites a des éléments communs :

– leur transmission sanguine (à l'exception des toxoplasmes), se fait principalement par des vecteurs, arthropodes, insectes, tiques. Elle peut être aussi transfusionnelle (à l'exception des filarioses), ou professionnelle par contact direct avec du sang contaminé au L.A.B.M. en particulier.

– leur répartition géographique est importante à connaître du biologiste puisqu'il s'agit pour lui d'un élément de contrôle de son diagnostic. Ces données sont envisagées ici.

Des méthodes de biologie moléculaire, comme la P.C.R. apparaissent et se développent toujours dans les centres de recherche. Leur valeur diagnostique pratique a encore besoin d'être confirmée par des études faites en aveugle sur des prélèvements inconnus.

Ce sont actuellement des méthodes nécessitant des équipements spéciaux, des locaux particuliers, des réactifs commerciaux, tous coûteux. Dans les pays occidentaux comme la France par exemple, leur emploi est limité pour l'ensemble des L.A.B.M. à de rares laboratoires spécialisés. Dans les pays en voie de développement le coût d'un seul test atteint fréquemment le budget de santé moyen annuel d'un autochtone et leur emploi n'est donc pas envisageable. Nous empruntons la conclusion faite à ce sujet par des membres de la London School of Hygiene and Tropical

Medicine et du Department of Preventive and Social Medicine, Surat India « le diagnostic de paludisme dans les régions de basse endémie (et à plus forte raison de forte endémie) nécessite la microscopie pour être valable » (Chandramohan réf. 11). C'est ainsi que l'examen microscopique du sang est toujours fondamental dans les parasitoses sanguicoles tropicales ou exotiques.

Les prélèvements (phase pré-analytique) ont des modalités importantes, quant à leur nature, leur horaire en particulier, l'urgence de la recherche de Plasmodium, la nature des anticoagulants à employer, leur transport,...

L'immunologie est envisagée ici sous différents aspects :

– l'immunité en raison de son importance dans de nombreuses parasitoses, notamment la leishmaniose viscérale infantile et autres protozooses opportunistes.

– la sérologie, n'a pratiquement aucun intérêt diagnostique dans le paludisme. Elle a un rôle de présomption dans des maladies comme la leishmaniose, les trypanosomiasés, mais doit, chaque fois que cela est possible, être confirmée par la mise en évidence du parasite.

– les immunoglobulines sont très modifiées dans les parasitoses sanguines ; dans la maladie du sommeil l'IgM (anciennement bêta 2 macroglobuline) est à un tel taux que cela a posé problème avec le diagnostic de la maladie de Waldenström.

D'autres paramètres biologiques sont souvent modifiés en particulier la numération formule sanguine avec l'hyperéosinophilie des filarioses et la thrombopénie du paludisme.

L'inoculation à l'animal a un intérêt dans certaines conditions, quant à la **culture** elle est en général difficile à réaliser. **Les données cliniques, base des prescriptions biologiques**, sont citées brièvement. Ces données documentaires sont souvent en petits caractères dans le texte.

Les tests de contrôle de qualité, voulus et financés par Bioforma ont une grande importance dans la formation des biologistes.

Dans ce cadre, lors des cinq envois de novembre 1996 à octobre 2000 ont été envoyés aux 4 500 laboratoires privés, hospitaliers et universitaires :

– pour le paludisme à *P. falciparum* 6 préparations : 1 frottis assez riche, 2 frottis pauvres en trophozoites, un accès pernicieux, un frottis avec gamétocytes, une goutte épaisse, ainsi qu'un frottis de chacune des espèces, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*.

– des frottis de microfilaires *Loa loa*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* et *Mansonella perstans*.

– des frottis de *Trypanosoma brucei gambiense*, *Toxoplasma gondii* et *Leishmania donovani infantum* (amastigote et promastigote).

Au total 13 frottis et une goutte épaisse représentant l'aspect pratique dont le présent ouvrage est l'illustration et la méthodologie.

Les préparations microscopiques avec une coloration de qualité, sont de conservation pratiquement illimitée (les frottis sanguins non colorés se conservent moins d'un mois ce qui ne permet donc pas de les envoyer dans le cadre du contrôle de qualité). Ainsi a été constitué une exceptionnelle collection de lames de référence, à garder dans la boîte offerte par Bioforma à cet effet, conformément au Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale.

En outre, les tableaux récapitulatifs des résultats de ces envois avec ceux effectués dans le cadre du contrôle national de qualité en parasitologie, permettent de préciser les diagnostics différentiels qui se posent aux biologistes. Par exemple, on y apprend que le diagnostic différentiel des microfilaires *Loa loa* est à faire avec les microfilaires *M. perstans*. C'est un apport de base à l'enseignement universitaire de la parasitologie médicale pour la formation initiale des

biologistes. Ces tableaux permettent aussi, en tenant compte de la richesse en parasites des préparations, de suivre l'évolution en général favorable des résultats de cette formation pratique.

La qualité du diagnostic biologique parasitaire a été une action majeure pour nous : nous l'avons initiée en 1977 (Petithory réf. 41).

Nous espérons que ces tests de Contrôle de Qualité pourront se poursuivre, dans le même climat de confiance entre biologistes et responsables scientifiques que nous avons connu depuis maintenant 24 ans. Nous estimons toujours que « le but principal est de donner aux biologistes la possibilité de contrôler la qualité de leurs analyses et ainsi permettre l'amélioration des prestations des biologistes dans l'intérêt du malade et de la santé publique » (Leblanc réf. 33). De plus, l'envoi régulier de parasites et de souches de champignons donne l'occasion d'une révision. L'importance actuelle de la pathologie d'importation peut donner l'occasion à un biologiste privé de province de diagnostiquer une maladie du sommeil. Certes, la probabilité d'un tel fait est encore faible. Mais est-ce une raison pour que les chances de diagnostic et donc de guérison d'un tel malade soient inexistantes ? Grâce aux envois réalisés, les laboratoires ont pu se constituer des collections d'échantillons de référence qui les aideront dans les années à venir.

La qualité en parasitologie dans le cadre du Contrôle National de Qualité ne doit comporter aucune sanction, puisque si les échantillons proviennent en règle générale de malades, ceux-ci sont déjà diagnostiqués, traités depuis longtemps : une erreur de diagnostic est donc totalement sans conséquence pour la santé du malade. Par contre, elle permet au biologiste de savoir qu'il risque de faire la même erreur sur le prélèvement d'un de ses patients et donc qu'il doit améliorer son diagnostic en ce domaine. Au total le Contrôle de Qualité en Parasitologie doit viser à améliorer, en confiance, la qualité en parasitologie par la formation continue qu'il assure :

- révision permanente de connaissances théoriques et surtout pratiques acquises lors des études.
- acquisition de nouvelles connaissances pour des parasites émergents, comme nous l'avons fait pour ceux du Sida dès 1983 pour *Pneumocystis carinii* (Petithory réf. 42).

NOMENCLATURE SCIENTIFIQUE

– Pour les noms d'espèce nous avons utilisé :

International Nomenclature of Diseases
Infectious Diseases volume II Part 4 : Parasitic diseases
CI OMS, Genève 1987
WHO 1211 Genève 27 Suisse

ABRÉVIATIONS

Laboratoire d'Analyses de Biologie Médicale : L.A.B.M.

Polymerase Chain Reaction : P.C.R.

May-Grünwald-Giemsa nous utilisons l'abréviation M.G.G.

Goutte Epaisse nous utilisons l'abréviation G.E.

Chemical Registry Number = N° CAS

European Inventory of Existing Commercial = N° EINECS = N° CEE

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

1. ANCELLE T., HENNEQUIN C., PAUGAM A. Décision en parasitologie et médecine tropicale. Vigot, Paris, 1994.
2. ASH L., ORIHEL T. Atlas of human parasitology. ASCP Press, 1997.
3. BEAVER P.C., JUNG R.C., CUPP E.W. Clinical parasitology. Lea & Febiger, Philadelphie, 1984.
4. BESSIS M. Traité de Cytologie sanguine. Masson et Cie, 1954.
5. BERNARD E., BILLAUDEL S., BROYART A., CARLES M., REINERT P. et al. Immunodépresseurs et infections. Editions Pradel, Paris, 1991.
6. BOURÉE P. Maladies tropicales. Masson, Paris, 1987.
7. BRUCE-CHWATT L.J. Essential malariology. E.L.B.S. London, 1985.
8. BRUMPT E. Précis de parasitologie. Masson et Cie, Paris, 1949.
9. BURROWS R.B. Microscopic diagnosis of the parasites of man. Yale Univ. Press, 1965.
10. C.D.C. Health information for international travel. U.S. Department of health and Human services. Atlanta. 2001-2002.
11. CHANDRAMOHAN D., CARNEIRO I., KAVISHWAR A., BRUGHA R., DESAI V., GREENWOOD B. A clinical algorithm for the diagnosis of malaria : results of an evaluation in an area of low endemicity. *Trop. Med. Intern. Health*, 2001, **6**, 505-510.
12. COLLINS C.H. Laboratory-acquired infections. Butterworths, 1988.
13. COLLIER L., BALOWS A., SUSSMAN M. Microbiology and microbial infections. Arnold, 1998.
14. COOK G.C. Manson's tropical diseases. WB Saunders Company Ltd, 1996.
15. FAUST E.C., RUSSELL P.F. Craig and Faust's clinical parasitology. Lea & Fibiger, Philadelphie, 1964.
16. EUZEBY J. Protozoologie médicale comparée. Vol I : généralités, sarcomastigophores (flagellés, rhizopodes), ciliés. Collection Fondation M. Mérieux, Lyon, 1986.
17. EUZEBY J. Protozoologie médicale comparée. Vol II : Myxozoa, microspora, ascetospora apicomplexa, 1 : coccidiose. Collection Fondation M. Mérieux, Lyon, 1987.
18. EUZEBY J. Protozoologie médicale comparée. Vol III : apicomplexa, 21 : hémosporeidies. Fasc. 1 : plasmodiidés, haemoprotéidés, piroplasmes. Collection Fondation M. Mérieux, Lyon, 1988.
19. EUZEBY J. Protozoologie médicale comparée. Vol III (suite) : Hémosporeidies. Fasc. 2 : piroplasmes, leucocytozoïdes, garniidés. Collection Fondation M. Mérieux, Lyon, 1990.
20. FAUST E.C., RUSSEL P.F. Clinical Parasitology. Lea & Febiger, Philadelphie, 1964.
21. FIELD J.W., SANDOSHAM A.A., FONG Y.L. The microscopical diagnosis of human malaria. I-A morphological study of the erythrocytic parasites in thick blood films. *Inst. Med. Res. Fed. Malaya*, **30**, 1963 (2^{ème} édition) et FIELD J.W., SHUTE P.G. The microscopical diagnosis of human malaria. II-A morphological study of the erythrocytic parasites. *Inst. Med. Res. Fed. Malaya*, **24**, 1956.
22. FLECK S.L., MOODY A.H. Diagnostic techniques in medical parasitology. Wright, 1988.
23. FUSCALDO A.A., ERLICK B.J., INDMAN B. Laboratory safety. Theory and practice. Academic Press, 1980.

24. FURR A.K. CRC handbook of laboratory safety. CRC Press, Boca Raton, Floride, 1990.
25. GENTILINI M., DUFLO B. Médecine tropicale. Flammarion médecine-sciences, Paris, 1982.
26. GILLESPIE S.H., HAWKEY P.M. Medical parasitology. A practical approach. Oirl Press, 1994.
27. GURR G.T. Biological staining methods. Seventh Edition, 1963.
28. HOWE G.M. A world geography of human diseases. Academic Press, New-York, 1977.
29. HUARD P., LAPIERRE J. Médecine et santé publique dans le tiers monde. Le Centurion/ Médecine humaine, Paris, 1981.
30. KREIR J.P. Malaria. Immunology and immunization. Academic Press, New-York, 1980.
31. LANGERON M. Précis de Microscopie. Masson, Paris, 1949.
32. LAPIERRE J. Maladies exotiques et parasitoses autochtones. Editions Médicales Fournier Frères, 1982.
33. LEBLANC A. Le contrôle de qualité des analyses de biologie médicale. Bull. Ass. Anc. élèves Inst. Pasteur, 1979, 17-18.
34. LEVINE N.D. Protozoan parasites of domestic animals and man. Burgess Publishing Compagny Minneapolis, Minnesota. 1971.
35. MANGESCHOTS E., LONIE M., VANDEPITTE J. Atlas de microbiologie médicale. Acco, 1990.
36. MARKELL E.K., VOGÉ M. Medical parasitology. Saunders Compagny, 1981.
37. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. Environmental health criteria 9. DDT and its derivatives, O.M.S. Genève, 1979.
38. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. Basic malaria microscopy. Part II. Tutor's guide, O.M.S. Genève, 1991.
39. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. Parasitologie médicale : techniques de base pour le laboratoire, O.M.S. Genève, 1993.
40. PETERS W., GILLES H.M. A colour atlas of tropical medicine & parasitology. Wolfe, 1989.
41. PETITHORY J.C. Le Contrôle de Qualité en Parasitologie. Bull. Soc. Path. Exo., 1979, 72, 386-395.
42. PETITHORY J.C. Préface. *Ann. Contr. Nat. Qual.* 1983, 51, 1-2.
43. PETITHORY J.C. Répertoire des sérums de qualité en parasitologie. *Union Nationale des Polios de France*, Ezanville, 2000.
44. PETITHORY J.C., HO THI SANG, BRUMPT L.C. Rapport au 1er Congrès international de parasitologie, Rome, 21-26 septembre 1964.
45. RIOUX J.-A. *Leishmania*. Taxonomie – Phylogénèse. I.M.E.E.E., Montpellier, 1986.
46. RODHAIN F., PEREZ C. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Maloine, Paris, 1985.
47. RONDANELLI E.G., SCAGLIA M. Atlas of human protozoa. Masson, Paris, 1993.
48. SCHNEIDER J. Les maladies tropicales dans la pratique médicale courante. Masson et Cie, Paris, 1967.
49. SCHWARTZ D. Méthodes statistiques. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1963.
50. TAYLOR A.E.R., BAKER J.R. *In vitro* methods for parasite cultivation. Academic Press, 1987.
51. WIKERHAUSER T., BRGLEZ J. Atlas parazita. Zagreb, 1996.

TABLE DES MATIÈRES

	pages
PRÉFACE	1
INTRODUCTION	3
• Nomenclature scientifique et abréviations.....	5
– Bibliographie générale	6
I – HISTORIQUE	
• Découverte de l'hématozoaire du paludisme par A. Laveran	13
II – TECHNIQUES GÉNÉRALES	
• Prélèvements	26
• Technique du frottis mince	26
• Technique du frottis épais.....	28
– Colorations	
• Coloration du frottis mince – technique au May-Grünwald-Giemsa.....	28
– Goutte épaisse	
• Technique de la goutte épaisse	32
• Coloration de la goutte épaisse.....	33
• Cyto-concentration des parasites sanguins.....	35
• Nettoyage des lames de frottis minces et gouttes épaisses	37
• Conservation des frottis et gouttes épaisses	38
• Bibliographie Techniques générales	39
III – DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DU PALUDISME	
– Introduction et Nomenclature	45
– Épidémiologie du paludisme	47
• Cycle des <i>Plasmodium</i>	47
– Rechutes et récidives.....	52
• Épidémiologie du paludisme en France	53
• Épidémiologie mondiale du paludisme	57
– Techniques	
• Prélèvements	59
• Numération des <i>Plasmodium</i>	60
• Colorations.....	61
– Goutte épaisse – Comparaison avec le frottis mince	65
– Diagnostic microscopique des <i>Plasmodium</i> .	
– <i>Plasmodium falciparum</i> . Accès pernicious (graves) – Variétés	68
– <i>Plasmodium vivax</i>	106
– <i>Plasmodium ovale</i>	123
– <i>Plasmodium malariae</i>	138
– Diagnostic différentiel des quatre <i>Plasmodium</i> – Polyinfestations	152

– Manifestations cliniques et biologie	
• Accès palustre	165
• Fièvre bilieuse hémoglobinurique	165
– Culture de <i>Plasmodium sp.</i>	166
– Modifications biologiques	
• Cytologie sanguine	168
• Paludisme et anomalies génétiques des globules rouges.....	168
• Leucocytes et leucocytes mélanifères.....	172
• Thrombocytes	172
• Automates de formules leucocytaires et diagnostic biologique du paludisme	178
• Biochimie : hypoglycémie, hypocalcémie, protéines, cryoglobulines, paramètres rénaux ...	178
– Immunologie	
• Diagnostic sérologique	180
• Paludisme hyperimmun (maladie de Charmot, tropical splenomegaly syndrome).....	181
• Immunité.....	182
• Paludisme et Sida.....	182
Bibliographie du paludisme	183
IV – DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES BABÉSIOSES	
• Épidémiologie, répartition géographique, clinique	195
• Pathogénie des babésioses	196
• Modifications biologiques	197
• Diagnostic parasitologique	197
• Diagnostic sérologique	198
• Babésiose et SIDA	203
• Babésiose et borréliose	203
• Conclusion	203
Bibliographie des babésioses	204
V – DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES FILARIOSES SANGUICOLES	
– Recherche et identification des microfilaires sanguicoles	207
– Prélèvements	207
– Techniques de recherche des microfilaires	208
• Techniques de concentration.....	209
– Éosinophilie	212
– Identification des microfilaires	213
• Techniques de coloration	213
• Mensurations des microfilaires.....	215
• Morphologie générale des microfilaires	215
– Critère d’identification des microfilaires	217
– Diagnostic microscopique des microfilaires <i>Loa loa</i>	219
• Sérologie de la loase.....	230
– Filarioses lymphatiques	232
• Épidémiologie.....	232
• Diagnostic microscopique des microfilaires de <i>Wuchereria bancrofti</i>	235
• <i>Wuchereria bancrofti</i> variété <i>vauceli</i>	242
• Diagnostic microscopique des microfilaires de <i>Brugia malayi</i>	245

• <i>Brugia sp. p.</i>	250
• <i>Meningonema peruzzii</i>	252
– Filarioses non pathogènes	
• Diagnostic microscopique des microfilaires de <i>Mansonella perstans</i>	253
• Diagnostic microscopique des microfilaires de <i>Mansonella ozzardi</i>	258
– Diagnostic différentiel des principales microfilaires	260
– Numération des microfilaires	270
Bibliographie des filarioses	272
VI – DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA TRYPANOSOMIASE AFRICAINE OU MALADIE DU SOMMEIL	
• Nomenclature	277
– Épidémiologie, Transmissions. Répartition géographique	277
• Clinique.....	278
– Modifications biologiques	279
– Prélèvements et techniques de recherche de <i>T. brucei</i> : examens directs et concentrations	280
Ganglions	280
Sang	281
Techniques de concentration	282
Liquide céphalo-rachidien.....	284
– Diagnostic microscopique des trypanosomes	
• Diagnostic microscopique des trypanosomes à frais.....	285
• Diagnostic microscopique des trypanosomes après coloration	285
• Culture.....	286
• Inoculation à l’animal	288
• Immunologie.....	291
VII – DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA TRYPANOSOMIASE AMÉRICAINE OU MALADIE DE CHAGAS	
• Épidémiologie. Transmission. Répartition géographique.....	293
• Clinique.....	294
• Modifications hématologiques.....	294
• Recherche des trypanosomes.....	294
• Diagnostic microscopique.....	297
• Inoculation à l’animal	297
• Diagnostic immunologique.....	299
• Anatomie pathologique.....	300
Bibliographie des trypanosomiasés	301
VIII – DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES LEISHMANIOSES VISCÉRALES	
• Taxonomie. Épidémiologie. Répartition géographique	303
• Prélèvements	305
• Modifications biologiques	306
• Diagnostic microscopique.....	307
• Culture.....	313
• Inoculation à l’animal	315
– Immunologie	315

– Leishmaniose viscérale à <i>L. infantum</i> et immunodéficits	318
– SIDA	321
• Épidémiologie. Clinique. Sérologie.....	321
Bibliographie de la leishmaniose viscérale	322
IX – DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES BORRELIOSSES	
• Épidémiologie.....	327
• Techniques de colorations.....	328
• Diagnostic microscopique.....	328
• Inoculation à l’animal	329
• Immunologie.....	331
Bibliographie des borrelioses	334
X – DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA TOXOPLASMOSE	
• Épidémiologie. cycle, répartition géographique.....	335
• Modifications cytologiques.....	335
– Diagnostic microscopique	
• Prélèvements	336
• Forme végétative.....	336
• Kyste	337
– Diagnostic différentiel avec les leishmanies	337
• Culture.....	338
• Inoculation à l’animal	338
– Toxoplasmose et SIDA	339
• Recherche du parasite	339
• Immunologie.....	340
Bibliographie de la toxoplasmose	344
XI – DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA BARTONELLOSE	
• Épidémiologie.....	347
• Diagnostic microscopique.....	347
• Bibliographie de la bartonellose	349
INDEX DES PHOTOS.....	351
INDEX DES TABLEAUX ET DES FIGURES	353

I

HISTORIQUE DE LA DÉCOUVERTE DE L'HÉMATOZOAIRE DU PALUDISME PAR A. LAVERAN

L'hématozoaire du paludisme a été découvert par A. Laveran en 1878 à Bône en Algérie (maintenant devenu Annaba), découverte confirmée à Constantine en 1880 par l'observation d'une exflagellation (53). Voilà comment il relate lui-même cette découverte (61).

« **Mes premières recherches remontent à 1878 ; j'étais à ce moment chargé d'un service à l'hôpital de Bône (Algérie)** et un grand nombre de mes malades étaient atteints de fièvres palustres. J'eus l'occasion de faire l'autopsie de plusieurs sujets morts de fièvre pernicieuse et d'étudier la mélanémie, qui déjà avait été observée mais qui n'était pas considérée comme une altération constante du paludisme ni comme une altération spéciale à cette maladie. Je fus frappé des caractères singuliers des granulations de pigment noir, surtout dans le foie et dans les vaisseaux cérébraux, et je cherchai à poursuivre, dans le sang des malades atteints de fièvre palustre, l'étude de la formation du pigment. **Je trouvai dans le sang des leucocytes chargés de pigment, déjà vus par d'autres observateurs, mais, à côté des leucocytes mélanifères, des corps sphériques, de volume variable, pigmentés, doués de mouvements amiboïdes, et des corps en croissant pigmentés attirèrent mon attention ; je supposai dès lors qu'il s'agissait de parasites.**

En 1880, à l'hôpital militaire de Constantine, je découvris sur les bords de corps sphériques pigmentés, dans le sang d'un malade atteint de paludisme, des éléments filiformes ressemblant à des flagelles qui s'agitaient avec une grande vivacité, en déplaçant les hématies voisines ; dès lors je n'eus plus de doutes sur la nature parasitaire des éléments que j'avais trouvés dans le sang palustre.

Des recherches ultérieures me montrèrent que lorsqu'on se plaçait dans de bonnes conditions (pendant les accès et avant l'emploi de la quinine), on trouvait toujours ces éléments parasitaires dans le sang des palustres et qu'on ne les trouvait jamais chez d'autres malades ; j'arrivai ainsi à la conviction qu'il s'agissait bien du parasite du paludisme.

Dès 1880, j'ai décrit les formes principales sous lesquelles se présente l'hématozoaire du paludisme ».

La première publication

C'est celle du Bulletin de l'Académie de Médecine séance du 23 novembre 1880 : *Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre*, 2^e série, IX, 1234-1236 (52). En fait, il s'agit de la présentation par M. Léon Colin professeur au Val de Grâce, d'un manuscrit de M. le docteur A. Laveran, professeur agrégé au Val de Grâce. La présentation de la note elle-même est faite en 12 lignes. Puis suivent 23 lignes de discussion critique de Léon

Colin comme : « En rappelant à l'Académie les doutes que j'ai émis sur la nature animée des germes de l'intoxication tellurique, doutes basés sur des considérations trop longues à rapporter ici, mais dont la principale est la non-contagiosité d'une affection qui ne paraît pas, comme les ferments animés, pouvoir se reproduire dans l'organisme... ». M.M. Pasteur, Léon Colin (Commissaires).

Nous avons été étonnés de ne trouver que 12 lignes de Laveran pour une si importante découverte et nous avons demandé aux bibliothécaires de l'Académie Nationale de Médecine si le manuscrit correspondant pouvait encore exister dans les archives. Mesdemoiselles Chapuis après de patientes recherches ont alors effectivement retrouvé ce manuscrit de huit pages. Nous les en remercions vivement ainsi que l'Académie Nationale de Médecine.

Il a un intérêt général considérable. Il est fait aussi état dans la séance du 30 novembre 1880, de la date et du lieu de son envoi « Constantine, 8 novembre 1880 ».

La première page du manuscrit porte sur la « composition de la commission » chargée de l'examiner :

- Pasteur Louis (Élu associé libre le 25 mars 1873).
- Colin Léon Jean (Élu membre de la section d'hygiène le 23 mars 1880).
- Laboulbène Jean Joseph Alexandre (Élu membre de la section d'anatomie pathologique le 2 décembre 1873).

Elle porte aussi la mention « Il n'y a pas lieu de faire un rapport » signé : Laboulbène.

Nous laissons aux lecteurs le soin de découvrir le texte dans son ensemble.

DATES IMPORTANTES DE L'HISTOIRE DES *PLASMODIUM*

- | | |
|---------|---|
| 1886 | Golgi décrit en Italie <i>P. vivax</i> et <i>P. malariae</i> |
| 1889-90 | Celli et Marchiafa décrivent en Italie <i>P. falciparum</i> |
| 1891 | Romanowsky met au point la méthode de coloration polychrome |
| 1897-98 | Ross découvre la transmission par anophèle |
| 1898 | Grassi montre le cycle chez le moustique |
| 1922 | Stephens découvre <i>P. ovale</i> |
| 1948 | Shortt, Garhnam, Covell et Shute découvrent les formes préérythrocytaires dans le foie de l'Homme |
| 1976 | Trager et Jensen mettent au point la culture de <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i> |

Présenté par M. L. Collet
dans la séance du 23 Nov. 1880,
(comme minutes à nos mes. mes.)

Muller

Note sur un nouveau parasite trouvé dans
le sang de plusieurs malades atteints de
fièvre palustre. par M. le Dr. Laveran.

Commission
M. L. Collet (Leon)
Laboulbène

Il n'y a pas lieu
de faire un rapport
Laboulbène

M. L. Collet



A.M. 276 (1880) n° 21 (A.H.)

Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang
de plusieurs malades atteints de fièvre palustre
par

A. Favrean médecin major à l'hôpital M^e de
Constantine, professeur agrégé du Val de Grâve

En examinant au microscope le sang des malades
atteints de fièvre palustre j'ai constaté à plusieurs
reprises l'existence des éléments suivants qui me
paraissent devoir être considérés comme des parasites
du sang; ces éléments se présentent sous trois
aspects que faute de mieux je décris sous les
noms de: Corps n^o 1, n^o 2, n^o 3.

Corps n^o 1. Ces corps sont allongés, cylindriques, un
peu effilés à leurs extrémités, ~~parfois~~
légerement recourbés ~~en croissant~~ en croissant; la longueur



AN. 276 (1880) n^o 21 (c)

2

de ces corps est de 8 à 10 millièmes de millimètre
c'est à dire un peu supérieure au diamètre des
globules rouges, leur largeur est de 3 millièmes de
millimètre environ; vers la partie moyenne il
existe une tâche noire, allongée qui paraît constituée
par un amas de granulations noires dont la
disposition est assez variable; le reste du corps est
très transparent; en général ces corps sont immobiles,
^{si ce n'est cependant avec l'obscurité des mouvements sur quelques uns}
Corps n° 2. Ces corps sont arrondis, transparents,
leur diamètre, un peu inférieur à celui des globules
rouges du sang, est de 6 millièmes de millimètre
en moyenne; en ce cas on distingue des granulations
noires qui souvent sont disposées en forme de
couronne, d'une façon très régulière. Tantôt ces corps
sont immobiles et on n'aperçoit que les bords très
pâles et la couronne de granulations, tantôt ils sont
en mouvement et on distingue alors des prolongements
espèces de tentacules, qui paraissent insérer dans les



AM 276 (1880) n° 21 (d)

3

bords et qui s'agitent très vivement dans tous les sens en imprimant les mouvements les plus variés aux corpuscules rouges du sang ~~les~~ ~~normaux~~. Par suite de leur grande mobilité et de leur transparence (qui les rend invisibles à l'état de repos), les prolongements sont très difficiles à mesurer, leur longueur peut être évaluée à 4 ou 5 fois le diamètre des corps n° 2. Les prolongements n'ont pas été au nombre de 3 ou 4; leurs mouvements sont beaucoup plus compliqués que ceux des Cils vibratiles, ils rappellent ceux des anguilles. Pendant que ces prolongements s'agitent les corps n° 2 sont animés d'un mouvement oscillatoire.

Corps n° 3. Éléments arrondis ou allongés, 3 ou 4 fois plus grands que les corps n° 2; ces éléments sont immobiles, sans prolongements apparents; on distingue à l'intérieur des granulations noires arrondies, déposées sans ordre mais le plus souvent situées à la périphérie.

La coexistence ~~de~~ dans le sang des mêmes maladies des corps n° 1 et n° 2 permet de croire



AM 276 (1880) n° 21(e)

4

quels s'agit de deux formes ou même seulement de deux aspects différents du même parasite, quant aux corps n° 3 je crois qu'ils représentent seulement une altération des corps n° 2 qui après leur mort s'imprégnent de sérum et se tassent, l'ovocyte parasite se rompt en de nombreuses petites masses et libère les granulations noires.

Les maladies chez lesquels ces parasites ont été trouvés ^(en plus ou moins grand nombre) sont atteints de fièvre intermittente rebelle avec anémie profonde consécutive.

Procédé de préparation du sang: une piqûre est pratiquée à un doigt, une goutte de sang est recueillie sur la lamelle porte-objet et recouverte avec la lamelle couvre-objet sans addition d'aucun liquide. Les lamelles de verre, le doigt du malade et l'éponge qui sert à faire la piqûre sont lavés dans l'eau distillée d'abord puis dans l'alcool afin de prévenir l'introduction de tout corps étranger.



A7 276 (1880) n° 21 (f)

5
L'examen est fait immédiatement; je me suis servi
presque toujours pour cet examen de l'oculaire n° 2
et de l'objectif n° 7 de Verick.

Dès aujourd'hui je crois pouvoir conclure à
l'existence d'un nouveau parasite du sang de
l'homme, parasite que me paraît se rapprocher des
amibes. Quel est le rôle pathologique de ce
parasite? Les faits que j'ai observés sont encore
en trop petit nombre pour que je puisse me
prononcer à cet égard. Le parasite en question
n'a été rencontré que chez des malades atteints
de fièvre palustre; s'agit-il d'une simple
coïncidence ou bien existe-t-il une relation
de cause à effet entre les parasites et la fièvre?
De nouvelles recherches sont indispensables pour
résoudre cette importante question. Plusieurs
observations ont déjà décrit dans le sang
des malades atteints de fièvres palustres graves



Art 276 (1880) n° 21 (3)

6

des éléments métalliques qui ont une grande
analogie avec ceux qui sont décrits dans cette
note sous le nom de corps n° 3, dans les fibres
pennées en particulier ces éléments qui
ont été décrits sous le nom de leucocytes métalliques
influencent pour ainsi dire tous les organes.

Constantin 11 novembre 80.

A. Laveran



AM 276 (1880) n° 21 (R)

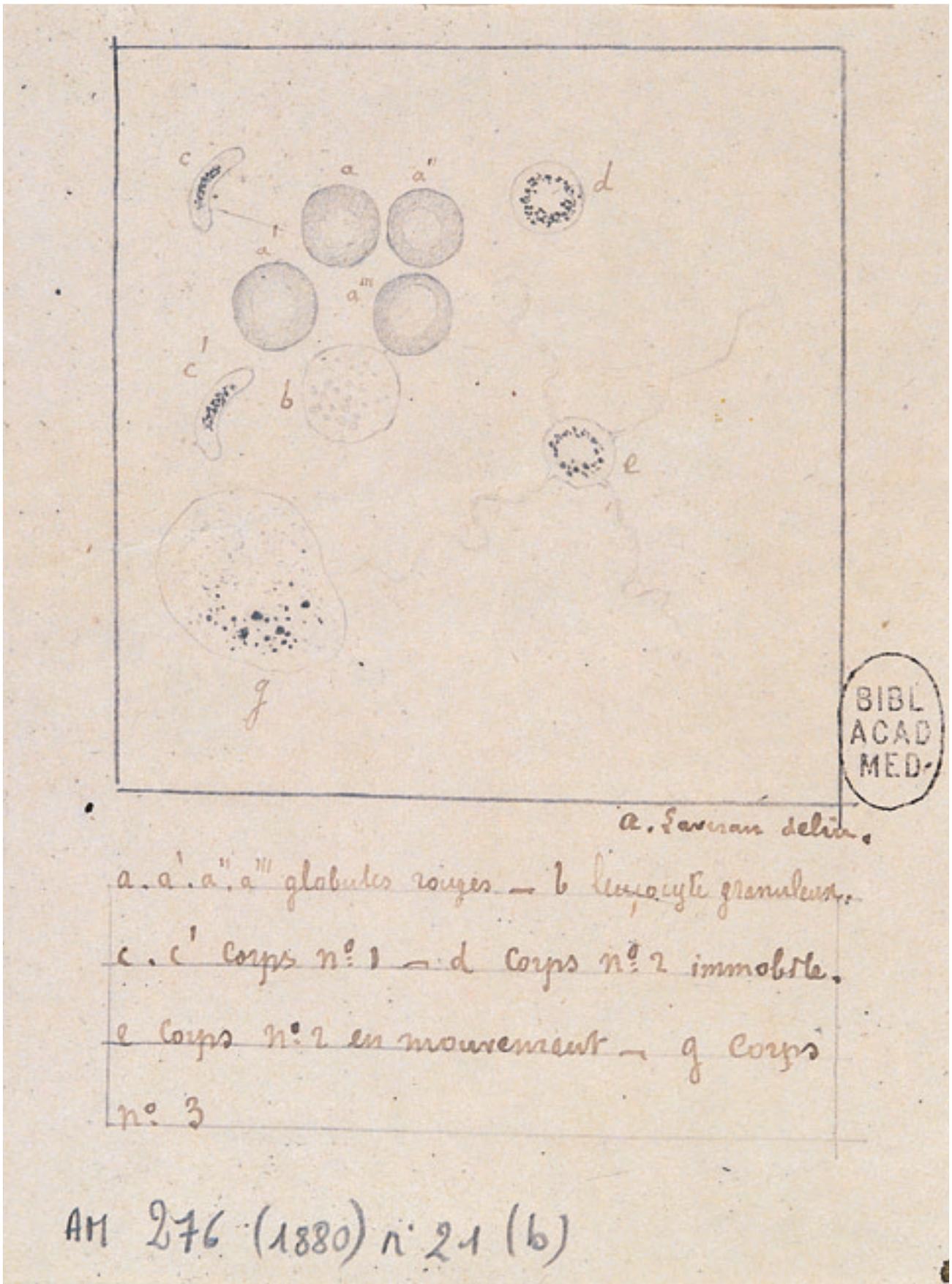


Figure 1 : Premier dessin par A. LAVERAN des hématozoaires du paludisme.

M. Laveran A. né en 1845, nommé Professeur agrégé du Val de Grâce en 1874, fut élu membre de la section de thérapeutique le 26 décembre 1893 puis Président de l'Académie Nationale de Médecine en 1920. Il fut chef de service à l'Institut Pasteur de 1897 à 1922. Son éloge y fut prononcé par Émile Brumpt le 23 mai 1922.

Le prix Nobel de physiologie et de médecine lui avait été décerné en 1907 pour l'ensemble de ses travaux sur le rôle des protozoaires comme agents de maladies.

La découverte d'A. Laveran était inattendue : en 1880 on était dans une période de grand développement du rôle des bactéries dans la pathologie infectieuse. Ainsi le *Bacillus malariae* fut décrit en 1879 par Klebs E. et Corrado Tomasi-Crudeli (53), deux des plus éminents bactériologistes de l'époque, comme agent étiologique du paludisme.

Pendant de nombreuses années Laveran dut lutter avec opiniâtreté pour que le parasite qu'il avait patiemment identifié fût reconnu. Ainsi en 1889, 9 ans après les travaux définitifs de A. Laveran, Léon Colin considérait bien que le bacille de Klebs et Tomasi-Crudeli n'était observé qu'avec des résultats trop inconstants pour qu'on puisse le considérer comme caractéristique de l'infection, mais il écrivait aussi « Plusieurs observateurs de premier ordre ont retrouvé les parasites de Laveran, et, si telle est la cause réelle de la fièvre intermittente... ». Il maintenait même encore « Le terme d'intoxication tellurique nous semble dès lors préférable au terme intoxication palustre qui ne rappelle qu'une condition moins essentielle de la genèse morbide » (62).

L'importance de la découverte de Laveran ne tient pas seulement à l'identification de l'agent causal du paludisme, qui est toujours en 2000 un fléau mondial mais aussi parce qu'elle ouvrait, la voie au rôle joué par de nombreux agents pathogènes chez l'homme : la protozoologie médicale. En 1880 était juste connu comme parasite non pathogène de l'Homme, *Entamoeba gingivalis*, 1849.

A. Laveran poursuivit pendant le reste de sa carrière à l'Institut Pasteur ses travaux sur le rôle des protozoaires dans la pathologie infectieuse (56 à 61).

Bibliographie

52. COLIN L. Présentation d'ouvrages manuscrits et imprimés (Séance du 23 novembre). *Bull. Acad. Méd. 2^e série*, 1880, **IX**, 1234-1236.
53. KLEBS E., CORRADO TOMMASI-CUDELI. Studi sulla natura della malaria. *Atti della Reale Accademia dei Lincei*, 1879, **3**, 172-243.
54. LAVERAN A. Un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre. Origine parasitaire des accidents de l'impaludisme. *Bull. Soc. Méd. Trop. Paris*, 1880, **30**, 158-164.
55. LAVERAN A. Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme. Description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre. Baillièrre, Paris, 58, 1881.
56. LAVERAN A. Encyclopédie Scientifique des aide-mémoire du paludisme. Masson, Paris, 1892.
57. LAVERAN A., BLANCHARD R. Les hématozoaires. I Protozoaires du sang. Rueff et Cie, Paris, 1895.
58. LAVERAN A., BLANCHARD R. Les hématozoaires. II Les vers du sang. Rueff et Cie, Paris, 1895.
59. LAVERAN A., MESNIL F. Trypanosomes et trypanosomiases. Masson, Paris, 1904.
60. LAVERAN A. Paludisme et trypanosomiase. Baillièrre, Paris, 1905.
61. LAVERAN A. Traité du paludisme. Masson, Paris, 1907.
62. PETITHORY J.C. À propos de la découverte de l'hématozoaire du paludisme par A. Laveran Bône 1878 – Constantine 1880. *Hist. Scien. Méd.*, 1995, **29**, 1-6.

La formation continue est devenue une obligation



BIOFORMA

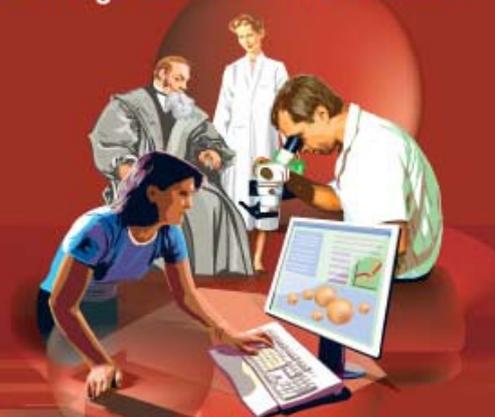
FORMATION CONTINUE DES BIOLOGISTES



80% des LABM se servent des outils BIOFORMA

dates et infos sur
www.bioforma.net

- **Simplicité : aucun dossier à remplir, juste s'inscrire**
- **Prise en charge du coût des formations**



BIOFORMA

230, boulevard Raspail 75014 Paris • tél. 01.56.54.39.39 • fax : 01.56.54.39.30 • e-mail : bioforma@wanadoo.fr
Site Internet : www.bioforma.net

II

TECHNIQUES GÉNÉRALES

	Pages
• Prélèvements	26
• Étalements	26
• frottis mince	26
• frottis épais	28
• Colorations	28
• Goutte épaisse	32
• Cyto-concentration.....	35
• Nettoyage des frottis et gouttes épaisses	37
• Conservation des frottis et gouttes épaisses	38
• Bibliographie	39

Nous allons étudier dans ce chapitre les techniques utilisées pour la recherche microscopique des parasites sanguins en général. Les adaptations aux différents parasites, Plasmodium, microfilaires, leishmanies... sont envisagées dans les chapitres correspondants.

■ PRÉLÈVEMENTS

SANG CAPILLAIRE : Il est prélevé par piqûre au moyen d'un hémostyle à la pulpe ou à la zone située en bas de l'ongle du quatrième doigt de la main gauche (= annulaire) car ce doigt est assez volumineux et peu employé. Ce type de prélèvement est recommandé chaque fois qu'il est possible. Il nécessite de faire immédiatement la goutte épaisse avec l'hémostyle ou le coin d'une lame, en enlevant le réseau de fibrine au fur et à mesure qu'il se forme. Dans ces conditions, la goutte épaisse adhère mieux à la lame de verre qui peut être rapidement colorée.

Confection des frottis : l'extrémité d'une lame propre est mise délicatement en contact avec le sommet de la goutte de sang de manière à ne recueillir sur la lame qu'un volume suffisant pour un frottis. Ne pas écraser la goutte contre la peau du doigt. Essuyer le reste du sang avec un tampon de coton hydrophile sec stérile. Faire sourdre une autre goutte pour faire un deuxième frottis.

Indications du prélèvement capillaire : les leucocytes sont intacts sans aucun artéfact morphologique et se colorent parfaitement. Ce mode de prélèvement peut être utilisé quand est seulement demandée une recherche d'hématozoaires, en particulier en zone d'endémie.

Gouttes épaisses pour la recherche de parasites : permet une déshémoglobination complète, une bonne coloration et une adhérence très satisfaisante. Elle permet aussi une coloration immédiate ce qui n'est pas le cas pour le prélèvement de sang veineux.

SANG VEINEUX : Le sang pour recherche de parasites sanguins est maintenant le plus souvent prélevé à la veine. La pose d'un garrot, le lieu de prélèvement, n'interfèrent pratiquement pas, mais un anti-coagulant est indispensable pour faire un frottis de sang. Les tubes à prélèvement habituellement utilisés sont les tubes EDTA K3 à capuchon violet (Éthylène diamine tétracetate tri potassique) contenant par exemple 0,072 ml d'une solution d'EDTA à 7,5 % pour prélever 3 ml de sang : la très faible dilution par l'anti-coagulant n'intervient pas dans le résultat final. Les tubes à héparine (capuchon vert) donnent des résultats moins bons, mais peuvent être utilisés en cas de nécessité. Les tubes à citrate de soude liquide comme anti-coagulant (capuchon bleu clair) peuvent aussi être utilisés mais entraînent une dilution assez importante, de 10 % en général.

■ TECHNIQUE DU FROTTIS MINCE

FROTTIS DE SANG

Matériel :

- lames, à tenir par les bords pour éviter les empreintes digitales graisseuses.
- lamelles, MOINS LARGES que les lames afin que les bords du frottis soient entièrement contenus sur la lame.

Plus la lamelle utilisée pour faire le frottis est mince, plus le frottis sera fin.

Étalement : PRÉCAUTIONS

- effectuer l'étalement très rapidement avant que le sang ne se coagule s'il a été prélevé au bout du doigt.
- sécher les frottis très rapidement afin d'éviter la rétraction des leucocytes et la déformation des hématies.

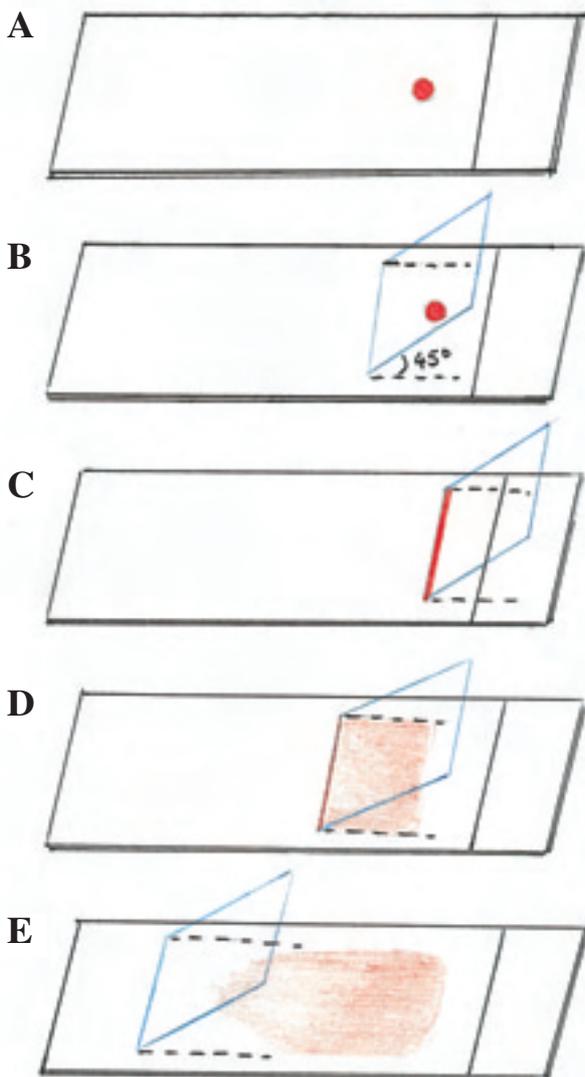


Figure 2 :
Technique de confection d'un frottis mince.

– Pour obtenir un frottis très mince, il faut (*Figure 2*) :

- une lamelle mince,
- un angle faible, inférieur à 45°,
- un étalement lent.

– Déposer une petite goutte de sang d'environ 1 à 3 microlitres (**A**) avec une pipette Pasteur de préférence bien effilée, si la pipette Pasteur n'est pas finement effilée (= pipette Pasteur utilisée en bactériologie) l'incliner presque horizontalement pour déposer une petite goutte de sang.

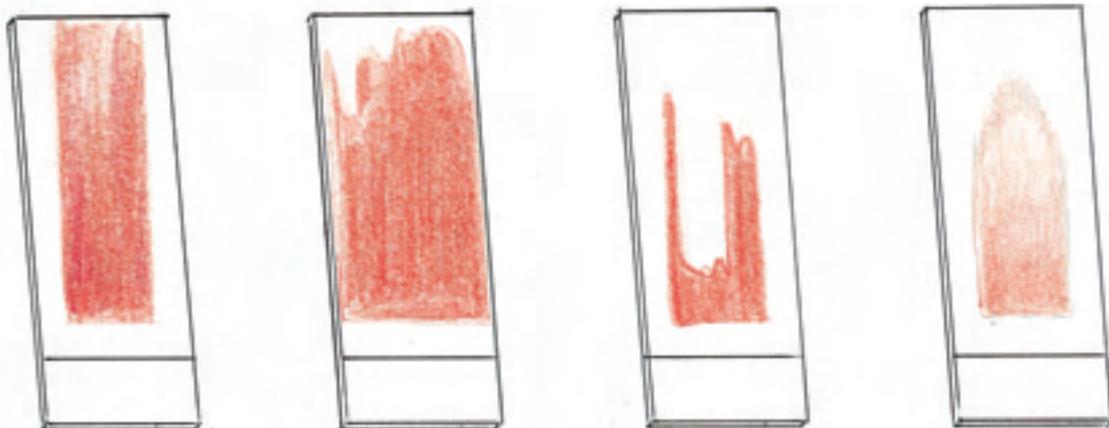
– Poser le petit bord de la lamelle au contact de la lame, à gauche de la goutte de sang, l'angle formé à droite étant de 45° environ (**B**) : plus l'angle est petit, plus le frottis est mince. Maintenir cet angle et ce contact avec une légère pression jusqu'à la fin de l'opération. (Inverser pour les gauchers).

– Faire glisser la lamelle vers la goutte de sang, à son contact il se répartit régulièrement par capillarité le long du bord de la lamelle en quelques secondes (**C**).

– Faire glisser alors la lamelle vers la gauche, jusqu'au bout, d'un mouvement assez lent et régulier en maintenant le contact et la pression nécessaire pour que le sang s'étale en une couche mince uniforme derrière la lamelle (**D**). **Un bon frottis doit être contenu entièrement** sur la lame, bords et franges compris (**E**).

– Sécher **Immédiatement** en agitant à l'air par des mouvements d'éventails **vifs**. Pas de séchage à la chaleur ou près d'une source de chaleur.

– En cas d'anémie le frottis est plus prolongé qu'avec un sang normal. Pour avoir un frottis plus dense il faut alors un mouvement plus rapide de la lamelle.



Frottis trop long et trop épais. La goutte de sang a été trop grosse.

Frottis trop long et trop épais. La goutte de sang est trop grosse, et la lamelle trop large.

Frottis effiloché. Mauvais contact de la lamelle sur la lame.

Bon frottis.

■ TECHNIQUE DU FROTTIS ÉPAIS

Cette technique est rapide, donc utile dans les prélèvements en série mais elle concentre moins que la goutte épaisse et est donc peu utilisée.

– Faire sourdre une goutte de sang au doigt.

– Mettre la lame en contact avec la goutte de sang, à 2 cm environ de l'extrémité droite, en écrasant légèrement la goutte sur la pulpe du doigt qui regarde vers le bas.

– Tirer la lame vers la droite sur une longueur de 2 à 2,5 cm tout en maintenant le contact avec le doigt qui étale la goutte sur la lame. Colorer comme une goutte épaisse.

On obtient un frottis épais de moins de 1 cm de large et de 2 à 2,5 cm de longueur. Il faut qu'il ait la même épaisseur d'un bout à l'autre.

■ COLORATIONS

COLORATION DU FROTTIS MINCE

Les premières méthodes de coloration du sang remontent à Ehrlich (62) avec ses « colorants neutres ».

Romanowsky, protozoologiste russe, mit au point en 1891 (67) une méthode combinant le bleu de méthylène, l'éosinate d'azur de méthylène et l'éosinate de violet de méthylène pour colorer le noyau des parasites du paludisme. Jenner en 1899 (63) fit évoluer cette méthode.

RÉACTIFS :

MAY-GRÜNWARD

May et Grünwald en 1902 (65) en Allemagne utilisèrent l'éosinate de bleu de méthylène insoluble dans l'eau, mais soluble dans l'alcool méthylique. Il peut être considéré comme un sel résultant de la combinaison d'une base colorée et d'un acide, ce qui correspond au colorant neutre selon Ehrlich.

Dilué dans l'eau il y a dissociation partielle et chacun des colorants agit séparément, pour avoir une coloration des éléments figurés il faut donc diluer avec la même quantité d'eau le May-Grünwald recouvrant la lame.

Si on lave la lame à l'eau directement après l'avoir recouverte de May-Grünwald, celui-ci sert surtout de fixateur par le méthanol qu'il contient, avant la coloration par le Giemsa. Le May-Grünwald amorce néanmoins une certaine coloration, en particulier des taches de Maurer.

GIEMSA

C'est une solution d'azur II éosine avec de petites quantités d'azur I et de bleu de méthylène dans un mélange d'alcool méthylique et de glycérol. L'alcool méthylique et le glycérol assurent une très bonne conservation à ce colorant et le mélange du colorant de Giemsa à l'eau provoque une dissociation partielle des colorants. Cette solution de Giemsa dans l'eau doit être fraîchement préparée, elle n'est pas stable et perd son pouvoir colorant rapidement.

Le Giemsa R.A.L.[®] est vendu sous deux formes : le Giemsa R est un Giemsa rapide, donnant des colorations intenses en peu de temps ; le Giemsa L est un Giemsa lent qui précipite moins rapidement que le précédent. Le premier convient surtout pour la coloration rapide des frottis

desséchés ; le second pour la teinture plus lente des frottis humides et des coupes. Autres colorants de Giemsa : Geigy®, Gurr®, Sigma®...

EAU DISTILLÉE TAMPONNÉE

L'eau de dilution du Giemsa doit avoir un pH bien défini : neutre ou voisin de la neutralité entre pH 7 et 7,4. Si l'eau a un pH acide, inférieur à 7 la couleur des éléments, en particulier des hématies, est rosé, ou rouge, d'autant plus rouge que le pH est plus bas. Si l'eau est alcaline les éléments figurés sont de plus en plus bleus, les hématies atteignent parfois une teinte verdâtre : c'est donc la couleur des hématies qui permet de juger de la valeur de la coloration :

- orange-beige : bonne coloration,
- rosée à rouge : eau acide,
- bleue à verdâtre : eau basique.

On peut aussi juger sur photos de la valeur d'une coloration réalisée.

Tampon Phosphate de Sørensen (70)

- Potassium dihydrogénophosphate en poudre
KH₂PO₄ (PM 136,09) N° CAS (7778-77-0)
- Di-sodium hydrogénophosphate (2H₂O)
N° CAS (10028-24-7)
- Eau distillée Q.S.P.

pH 7	pH 7,2	pH 7,4
3,75 g	2,69 g	1,79 g
6,97 g	8,36 g	9,53 g
100 ml	100 ml	100 ml

Pour assurer la conservation ajouter 1/10 000 de Merthiolate (Mercurothiolate de sodium)

Préparation de l'eau tamponnée

- Tampon 20 ml
- Eau distillée 1 000 ml

Vérifier le pH de préférence avec un pH mètre, sinon avec du papier pH et l'ajuster si nécessaire.

EAU MINÉRALE

Dans notre expérience personnelle l'eau distillée tamponnée peut être remplacée par différentes eaux minérales, en particulier l'eau d'ÉVIAN® source Cachat qui a un pH de 7,2-7,3 et qui est peu minéralisée (tableau I). Elle est bonne pour la coloration de May-Grünwald-Giemsa. (Petithory J.C., Ardoin F.G., Ash L.R. A rapid and easy method of diluting Giemsa stain for use in staining blood smears for the diagnosis of malaria and other blood parasites. *Am. J. Trop. Med.*, 2001, **63**, sup. n° 3).

Notre expérience concernant l'utilisation d'une telle eau minérale est de 3 ans et grâce à elle nous avons toujours réalisé de très bonnes colorations. Elle nous permet, en particulier, de mettre presque toujours en évidence les tâches de Maurer dans les cas de paludisme à *P. falciparum* (67). La mesure du pH de l'eau d'Evian étudiée sur un échantillon de 9 bouteilles avec un pH mètre utilisé pour les gaz du sang nous a donné une moyenne de 7,280 tableau II. La conservation de la bouteille ouverte pour la coloration de frottis a été d'au moins 3 mois. D'autres eaux minérales nous ont donné également des résultats satisfaisants lors de quelques essais qui figurent dans le tableau I. Le coût de l'eau minérale est inférieur à celui de l'eau distillée tamponnée.

Tableau I : Étude de 4 eaux minérales ayant un pH entre 7 et 7,4 pour coloration.

EAU MINÉRALE N° LOT		EVIAN B01: 48	VOLVIC 50128	THONON L 31801100	TERRES DE FLEIN
Caractéristiques fournies	pH	7,2	7	7,4	7,2
	Bicarbonate	357 mg/l	65,3 mg/l	350 mg/l	333 mg/l
	Résidu sec	309 mg/l	109 mg/l	342 mg/l	370 mg/l
PH mesuré (1)		7,251	7,133	7,461	7,188
Osmolarité (2)		16	10	14	19

Tableau II : caractéristiques fournies et mesurées d'eaux minérales d'un pH 7 à 7,4.

CONTENANCE	NUMÉRO DU LOT	PH
0,5 litre	B 01 : 48	7,232
0,5 litre	B 01 : 48	7,27
0,5 litre	B 01 : 48	7,251
0,5 litre	B 01 : 48	7,235
0,5 litre	B 17 : 17	7,224
2 litres	F 07 : 06	7,271
2 litres	F 15 : 10	7,523
2 litres	F 14 : 16	7,246
2 litres	B 14 : 16	7,271
MOYENNE		7,280

- 1) Mesuré à 37 ° dès l'ouverture de la bouteille, sur auto analyseur gaz du sang I.L. B GE.
- 2) Mesuré à l'ouverture d'une bouteille sur osmomètre FISKE modèle 03

TECHNIQUE DU MAY-GRÜNWARD-GIEMSA

Les frottis ne présentent pas de coloration nette après le seul May-Grünwald lavé abondamment à l'eau : les hématies sont orangé-beige alors qu'elles sont naturellement de couleur orange et une imprégnation non visible par le bleu de méthylène se produit qui joue un rôle dans le résultat final de la coloration :

- recouvrir le frottis de May-Grünwald (*) et laisser agir 3 minutes.
- laver rapidement à l'eau tamponnée.
- recouvrir d'une solution de Giemsa dilué à 3 % en eau tamponnée ou en eau minérale à pH d'environ 7,2 et laisser agir 15 minutes. Cette solution de Giemsa est à préparer extemporanément pendant la fixation.
- laver à l'eau courante du robinet. Bien nettoyer l'envers de la lame.
- sécher à l'air, loin de toute source de chaleur. Ne pas souffler dessus.

PRÉCAUTIONS :

Le May-Grünwald-Giemsa est une coloration facile à réussir, à certaines conditions :

Il faut recouvrir entièrement la lame par le May-Grünwald, il faut en mettre suffisamment pour éviter des dépôts survenant par l'évaporation rapide de cette solution alcoolique. Pour cela quand on colore la lame horizontalement le liquide doit être bombé.

– Ne pas laisser sécher les colorants. l'alcool méthylique ou le May-Grünwald s'évaporent rapidement, surtout quand il fait chaud. Des précipités de colorant surviennent alors sur le frottis, particulièrement gênants pour la recherche de *Plasmodium*. Il convient donc de surveiller de près ce temps et éventuellement de le raccourcir en passant au 3^e temps, coloration au Giemsa, sans attendre la fin des 3 minutes si l'on voit le May-Grünwald ne plus bien recouvrir la lame.

Si les colorants ont laissé un précipité : laver à l'eau. Laisser sécher. Décolorer complètement la lame avec de l'alcool méthylique ou de l'alcool éthylique à 95 %. Colorer au Giemsa (3^e temps).

– Bien vérifier la solution de Giemsa qui doit être préparée extemporanément. Si l'on met trop de Giemsa, certaines solutions précipitent. Si l'on secoue trop la solution il se produit aussi un précipité.

VARIANTES DE LA COLORATION MAY-GRÜN WALD-GIEMSA

Il existe plusieurs variantes de la coloration May-Grünwald-Giemsa, variantes qui donnent de bons résultats immédiats.

Méthode rapide (10-12 minutes)

– Recouvrir le frottis de May-Grünwald. Laisser agir 30 secondes environ pendant ce temps préparer 10 ml, pour un frottis, d'une solution de Giemsa à 5 % en eau tamponnée ou eau minérale à pH d'environ 7,2 et la verser aussitôt en excès sur le frottis, ce qui élimine la majeure partie du May-Grünwald.

– laisser agir 10 minutes.

– rincer à l'eau du robinet.

– sécher

Cette méthode rapide est à utiliser en particulier quand une recherche d'hématozoaire est demandée en urgence.

TECHNIQUE DU GIEMSA (7)

La coloration au Giemsa seul est souvent employée, en particulier dans les pays anglo-saxons.

Fixer le frottis par de l'alcool méthylique ou éthylique 3 secondes. Cela peut être fait soit en immergeant le frottis dans l'alcool méthylique ou en le recouvrant d'alcool avec une pipette puis rejeter l'excès. Sécher.

Pendant la fixation préparer la solution aqueuse de Giemsa à 5 %

– Colorant de Giemsa 0,5 ml

– Eau tamponnée pH 7,2 10 ml

Après avoir mélangé, recouvrir entièrement la lame par la solution de colorant, en mettre suffisamment pour éviter les dépôts sur la préparation.

– laisser agir pendant 20 à 30 minutes.

– laver à l'eau du robinet, faire sécher la lame à la verticale.

TECHNIQUE DU WRIGHT

Ce colorant est utilisé aux U.S.A. il est voisin du Giemsa.

– Wright en poudre	0,3 gm
– Glycérine	3 ml
– Alcool méthylique	97 ml

Recouvrir le frottis de colorant, attendre 1 minute. Ajouter la même quantité d'eau tamponnée pH 7. Mélanger délicatement. Laisser agir 15 minutes pour la recherche d'hématozoaires. Laver. Sécher. Plus de détails précis sont vus sur les frottis colorés avec le Giemsa (36).

■ GOUTTE ÉPAISSE

TECHNIQUE DE LA GOUTTE ÉPAISSE = G.E.

La goutte épaisse a été mise au point par Ross en 1903 sur les constatations suivantes : les parasites adhèrent au stroma de l'hématie et un frottis épais de sang est opacifié par l'hémoglobine et non pas les stromas. Or il est aisé de chasser l'hémoglobine tout en conservant les stromas.

La disparition, de la morphologie des hématies, des granulations de Schüffner ou des taches de Maurer et les modifications de formes des parasites font que le diagnostic d'espèce plasmodiale est plus difficile que sur un frottis : « il est nécessaire que l'étudiant se familiarise lui-même avec l'aspect des parasites dans ce type de préparation » (69), c'est une méthode simple et excellente de concentration des parasites sanguins, du moins pour des techniciens entraînés. Elle nécessite, en effet, quelques petits tours de main que ne possèdent pas les laborantin(e)s qui la pratiquent rarement. Aussi conseillons-nous aux techniciens qui n'ont pas l'occasion de la pratiquer couramment de lui préférer le frottis, ou, au minimum, de toujours lui adjoindre un frottis (voir page 64).

Technique d'origine

La technique de la goutte épaisse décrite par Ronald Ross en 1903, est la suivante :

« Une large goutte de sang d'environ 20 mm³, placée sur une lame de verre est étalée au moyen d'une aiguille ou d'une lancette sur une surface qui peut être couverte par une lamelle d'origine ordinaire. Elle est alors séchée. Le résultat est que nous avons un film épais de sang d'environ 20 mm³ (au lieu de 1 mm³ généralement utilisé) sur une surface qui n'est pas plus large que celle utilisée dans les méthodes habituelles. Dès que cette préparation est parfaitement sèche, mettre dessus une solution aqueuse d'éosine en quantité suffisante pour la couvrir (solution habituelle employée dans la méthode de Romanowsky) pendant un quart d'heure. Comme la préparation n'a pas été fixée, la solution d'éosine va chasser l'hémoglobine des éléments secs et en même temps colorer le stroma des leucocytes, plaquettes et parasites. Après que cette solution ait été enlevée, laver doucement la préparation à l'eau courante. Colorer alors par une solution au bleu de méthylène (employée habituellement comme pour le Romanowsky). Laver délicatement, sécher, examiner à l'immersion. »

SANG CAPILLAIRE

Prélever une assez grosse goutte de sang au 4^e doigt de la main gauche avec la face inférieure d'une lame, en la déposant au milieu de celle-ci.

SANG VEINEUX

Le sang recueilli sur anticoagulant donne souvent de mauvaises gouttes épaisses :

– mauvaise adhérence : la G.E. se décolle à la coloration. Il faut laisser sécher la préparation pendant un un temps prolongé ou la sécher à 37 °C pendant 1 à 2 heures, ou par un autre procédé.

– mauvaise déshémoglobination : il reste une grande partie du stroma des hématies qui se colore et qui gêne ainsi la lecture.

– **Défibriner** : pour cela, avec la pointe d'un vaccinostyle (ou mieux avec le coin d'une autre lame), posé au milieu de la goutte, on tourne régulièrement tout en étalant de façon homogène le sang, en grattant un peu la surface de verre pour favoriser l'adhérence, pendant une à deux minutes. On s'arrête avant que le sang ne commence à sécher afin d'obtenir un disque d'épaisseur uniforme de 1 à 1,5 cm de diamètre (selon la grosseur de la goutte de sang initiale).

– Laisser sécher à plat à l'abri de la poussière et des mouches (sous un couvercle de boîte de Pétri par exemple) 24 heures environ ou à l'étuve à 37 °C, une heure au moins. L'épaisseur d'une goutte épaisse est satisfaisante quand on peut juste lire un texte imprimé au travers.

NE PAS FIXER, NI À LA CHALEUR, NI À L'ALCOOL.

DÉSHÉMOGLOBINISATION

Lavage, Séchage

Laver prudemment la lame à l'eau du robinet, sans décoller la G.E. Laisser sécher à l'air, loin de toute source de chaleur.

Conservation des gouttes épaisses avant coloration

On ne doit pas conserver les gouttes épaisses non déshémoglobinisées.

En pays tropicaux, il faut les hémolyser puis les colorer au plus tard dans les 24 à 48 heures, car après le sang se laque et la G.E. devient inutilisable.

En pays tempéré, on peut les garder une semaine environ, car plus le temps passe plus l'hémolyse est difficile.

COLORATION DE LA GOUTTE ÉPAISSE

Il y a deux techniques de coloration des gouttes épaisses selon qu'on recherche ou non des microfilaires : nous ne nous occupons ici que des parasites autres que les microfilaires.

1^{er} temps : déshémoglobination en hémolysant les hématies,

soit avec de l'eau distillée tamponnée,

soit avec de l'eau du robinet

soit avec la solution : Eau tamponnée 5 ml

Colorant de Giemsa 1 goutte

On laisse agir jusqu'à ce que la G.E. devienne blanchâtre et transparente, ce qui demande **3 à 10 minutes** selon l'épaisseur et l'âge de la G.E. Mais il **ne faut pas laisser trop longtemps** les lames dans l'eau après l'hémolyse totale car les noyaux des leucocytes se lyseraient et gêneraient la lecture.

On peut, pour cette hémolyse, adopter plusieurs techniques :

- sur portoir, G.E. vers le haut : recouvrir abondamment la lame avec le liquide d'hémolyse. Changer au moins une fois ce liquide.
- sur portoir, en boîte de Pétri, G.E. vers le bas : l'hémoglobine libérée tombe directement dans le fond et non sur la G.E. (meilleure méthode).
- en tube de Borrel, dans un verre ou un cristalliseur, la lame étant verticale.

2^e temps : Coloration au Giemsa

- préparer une solution de Giemsa à 3 % en eau tamponnée ou en eau minérale pH 7-7,4 (eau d'EVIAN)
- sortir la G.E. de l'eau, égoutter, verser sur toute la lame la solution de Giemsa et laisser colorer 20 minutes au moins.

3^e temps : Laver prudemment la lame sous un mince filet d'eau du robinet, afin de ne pas décoller la G.E.

Laisser sécher à l'air, loin de toute source de chaleur.

RÉSULTATS DE LA COLORATION

ASPECT MACROSCOPIQUE : disque coloré en bleu au centre où la G.E. est plus épaisse et en rose à la périphérie.

ASPECT MICROSCOPIQUE : fond incolore ou rose pâle constitué par le stroma des hématies. Sur ce fond clair se détachent des éléments de 5 à 10 µm, violet bleu, qui sont les noyaux des leucocytes. Si ces noyaux n'ont pas été lysés par un séjour trop prolongé dans l'eau, on peut très bien reconnaître à quelles cellules ils appartiennent.

La préparation diffère du frottis habituel sur deux points :

- 1) elle ne contient pas d'hémoglobine
- 2) la quantité de sang 4 fois plus grande que celle utilisée dans un frottis mince, couvre une surface 5 fois moindre que celle habituelle d'un frottis. Il s'ensuit que nous trouverons 20 fois plus de parasites dans chaque champ que ceux trouvés sur un frottis. Cela veut dire 20 fois plus de chance diagnostique qu'un frottis ordinaire.

ASSOCIATION DE LA GOUTTE ÉPAISSE ET DU FROTTIS SUR UNE SEULE LAME

Cette association est utile dans les études épidémiologiques.

TECHNIQUE : recueillir au centre de la lame une petite goutte de sang et faire le frottis. Bien sécher par agitation. Recueillir ensuite une grosse goutte de sang au centre de la partie inoccupée de la lame et faire une G.E. Laisser sécher à plat.

MARQUER LE NOM DU MALADE AINSI QUE LA DATE SUR LE TALON DU FROTTIS avec un crayon ordinaire ou avec de l'encre ordinaire (pas de crayon à bille car l'encre de ces crayons se dissout dans l'alcool des colorants) ou au diamant.

COLORATION

Fixer d'abord le frottis : tenir la lame légèrement inclinée sur une cuvette, la G.E. vers le haut. Verser, avec une pipette, de l'alcool méthylique sur le frottis. Laisser sécher.

Hémolyser la G.E. en plongeant la lame dans un Borrel contenant juste assez d'eau pour recouvrir la G.E. et non le frottis. Laisser sécher. Colorer la lame entière avec la solution de Giemsa.

■ CYTO-CONCENTRATION DES PARASITES SANGUINS

Cette technique basée sur l'emploi d'une cyto-centrifugeuse, appareil très répandu dans les laboratoires de biologie médicale, permet après la lyse des globules rouges et des plaquettes par une solution à base de saponine de centrifuger et concentrer sur une faible surface de 28 mm² et de 6 mm de diamètre les parasites sanguins ainsi que les leucocytes contenus dans 100 à 500 µl de sang. Cette technique est efficace pour la concentration de parasites sanguins résistants à l'hémolyse par la saponine : microfilaires, leishmanies intra et extra-cellulaires. Les trophozoïtes âgés, schizontes et gamétocytes de *Plasmodium* sp. p. sont très bien concentrés, les jeunes trophozoïtes le sont moins.

Prélèvement : sang veineux sur E.D.T.A. ou citrate de soude.

Matériel : Cyto-centrifugeuse

La Cytospin® (Shandon) de 2^e ou 3^e génération donne de très bons résultats. La Cyto-Tek® (Miles Bayer) peut également être employée, mais nécessite une centrifugation préalable de 10 minutes pour obtenir un culot de cellules, et une seconde centrifugation après hémolyse. Le cytoplasme des leucocytes est alors moins bien conservé. Quant à la Cyto-centrifugeuse Hettich®, elle nécessite deux centrifugations et la morphologie des éléments est souvent altérée.

Accessoires : Des Cytofunnel® sample chambers, avec une carte filtrante attachée (n° 5991040). Une carte filtrante blanche épaisse supplémentaire est ajoutée (n° 1900S). L'assemblage avec la lame porte-objet est tenu en position par un clip en acier : Cytoclip Shandon®.

Réactifs

- Saponine S 7.900 Sigma® de *Saponaria* ou Quillaja bark contenant environ 10 % de sapogénine donnent des résultats équivalents. La saponine produit d'origine végétale peut montrer des différences d'activité selon le lot utilisé, aussi chaque fois qu'est mis en route un nouveau lot, son efficacité doit être vérifiée sur un sang normal.
- Formaldéhyde à 37 % 5 formol du commerce (fixateur).
- Ethylmercurithiosalicylic de sodium (Prolabo®) = merthiolate (fixateur).
- Tween 20 (Prolabo®) agent mouillant.

Solution hémolysante

Dans un flacon de 100 ml, mettre 30 à 40 ml de solution de ClNa à 9 p. mille à laquelle on ajoute 0,4 g de saponine, 1,5 ml de formol tamponné, 0,1 g de merthiolate et 0,1 ml de Tween 20. Mélanger. Compléter à 100 ml avec du ClNa à 9 p. mille Filtrer la solution à travers un filtre Millipore® de porosité 0,22 µm afin d'éliminer les levures et bactéries souvent présentes dans la saponine.

TECHNIQUE

Placer une lame porte objet propre dans chacun des deux cyto-clips de la cytospin Shandon®. Y ajouter une carte filtrante blanche épaisse et un cytofunnel. Les placer dans la cytospin.

Un millilitre de la solution hémolysante et 500 µl de sang bien homogénéisé sont alors introduits dans un petit tube. Ils sont mélangés et agités doucement jusqu'à hémolyse complète ce qui demande en général moins d'une minute.

Dès que l'hémolyse est complète 300 µl du mélange est transféré avec une pipette automatique dans chacun des 2 cytofunnels.

Centrifuger immédiatement 12 minutes à 2 000 tours/minute (447 xg) avec l'accélération maximum.

Pour éviter que l'hémolyse n'atteigne les éléments parasitaires il est indispensable d'effectuer les manœuvres avec la rapidité indiquée.

Afin d'obtenir une concentration optimale de leucocytes sur la lame il est nécessaire d'adapter le volume de sang hémolysé au nombre de globules blancs/µl, en particulier dans le cas de leishmaniose avec leucopénie.

Tableau III : Quantité du mélange à centrifuger après hémolyse en fonction du nombre de globules blancs.

Leucocytes/µl	Quantité de sang hémolysé à centrifuger
1 000 – 3 000	400 – 500 µl
3 000 – 4 000	350 µl
5 000 – 6 000	300 µl
9 000 – 12 000	200 µl
> 12 000	150 µl

Il y a de rares cas où l'hémolyse ne se produit pas. Dans notre expérience cela s'est produit dans des cas d'urémie élevée ou d'hémoglobinopathie.

Dans ce dernier cas l'électrophorèse d'hémoglobine et/ou l'examen du frottis de sang coloré du malade permet le diagnostic de drépanocytose ou de thalassémie.

Coloration des cyto-concentrations

Le sédiment obtenu est blanc et peut être immédiatement coloré pendant 30 minutes par le Giemsa dilué après fixation par le méthanol ou 5 minutes par le May Grünwald.

PARASITES ET CELLULES OBSERVÉS

Trois groupes de parasites se concentrent plus efficacement que par la goutte épaisse et conservent bien leur morphologie :

LEISHMANIA INFANTUM

La leishmaniose viscérale du bassin méditerranéen survient assez souvent dans le SIDA.

La cyto-concentration est très efficace pour déceler alors les leishmanies, dans des monocytes et des polynucléaires neutrophiles ce qui est rarement observé par les autres méthodes. Elle est également efficace dans la leishmaniose viscérale infantile en dehors du SIDA, mais moins que dans le cas de SIDA.

MICROFILAIRES

Les espèces de microfilaires sanguicoles sont très bien concentrées et conservent une morphologie parfaite.

PLASMODIUM SP. P.

Les formes asexuées et sexuées de *Plasmodium sp. p.* sont bien concentrées. Les trophozoïtes de *Plasmodium falciparum*, particulièrement légers à la sédimentation, le sont parfois moins. Ils sont également très fragiles à l'hémolyse d'où la nécessité de centrifuger dès que l'hémolyse est obtenue. Pour les photos correspondantes se rapporter à ces parasites.

■ NETTOYAGE DES FROTTIS ET GOUTTES ÉPAISSES

LE XYLÈNE (ET LE TOLUÈNE)

International Programme on Chemical Safety, OMS, Genève, 1997

(Xylène, environmental health criteria 190, O.M.S., 1997)

Etude d'après « Environmental health criteria 190 », le xylène (et le toluène) continue à être employé avec précaution, quantités limitées, récipients fermés, aération, hotte, etc. dans les laboratoires d'hématologie et d'anatomo-pathologie.

« Après exposition par la voie respiratoire, la dose inhalée est retenue à 60 % environ dans les poumons. La métabolisation est efficace puisque le xylène est transformé à 90 % en acide méthylhippurique, lequel est ensuite excrété dans les urines. Le xylène ne s'accumule pas en quantité importante dans l'organisme humain.

Chez l'homme, une exposition **aiguë** à du xylène sous forte concentration peut avoir des effets sur le système nerveux central et provoquer une irritation. Ces effets n'ont toutefois pas donné lieu à des études contrôlées ni à des études épidémiologiques à long terme. Chez les animaux de laboratoire, la toxicité chronique se révèle faible. »

« Le xylène ne s'est révélé ni mutagène ni cancérigène. »

■ CONSERVATION DES FROTTIS ET GOUTTES ÉPAISSES

La conservation de ces préparations colorées au May-Grünwald-Giemsa, ou au Giemsa est pratiquement indéfinie.

Nous possédons de nombreuses préparations provenant de la collection d'Emile Brumpt, qui ont maintenant près d'un siècle, et qui sont toujours de bonne qualité, comme celles de la mission du Bourg de Bozas, de la mer Rouge à l'Atlantique, janvier 1901 à mai 1903 (photo n° 1).

Il est à souligner que cette conservation d'un siècle concerne des frottis

- colorés avec des réactifs comme le May-Grünwald-Giemsa,
- examinés avec de l'huile de cèdre pour l'étude à l'immersion,
- nettoyés avec du toluène.

Il convient d'être toujours prudent avec les nouveaux produits. En 2000 plusieurs laboratoires nous ont signalé que des frottis que nous avons envoyés n'étaient pas « beaux » ou « illisibles » ou expliquaient une erreur de diagnostic par la mauvaise qualité du frottis.

L'envoi de mai 2000 contenait un frottis de *P. malariae*. Une lettre nous est parvenue avec les remarques suivantes : « Concernant le frottis sanguin envoyé sous le nom de MBOH, la réponse attendue était : *Plasmodium malariae*. Nous contestons cette réponse concernant la lame que nous avons reçue et que vous trouverez ci-jointe. Vous constaterez qu'elle est de très mauvaise qualité pour un diagnostic d'espèce. » Effectivement la qualité du frottis renvoyé ne correspondait absolument pas à celui que nous avons envoyé. Cela ne s'était jamais produit en 23 ans d'envois de 270 000 frottis au total.

Nous avons alors effectué une longue et minutieuse enquête qui nous a permis de constater qu'un frottis de sang coloré au May-Grünwald-Giemsa, recouvert par une nouvelle huile à immersion (à base de polyesterpolyol, de diphénylcrésulphosphate et de tricyclodécandiméthanol) d'indice N1,518 (DIN 58884, INR 360.737 ISO 8036/1), s'altérait progressivement pour devenir illisible après 3 jours (photos n° 2, 3, 4, 5). Nous en avons informé la société qui procurait l'huile à immersion INR 360.737 : elle l'a immédiatement et très obligeamment retirée du circuit commercial. Les photos montrent la détérioration des leucocytes, plaquettes et *P. malariae* après la présence pendant 3 jours de l'huile à immersion INR 360.737. Laisser une lame recouverte d'huile à immersion arrive assez fréquemment, en particulier quand le frottis sanguin pose un problème diagnostic, que l'on veut donc le vérifier où le montrer à d'autres spécialistes. L'huile à immersion essuyée soigneusement du frottis provoquait néanmoins les mêmes altérations mais plus lentement. Il est donc préférable de nettoyer les lames ayant reçu de l'huile à immersion en les plongeant dans du toluène ou du xylène.

Il est également à noter qu'une huile à immersion époxy résine (64) a provoqué une dermatite de contact chez une technicienne de laboratoire.

Les détériorations = rayures éventuelles peuvent provenir du nettoyage des frottis surtout quand celui-ci est effectué à sec (voir page précédente).

Bibliographie

62. EHRLICH P. *Arch. Mikr. Anat.*, 1877, **13**, 263.
63. JENNER L. *Lancet*, 1899, **1**, 370.
64. LE COZ C., GOOSSENS A. Contact dermatitis from an immersion oil for microscopy. *New Engl. J. Med.*, 1998, **339**, 406-407.
65. MAY R., GRÜNWARD L. *Centralbl. Inn. Med.*, 1902, **23**, 265.
66. PETITHORY J.C., ARDOIN F.G., ASH L.R. A rapid and easy method of diluting Giemsa stain for use in staining blood smears for the diagnosis of malaria and other blood parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001, **63**, sup. 3 .
67. ROMANOWSKY D. *St Petersburg Med. Woch.*, 1891, **16**, 297 et **16**, 307.
68. ROSS R. An improved method for the microscopical diagnosis of intermittent fever. *Lancet*, 1903, **1**, 86.
69. SÖRENSEN S.P.L. Enzymstudien. *Biochem Z.*, 1909, **21**, 131-170.

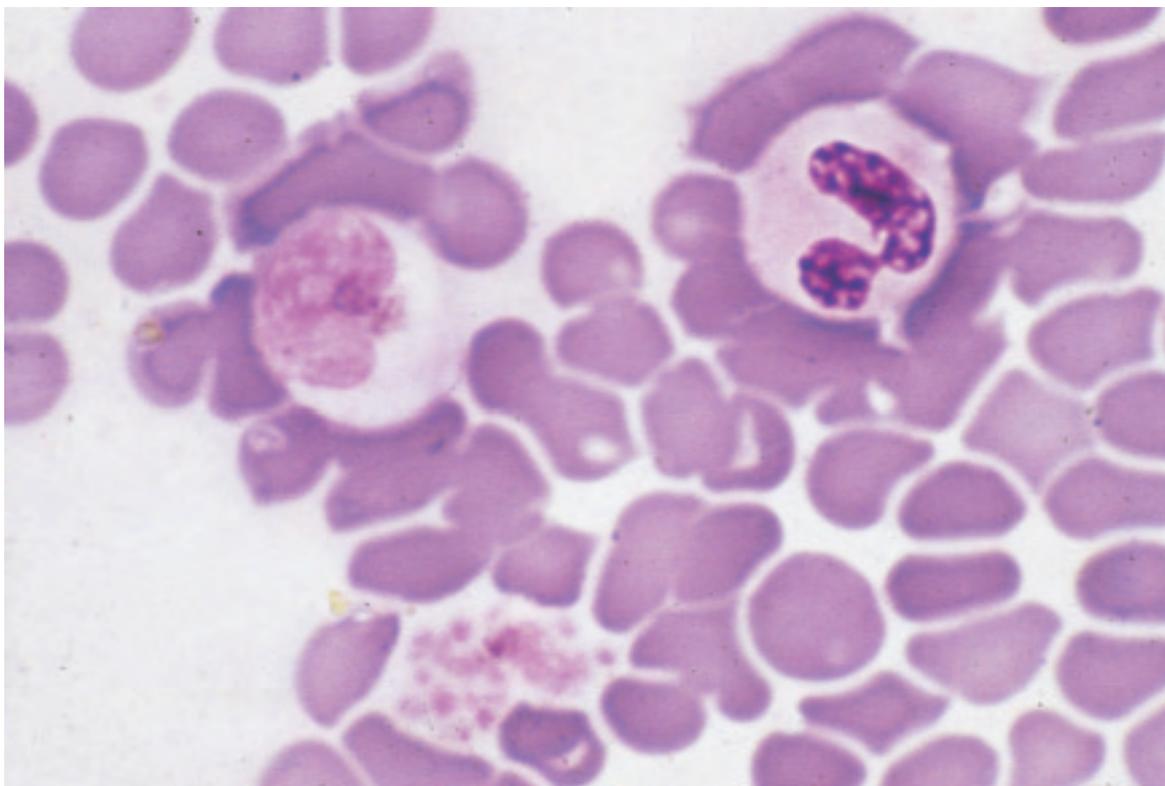


Photo n° 1 : Frottis sanguin fait par Emile Brumpt en septembre 1902, chez un membre de la tribu Madi, au Congo. Coloration Romanovsky.

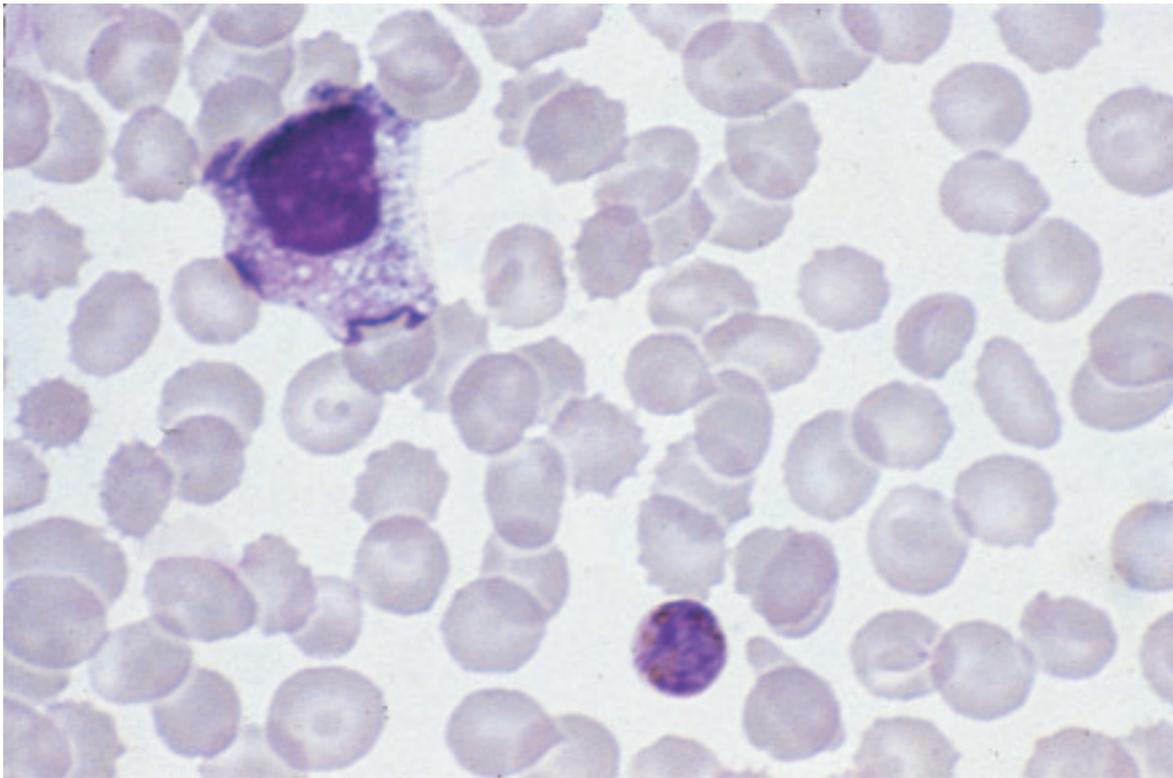


Photo n° 2 : Contenant un monocyte et un schizonte à quatre noyaux de Plasmodium malariae, au moment de l'application de l'huile à immersion INR 360.737.

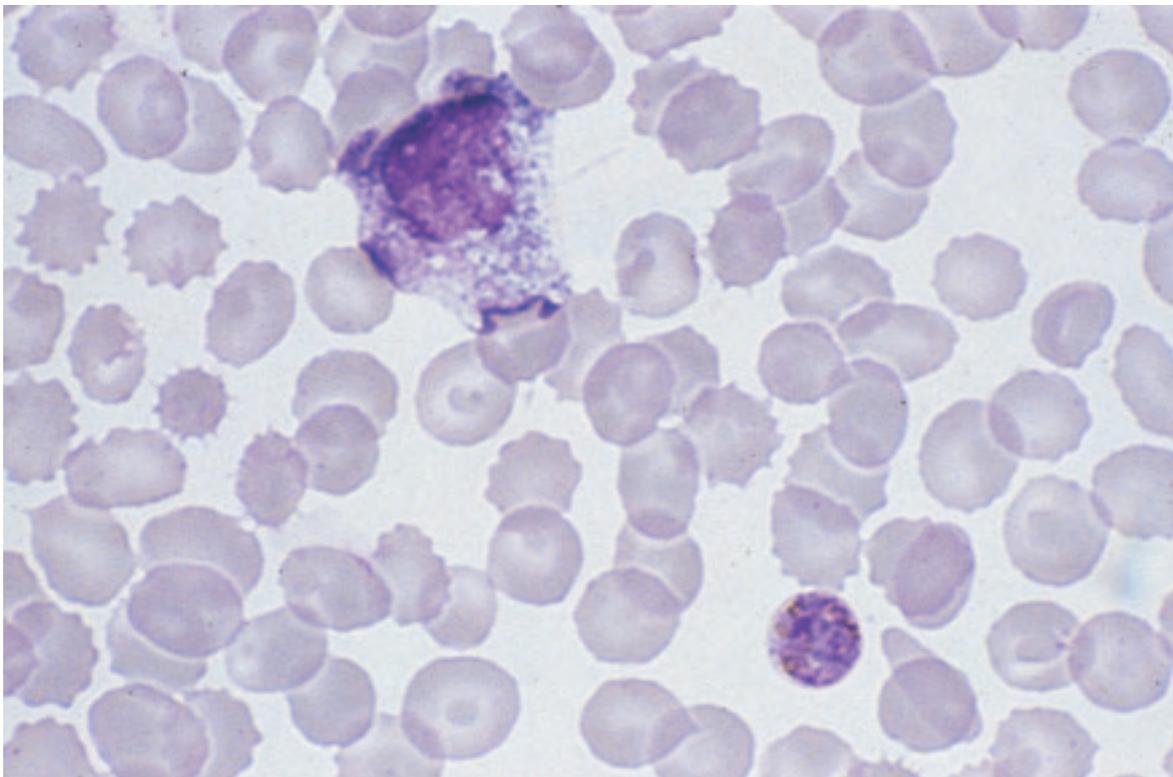
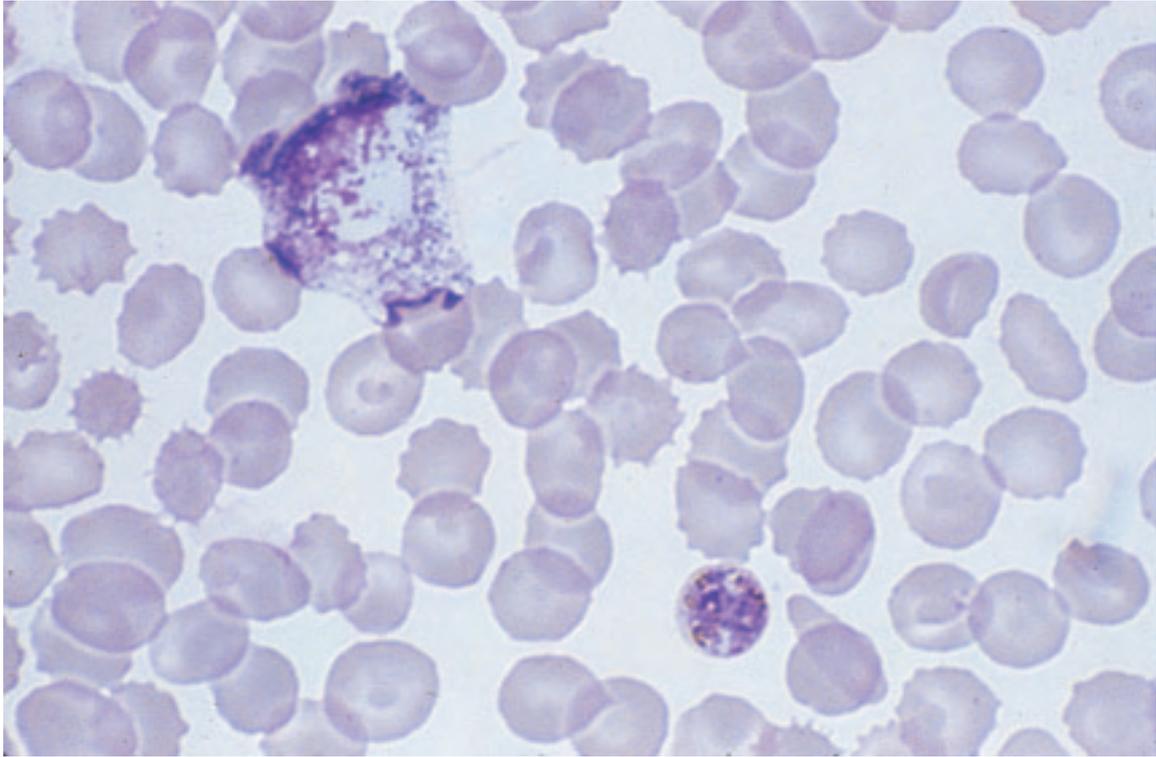
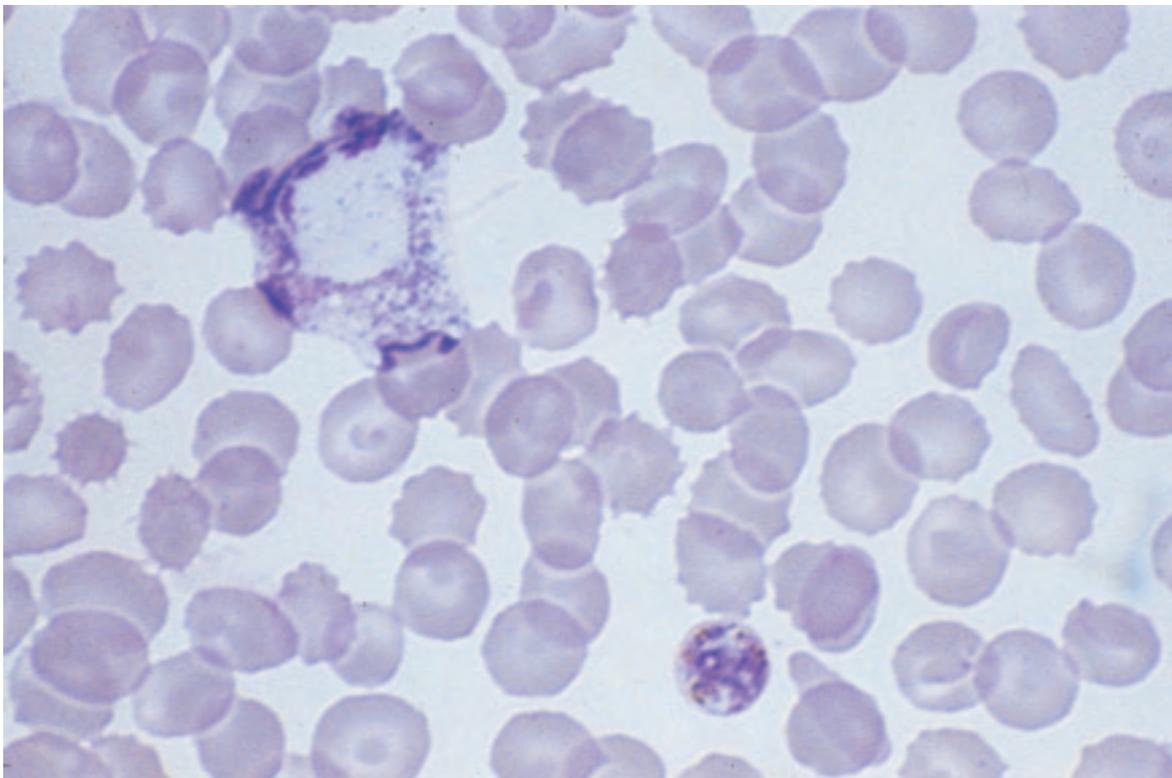


Photo n° 3 : Prise un jour après, sans avoir enlevé l'huile à immersion. Les éléments nucléés s'éclaircissent.



*Photo n° 4 : Prise 2 jours après, sans avoir enlevé l'huile à immersion.
Les noyaux s'éclaircissent considérablement.*



*Photo n° 5 : Prise 3 jours après, sans avoir enlevé l'huile à immersion.
Les noyaux du monocyte et du schizonte de *P. malariae* ont disparu*

III

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DU PALUDISME

	pages
– Introduction et Nomenclature	45
– Épidémiologie du paludisme	47
• Cycle des plasmodiums	47
• Rechutes et récurrences	52
• Épidémiologie du paludisme en France	53
• Épidémiologie mondiale du paludisme	57
– Techniques	
• Prélèvements	59
• Numération des <i>Plasmodium</i>	60
• Colorations	61
– Goutte épaisse – Comparaison avec le frottis mince	65
– Diagnostic microscopique des <i>Plasmodium</i>	
– <i>Plasmodium falciparum</i> . Accès graves – variétés	67
– <i>Plasmodium vivax</i>	106
– <i>Plasmodium ovale</i>	123
– <i>Plasmodium malariae</i>	138
– Diagnostic différentiel des quatre <i>Plasmodium</i>	152
– Polyinfestations	162
– Manifestations cliniques et biologie	
• Accès palustre	165
• Accès pernicieux ou grave	165
• Fièvre bilieuse hémoglobinurique	165
– Culture de <i>Plasmodium sp.</i>	166
– Modifications biologiques	
• Cytologie sanguine	168
• Paludisme et anomalies génétiques des globules rouges	168
• Leucocytes et leucocytes mélanifères	172
• Thrombocytes	172
• Automates de formules leucocytaires et diagnostic biologique du paludisme	178
• Biochimie : hypoglycémie, hypocalcémie, protéines, cryoglobulines, paramètres rénaux	178
– Immunologie	
• Diagnostic sérologique	180
• Paludisme hyperimmun (maladie de Charmot, Tropical Splenomegaly Syndrome)	181
• Immunité	182
• Paludisme et Sida	182
Bibliographie du paludisme	183

■ INTRODUCTION ET TERMINOLOGIE

Le paludisme est dû à un protozoaire du genre *Plasmodium* et occupe la première place des maladies infectieuses sur le plan mondial. En Afrique, on estime à l'heure actuelle à 200 millions le nombre de malades et à un million le nombre de nourrissons qui en meurent chaque année. Les formes graves de paludisme sont presque toujours dues à *P. falciparum*. Pour l'ensemble du monde les estimations atteignent 500 millions de malades et 2,7 millions de morts annuels.

Malgré un certain nombre de succès dans la lutte contre cette maladie qui ont permis son éradication dans différentes régions, principalement en Europe, le paludisme persiste dans de nombreux pays. Le nombre de cas est même en augmentation par exemple en Turquie où il est ainsi passé de 1 000 en 1970 à 115 000 en 1977 et en Inde de 50 000 en 1965 à 5 000 000 en 1975. Cette situation est due à l'apparition de la résistance des moustiques aux insecticides D.D.T. et à la résistance de *P. falciparum* aux amino-4-quinoléines dans de nombreux pays d'Asie, d'Amérique du Sud et d'Afrique.

Le diagnostic biologique du paludisme se fait toujours par la mise en évidence microscopique du parasite dans le sang.

Bruce-Chwatt a récemment écrit :

« Quoique différentes méthodes, allant de la centrifugation haute vitesse en gradient de densité, en passant par l'emploi d'anticorps monoclonaux aux techniques de séparation magnétique ou aux sondes D.N.A., ont été essayées pour déceler les faibles parasitémies, il apparaît que pour la routine clinique et les études épidémiologiques le frottis mince et la goutte épaisse examinés par un microscopiste compétent demeurent irremplaçable, tenant compte de la durée de travail pour réaliser ces méthodes récentes, de leur prix de revient en réactifs et de la formation nécessaire du personnel » (souvent nombreux pour assurer les gardes dans les hôpitaux). Nous partageons totalement cette opinion. Ainsi dans une étude faite chez 7 volontaires inoculés par des sporozoïtes de *P. falciparum* et ayant développé un paludisme, la parasitémie fut trouvée chez tous les malades dans des gouttes épaisses faites 9 à 13 jours après l'inoculation, par culture après 7 jours, et il n'y eut que 5 à 28 % de recherches positives lors de l'utilisation de quatre sondes différentes (72). Une évolution de la méthodologie microscopique vers les méthodologies de biologie moléculaire, n'est en cours, et cela seulement pour les pays développés, que pour le diagnostic d'une espèce, *P. falciparum*, par l'automatisation d'une de ces méthodes ou l'utilisation de bandelettes diagnostiques.

Le diagnostic microscopique du paludisme nécessite une connaissance des caractères des quatre espèces.

Le premier élément à considérer est la morphologie des hématies parasitées, c'est un élément très important, il a d'ailleurs été à la base de la découverte de l'espèce *Plasmodium ovale*, mais deux réserves sont à faire à ce sujet :

- cette morphologie de l'hématie disparaît en goutte épaisse,
- les hématies subissent lors de la confection des frottis des déformations multiples que l'on a constaté dans tous les frottis normaux et surtout dans les anémies d'origines diverses. Par exemple il peut toujours y avoir quelques hématies allongées, plus ou moins ovales et, crénelées, on peut trouver aussi dans des anémies non palustres, des microcytes, des macrocytes, des réticulocytes. Cela explique que l'on peut voir de rares hématies ovales parasitées par *P. vivax*, de rares réticulocytes parasités par *P. falciparum*...

Pour porter un diagnostic d'espèce de Plasmodium il faut donc étudier plusieurs hématies parasitées, plusieurs dizaines dans la mesure du possible.

Le deuxième élément correspond aux granulations, taches, ponctuations internes dans ces hématies qui ont une très grande importance pour le diagnostic, à condition que le frottis soit coloré au M.G.G. en employant une eau de pH 7-7,4, une eau minérale avec ce pH en particulier. Les granulations de Schüffner sont caractéristiques de *P. vivax* et *P. ovale*.

Les taches de Maurer sont caractéristiques de *P. falciparum*.

Le diagnostic d'accès pernicieux dû à *Plasmodium falciparum* est une grande urgence médicale.

L'immunologie joue un rôle secondaire et est réservée à des cas précis que nous envisagerons.

■ NOMENCLATURE DES ESPÈCES PARASITES DE L'HOMME

NOMENCLATURE

Les dénominations des quatre espèces plasmodiales sont :

- *Plasmodium falciparum* Welch, 1897
- *Plasmodium vivax* Grassi et Feletti, 1890 (71)
- *Plasmodium malariae* Laveran, 1881 (73)
- *Plasmodium ovale* Stephens, 1922 (74)

N.B. : La première espèce observée par A. Laveran était *P. falciparum* (gamétocyte), la deuxième *P. vivax* (exflagellation) voir page 13 et suivantes.

■ ÉPIDÉMIOLOGIE DU PALUDISME

L'épidémiologie du paludisme comprend de nombreuses données importantes à connaître pour le diagnostic biologique et qui peuvent être fournies par le médecin traitant ou le malade.

Le paludisme est éradiqué en France depuis près d'un demi-siècle mais de très nombreux cas sont importés de zones d'endémie. Des modalités particulières de transmission sont à l'origine de contaminations métropolitaines multiples :

- par des anophèles porteurs, importés (aéroports, bagages, ports...).
- par le sang (paludisme transfusionnel, nosocomial, des toxicomanes, congénital...).

Le médecin traitant devant un accès fébrile n'évoque pas toujours le diagnostic de paludisme, surtout si le malade n'a pas quitté la France. Le diagnostic de cette maladie souvent mortelle peut alors être fait tardivement, ou même ne pas être porté. Le biologiste est alors l'importante voie de secours du patient lors de l'examen microscopique du sang par la découverte même en absence de la prescription de cette recherche du *Plasmodium*. L'automatisation de la formule sanguine a diminué cette chance, mais elle reste cependant importante en raison des modifications cytologiques, thrombopénie inférieure à 150 000 dans 70 % des cas (143) notamment, qui conduisent à un contrôle microscopique de ces anomalies.

La répartition géographique des espèces plasmodiales est également importante à connaître puisqu'elle permet un contrôle de la vraisemblance du diagnostic d'espèce par le biologiste.

Les modalités du cycle hépatique, avec présence d'hypnozoïtes selon l'espèce ou la durée de la persistance dans le sang des hématozoaires conditionnent le nombre d'années pendant lesquelles une rechute est possible.

Le cycle érythrocytaire est en relation avec la périodicité de l'accès fébrile, ainsi qu'avec les variations de richesse du sang en hématozoaires.

Ce sont ces différentes notions utiles au biologiste, que nous allons approfondir.

CYCLE DES *PLASMODIUM*

Le cycle des *Plasmodium sp. p.* humains se déroule successivement chez l'homme et chez le moustique, une femelle anophèle, voir schéma page 50. Il comporte deux phases :

- une phase sexuée chez le moustique et chez l'Homme (sporogonie).*
- une phase asexuée uniquement chez l'Homme (schizogonie) .*

Au cours du déroulement de ces deux phases il y a, à plusieurs stades des multiplications qui assurent la pérennité et permettent la diffusion des espèces de *Plasmodium*.

Phase sexuée = sporogonie chez l'Homme et le moustique

CHEZ L'HOMME

Gamétocytes : « Formes sexuées, mâle et femelle (micro et macrogamétoocyte respectivement), qui, hors de l'organisme de l'hôte vertébré, forment des gamètes après exflagellation =

microgamétocyte ou maturation = macrogamétocyte (144) ». Des formes en voie d'exflagellation peuvent parfois se voir dans du sang parasité surtout par *P. vivax*, en particulier lorsque le sang est conservé 24 heures avant confection des frottis. Les gamétocytes sont les formes sexuées qui se développent à l'intérieur des globules rouges à partir des mérozoïtes. Les trophozoïtes évoluant vers le cycle sexué se reconnaissent par leur forme compacte et surtout, lors de leur maturation, par la grande taille du cytoplasme, alors que la masse nucléaire reste indivise. Le terme de gamète est réservé aux formes sexuées chez l'hôte invertébré vecteur.

CHEZ LE MOUSTIQUE : les gamétocytes males et femelles puisés dans le sang humain évoluent en microgamètes (flagelles) et macrogamètes qui après union donnent naissance dans l'estomac à un ookinète mobile, puis à un oocyste où se forment un millier de sporozoïtes qui seront injectés chez l'Homme avec la salive du moustique. La durée de la sporogonie est variable selon l'espèce plasmodiale et la température (voir tableau IV page 51).

Phase asexuée chez l'Homme = schizogonie

Les sporozoïtes après avoir été injectés avec la salive du moustique se transforment avec multiplication en formes préérythrocytaires (voir page 50) aboutissant à l'invasion des globules rouges par des mérozoïtes. Dans les hématies a lieu une nouvelle multiplication aboutissant aux corps en rosace = schizonte mûr (voir page 50).

(*) Tous les éléments morphologiques étudiés ci-après le sont après coloration au May-Grünwald-Giemsa, sauf indication contraire.

MÉROZOÏTE (photos n° 39 et 121) : « Forme jeune du parasite résultant de la division des schizontes, que ceux-ci aient évolué dans des cellules fixes ou dans des hématies (144) ». Ce sont des éléments de petite taille de forme ovalaire, 1,5 à 2 µm qui pénètrent dans les globules rouges soit à la fin de la phase sexuée et après leur formation dans le foie, soit à la fin de la phase asexuée et l'éclatement des rosaces = schizontes mûrs, dans le sang. Ils sont alors rarement vus libres dans le sang, ou leur présence est très brève, la pénétration dans l'hématie durant 30 à 60 secondes.

TROPHOZOÏTE : « Au sens strict, toute forme asexuée de *Plasmodium* en voie de développement. Employé habituellement pour désigner des formes intra-globulaires à leur premier stade de développement (formes annulaires), dont la nature asexuée ou sexuée ne peut être reconnue avec certitude (144) ». Le terme de trophozoïte doit donc être réservé aux seules formes non divisées, ayant un seul noyau, qui se nourrissent abondamment (trophé = nourriture).

Le trophozoïte jeune a une forme en bague à chaton : le noyau rouge devient périphérique, tandis que le cytoplasme annulaire bleu entoure la vacuole nutritive claire, incolore. Le trophozoïte grandit et prend une forme caractéristique de l'espèce : corps amiboïde de *P. vivax* caractérisé par sa grande mobilité qui conditionne ses aspects variés comparables à une amibe en mouvement ; forme massive quadrangulaire, en bande équatoriale (en drapeau) de *P. malariae* etc...

Le trophozoïte âgé présente dans son cytoplasme des pigments dont la couleur va du brun foncé au noir, pigments fins ou grossiers selon les espèces et qui persistent dans tous les stades suivants. (Notons que les *Babesia* dont les trophozoïtes annulaires peuvent être pris pour des plasmodiums sont dépourvus de pigment).

SCHIZONTE : « Au sens strict, forme asexuée intracellulaire à tout stade de développement. Pratiquement réservé pour désigner les formes asexuées autres que les formes annulaires. On

distingue des schizontes jeunes à chromatine peu divisée et des schizontes mûrs ou adultes (= corps en rosace) (formes de segmentation) dans lesquels la différenciation des mérozoïtes est évidente (144) ». Le schizonte (schisme = division) a donc plusieurs noyaux. Le schizonte jeune a 2-4-6 masses nucléaires de grande taille dans une masse cytoplasmique indivise.

CORPS EN ROSACE = SCHIZONTE MÛR : « Aspect du parasite au stade du schizonte mûr, avec différenciation visible des mérozoïtes. Synonyme : forme de segmentation ». Lorsque les divisions sont terminées, on a un schizonte mûr ou rosace qui contient des mérozoïtes : éléments individualisés formés d'un petit noyau bien net entouré d'un cytoplasme. L'éclatement d'une rosace libère les mérozoïtes qui vont parasiter des globules sains et le cycle recommence. Le nombre de mérozoïtes dans une rosace est pratiquement fixe pour une espèce donnée.

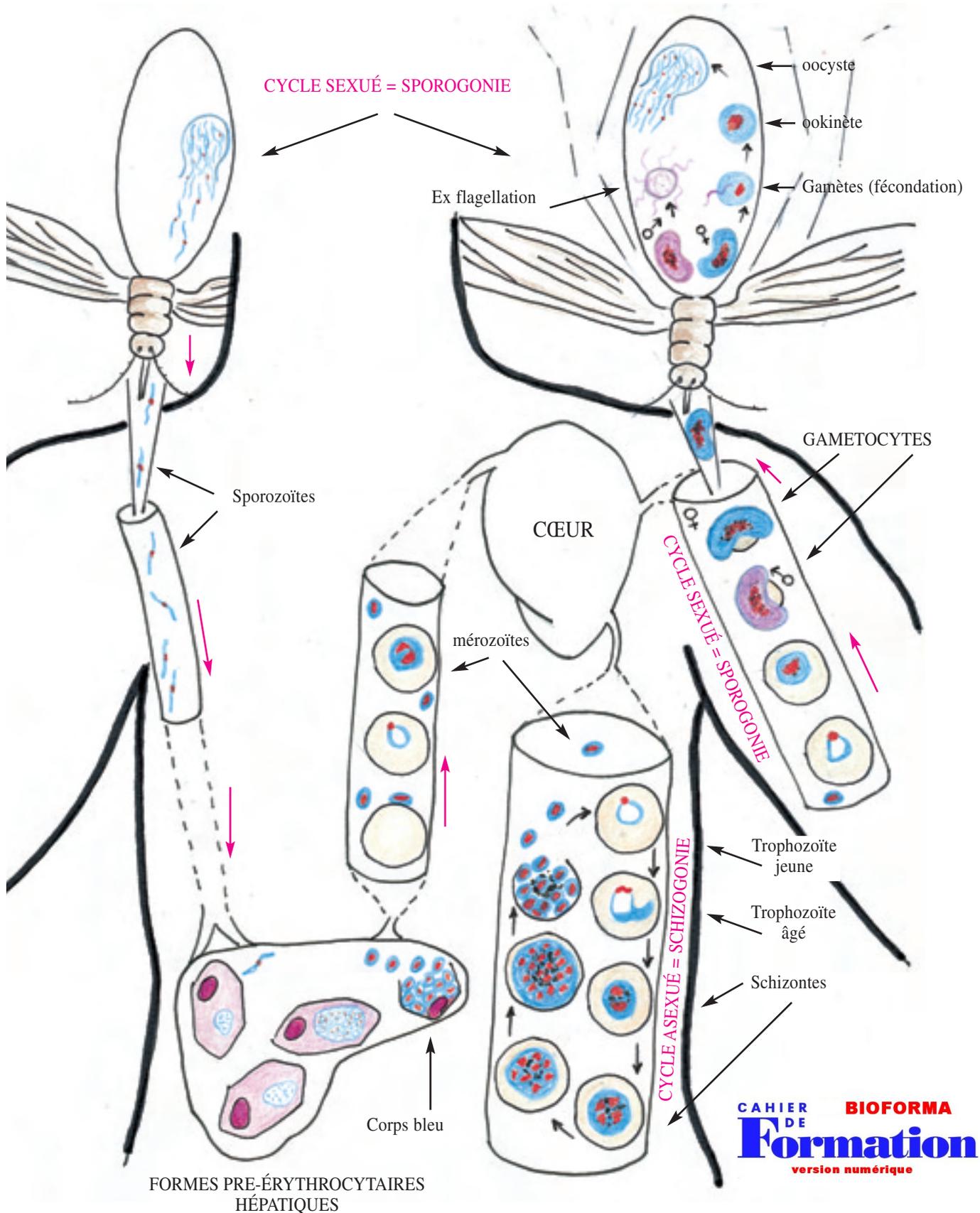


Figure n° 3 : Schéma des cycles sexué (= sporogonie) et asexué (= schizogonie) du *Plasmodium falciparum*

Tableau IV : Comparaison des principaux caractères épidémiologiques des quatre espèces de Plasmodium de l'Homme.

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
Stade préérythrocytaire (1)	5,5 – 7	6 – 8	9	14 – 16
Période prépatente (1-2)	9 – 10	11 – 13	10 – 14	14 – 16
Période d'incubation (1-3) moyenne minimum maximum	12 9 14	15 12 17 jusqu'à 1 an	17 16 18 et plus	28 18 40 et plus
Rechute : (4)	–	+	+	+
Origine de la rechute		hypnozoïte	hypnozoïte	hématozoaire sanguin
Durée maximum des rechutes ou récurrences possibles en l'absence de traitement	1 à 2 ans	1 à 5 ans	1 à 5 ans	50 ans et plus
Durée de la sporogonie (1) chez l'anophèle	9-10	8-10	12-14	14-16

1) En jours

2) **La période de prépatence** est l'intervalle de temps qui sépare la piqûre infestante de l'apparition de la parasitémie.

3) **La période d'incubation** est l'intervalle de temps qui sépare la piqûre infestante de l'apparition des symptômes (fièvre).

4) **Rechute** (*anglais : relapse*) : reprise évolutive de la maladie après une première infection de même nature sans qu'il y ait eu une réinfestation.

Récurrence (*anglais : recurrence*) : Reprise évolutive d'une maladie apparemment guérie, sans nouveau contact pathogène. L'emploi de ce terme implique un délai beaucoup plus long (plusieurs semaines ou mois) que celui de la rechute.

Récidive (*anglais : recurrence*) : Réapparition d'une maladie antérieurement guérie après une nouvelle infestation.

RECHUTES ET RÉCIDIVES

FORMES PRÉ-ÉRYTHROCYTAIRES

(Réf. 87, 92, 103 et 141)

Après l'inoculation des sporozoïtes par un anophèle femelle existe une courte période, d'une demi-heure environ, pendant laquelle les sporozoïtes sont présents dans le sang. Puis il y a une période plus longue d'incubation pendant laquelle, les hématozoaires disparaissent du sang (voir tableau IV page 51). Beaucoup de sporozoïtes sont détruits par les macrophages, mais certains pénètrent dans les cellules parenchymateuses du foie (hépatocytes) où ils se développent et se multiplient, c'est la schizogonie pré-érythrocytaire existant pour toutes les espèces de *Plasmodium*.

Les sporozoïtes deviennent alors des schizontes et ont été aussi appelés corps bleus. À maturité ils ont une taille de 45 à 60 µm et contiennent 10 000 à 30 000 noyaux qui s'isolent et se différencient en mérozoïtes. À la fin du stade pré-érythrocytaire l'enveloppe de la cellule se rompt, les mérozoïtes sont libérés et vont envahir les hématies. Tous ces éléments parasitaires hépatiques ne contiennent pas de pigment.

LES HYPNOZOÏTES (FORMES EXO-ÉRYTHROCYTAIRES)

DE *P. VIVAX* ET *P. OVALE*

(Réf. 103 et 112).

Des éléments, qui ont reçu l'appellation d'**hypnozoïtes**, sont vus dans les biopsies hépatiques à partir du 3^e jour après l'inoculation anophélienne ; ils mesurent alors 3,8 µm. Légèrement plus grands le 5^e jour, ils atteignent 5-6 µm le 7^e. Ils sont en règle générale uninuclés, et garderont ensuite la même taille. Le noyau, remarquablement bien coloré, est habituellement anguleux ou de contour irrégulier mais compact et entouré d'un halo rose pâle. Le cytoplasme, granuleux, se colore en bleu clair. L'hypnozoïte est délimité par une membrane fine mais nette. Cependant, au Giemsa, l'aspect en cible est très caractéristique. Ils sont situés près du noyau de la cellule parenchymateuse hépatique, quand les hypnozoïtes reprennent leur activité ils grandissent, leur noyau se divise, ce qui aboutit à la formation de mérozoïtes qui entraînent les rechutes.

P. falciparum : Il n'y a pas d'hypnozoïtes comme dans *P. vivax* et *P. ovale*, ni de formes persistantes dans le sang comme dans *P. malariae*, si bien que les cas de rechute après 1 an ou au maximum 2 ans sont exceptionnels. Les seuls cas publiés sont sujet à caution, comme le montre ceux qui auraient pu l'être pour des rechutes de 3 et 4 ans après le départ de la zone d'endémie mais qu'une remarquable enquête montre en fait être inférieurs à un an ! (105).

LES HÉMATOZOAIRES SANGUINS PERSISTANTS

DE *P. MALARIAE*

La persistance de *P. malariae* dans le sang pendant de nombreuses années a été prouvée par inoculation sanguine expérimentale chez le singe. Elle a été prouvée aussi par la survenue chez un receveur, d'un paludisme à *P. malariae* après une transfusion sanguine humaine. Le donneur avait vécu dans un pays où l'éradication de cette espèce de paludisme avait été réalisée il y a très longtemps. Les cas survenus chez des receveurs dans des pays exempts de *P. malariae* après transfusion le prouvent aussi (voir transmission transfusionnelle page 54) Shute 1944 (142). Une

récidive a été décrite 53 ans après le premier épisode à la suite d'une splénectomie (107), ainsi qu'une incubation muette en Grèce de probablement 70 ans (146).

MÉROPHORES

Récemment, (1999) vient d'être montré par Landau I., Chabaud A.G. et al. (113) l'existence de mérozoïtes latents, chez différentes espèces de *Plasmodiums sp. p.* de rongeurs. Ces structures, présentes dans les organes lymphatiques ont été dénommées mérophores et constituent des formes de latence du parasite. Il est suggéré que le réseau lymphatique, refuge privilégié de nombreux parasites, joue un rôle comparable dans les paludismes humains.

ÉPIDÉMIOLOGIE DU PALUDISME EN FRANCE

En 1979 sa prévalence a été estimée à 2 000 cas annuels dont 20 mortels (88) depuis le nombre de cas annuel croit de manière importante et a été multiplié par 2,6 entre 1986 et 1995 (143). Il a été de 5 300 cas en 1997 dont 25 mortels (117 et 118). L'épidémiologie du paludisme en France, pays tempéré est bien différente de celle des pays tropicaux mais est similaire à celle des autres pays tempérés (Amérique du Nord, Europe, Russie, Japon, Australie...).

LE PALUDISME AUTOCHTONE, selon la terminologie moderne et précise de Bruce-Chwatt 1970 (85) et Brumpt 1978 (88), il correspond à des pays où existe une endémie permanente. Il a disparu de France dans les années 1950, en particulier de Corse.

LE PALUDISME INTRODUIT, correspondant dans un pays indemne ou éradiqué, à un foyer localisé comprenant quelques cas, au maximum plusieurs dizaines. « Il est dû à la transmission locale à partir d'un cas importé d'un pays autre que celui concerné » (85). Il serait transmis en France même par un anophèle autochtone à partir d'un migrant ou d'un voyageur en provenance d'un pays impaludé et porteur de gamétocytes. Une telle bouffée épidémique dure habituellement quelques mois et ne se maintient pas l'année suivante. En raison des conditions climatiques nationales, il ne peut guère s'agir que de *P. vivax*, agent de la tierce bénigne. Il y eut ainsi une petite épidémie de 18 cas à la Croix de Berny en 1940 (136) et une autre de 20 cas en Corse en 1970 (140). Il est certain que de tels foyers transitoires de paludisme introduit peuvent encore apparaître : le dépistage par les biologistes, surtout au microscope, est la meilleure arme pour un diagnostic précoce évitant l'extension.

LE PALUDISME D'IMPORTATION (114, 128, 130 et 143), de loin le plus fréquent, est contracté dans les pays tropicaux en dehors du pays où il a été diagnostiqué. Il atteint pour moitié des français tels que les coopérants, touristes ou aviateurs ayant fait un séjour exotique et retournant en France, et pour moitié des migrants principalement africains. Pour ces derniers, le paludisme est observé soit lors de leur première arrivée en France, soit au retour de vacances qu'ils vont passer dans leur pays d'origine alors qu'ils ont perdu leur prémunition. Le nombre de cas de paludisme importé en France est en accroissement en raison de la généralisation de la chimiorésistance aux amino-4-quinoléines et du développement des séjours en pays d'endémie.

Les séjours de vacances, de français ou d'africains, expliquent que la moitié des cas soient observés en août, septembre et octobre. Toutes les espèces sont diagnostiquées : *P. falciparum* vient de loin en tête dans 85 % des cas, *P. vivax* et *P. ovale* sont à peu près au même niveau, environ 7 % et *P. malariae* ne représente que 1 à 2 % des cas. (117, 118 et 143). Dans environ 90 % des cas, la contamination est en relation avec l'Afrique sub-saharienne.

LE PALUDISME DES ANOPHÈLES IMPORTÉS, correspond au transport par des moyens rapides d'anophèles porteurs de sporozoïtes en provenance de pays d'endémie.

Le paludisme des aéroports, découvert par Giacomini et al. en 1977 (105), est dû à une modalité originale de transmission : transport par les avions d'anophèles infectés, principalement dans les conteneurs d'aliments (régimes de bananes), anophèles qui vont piquer les personnes se trouvant dans l'aéroport ou vivant dans le voisinage, à la portée du vol de ces insectes, généralement moins de 2 km (7). Une fois arrivés à l'aéroport par avion les anophèles infectés peuvent alors retrouver une chaude température près du moteur des automobiles garées à côté des avions par les employés de l'aéroport : avec ce deuxième moyen de locomotion ils peuvent aller injecter les sporozoïtes à des personnes à 7 km (106) ou même 10 et 15 km, (147).

En 1995, au total cinquante cas avaient été publiés, dont 15 pour le seul aéroport de Roissy, 2 au Bourget, 1 à Orly et 1 à Marseille, ainsi que 9 en Suisse, 8 en Belgique, 6 en Grande-Bretagne, 3 en Italie, 2 aux Pays Bas et 1 en Espagne. À l'exception d'un cas à *P. vivax* (115) et 1 cas à *P. malariae* il s'agit toujours de *P. falciparum*, le diagnostic est souvent tardivement fait ce qui explique la forte mortalité : 5 cas soit 10 % (106).

Le paludisme d'escale de nuit = runway malaria dans un aéroport d'un pays d'endémie palustre est une autre modalité particulière du paludisme des aéroports : un passager, qui ne descend pas de l'avion lors de l'escale de nuit, y est cependant piqué par un anophèle infesté qui pénètre à l'intérieur de l'avion par une porte laissée longuement ouverte (93, 94 et 127).

Le paludisme des bagages. Les anophèles infestés peuvent également être transportés dans les bagages de personnes ayant séjourné en zone d'endémie, et aller piquer lors de leur ouverture dans un pays indemne, des personnes n'ayant pas voyagé : trois cas ont été observés en Italie (90 et 137), deux cas à Berlin (120) et un cas s'est également produit à Toulouse.

Le paludisme des ports. Deux personnes vivant ou travaillant dans le port de Marseille ont contracté un paludisme à *P. falciparum* sans avoir voyagé en pays d'endémie. 6 à 8 jours étant la durée des voyages maritimes à partir de l'Afrique cela permet le transport par bateau des anophèles infestés (96).

LE PALUDISME ACCIDENTEL (ou **INDUIT** 87) correspond à différentes modalités de transmission sans l'intermédiaire du vecteur. Il s'agit de transmissions directes par du sang contaminé introduit chez l'Homme par différentes voies : paludisme transfusionnel, paludisme nosocomial, paludisme des toxicomanes, paludisme congénital... La durée d'incubation lors de la transmission sanguine est variable et dépend de la quantité d'hématozoaires présente dans le sang contaminant. Elle a été par exemple d'un seul jour lors d'impaludations thérapeutiques par 5 ml de sang contenant *P. vivax* (122).

Le paludisme transfusionnel. Les premiers cas ont été rapportés à la Société de Pathologie Exotique en 1929 par Marchoux et M.L. Netter (121 et 123). Le nombre de cas annuels diagnostiqués est de cinq en moyenne en France, chiffre certainement inférieur à la réalité (86, 125 et 132).

Deux données le concernant sont importantes :

- la gravité de ce paludisme survenant chez un malade affaibli et non immunisé,
- la difficulté du diagnostic chez un patient le plus souvent sans passé tropical : une fièvre chez un opéré fait rechercher une phlébite, une suppuration de paroi conduit à demander une hémoculture, mais bien rarement une goutte épaisse. Aussi, plus souvent encore que dans les autres cas, le diagnostic est porté fortuitement par la laborantine qui fait la formule leucocytaire, ou examine un frottis sanguin en raison d'anomalies. Le dernier cas que nous avons eu à étudier a été diagnostiqué par un technicien entraîné alors qu'il réalisait une numération de réticulocytes colorés au bleu de cresyl !

La prophylaxie est alors basée sur l'élimination des donneurs de sang ayant fait un séjour datant de moins de 3 ans dans les pays d'endémie et ayant une sérologie anti *Plasmodium* positive (139).

Dans les pays d'endémie palustre le diagnostic de cette modalité de transmission est encore plus rarement fait : le mode habituel par la piqûre de moustique rend le diagnostic de transmission transfusionnelle à posteriori très difficile. À Cotonou une enquête a montré qu'un tiers des donneurs de sang était porteur d'hématozoaires, surtout *P. falciparum* : la prévention préconisée dans ce cas est la chimio prophylaxie anti palustre systématique de tout receveur de sang (110).

P. malariae qui peut persister dans le sang périphérique toute la vie peut continuer à être transmis même après **éradication** dans un pays, par exemple l'Iran (99) ou le Mexique (125). Dans ces conditions particulières *P. malariae* représente presque la moitié des cas transfusionnels, *P. vivax* est à l'origine de presque autant de cas, quant à *P. falciparum* il est rarement en cause.

Le paludisme nosocomial

Personnel de laboratoire ou des services de soins. Le premier cas a été une infirmière qui avait donné son sang à Alger pour un soldat atteint d'accès pernicieux (138). La contamination par piqûre anatomique lors d'une autopsie a été relatée (87). Mais la transmission même sans pénétration par aiguille l'est aussi. Ainsi, un de nos internes a fait un paludisme grave en renversant un tube de prélèvement de sang d'un malade porteur de *P. falciparum* (131) : de banales égratignures ont permis le passage du parasite sur une main. La preuve d'une infestation récente a pu être apportée par la constatation d'un virage sérologique en immunofluorescence, grâce à des sérums prélevés antérieurement à la maladie et conservés en sérothèque. Un tel mode de transmission recommande la prudence dans la manipulation de sang paludéen. Cet exemple montre l'intérêt de la constitution dans chaque laboratoire d'une sérothèque de sérums du personnel qui ne peut être utilisée que dans son intérêt, ou dans un but scientifique anonyme (134). Un autre cas est survenu chez une infirmière où la porte d'entrée était également des petites écorchures sur les doigts (80). Chez une infirmière contaminée de la même manière la parasitémie atteint 40 % (135) : ces observations montrent l'importance du port des gants, surtout quand de petites lésions cutanées des mains sont présentes. Cette modalité a également été observée en Angleterre (78 et 89) et en Pologne (111). Cette contamination peut survenir également à la suite d'une piqûre d'aiguille (82). Les atteintes sont souvent graves puisque survenant chez des personnes non immunisées. De tels cas ne sont pas publiés pour les pays d'endémie : ils sont certainement très nombreux mais passent souvent inaperçus par rapport au grand nombre d'infestations habituelles par piqûres d'anophèles.

Une modalité particulière de transmission du paludisme est la contamination de laboratoire par un anophèle femelle d'élevage porteur de sporozoïtes de *Plasmodium*. Cela n'est pas exceptionnel

notamment avec l'espèce *Plasmodium cynomolgi bastianellii*, très voisine de *P. vivax*, et pouvant contaminer l'Homme (98 et 101). Cela est survenu aussi aux U.S.A. où une femelle d'*A. stephensi* infestée par une souche Thaïlandaise de *P. vivax* l'a inoculée à un entomologiste. Il n'y avait pas d'autres causes de contamination possible M.M.W.R. (124). Ce sont des exemples particuliers de transmission par moustique en dehors des zones d'endémie.

Une autre modalité particulière est la contamination avec une souche de culture de *P. falciparum* (109 et 148).

Ainsi dans un autre pays exempt de paludisme autochtone, l'Irlande, 14 soldats devinrent malades et 10 moururent à la suite de perfusions intra-veineuses d'arsephenamine (Salvarsan®) en 1917 à Dublin. À l'autopsie de nombreuses formes parasitaires de tierce maligne furent découvertes. Un seul malade avait séjourné en Grèce dans une zone de paludisme. Les aiguilles avaient été changées entre chaque perfusion mais la conclusion fut que certaines parties de l'appareil à perfusion avaient été contaminées par des hématozoaires à partir du sang du soldat ayant contracté *P. falciparum* en Grèce (122 bis).

La transmission par greffe d'organes a également été observée en France. Une femme de 53 ans a présenté une fièvre élevée 12 jours après une greffe cardiaque. Le diagnostic de paludisme à *P. falciparum* fut fait 6 jours après et malgré la quinine intra-veineuse elle mourut, le donneur était d'origine camerounaise (75). Plusieurs cas ont été décrits après une greffe de rein dans des pays occidentaux dont un à *P. falciparum* mortel aux U.S.A. (95) et deux dus à *P. vivax* en Suisse (108).

Le paludisme des toxicomanes. Les 10 premiers cas de tierce maligne chez des héroïnomanes furent observés en 1929 par Biggam (79) au Caire, où ce paludisme était inhabituel. Des épidémies de plusieurs dizaines de cas dus à l'usage de la même seringue chez les toxicomanes furent observés à Saïgon en 1975, 20 cas dont 8 mortels, (84) ; 47 cas dus à *P. vivax* en Californie en 1970 (102). Cette modalité de transmission fut observée pour la première fois en France en 1979 chez un héroïnomane (77). De tels cas peuvent encore survenir en France, mais plus difficilement depuis la mise en vente libre des seringues en 1986 (133) préconisée en raison de l'épidémie du SIDA.

LE PALUDISME CONGÉNITAL. Il est fréquent dans les pays d'endémie palustre comme la Zambie, 29 % (116), ou 8 % à Thiès au Sénégal (97). En France des cas sont observés chez des nouveaux-nés mis au monde par des mères qui ont émigré le plus souvent au cours de leur grossesse : un cas (*P. vivax*) à Tourcoing chez un nouveau-né dont la mère était cambodgienne (145), un autre cas semblable à Lyon (100) un cas (*P. falciparum*) à Paris chez un nouveau-né de mère camerounaise (81) un cas (*P. falciparum* chloroquino-résistant) à Angers de mère malienne (119), un cas (*P. vivax*) à Montreuil de mère pakistanaise (129).

Des cas similaires ont été observés dans d'autres pays tempérés comme les U.S.A. chez 7 nouveaux-nés de mères vietnamiennes en 1980 (91).

Le diagnostic peut présenter des difficultés chez les enfants ayant toujours vécu dans des pays d'endémie palustre.

Ce paludisme n'est en général pas grave, souvent avec une simple parasitémie asymptomatique, cela sans doute en relation avec le fait que la mère a en même temps transmis l'hématozoaire et les anticorps spécifiques.

EN CONCLUSION

Il convient donc de souligner que le diagnostic clinique du paludisme peut être difficile en France dans les conditions épidémiologiques actuelles et que le rôle du biologiste est prépondérant. Ainsi, en l'absence de prescription de recherche de Plasmodium, plus du tiers des cas sont diagnostiqués par les laborantines. Il faut que celles-ci connaissent bien la morphologie des hématozoaires ce qui est le but de la formation permanente du Contrôle de Qualité en Parasitologie et de Bioforma.

ÉPIDÉMIOLOGIE MONDIALE DU PALUDISME

(Réf. 76, 80 et 126)

En 1994 le risque de paludisme existait toujours dans 100 pays, dont 92 où sévit *P. falciparum* (tableau VIII page 70). Dans 8 était seulement présent *P. vivax*. On estimait alors que 2,3 milliards de personnes (41 % de la population mondiale) vivaient dans des zones d'endémie.

L'incidence du paludisme est estimée être entre 300 et 500 millions de cas de maladie par an. Le nombre de décès annuel se situe entre 1,5 et 2,7 millions dont environ 1 million d'enfants qui est le premier groupe très exposé.

Le deuxième groupe de population exposé aux formes mortelles de paludisme est constitué par les sujets de moins de 5 ans non immunisés qui vont pour la première fois en zone d'endémie. Le troisième groupe étant les populations autochtones de ces zones de migration, qui retournent au pays après une longue absence, de 5... 10 ans et plus et ayant perdu leur immunité. La partie du monde la plus touchée est l'Afrique tropicale avec 90 % de l'incidence totale. La résistance de *P. falciparum* à la chloroquine, puis de *P. vivax*, est à l'origine d'un nombre sans cesse plus élevé de cas de paludisme, ce qui en fait une maladie en voie d'accroissement. Le paludisme a par ailleurs réapparu dans quelques pays d'où il avait été éradiqué (Turquie, Azerbaïdjan, Tadjikistan, Corée du Sud...).

Les rapports établis par de nombreux pays pour l'O.M.S. prennent surtout en considération les cas de paludisme à *P. falciparum* en raison de la prédominance et de la gravité de cette espèce. Il est donc souvent difficile d'être précis sur la répartition géographique des 3 autres espèces. Cette répartition sera envisagée plus loin lors de l'étude de chaque espèce de *Plasmodium sp.*

EUROPE : Le paludisme n'existe plus excepté dans certaines régions de Turquie (Sud-Est) et en Russie. Quelques cas sporadiques de *P. malariae* en Europe centrale, correspondent à des rechutes très tardives.

AFRIQUE : Presque toute l'Afrique est fortement impaludée, surtout l'Afrique tropicale. Le paludisme a disparu d'Afrique du sud, de l'Ile Maurice et de la Réunion, de l'ancien Sahara espagnol. En Afrique du nord, le paludisme est devenu rare et il s'agit le plus souvent de *P. vivax*. Il a été éradiqué de Tunisie mais existe encore dans le sud Algérien et Marocain.

AMÉRIQUE : En Amérique du nord, il a disparu des U.S.A. et de Cuba mais persiste dans de rares régions du Mexique où existe seulement *P. vivax*.

En Amérique centrale, il a disparu de la zone du Canal de Panama ainsi que des Antilles. Existe dans tous les autres pays, il s'agit surtout de *P. vivax*.

En Amérique du sud, il a été éradiqué au Chili, en Uruguay et en Argentine. Le paludisme est assez fréquent dans tous les autres pays. *P. falciparum* y est souvent résistant aux amino-4-quinoléines (Brésil, Colombie, Venezuela, Guyane, Équateur).

ASIE : Il a disparu de Chypre, Israël, Liban, Koweït, de la République de Corée du Nord, de Macao et du Japon. Il existe dans tous les autres pays, particulièrement en Inde, Vietnam, Cambodge, Laos où *P. falciparum* est souvent résistant aux amino-4-quinoléines ainsi qu'en Thaïlande, Birmanie, Philippines, Bornéo, Nouvelle-Guinée.

PRÉLÈVEMENTS

SANG :

Horaire du prélèvement : il est classique de dire que les hématozoaires sont plus nombreux quelques heures après l'accès fébrile, quand les rosaces viennent d'éclater et que les nombreux trophozoïtes jeunes sont présents dans les hématies. C'est donc le meilleur moment pour faire la recherche d'hématozoaires. Mais ce fait n'est vrai que pour *P. falciparum* qui doit gagner les organes profonds vers le milieu du cycle (de 48 h environ) afin d'y effectuer sa schizogonie. Il est par ailleurs plus difficile de faire le diagnostic d'espèce au stade indifférencié de trophozoïtes que sur les formes plus évoluées. Comme pour les formes sévères (où les parasites sont en général nombreux dans le sang de façon permanente) le traitement doit être entrepris d'urgence dans l'heure qui suit le diagnostic, il convient de faire la recherche de **Plasmodium dès qu'elle est demandée**, et de la répéter, éventuellement si elle a été négative, quelques heures **après un accès fébrile**.

Si le diagnostic d'espèce s'avère difficile à cause des trophozoïtes annulaires indifférenciés, il est recommandé de faire alors un second prélèvement 5-6 heures plus tard pour voir les formes plus évoluées, même si le malade a déjà été traité car l'effet des médicaments sur la parasitémie n'est pas immédiat.

Sang veineux : le sang est prélevé de préférence sur E.D.T.A. (tube à numération formule sanguine), à défaut sur du citrate de soude ou de l'héparine. Le sang prélevé sur anticoagulant ne peut pas être défibriné facilement : il est surtout étalé en frottis mince (voir techniques générales).

ADRÉNALINO-SPLÉNO-CONTRACTION : lorsqu'on ne réussit pas à mettre en évidence les Plasmodiums dans le sang malgré les examens répétés et les gouttes épaisses, on peut recourir à l'adréNALINO-spléno-contraction.

Cette méthode consiste à injecter au sujet de l'adrénaline qui provoque une contraction de la rate, contraction qui chasse les parasites vers le sang périphérique. Pour cela, on injecte 1 mg d'adrénaline en sous cutanée, et on fait les prélèvements 15, 30 et 45 minutes après. La réapparition des Plasmodium se fait, en principe, pendant la première demi-heure.

C'est une méthode ayant une certaine efficacité pour *P. falciparum*, moindre pour *P. vivax*. Il faut cependant faire attention aux contre-indications possibles de l'adrénaline chez le sujet présentant une hypertension. Au total, elle est normalement peu employée.

Transport du sang veineux

Quand le frottis et la goutte épaisse ne sont pas faits au bout du doigt mais à partir d'un prélèvement de sang veineux, ils doivent être réalisés dans les plus brefs délais, quatre heures est pratiquement le temps maximum pour pouvoir observer des hématozoaires avec une belle morphologie.

En effet passé ce délai :

– les parasites s'altèrent, les hématies se modifient en particulier dans le cas de *P. vivax* et *P. ovale*.

– les parasites diminuent de nombre. Pour *P. falciparum* chez 4 malades le nombre de parasites avait diminué de plus de 50 % dans du sang prélevé sur EDTA, conservé 24 heures à + 4 °C. Ils avaient même disparu dans un cas de parasitémie faible.

EXAMEN DIRECT DU SANG

C'est par l'examen direct de sang entre lame et lamelle que Laveran découvrit à Bône (Algérie) l'hématozoaire du paludisme.

Cette méthode est toujours valable et permet à un microscopiste averti de faire très rapidement un diagnostic, surtout en cas de parasitémie élevée.

Moelle : les formes de division (schizontes) et les gamétocytes jeunes, absents du sang périphérique pour *P. falciparum*, y sont présents. La moelle est parfois plus riche que le sang périphérique.

Placenta : est habituellement riche en parasites. Les formes de division (schizontes) de *P. falciparum* y sont présentes.

NUMÉRATION DES *PLASMODIUM*

FROTTIS MINCE : POURCENTAGE D'HÉMATIES PARASITÉES

On compte le nombre d'hématies parasitées par rapport au nombre d'hématies saines et on en établit le pourcentage

Technique : Compter dans 3 ou 4 champs microscopiques, choisis au hasard mais éloignés les uns des autres, le nombre d'hématies (celui-ci doit être d'au moins 1 000 au total) et le nombre d'hématies parasitées. En établir le pourcentage.

Un champ microscopique à l'immersion ($\times 100$) contient 150 à 300 hématies en moyenne.

Il est facile de passer du pourcentage à la valeur absolue d'hématies parasitées par μl de sang quand on connaît le nombre total d'hématies par ml.

Les manifestations cliniques de l'accès palustre n'apparaissent, en général, qu'à partir d'une parasitémie minimum, ou seuil pyrétogène, qui est de l'ordre de 10.000/ μl pour *P. falciparum*, 100/ μl pour *P. vivax* et *P. malariae* (21).

GOUTTE ÉPAISSE - RAPPORT PARASITES/LEUCOCYTES

En goutte épaisse en l'absence d'hématies, on établit le pourcentage de parasites par rapport à 100 leucocytes : le résultat dépend donc en partie du nombre de leucocytes par μl et est donc moins précis qu'un frottis.

Intérêt : La numération des hématies parasitées est surtout indispensable dans le paludisme à *P. falciparum*. Son intérêt est double :

– la gravité de l'affection palustre est liée au nombre d'hématies parasitées. Un paludisme à *P. falciparum* est considéré comme sévère quand le nombre d'hématies parasitées est supérieur à 100 000/ μl (156), l'accès pernicieux est probable au-delà de 150 000/ μl (21). Une parasitémie supérieure à 400 000/ μl est un élément de très mauvais pronostic (155).

– Surveillance du traitement, surtout en raison de la fréquence de la résistance de *P. falciparum* aux amino-4-quinoléines en Asie du Sud-Est, en Amérique du Sud et en Afrique.

La numération qui doit être quotidienne jusqu'à disparition complète de la parasitémie permet donc de vérifier l'efficacité du traitement, surtout dans les formes sévères et éventuellement de préciser le type de résistance aux antipaludéens.

Sous traitement la morphologie des Plasmodium s'altère, en particulier avec la chloroquine (149) :

Type R1 : les parasites disparaissent en moins d'une semaine mais réapparaissent avant le 30^e jour, sans réinfestation.

Type R2 : le nombre d'hématies parasitées diminue de façon importante mais incomplète. Si au bout de 3 jours d'un traitement correct à un antipaludéen, on retrouve encore des parasites dans le sang, il faut penser à une résistance de type R2 ou R3 et changer immédiatement de médicament.

Type R3 : Aucune diminution du nombre d'hématies parasitées.

CAUSES D'ERREUR

Différents éléments peuvent prêter à confusion avec des *Plasmodium* :

– les plaquettes, c'est la cause la plus fréquente. Il peut s'agir d'une plaquette posée sur une hématie, et qui est confondue avec un trophozoïte, ou bien un amas de plaquettes pris pour un corps en rosace.

– les réticulocytes peuvent être confondus avec des hématies contenant des granulations de Schüffner.

– les corps de Jolly dans des hématies en cas d'anémie.

– les algues microscopiques provenant de l'eau ayant servi à la coloration, surtout l'eau du robinet.

COLORATIONS

Frottis

RÉACTIFS DE LA COLORATION AU MAY-GRÜNWARD-GIEMSA

Il est important d'utiliser une eau à pH 7,2-7,4. En effet, une eau acide ne permet pas la coloration du cytoplasme basophile de *P. falciparum*. Quand on utilise de l'eau distillée pure, souvent acide, il faut la tamponner (voir page 29), sinon lui préférer de l'eau du robinet qui est, en général, légèrement alcaline. Un pH à 7,2-7,4 permet de faire apparaître les taches de Maurer de *P. falciparum* de grande valeur diagnostique.

L'eau distillée neutre peut être remplacée par de l'eau d'EVIAN® source Cachat qui a un pH de 7,2-7,3 et qui est peu minéralisée. (Petithory J.C., Ardoin F.G., Ash L.R. : A rapid and easy method of diluting Giemsa stain for use in staining blood smears for the diagnosis of malaria and other blood parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001, **63**, sup. n° 3) (152). Dans certains cas, la coloration peut être défectueuse, en particulier quand les frottis ont été conservés longtemps, plusieurs semaines, avant d'être colorés. Les granulations de Schüffner apparaissent mal pour *P. ovale* et *P. vivax* ou les taches de Maurer pour *P. falciparum*. On peut alors pratiquer une surcoloration (Lacan 150) en préparant une solution de Giemsa à raison d'une goutte par ml d'eau distillée pH 7,2. On colore pendant 3 et même 6 heures, en tenant compte, en particulier, du temps

écoulé depuis la prise de sang. Après coloration, on plonge rapidement la préparation dans une solution à 1 % d'acide borique et on lave immédiatement dans l'eau distillée.

Il est nécessaire d'examiner au moins 200 champs microscopiques à l'immersion pour déclarer négatif un frottis. La parasitémie est alors inférieure à 200 par μl . Cent champs microscopiques ($\times 100$) correspondent à un volume d'environ 0,2 μl .

Goutte épaisse

TECHNIQUE voir page 32

Deux points pratiques importants sont à souligner :

– avant de la colorer, il faut laisser sécher la goutte épaisse préparée avec du sang veineux 24 heures à la température du laboratoire, ou à la rigueur, une heure au moins à 37 °C, sinon elle se décollera dans l'eau d'hémolyse, ou le Giemsa ou au lavage. Cette donnée technique n'est pas compatible avec la recherche en urgence des hématozoaires. On peut, dans ce cas, faire un frottis ou une goutte épaisse fine qui adhère à la lame de verre qui doit être au préalable bien dégraissée. Ce décollement de la goutte épaisse s'observe plus fréquemment quand le sang a été prélevé sur anti-coagulant (EDTA) que quand il s'agit d'un prélèvement de sang capillaire.

– il ne faut pas fixer la goutte épaisse à la chaleur, ni à l'alcool, avant de l'avoir déshémoglobinisée, c'est à dire avoir lysé les hématies dans de l'eau ordinaire.

Dans une goutte épaisse, les hématies sont empilées les unes sur les autres en plusieurs couches superposées : si l'on colore directement une telle préparation, sans déshémoglobinisation préalable, on ne distingue ni les leucocytes, ni la morphologie des hématies, ni bien entendu, les plasmodiums. Cet aspect correspond à ce que l'on peut observer dans la partie épaisse d'un frottis, le talon par exemple. Le traitement par l'eau fait disparaître l'hémoglobine et rend visible les hématozoaires.

AVANTAGES

Étalement d'une grande quantité de sang sur une petite surface, de moins de 1 cm^2 , alors que la surface d'un frottis mince est de 3-4 cm^2 . Un frottis moyen correspond à un volume de sang d'environ 1 μl , alors qu'une goutte épaisse correspond à un volume de 3 à 5 μl (7). Cela aboutit à une concentration des parasites : il y a de 10 à 20 fois (**15 en moyenne**) plus de parasites par champ microscopique (21 et 154). Ces données bibliographiques sont identiques à celles de l'étude effectuée (page 65). Cette concentration est importante pour la recherche de parasites lorsqu'ils sont trop rares pour être facilement trouvés sur un frottis (photo n° 6).

INCONVÉNIENTS

La morphologie des *Plasmodiums* est modifiée et les hématies, dont la morphologie est très utile au diagnostic d'espèce sont hémolysées. Les taches de Maurer (photo n° 7), les ponctuations de Ziemann ne sont pas visibles. Les granulations de Schüffner le sont inconstamment (photos n° 8 et 9). Les artéfacts sont fréquents. Le diagnostic d'espèce de Plasmodium est donc plus difficile que sur frottis, et à plus forte raison pour des microscopistes dont ce n'est pas le travail quotidien.

Lorsque l'on colore les lames de plusieurs malades dans un même bac il y a un risque de contamination des gouttes épaisses négatives à partir de celles fortement parasitées.

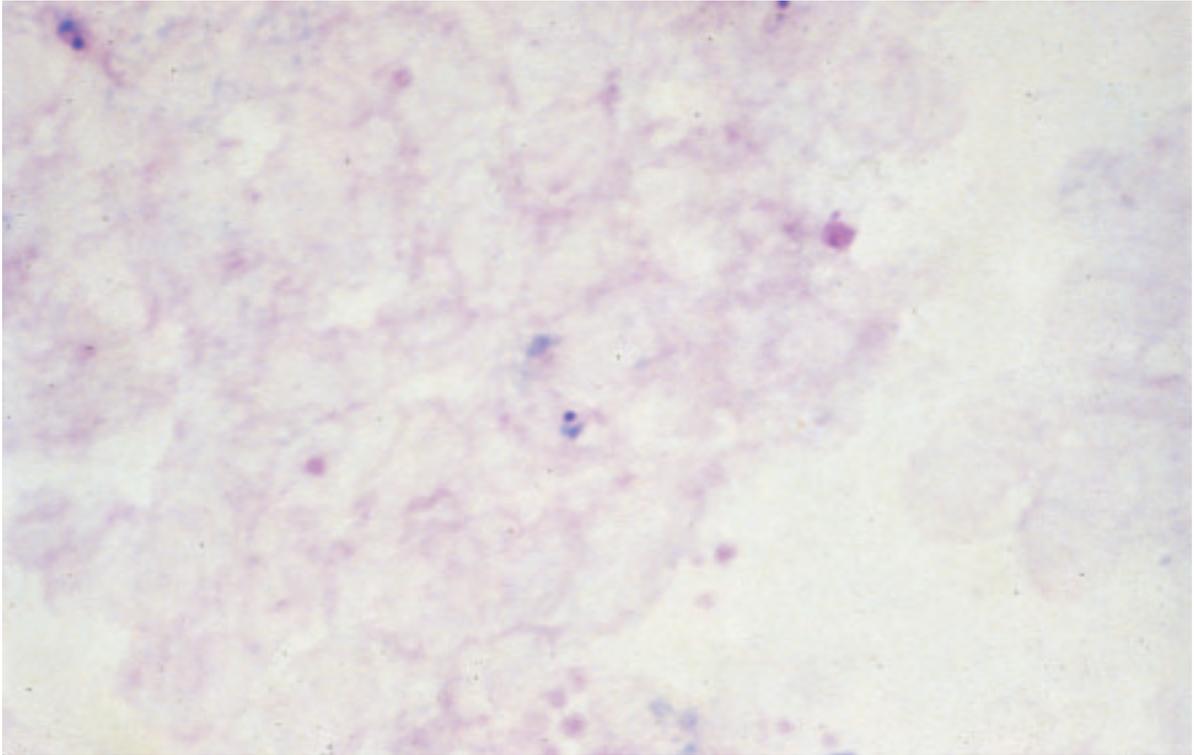


Photo n° 6 : Plasmodium falciparum. Goutte épaisse. Un trophozoïte au centre du champ, provenant d'un sang bien pauvre qui nécessiterait l'examen de très nombreux champs microscopiques pour être trouvé sur un frottis. Coloration Giemsa Obj. $\times 100$.

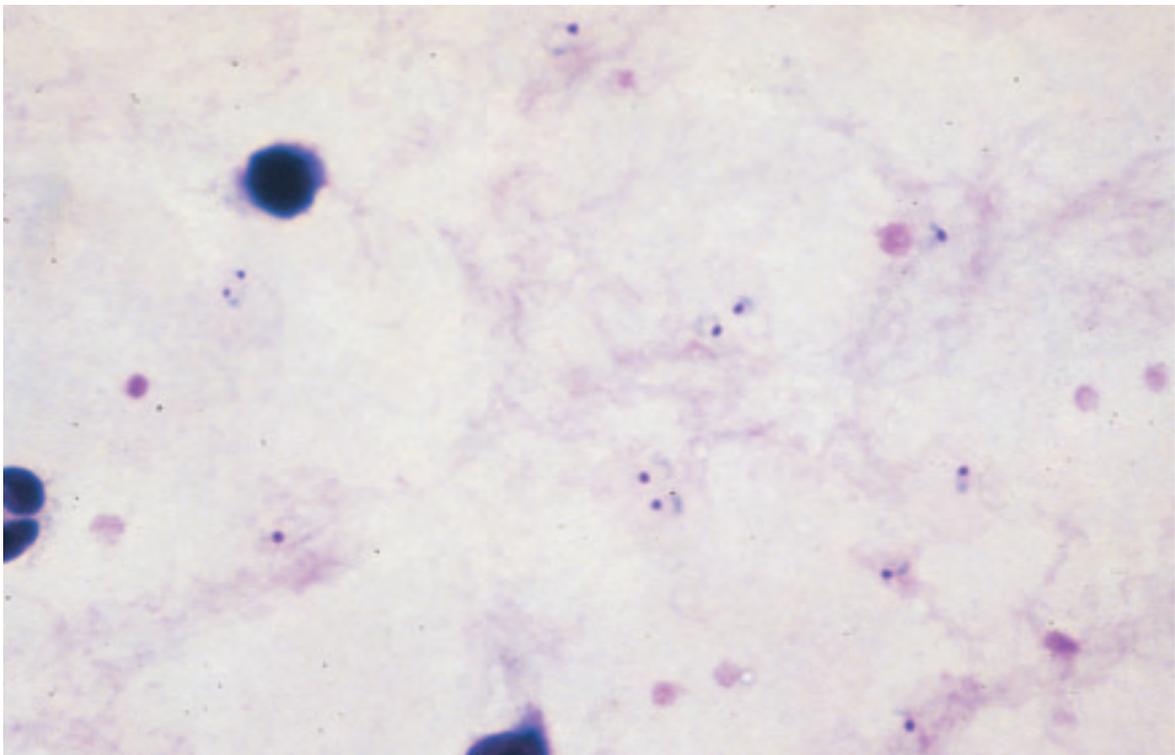


Photo n° 7 : Plasmodium falciparum. Goutte épaisse. Une dizaine de trophozoïtes de différents âges, les taches de Maurer ne sont pas visibles. Coloration Giemsa Obj. $\times 100$.

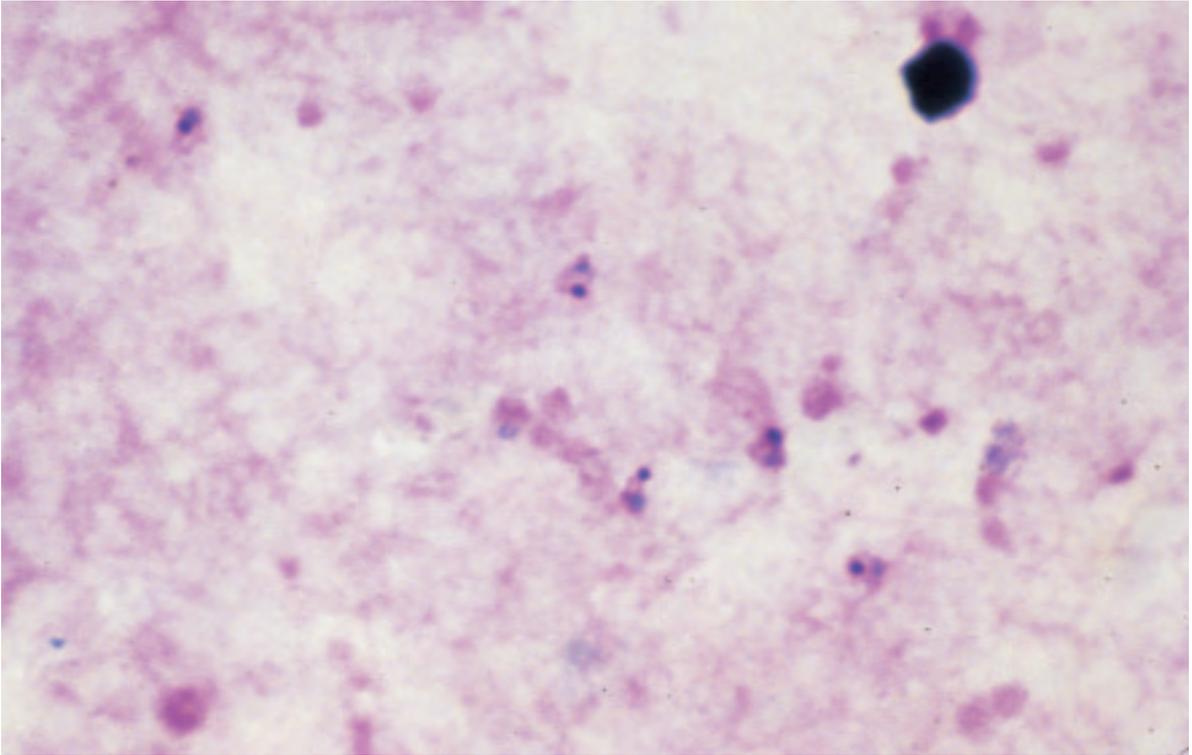


Photo n° 8 : Plasmodium ovale. Goutte épaisse. Trophozoïtes. Les granulations de Schüffner ne sont pas visibles. Coloration Giemsa Obj. × 100.

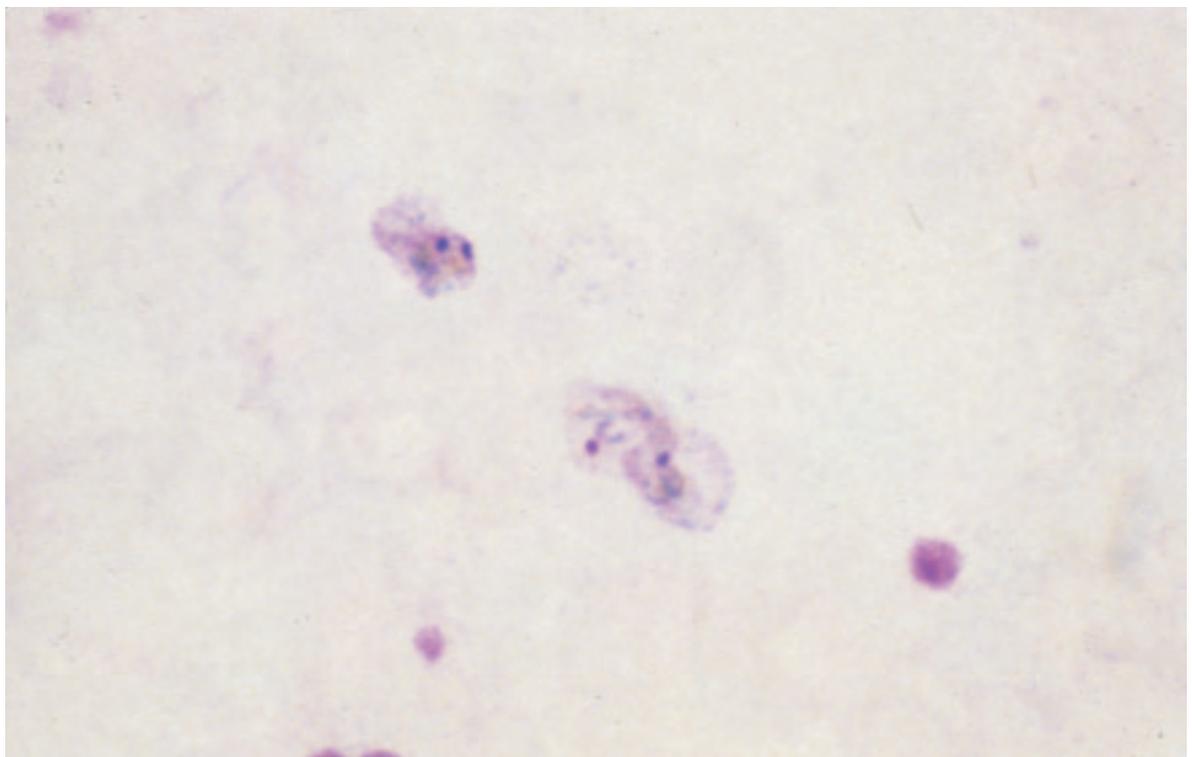


Photo n° 9 : Plasmodium vivax. Goutte épaisse. Trois trophozoïtes âgés amiboïdes, les stromas des hématies ont résisté à l'hémolyse et l'on voit les granulations de Schüffner. Coloration Giemsa Obj. × 100.

**LA GOUTTE ÉPAISSE : ÉTUDE DE SON INTÉRÊT
ET DE SES LIMITES DANS LE DIAGNOSTIC DU PALUDISME
COMPARAISON AVEC LE FROTTIS MINCE**

Un test avec l'aide de **Bioforma** réalisé en novembre 1996 dans le cadre du Contrôle de Qualité National en Parasitologie, nous a permis de réaliser une étude grandeur nature avec près de quatre mille laboratoires de biologie médicale français participants et qui portait sur l'efficacité de la recherche d'hématozoaires respectivement en frottis et en goutte épaisse.

Le sang parasité provenait de cinq malades ayant une parasitémie assez faible mais voisine, en moyenne un trophozoïte pour 5 champs microscopiques Obj. \times 100, ce qui correspond à environ 0,1 % d'hématies parasitées sur le frottis. **On constate dans le tableau V que la goutte épaisse était en moyenne 15 fois plus riche par champ microscopique que le frottis en trophozoïtes de *P. falciparum*.**

NB : l'expression par champ microscopique pour la goutte épaisse et le frottis a été choisie pour permettre la comparaison avec la richesse du frottis.

Tableau V : Richesse respective des frottis et des gouttes épaisses.

Nom	MOGON	MAKAN	NASSOU	CENTAR	FATIMA
Richesse du frottis : en pourcentage d'hématies parasitées	$\leq 0,1 \%$	$\leq 0,1 \%$	0,1 % à 0,2 %	0,1 %	0,1 %
Richesse du frottis : en nombre moyen de champs microscopiques Obj. \times 100 pour trouver un trophozoïte	1 trophozoïte pour 7 champs	1 trophozoïte pour 5 champs	1 trophozoïte pour 3 champs	1 trophozoïte pour 5 champs	1 trophozoïte pour 5 champs
Richesse de la goutte épaisse, nombre de trophozoïtes par champ microscopique Obj. \times 100	1 à 4	2 à 6	1 à 6	2 à 8	1 à 4

RÉSULTATS

Lors de cette étude en aveugle, d'une dimension jamais réalisée à ce jour et d'une valeur statistique incontestable, les résultats obtenus pour la goutte épaisse par rapport au frottis ont été (tableau VI) :

7,3 % de réponse « absence de parasite » pour la goutte épaisse contre 2,8 % pour le frottis soit 4,5 % en plus.

51 % de diagnostic de *P. falciparum* pour la goutte épaisse contre 65,5 % pour le frottis soit 14,5 % en moins (151).

Ces constatations montrent qu'en pratique courante les résultats obtenus avec le frottis sont meilleurs que ceux obtenus avec la goutte épaisse et qu'il est indispensable de toujours faire un frottis sanguin pour la recherche ainsi que pour le diagnostic d'espèce de *Plasmodium* (Petithory J.C., Ardoin F.G., Ash L.R. Limitations of thick blood smears for the diagnosis of malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001, **63**, sup. 3) (153). Cela correspond à la nomenclature des actes de biologie médicale du 12 août 1997 n° 1125 : « recherche des hématozoaires sur frottis et en goutte épaisse : B 100 ».

Tableau VI : Bilan de 3 827 recherches de *P. falciparum* en frottis et gouttes épaisses

STADE	ESPÈCE	GOUTTE EPAISSE		FROTTIS	
		% DES DIAGNOSTICS DE STADE	% DES DIAGNOSTICS D'ESPÈCES	% DES DIAGNOSTICS DE STADE	% DES DIAGNOSTICS D'ESPÈCES
Trophozoïtes	<i>P. falciparum</i>	42.8	51	56.5	65.5
Schizontes jeunes	<i>P. falciparum</i>	5.0		6.9	
Schizontes âgés	<i>P. falciparum</i>	1.4		1.8	
Gamétocytes	<i>P. falciparum</i>	1.2		0.9	
Non précisés	<i>P. falciparum</i>	1.3		0.9	
Trophozoïtes	<i>P. vivax</i>	7.7	11,4	12.0	16.3
Schizontes jeunes	<i>P. vivax</i>	1.9		3.6	
Schizontes âgés	<i>P. vivax</i>	0.8		1.5	
Gamétocytes	<i>P. vivax</i>	0.2		0.3	
Non précisés	<i>P. vivax</i>	0.7		0.5	
Trophozoïtes	<i>P. ovale</i>	4.6	5.6	6.5	8.2
Schizontes jeunes	<i>P. ovale</i>	0.6		1.4	
Schizontes âgés	<i>P. ovale</i>	0.3		0.4	
Gamétocytes	<i>P. ovale</i>	< 0.1		0.1	
Non précisés	<i>P. ovale</i>	0.2		0.1	
Trophozoïtes	<i>P. malariae</i>	1.7	3	2.5	4.1
Schizontes jeunes	<i>P. malariae</i>	0.6		0.8	
Schizontes âgés	<i>P. malariae</i>	0.6		0.9	
Gamétocytes	<i>P. malariae</i>	0.1		0.2	
Non précisés	<i>P. malariae</i>	0.1		0.2	
Trophozoïtes	Non précisés	5.5	22	1.0	2.9
Schizontes jeunes	Non précisés	0.8		0.2	
Schizontes âgés	Non précisés	0.2		< 0.1	
Gamétocytes	Non précisés	0		< 0.1	
Non précisés	Non précisés	15.5		1.6	
Non précisés		0.2		0.3	
Absence parasite		7.3		2.8	

■ DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE DES *PLASMODIUM*

	Pages
<i>Plasmodium falciparum</i>	68
Hématies parasitées	72
Trophozoïtes jeunes et âgés.....	73
Schizontes jeunes et âgés, corps en rosace	75
Gamétocytes jeunes et mûrs	75
Accès pernicieux	77
– Variétés de <i>Plasmodium falciparum</i>	78
<i>Plasmodium vivax</i>	106
<i>Plasmodium ovale</i>	123
<i>Plasmodium malariae</i>	138
Diagnostic différentiel des quatre <i>Plasmodium</i>	152
– Polyinfestations par deux ou trois espèces de <i>Plasmodium sp.</i>	162

■ PLASMODIUM FALCIPARUM

Tableau VII : Plasmodium falciparum : résultats des 25 tests du Contrôle National de Qualité en Parasitologie de France

DATE D'ENVOI	NOMBRE DE RÉPONSES	RICHESSSE*	RÉSULTATS CONFORMES	DEUXIÈME RÉPONSE	TROISIÈME RÉPONSE
11/1979	1 603	10 à 20	82,4 %	<i>Plasmodium vivax</i> 9,2 %	<i>Plasmodium sp.</i> 4,3 %
11/1980	1 461	10 à 30	88,7 %	<i>Plasmodium vivax</i> 5,7 %	<i>Plasmodium malariae</i> 1,5 %
11/1981	765	1 à 10	86,2 %	<i>Plasmodium vivax</i> 6,3 %	<i>Plasmodium ovale</i> 1,6 %
04/1982	1 021	0,5 à 2	73 %	<i>Plasmodium vivax</i> 12 %	<i>Plasmodium malariae</i> 8,8 %
02/1984	1 045	1 à 2	93,6 %	<i>Plasmodium vivax</i> 7,6 %	<i>Plasmodium malariae</i> 1,7 %
01/1985	1 095	10 à 30	82,1 %	<i>Plasmodium vivax</i> 5,6 %	<i>Plasmodium malariae</i> 5,3 %
02/1986	623	0,5 à 2	77,2 %	<i>Plasmodium vivax</i> 9 %	<i>Plasmodium malariae</i> 5,1 %
11/1987	1 142	27 à 34	82,1 %	<i>Plasmodium vivax</i> 6,5 %	<i>Plasmodium malariae</i> 4,9 %
11/1988	1 167	10 à 15	88,2 %	<i>Plasmodium ovale</i> 4 %	<i>Plasmodium vivax</i> 2,7 %
03/1989	1 152	0,2 à 1	78,5 %	<i>Plasmodium ovale</i> 9,1 %	<i>Plasmodium vivax</i> 6,2 %
01/1990	1 140	1 à 2	90,5 %	<i>Plasmodium vivax</i> 9,6 %	<i>Plasmodium malariae</i> 2,2 %
03/1991	1 151	5 à 10	59,1 %	<i>Plasmodium ovale</i> 23,8 %	<i>Plasmodium vivax</i> 14 %
05/1992	2 409	30 à 40	88,7 %	<i>Plasmodium malariae</i> 3,4 %	<i>Plasmodium ovale</i> 3,3 %
04/1994	1 404	20 à 30	86,3 %	<i>Plasmodium ovale</i> 5,4 %	<i>Plasmodium vivax</i> 4,8 %
11/1994	1 203	3 à 5	77,9 %	<i>Plasmodium vivax</i> 14,1 %	<i>Plasmodium ovale</i> 4,1 %
11/1995	1 268	0,5 à 1	67,7 %	<i>Plasmodium vivax</i> 15,9 %	<i>Plasmodium ovale</i> 12,7 %
07/1997	1 281	1 à 3	84,1 %	<i>Plasmodium vivax</i> 7,3 %	<i>Plasmodium ovale</i> 3,4 %
11/1997 (Bioforma)	3 678	2 à 5	97,9 %	<i>Plasmodium vivax</i> 0,9 %	<i>Plasmodium ovale</i> 0,6 %
06/1998	1 271	8 à 10	94,7 %	<i>Plasmodium vivax</i> 2,4 %	<i>Plasmodium ovale</i> 1,3 %
10/1998	1 256	3 à 5	95,1 %	<i>Plasmodium vivax</i> 2,2 %	<i>Plasmodium ovale</i> 1,0 %
06/1999	1 316	0,5	57,5 %	<i>Plasmodium vivax</i> 21,2 %	<i>Plasmodium ovale</i> 17 %
10/1999	1 323	0,5 à 1,5	94,0 %	<i>Plasmodium ovale</i> 2 %	<i>Plasmodium vivax</i> 1,7 %
05/2000	1 301	0,1	80,9 %	<i>Plasmodium vivax</i> 7,4 %	<i>Plasmodium malariae</i> 4,0 %
10/2000	1 306	8 à 12	91,5 %	<i>Plasmodium vivax</i> 4,6 %	<i>Plasmodium ovale</i> 2,8 %
10/2000 (Bioforma)	2 332	0,1	83,4 %	<i>Plasmodium ovale</i> 9,6 %	<i>Plasmodium vivax</i> 5 %

* La Richesse moyenne est exprimée en pourcentage d'hématies parasitées

Agent de la fièvre tierce maligne, *Plasmodium falciparum* est responsable d'accès perniciox le plus souvent mortels si le diagnostic n'a pas été posé rapidement et le traitement institué immédiatement.

RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE (voir également tableau VIII)

Nous indiquons ci-après la répartition géographique avec les groupes de chloroquinorésistance.

PAYS DE GROUPE I

Pas de *P. falciparum* ou de chloroquinorésistance

Afrique : Cap-Vert, Égypte, Maroc, Ile Maurice

Amérique : Argentine (nord), Belize, Bolivie (sud), Brésil (Côtes est et sud), Costa Rica, Guatemala, Haïti, Honduras, Mexique, Nicaragua, Paraguay (est), Pérou (ouest), République dominicaine, El Salvador, Nord Panama.

Asie : Chine (nord-est)

Moyen-Orient : Émirats arabes unis, Iran (sauf sud-est), Iraq, Syrie, Turquie.

PAYS DU GROUPE II

Chloroquinorésistance présente

Afrique : Afrique du Sud (Transval, Natal), Bénin, Botswana, Burkina-Faso, Cameroun (nord), Côte d'Ivoire, Gambie, Ghana, Guinée, Guinée Bissau, Liberia, Madagascar, Mali, Mauritanie, Namibie, Niger, Nigeria, São Tomé et Príncipe, Sénégal, Sierra Leone, Somalie, Tchad, Togo, Zimbabwe.

Asie : Inde, Indonésie, Malaisie, Népal, Pakistan, Philippines, Sri Lanka.

Moyen-Orient : Afghanistan, Arabie Saoudite, Iran (sud-est), Oman, Yémen.

PAYS DU GROUPE III

Prévalence élevée de chloroquinorésistance ou multirésistance

Afrique : Angola, Burundi, Cameroun (sud), Comores, Congo, Djibouti, Éthiopie, Gabon, Guinée équatoriale, Kenya, Malawi, Mozambique, Ouganda, République Centrafricaine, Rwanda, Soudan, Swaziland, Tanzanie, Zaïre, Zambie.

Amérique : Bolivie (nord), Brésil (centre, nord, ouest), Colombie, Équateur, Guyana, Guyane française (fleuves), Panama (sud), Pérou (est), Surinam, Venezuela.

Asie : Bangladesh, Bhoutan, Cambodge, Chine (Etats du sud et Hainan), Laos, Myanmar, Thaïlande (zones frontalières), Vietnam.

Océanie : Iles Salomon, Papouasie - Nouvelle-Guinée, Vanuatu.

Tableau VIII : Liste des pays impaludés (*P. falciparum*) (1)

PAYS	RÉPARTITION (2)
Afghanistan	R. Totale
Afrique du Sud	R. Partielle
Algérie (P.V.)	R. Partielle
Angola	R. Totale
Arabie Saoudite	R. Partielle
Argentine (P.V.)	R. Partielle faible
Arménie (P.V.)	R. Partielle faible
Azerbaïdjan (P.V.)	R. Partielle faible
Bangladesh	R. Totale
Bélize (P.V.)	R. Totale
Bénin	R. Totale
Bhoutan	R. Totale
Bolivie	R. Partielle
Botswana	R. Partielle Nord
Brésil	R. Partielle
Burkina Faso	R. Totale
Burma	R. Partielle
Burundi	R. Totale
Cambodge	R. Totale
Cameroun	R. Totale
Cap Vert	R. Partielle
Chine	R. Partielle
Colombie	R. Partielle rurale
Comores	R. Totale
Congo	R. Totale
Corée du Nord	R. Partielle
Corée du Sud	R. Partielle
Costa Rica (P.V.)	R. Partielle
Côte d'Ivoire	R. Totale

PAYS	RÉPARTITION (2)
Djibouti	R. Totale
Égypte	R. Partielle faible
El Salvador (P.V.)	R. Partielle rurale
Émirats Arabes	R. Totale
Équateur	R. Partielle
Érythrée	R. Partielle
Éthiopie	R. Partielle
Guinée (Française)	R. Totale
Gabon	R. Totale
Gambie	R. Totale
Géorgie	R. Partielle
Ghana	R. Totale
Guatemala (P.V.)	R. Partielle
Guinée	R. Totale
Guinée-Bissau	R. Totale
Guyane	R. Totale
Haïti	R. Totale
Honduras (P.V.)	R. Partielle rurale
Inde	R. Totale
Indonésie	R. Partielle rurale
Iran	R. Partielle rurale
Iraq (P.V.)	R. Partielle
Kenya	R. Totale
Laos	R. Totale
Libéria	R. Totale
Madagascar	R. Totale
Malaisie	R. Totale
Malawi	R. Partielle
Mali	R. Totale

Tableau VIII : Liste des pays impaludés (*P. falciparum*) (1)

PAYS	RÉPARTITION (2)
Maroc (P.V.)	R. Partielle rurale
Ile Maurice (P.V.)	R. Partielle rurale
Mauritanie	R. Totale
Mayotte	R. Totale
Mexique (P.V.)	R. Partielle rurale
Mozambique	R. Totale
Namibie	R. Totale
Népal	R. Partielle rurale
Nicaragua (P.V.)	R. Partielle rurale
Niger	R. Totale
Nigéria	R. Totale
Oman	R. Partielle
Ouganda	R. Totale
Pakistan	R. Totale
Panama (P.V.)	R. Partielle rurale
Papouasie-Nouvelle-Guinée	R. Totale
Paraguay	R. Partielle
Pérou	R. Partielle
Philippines	R. Partielle rurale
République Dominicaine	R. Totale
Rwanda	R. Totale
République Centre Afrique	R. Totale
République Démocratique Congo	R. Totale

PAYS	RÉPARTITION (2)
Salomon (Iles)	R. Totale
Sao Tome Principe	R. Totale
Sénégal	R. Totale
Sierra Leone	R. Totale
Somalie (Iles)	R. Totale
Soudan	R. Totale
Sri Lanka (P.V.)	R. Partielle
Surinam	R. Partielle rurale
Swaziland	R. Partielle
Syrie (P.V.)	R. Partielle
Tadjikistan (P.V.)	R. Partielle
Tanzanie	R. Totale
Tchad	R. Totale
Thaïlande	R. Totale
Togo	R. Totale
Turquie (P.V.)	R. Partielle
Turkménistan	R. Partielle
Vanuatu	R. Totale
Vénézuela	R. Partielle rurale
Vietnam	R. Partielle rurale
Yemen	R. Totale
Zambie	R. Totale
Zimbabwe	R. Totale

(1) Les pays figurant dans cette liste sont en général infestés par l'espèce *P. falciparum* seule ou associée à d'autres espèces. Ceux dont le nom est suivi par P.V. le sont par *P. vivax*.

(2) R. totale = Répartition totale : pays où le risque existe sur la totalité du territoire (sauf de rares exceptions).

R. partielle : pays où le risque existe dans certaines parties du territoire seulement.

NOTIONS DE PHYSIOPATHOLOGIE concernant le paludisme de primo-invasion à *Plasmodium falciparum*.

Définition : Le paludisme de primo-invasion est un paludisme dit « d'apport anophélien », ce qui élimine le paludisme observé au cours des reprises ou des rechutes et celui dû à une inoculation directe (transfusion, seringue, excoriations cutanées...) où manque la phase pré-érythrocytaire intrahépatique.

Les parasites peuvent apparaître dans le sang dans les cas expérimentaux fortement infectés, dès le 5^e jour après l'inoculation de sporozoïtes (163) : c'est l'incubation parasitaire qui dure donc 5 à 7 jours pour *P. falciparum*, correspondant à la phase hépatique pré-érythrocytaire qui est cliniquement silencieuse en général.

En pratique, il faut attendre un cycle érythrocytaire de 48 heures pour retrouver les plasmodium qui se sont multipliés dans le sang, donc incubation parasitologique 8 à 9 jours.

Au bout de quelques autres cycles de 48 heures, le nombre de parasites atteint le seuil pyrétogène (environ 10 000 par mm³, certains l'évaluent à 2 500 par mm³ seulement), ce qui provoque la fièvre. D'où une incubation clinique de 9 à 10 jours.

Au début, les mérozoïtes, provenant de schizontes hépatiques d'âges variés, passent dans le sang de façon quasi continue et les schizogonies ne sont donc pas synchrones. Mais comme *P. falciparum* est, en général, en quantité considérable (30 000 mérozoïtes dans un seul schizonte intrahépatique !), ces schizogonies continues provoquent à chaque éclatement de corps en rosace une poussée de fièvre, d'où pyrexie continue rémittente ou plus souvent en plateau : fièvre de primo-invasion palustre pouvant durer 1 à 2 semaines, si le malade ne bascule pas dans l'accès pernicieux fatal entre temps.

Puis les cycles se synchronisent et, après quelques oscillations thermiques, surviennent les accès intermittents (toutes les 48 heures) tierce aux jours J1, J3, J5... dite fièvre tierce maligne. Si l'inoculation est faible au départ, la 1^{re} phase de fièvre continue ne peut pas se produire, le seuil pyrétogène n'étant pas atteint) et l'on assiste d'emblée aux accès intermittents, en général, après une incubation de 2 à 3 semaines.

La fièvre continue de primo-invasion n'est donc pas un phénomène constant.

On compte 5 à 6 accès tierce puis ceux-ci deviennent de moins en moins intenses et de plus en plus espacés (certains pics parasitaires étant en-dessous du seuil) pour disparaître enfin, pendant que les anticorps protecteurs s'élaborent sous l'action des parasites intra-érythrocytaires et augmentent progressivement.

Longévité du parasite

Une personne ayant quitté les zones d'endémie peut donc guérir spontanément cliniquement de son paludisme à *P. falciparum* après 6 mois à un an (à côté des évolutions graves et mortelles). Mais pendant ce temps elle reste porteur sain d'une parasitémie résiduelle qui peut se réveiller au cours d'une grossesse, d'un état de choc, d'une opération chirurgicale (en particulier une splénectomie...) ou être responsable d'un paludisme transfusionnel jusqu'à deux années plus tard au maximum.

Au bout de deux ans déjà, cette personne perd ses anticorps et son immunité antipalustre (entretenu par les parasites érythrocytaires) et elle devient apte de nouveau à une nouvelle infection. Cela explique le paludisme des Africains immigrés au retour de vacances passées dans leur pays d'origine après plusieurs années vécues en France.

Les accès de reviviscence schizogonique ou reprises de la schizogonie érythrocytaire (appelés aussi rechutes précoces), dus aux plasmodiums résiduels du sang peuvent être observés vers le 5-6^e et parfois 9^e mois, soit spontanément, soit lorsque certaines circonstances les favorisent.

Les vraies rechutes, tardives, sont absentes avec *P. falciparum*, fait attribué à l'absence de formes exo-érythrocytaires, existantes pour *P. vivax* et *P. ovale*.

HÉMATIES PARASITÉES : ce sont des hématies jeunes de préférence (169 bis) sans être spécialement des réticulocytes.

Taille, forme, couleur : normales. Le pourtour des hématies contenant des grands anneaux peut être plus épais et foncé (165), comme cerclé d'un liséré rouge.

Granulations : Ce sont les taches de Maurer.

« Certaines hématies n'en présentent qu'une ou deux, d'autres sont plus riches, mais leur nombre en est toujours facilement comptable. Leur grosseur est variable. Il y a de petits points et d'autres

qui ont près de 1 μm de diamètre. Elles sont présentes dans les hématies occupées par les formes annulaires les plus grandes (c'est-à-dire les plus âgées) : elles sont moins abondantes ou plus nombreuses dans une hématie dès lors que le parasite est plus petit ou plus grand. Il n'y a qu'une explication satisfaisante à leur présence : c'est la suite de l'agression du parasite pour se procurer de la nourriture. » Nous ajouterons à cette description de Maurer, que leur forme est variable, arrondie, ovalaire, souvent triangulaire et de coloration rouge à rouge brun non uniforme. Nous avons constaté qu'elles sont présentes dans 9 cas sur 10 de paludisme à *P. falciparum* (158) à condition que le frottis ait été coloré avec une eau ayant un pH aux environs de 7,2 (voir page 61). Nous estimons que c'est un des meilleurs éléments diagnostics de l'espèce *P. falciparum*.

PLURIPARASITISME : fréquent : 2-3-4 parasites jusqu'à 7 dans le même globule rouge. C'est dans le paludisme à *P. falciparum* que le polyparasitisme des globules rouges est le plus net, suivi d'assez loin par *P. ovale*. Ce pluriparasitisme est principalement lié à l'abondance des trophozoïtes et a donc une valeur diagnostique différentielle limitée (photos n° 10, 11, 49, 65 et 86).

TROPHOZOÏTES JEUNES : Rappelons qu'un trophozoïte jeune (de n'importe quelle espèce) est en forme de bague à chaton avec un noyau rouge périphérique, un cytoplasme bleu annulaire entourant une vacuole incolore.

Une lame de *P. falciparum* frappe par sa monotonie : on n'y voit que des formes jeunes annulaires : anneaux de petite taille : 1/5 ou 1/3 de l'hématie, graciles et fins (photos n° 12 à 18). Durant un accès, les anneaux sont de petite taille (2 microns) quand la température s'élève, et plus grands (3 microns en moyenne) quand elle est normale, entre deux accès.

Noyau en haltère : le noyau est souvent constitué de deux masses nucléaires, juxtaposées comme des diplocoques, ou reliées entre elles par un pont de chromatine comme des haltères (photo n° 15). Cet aspect du noyau est assez caractéristique.

On ne voit généralement pas de pigment dans le cytoplasme.

TROPHOZOÏTES ÂGÉS : les trophozoïtes se modifient pendant le cycle du parasite : les anneaux sont petits au moment des accès et deviennent plus grands entre les poussées de fièvre (21).

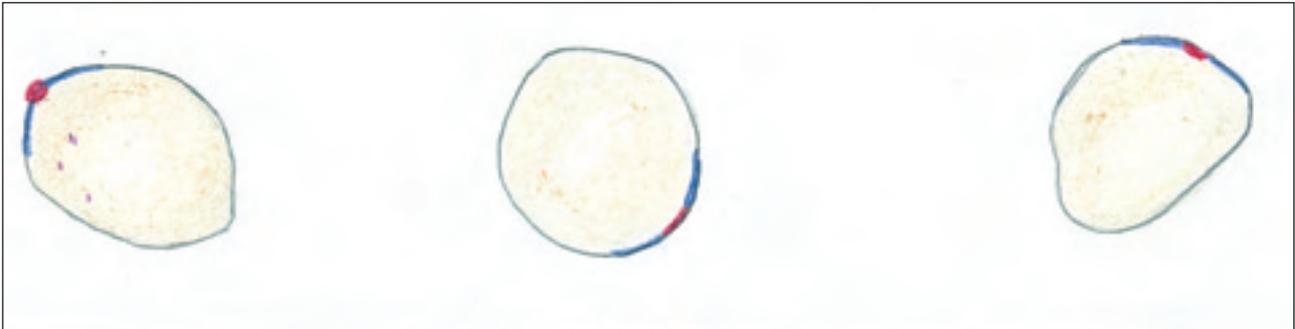
Pigment : Il apparaît, vert-jaune. Dans quelques cas, un grain unique de pigment (photo n° 21) est observé dans une proportion importante d'hématies parasitées par des trophozoïtes. Il convient de ne pas faire alors une confusion avec *P. malariae* ou avec une association *P. malariae/P. falciparum*.

Remarques : chez les sujets des régions endémiques, soumis à de fréquentes réinfections et plus ou moins immunisés, on peut voir des formes plus évoluées, avec un anneau plus grand, plus épais et présence de pigments rares et fins.

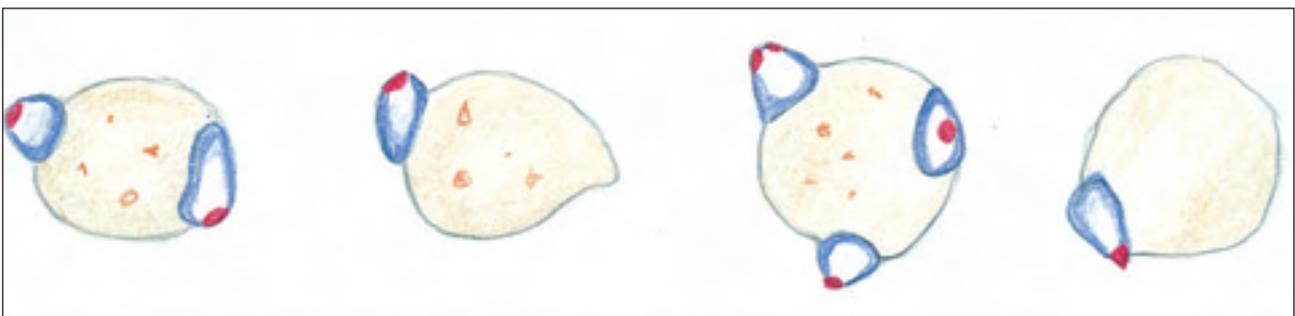
Formes marginales (21) : elles ne s'observent pratiquement que chez *P. falciparum* (photos 18, et 29).



1) L'aspect marginé habituel : le trophozoïte a un cytoplasme en anneau, une vacuole centrale, et le noyau souvent périphérique, ce qui correspond à l'aspect en « bague à chaton » classique. Il est accolé au bord de l'hématie, mais reste totalement à l'intérieur du cercle de celle-ci (photos n° 18 et 29).



2) La forme aplatie : le parasite est aplati sur le bord de l'hématie avec une bande de cytoplasme bleu, sans vacuole. Ce trait est séparé en deux par le noyau rouge. D'autres ont gardé leur forme normale mais déforment l'hématie provoquant une excroissance (photo n° 17).



3) Formes extra-terrestres (157) : ce sont des formes qui sortent de l'orbite normal de l'hématie dont la plus grande partie est située en dehors du bord normal de l'hématie. Leur proportion varie de moins de 1 % à 5 % des trophozoïtes de *P. falciparum*. L'irrégularité de leur présence n'est pas lié à l'origine géographique de la souche. L'hypochromie des hématies est assez fréquente (photos n° 28 et 29).

SCHIZONTES

En règle générale, il n'y a pas de schizontes dans le sang périphérique, sauf en cas d'accès pernicieux où l'on voit des schizontes jeunes à 2-4-8 noyaux pourvus d'un pigment en général dispersé. Ils sont trouvés dans 7 % des cas quand la parasitémie est inférieure à 5 000/ μ l et dans 62 % quand elle est supérieure à 500 000/ μ l (21). Il y a également présence de schizontes dans le sang périphérique chez les malades splénectomisés. Il y a, exceptionnellement, de rares schizontes dans le sang périphérique d'affections moyennes et cela peut être en relation avec un état d'immunité. De très rares schizontes (en moyenne 10 par μ l) sont présents dans le sang périphérique de 50 % des cas, lors de la période aiguë de primo-invasion, une semaine environ après le début des manifestations cliniques. Ils restent présents quelques jours seulement, 4 en moyenne (172). Ils sont souvent trop peu nombreux pour être trouvés à l'examen microscopique habituel.

Dans le sang capillaire des organes profonds, on trouve des schizontes mûrs ou rosaces qui sont de petite taille : ils occupent un peu plus de la moitié de l'hématie. Ils contiennent de nombreux mérozoïtes à noyaux arrondis et fins : 18 à 20 en général, mais pouvant atteindre 24 ou plus. Le pigment se concentre en une grosse masse unique au centre de la rosace.

Les schizontes et les gamétocytes jeunes de *P. falciparum* sont des éléments exceptionnellement rencontrés sur un frottis de sang, sauf dans certains cas d'accès pernicieux où le parasitisme souvent très intense permet facilement le diagnostic d'espèce. Le problème est de savoir ne pas prendre ces *P. falciparum* insolites pour *P. malariae* ou *P. ovale* et de conclure à une association de 2 ou 3 espèces sur la même préparation.

SCHIZONTES JEUNES : un peu plus grands que les trophozoïtes annulaires de la lame, ils présentent un cytoplasme en général massif, quelquefois avec encore un petit reste de vacuole et coloré en bleu intense. Les noyaux sont mal individualisés. On remarque surtout un amas dense, unique, de pigment brun foncé qui grossit au fur et à mesure que le parasite avance en âge, il est parfois divisé en 2 ou 3 masses (photos n° 30 à 33).

ÉVOLUTION DU SCHIZONTE : le schizonte est un amas cytoplasmique arrondi, compact, coloré en bleu foncé, occupant environ 1/3 de l'hématie au moment de la première division, puis gagnant les 2/3 de l'hématie ou plus lorsque cette division est complète.

Les masses nucléaires rouges se voient mal, noyées dans un cytoplasme très bleu. Elles sont au début, de structure lâche, de forme irrégulière et de taille variable. Plus tard, les masses nucléaires deviennent plus petites, plus régulières et plus denses.

Le pigment n'a pas changé depuis le début ; un seul amas, brun foncé occupant n'importe quelle position.

Le corps en rosace ou schizonte mûr renferme 15 à 30 mérozoïtes, en moyenne 20, chaque mérozoïte a un cytoplasme et un noyau bien individualisé. Le pigment est toujours réuni en une masse unique (photos n° 34 à 38).

GAMÉTOCYTES

La présence de gamétocytes est inconstante, comme pour les autres plasmodiums. Chez *P. falciparum* en particulier, les gamétocytes n'apparaissent qu'une dizaine de jours après le début de la fièvre (21), si bien qu'on ne les voit pas dans les cas de paludisme de primo-invasion ou d'accès pernicieux d'emblée. Par contre, lorsqu'on voit ces gamétocytes, on peut en déduire que

le paludisme a évolué depuis au moins plusieurs semaines. Ils disparaissent 2 à 3 semaines après la chute de la fièvre (21).

GAMÉTOCYTES JEUNES (photos n° 40 et 41) : les gamétocytes de *P. falciparum* se développent lentement (en une dizaine de jours) dans la moelle osseuse et dans la rate. Ils proviennent des gamontes (159). La présence de jeunes gamétocytes dans le sang périphérique est un élément de mauvais pronostic.

Les jeunes gamétocytes occupent environ le tiers, puis la moitié de l'hématie. Ils sont arrondis, compacts (dépourvus de vacuoles) colorés en bleu pâle (ce qui les différencie des jeunes schizontes qui sont bleu foncé). Le noyau est plus ou moins gros, unique, pâle et flou. Le pigment est fin, souvent en bâtonnet et dispersé, de couleur brun clair.

Les gamétocytes jeunes contiennent assez souvent un corps de Garnham (photo n° 41) (162) d'origine chromatinienne, de forme allongée, élliptique ou circulaire, pouvant atteindre une longueur de la moitié de l'hématie.

Plus tard, ce sont des éléments plus grands (2/3 de l'hématie) à cytoplasme bleu pâle, à noyau flou avec une chromatine dispersée, et de nombreux grains de pigment dispersés aussi. On note parfois une condensation cytoplasmique sur la périphérie donnant l'aspect d'une capsule.

GAMÉTOCYTES MÛRS (photos n° 42 à 47)

Forme : typique, en banane, en croissant, en faux (d'où le nom du parasite), d'abord intracellulaire (un petit liseré d'hématie dans la partie concave du gamétocyte), le gamétocyte devient ensuite libre lorsque l'hématie est lysée.

Ils n'ont pas de taches de Maurer (21).

Gamétocyte femelle (= macrogamétocytes) : cytoplasme bleu
noyau condensé au centre
pigments rassemblés au centre recouvrant le noyau

Gamétocyte mâle (= microgamétocytes) : cytoplasme violet bleu, lilas
noyau sous forme de masses chromatiniennes dispersées le long du grand axe
pigments essaimés dans tout le cytoplasme

Il y a 4 gamétocytes femelles pour un mâle. Ils persistent dans le sang pendant 3 semaines après traitement par Chloroquine, ce qui peut permettre le diagnostic rétrospectif de la maladie (170).

La longévité des gamétocytes est de 3 semaines environ. Notons que ces formes sexuées qui se développent lentement dans les organes profonds apparaissent plus nombreuses dans le sang périphérique dans les jours qui suivent un traitement par le Fansidar®.

NOTE : Les gamétocytes peuvent prendre une forme ovale ou même ronde quand le frottis – et surtout la goutte épaisse – sèchent lentement. Ces gamétocytes arrondis sont souvent des gamétocytes mâles qui sont sur le point de s'exflageller. Il ne faut pas les prendre pour *P. malariae* à cause de la forme massive et de l'abondance des pigments. Il suffit pour ne pas faire d'erreur de remarquer que ces éléments sont libres et non inclus à l'intérieur d'une hématie.

LE PALUDISME PERNICIEUX (GRAVE) (photos n° 48 à 59)

Correspond à « des formes cliniques graves, souvent mortelles, de paludisme à *P. falciparum*, observées chez les individus non immuns des régions d'endémie (enfants, immigrants) et au cours des poussées épidémiques dans les régions de paludisme saisonnier. Le risque de paludisme pernicieux diminue avec les progrès de la prémunité chez l'individu exposé. Du point de vue parasitologique, le paludisme pernicieux est caractérisé par la présence de nombreux trophozoïtes dans le sang circulant et de formes de segmentation dans les capillaires profonds, où elles provoquent des blocages conditionnant la symptomatologie ».

Severe falciparum malaria (166) = accès pernicieux à *P. falciparum* ces deux termes peuvent être considérés comme voisins, accès pernicieux étant utilisé dans les pays francophones.

Il y a plus d'un million de morts par an dus à *P. falciparum* dont plus de 90 % sont des enfants africains. Les manifestations cliniques en sont prostration ou coma, détresse respiratoire, convulsions, collapsus circulatoire, œdème pulmonaire, insuffisance rénale chez l'adulte surtout.

Sur le plan biologique :

Hémoglobine : anémie grave < 5 g dl

Hypoglycémie : glycémie $< 2,2$ mmol/L

Acidose : bicarbonate dans le plasma < 15 mmol/L, pH $< 7,35$

Hyperparasitémie : d'une manière générale il existe une importante relation entre le taux de mortalité par *P. falciparum* et la parasitémie (161). Chez les personnes non immunisées, ce sont surtout les enfants ayant une parasitémie > 4 % qui comportent un risque de mort. Chez les personnes immunisées une parasitémie ≥ 20 % indique un accès pernicieux.

Habituellement, un sang d'accès pernicieux (donc grave) se caractérise par trois faits de mauvais pronostic :

– la quantité d'hématies parasitées : $150.000/\mu\text{l}$ (= 5 à 7 %) au moins avec, par conséquent, des hématies polyparasitées nombreuses (21) (photos n° 48 à 59).

– la présence dans le sang périphérique de schizontes, formes de division à 2, 4, 6, 8 noyaux et plus (photos n° 53 et 57).

– la présence de gamétocytes jeunes (photos n° 54, 56, 57, 58 et 59).

Devant un des deux premiers critères de gravité cités plus haut, le biologiste doit :

– prévenir d'urgence le médecin traitant, par téléphone et par écrit (fax),

– lui indiquer qu'il s'agit de *P. falciparum* (et non de « Plasmodium » tout court),

– lui préciser le nombre ou pourcentage d'hématies parasitées, car plus le pourcentage est élevé, plus le cas est grave (10-20-30 %), le record semble être de 72 % (160).

– signaler que l'aspect du sang suggère le diagnostic d'accès grave sinon d'accès pernicieux.

La vie du malade dépend d'abord de la rapidité avec laquelle le biologiste fait l'examen et de la sûreté du diagnostic parasitologique.

Il faut se souvenir aussi que l'accès pernicieux peut survenir malgré la prise d'antipaludique : le médicament a fait disparaître une partie des parasites du sang mais l'accès pernicieux évolue pour son propre compte. Donc, ne pas rejeter le diagnostic d'accès pernicieux sous prétexte que les parasites sont peu abondants dans le sang ou qu'il n'y a pas de schizontes.

Il est enfin absolument faux de dire qu'il n'y a pas du tout de parasites lorsqu'il s'agit d'accès pernicieux, à moins d'une prise massive et récente d'antipaludique qu'on retrouve facilement à l'interrogatoire.

Par contre, il est classique qu'il y ait peu ou pas de plasmodium en cas de fièvre bilieuse hémoglobininurique, entité clinique liée à l'utilisation de la quinine, qui n'est plus utilisée en chimioprophylaxie du paludisme. Ainsi, lorsqu'on découvre de nombreux parasites au cours de manifestations associant fièvre, anémie, ictère, vomissements bilieux, urines rouges, il faut penser plutôt à une forme grave proche de l'accès pernicieux, la fièvre rémittente bilieuse et prescrire d'urgence un traitement par la quinine qui est contre-indiquée dans la vraie fièvre bilieuse hémoglobininurique.

VARIÉTÉS DE *P. FALCIPARUM*

De nombreuses variétés de *P. falciparum* ont été décrites autrefois, parfois en fonction de différences géographiques. Les variations diverses de l'hôte (immunité, splénectomie, hémoglobinopathies...) peuvent jouer un certain rôle dans les différences de morphologie qui ont pu être interprétées comme des espèces, ou des sous-espèces différentes.

– *Plasmodium tenue* (photos n° 60 et 61) : Le *Plasmodium tenue* a été décrit en Inde (171), retrouvé en Afrique et en Iran. Il est caractérisé par de jeunes trophozoïtes de forme amiboïde, très variables. Le cytoplasme est réduit et la chromatine nucléaire très importante. L'existence de cette espèce a été critiquée, en particulier parce qu'elle coexiste avec des aspects habituels de *P. falciparum* sur le même frottis : ces formes sont en particulier observées en fin de frottis. Plusieurs auteurs considèrent que c'est une « distorsion » (= artéfact) des trophozoïtes de *P. falciparum* (21). Cela peut également s'expliquer par l'association *P. vivax* et *P. falciparum* sur le même frottis (169).

– *Plasmodium falciparum*, var. *Malaysienne* (21).

– *Plasmodium falciparum*, var. *Éthiopienne* (= *P. immaculatum*) (164) : fréquence des anneaux de grande taille, pigment rare et d'apparition tardive, schizontes trouvés dans le sang périphérique en dehors des accès pernicieux, gamétocytes moins longs et plus larges surtout pour les mâles.

LE SANG DANS LE PALUDISME À *P. FALCIPARUM*

Le paludisme à *P. falciparum* de première invasion se présente peu souvent sous la forme d'accès intermittents typiques, mais plutôt sous la forme d'une fièvre élevée, continue, en plateau après une incubation de 15 jours en moyenne (voir Physiopathologie).

Il s'accompagne d'une hyperleucocytose (15 à 20.000 leucocytes/ μ l) avec polynucléose neutrophile (80 à 90 %), et avec présence de plasmocytes typiques et de granulocytes mélanifères.

La splénomégalie est absente et n'apparaît que plus tard après plusieurs accès francs intermittents.

Il faut bien connaître ces manifestations non classiques afin de ne pas rejeter le diagnostic de paludisme en faveur d'une infection bactérienne.

À ce stade, le parasite est toujours présent en grande abondance dans le sang, sauf si le malade a pris un antipaludique capable de détruire une bonne partie des parasites du sang mais incapable d'arrêter la marche inexorable du syndrome malin. Rechercher dans ce cas les leucocytes mélanifères qui persistent après la disparition des parasites.

Après la fièvre d'invasion en plateau surviennent les accès intermittents dits « tierce » revenant toutes les 48 heures. Au moment des accès, on trouve aussi une certaine leucocytose avec polynucléose, mais dans l'intervalle, on constate le plus souvent une leucopénie avec monocytose.

Dans les pays d'endémie palustre, la population présente habituellement une leucopénie assez importante.

Le sang contient de nombreux parasites pendant 16-18 heures après l'accès, mais après ce délai, les parasites passent dans les organes profonds pour se diviser si bien qu'ils deviennent moins nombreux dans le sang périphérique.

À cause de ce phénomène, qui n'existe pas chez les autres Plasmodiums, il est parfois difficile de mettre en évidence *P. falciparum* dans certains cas chroniques. On conseille alors :

- la goutte épaisse,
- le prélèvement immédiatement après l'accès de fièvre (s'il existe des accès typiques) accès qui correspond à l'éclatement des rosaces et à la libération de nouveaux parasites dans le courant sanguin.

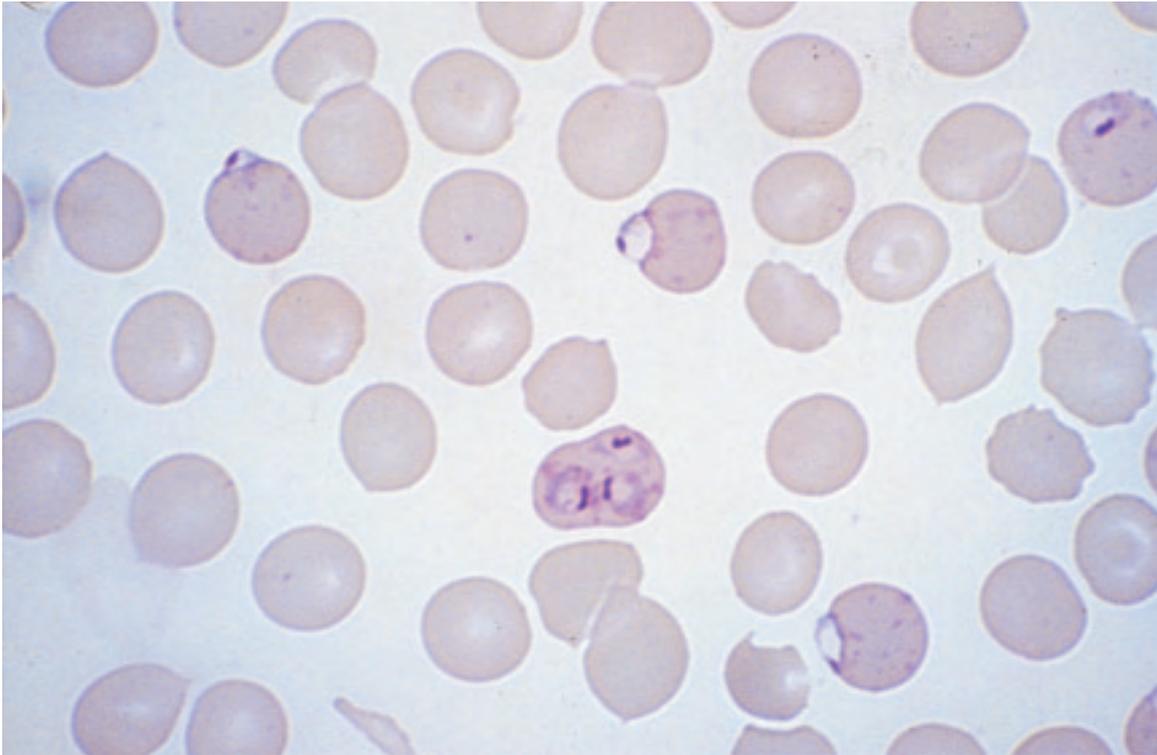


Photo n° 10 : Plasmodium falciparum. Frottis. Pluriparasitisme, une hématie parasitée par trois trophozoïtes. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

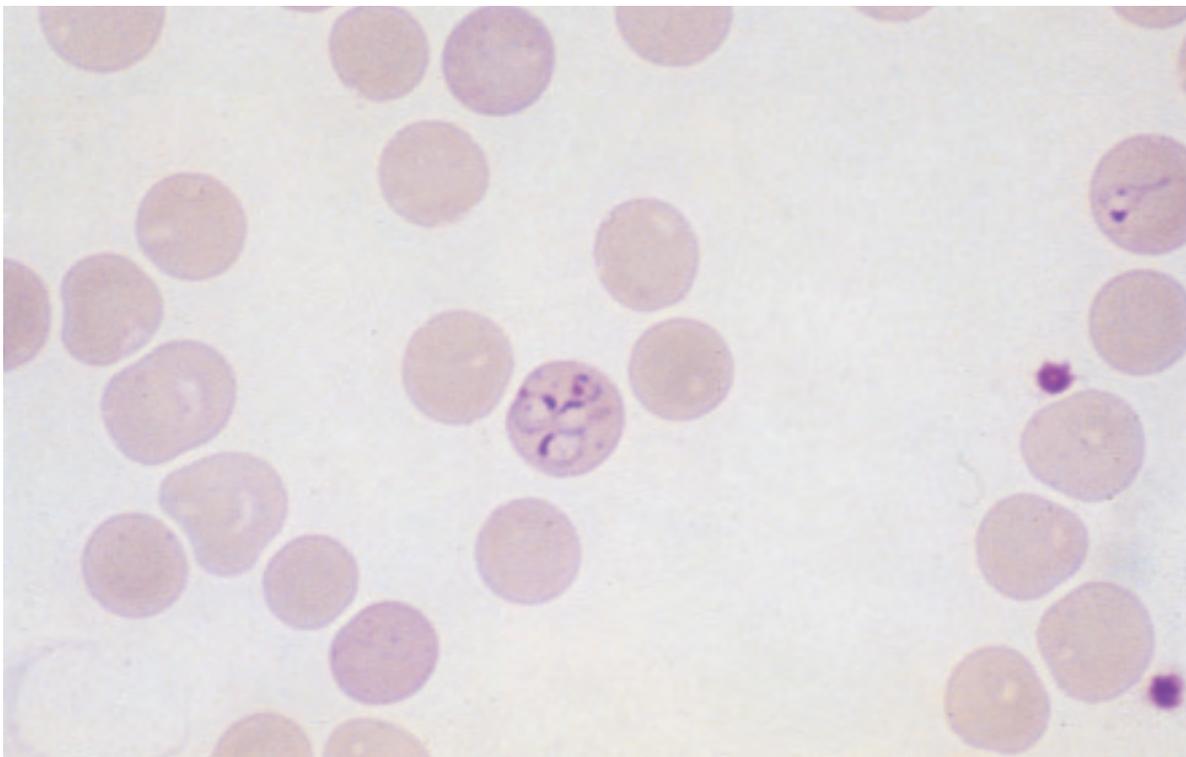


Photo n° 11 : Plasmodium falciparum. Frottis. Hématie parasitée par quatre trophozoïtes. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

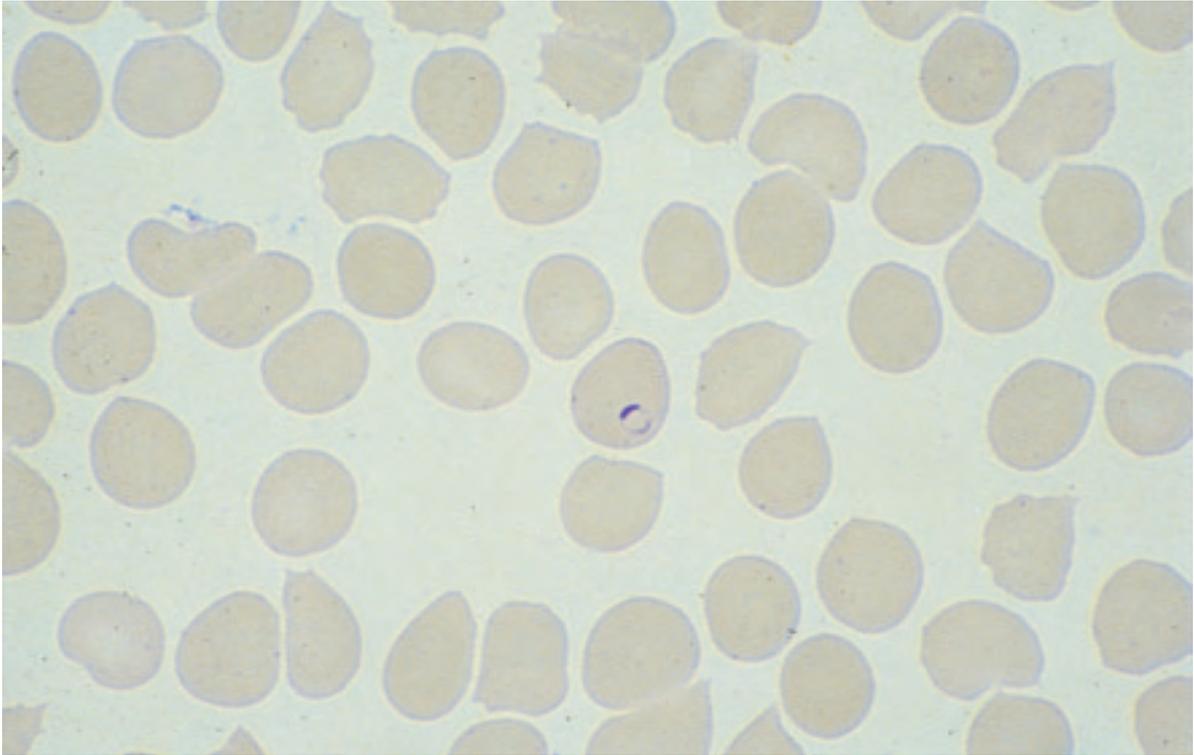


Photo n° 12 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Trophozoïte jeune de petite taille, noyau allongé, absence de taches de Maurer. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

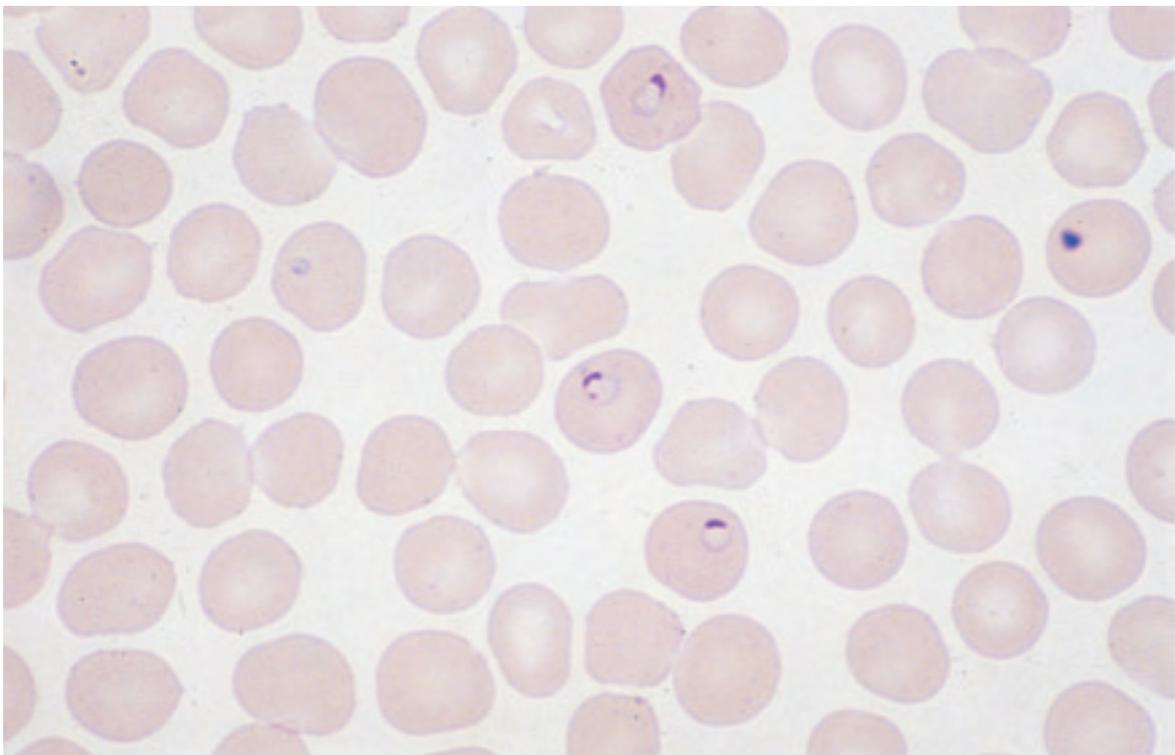


Photo n° 13 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Trois jeunes trophozoïtes, absence de taches de Maurer. Hématies de taille normale. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

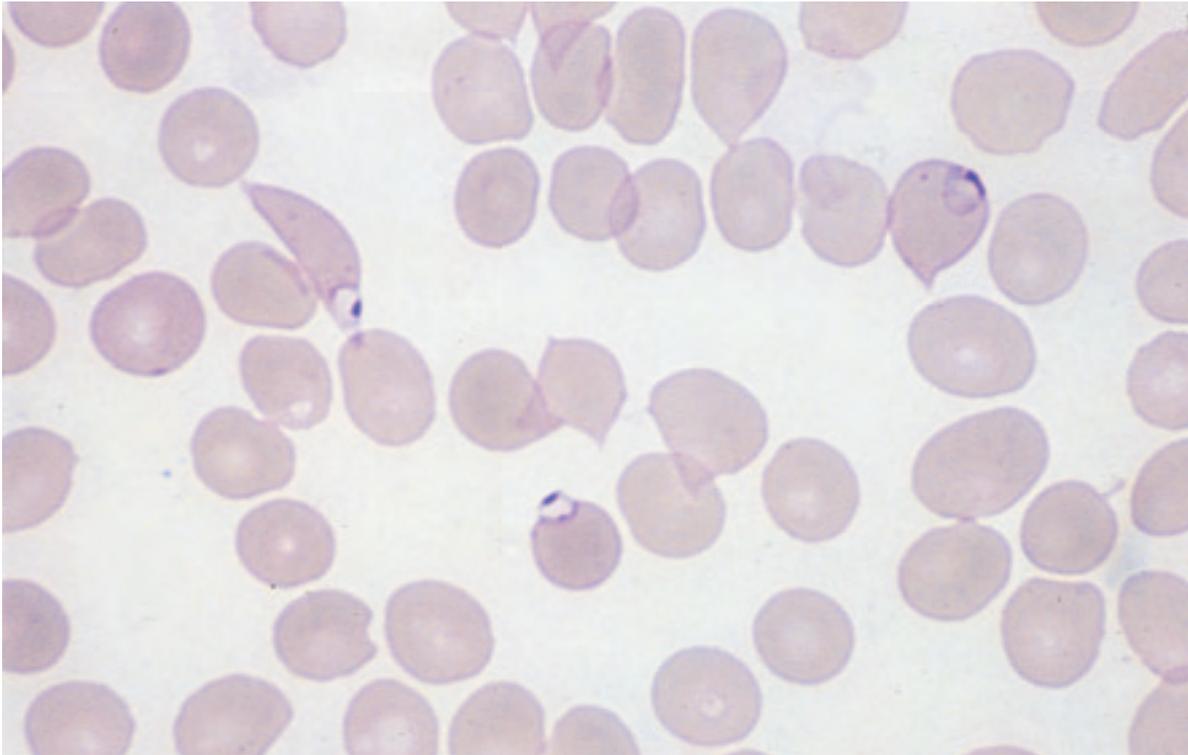


Photo n° 14 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Une hématie en forme de faux, parasitée par un jeune trophozoïte, une 2^e hématie parasitée par un trophozoïte extra-terrestre, la 3^e hématie parasitée par un trophozoïte plus âgé. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

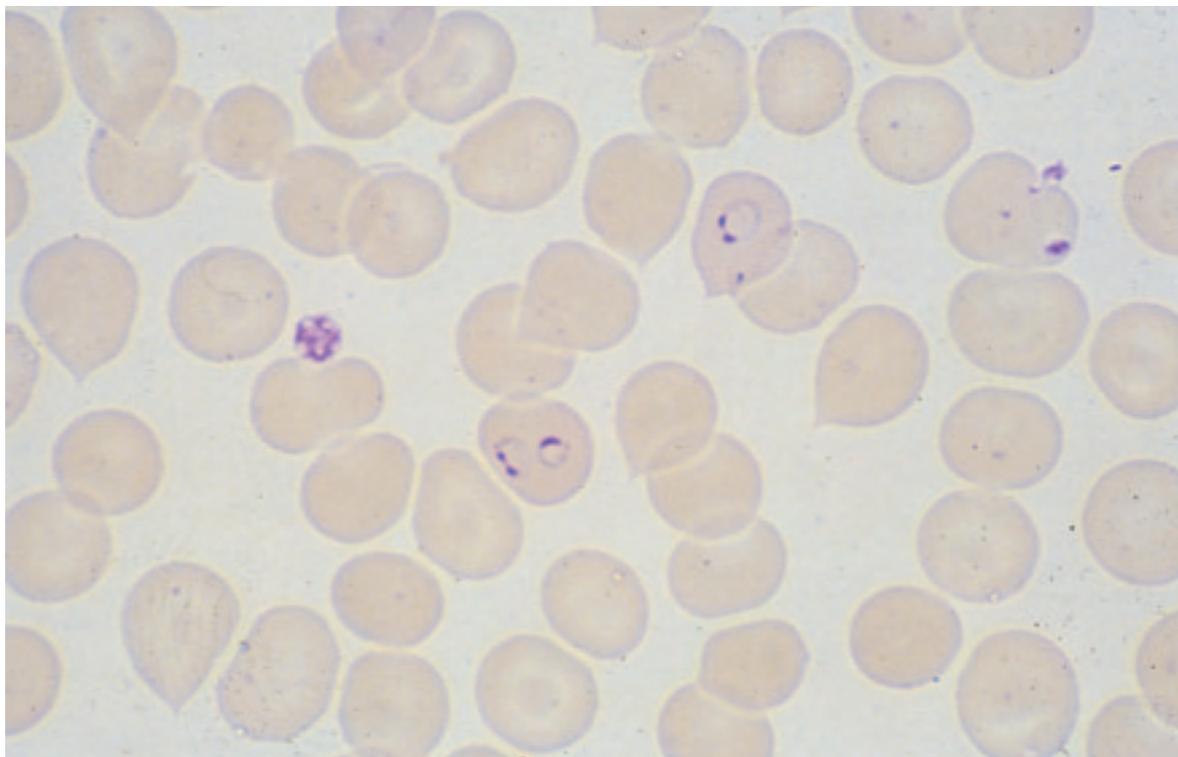


Photo n° 15 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Une hématie biparasitée par un trophozoïte jeune et un autre avec un noyau en haltère. Une deuxième hématie parasitée par un trophozoïte avec noyau en haltère. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

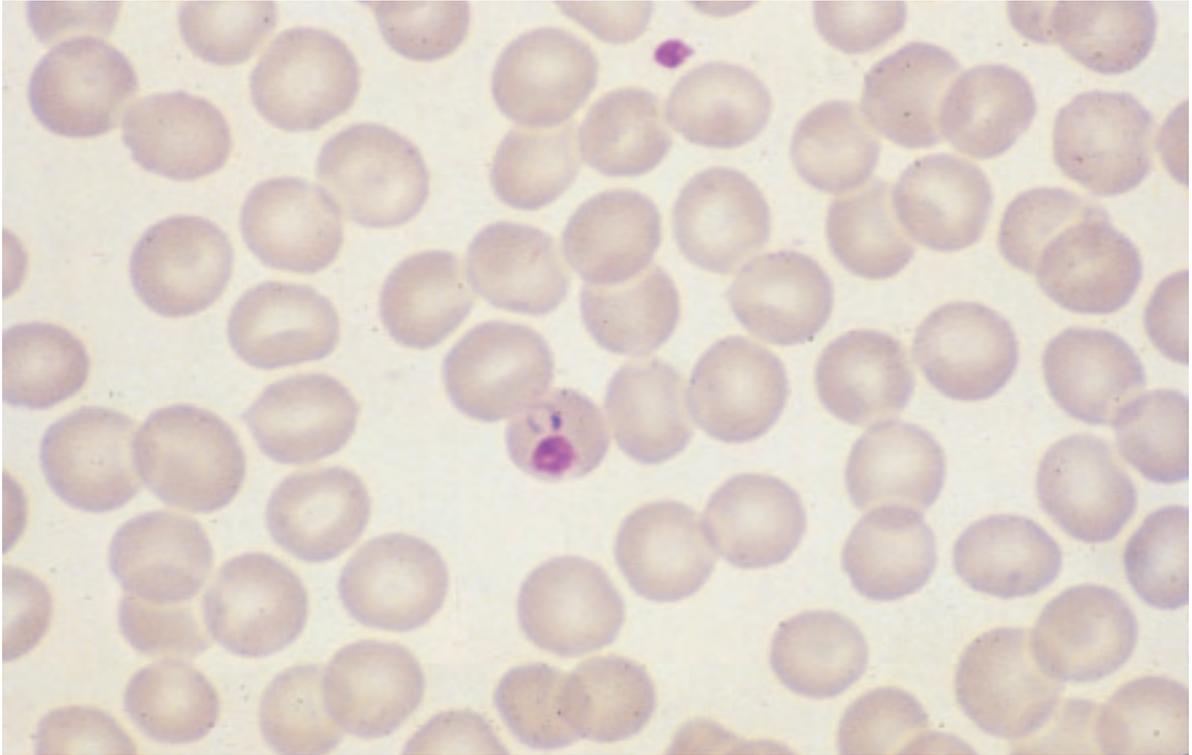


Photo n° 16 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Trophozoïte jeune avec plaquette sur l'hématie parasitée. Comparer la morphologie de la plaquette et du trophozoïte. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

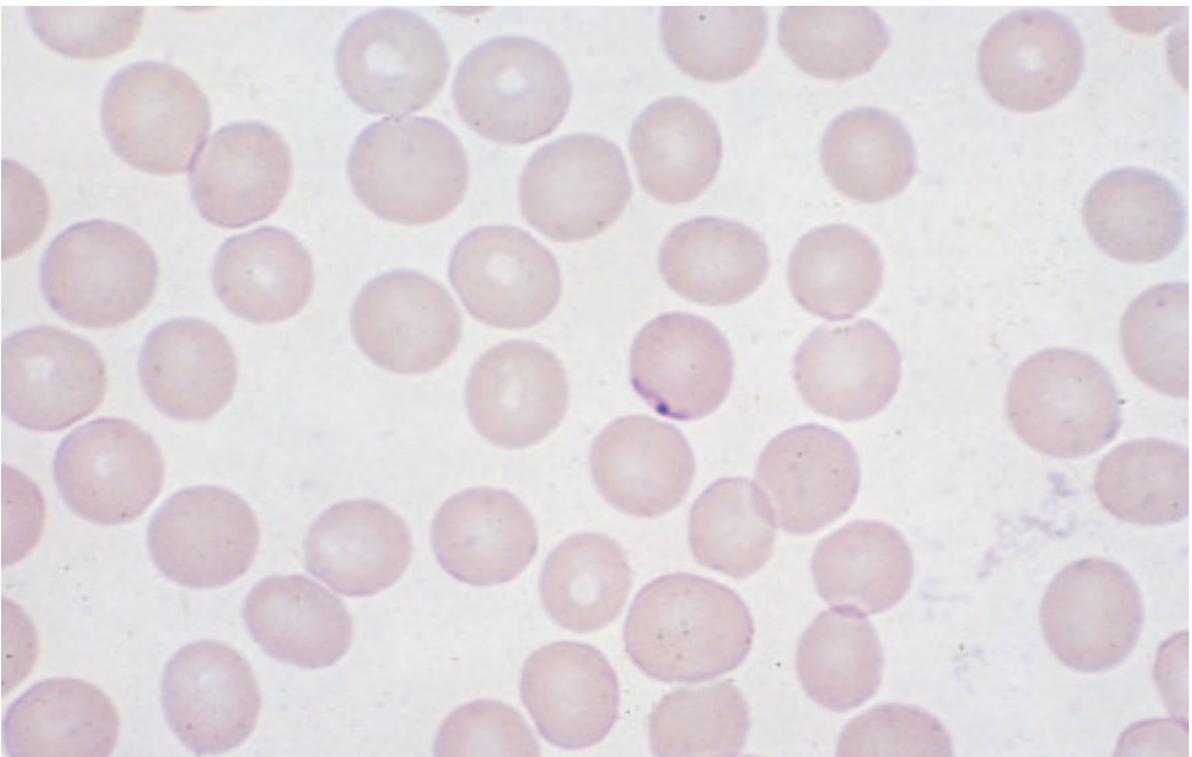


Photo n° 17 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Trophozoïte de forme aplatie. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

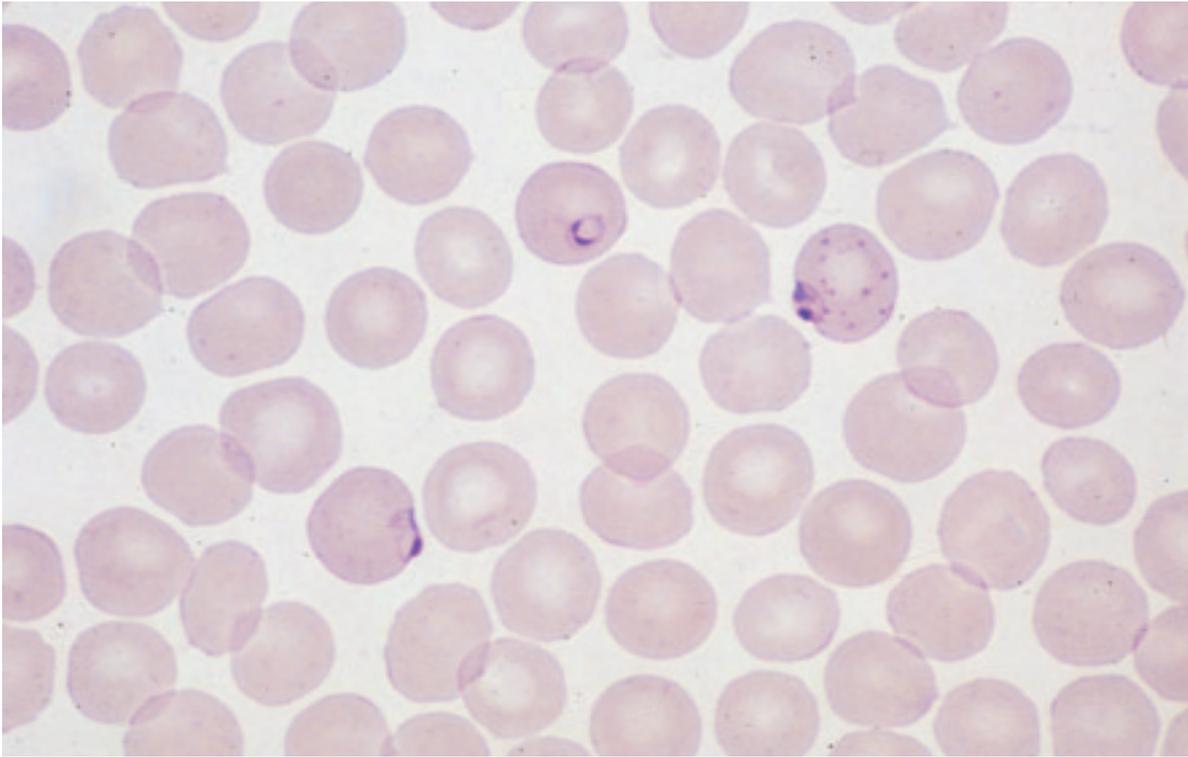


Photo n° 18 : Plasmodium falciparum. Frottis. Deux hématies parasitées par des trophozoïtes jeunes, dont un marginé. Une hématie parasitée par un trophozoïte âgé avec taches de Maurer. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

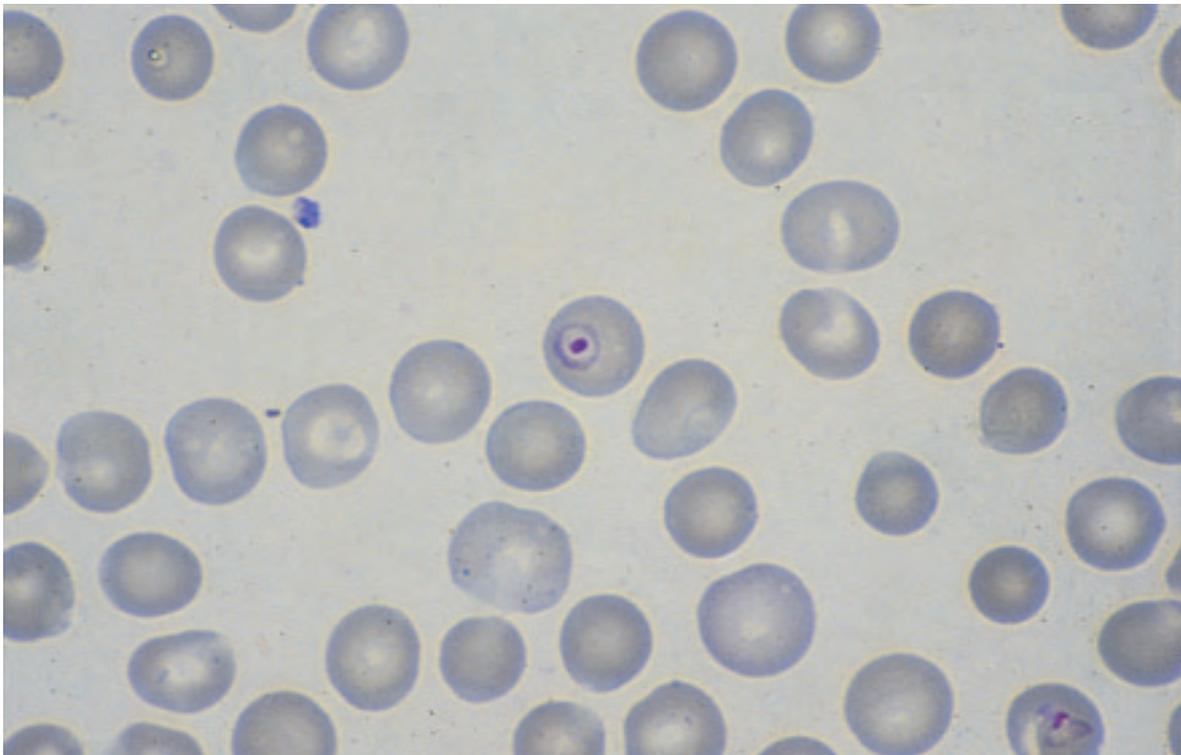


Photo n° 19 : Plasmodium falciparum. Frottis. Trophozoïte en cocarde. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

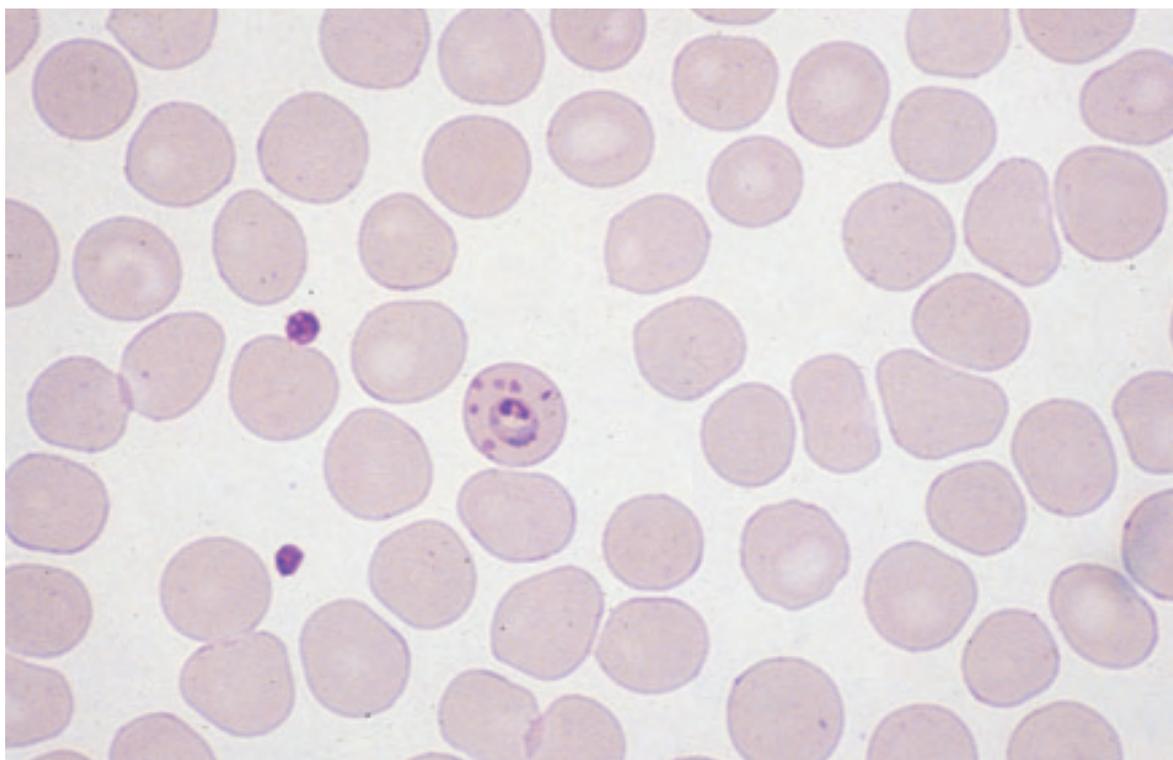


Photo n° 20 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Hématie parasitée, de taille normale, avec six grosses taches de Maurer, trophozoïte âgé. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

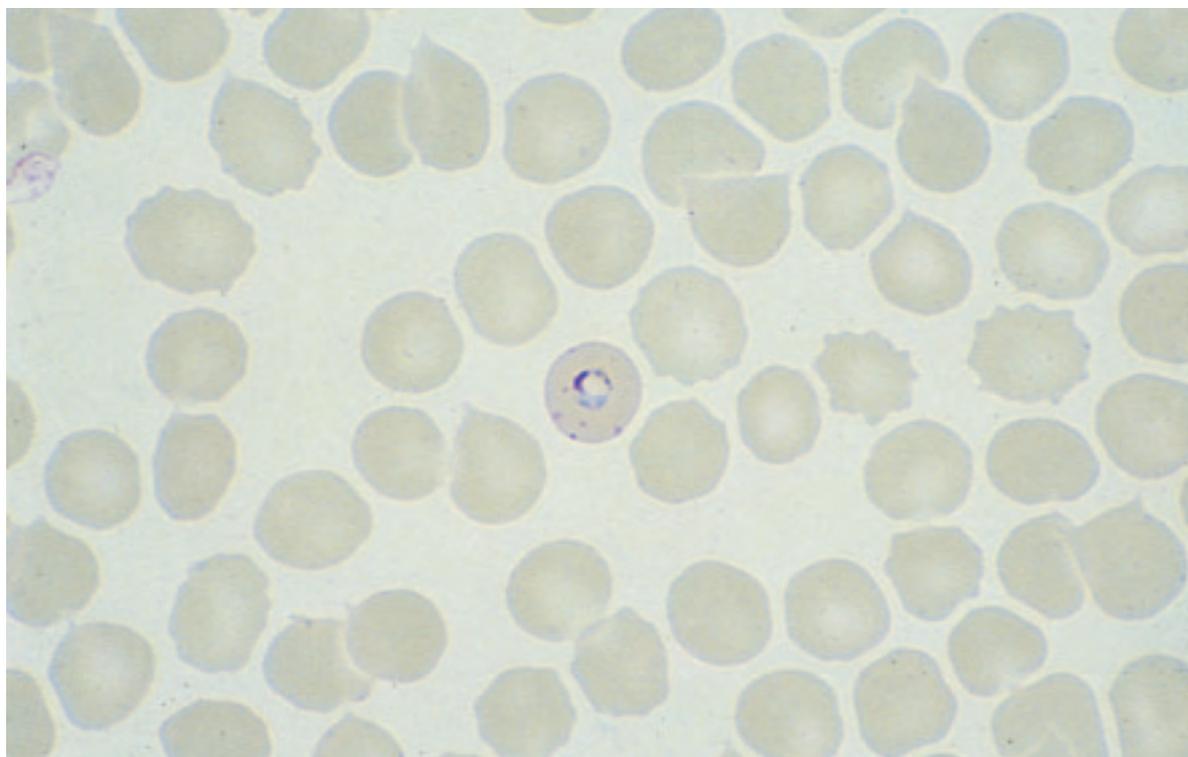


Photo n° 21 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Trophozoïte âgé avec un grain de pigment. Cet aspect est parfois diagnostiqué comme trophozoïte de *Plasmodium malariae*. Les taches de Maurer éliminent ce diagnostic. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

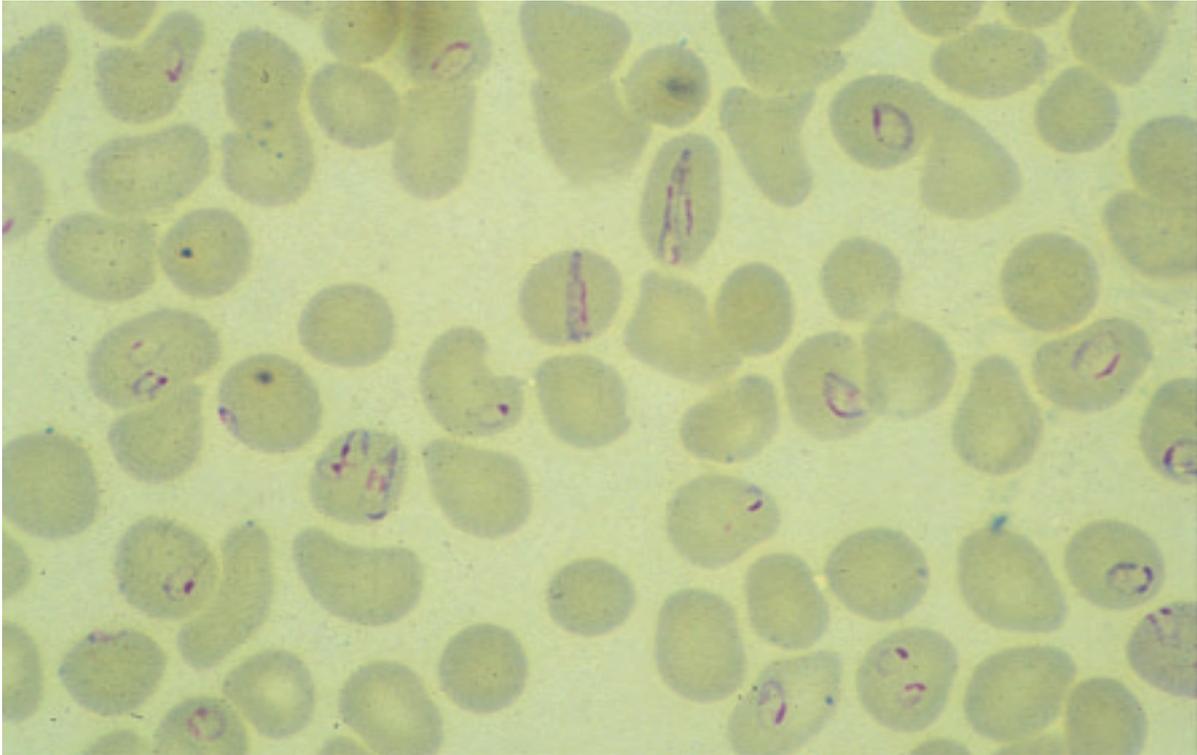


Photo n° 22 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Plusieurs trophozoïtes en fausses bandes équatoriales sans pigment, ce qui élimine le diagnostic de *P. malariae*.
Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

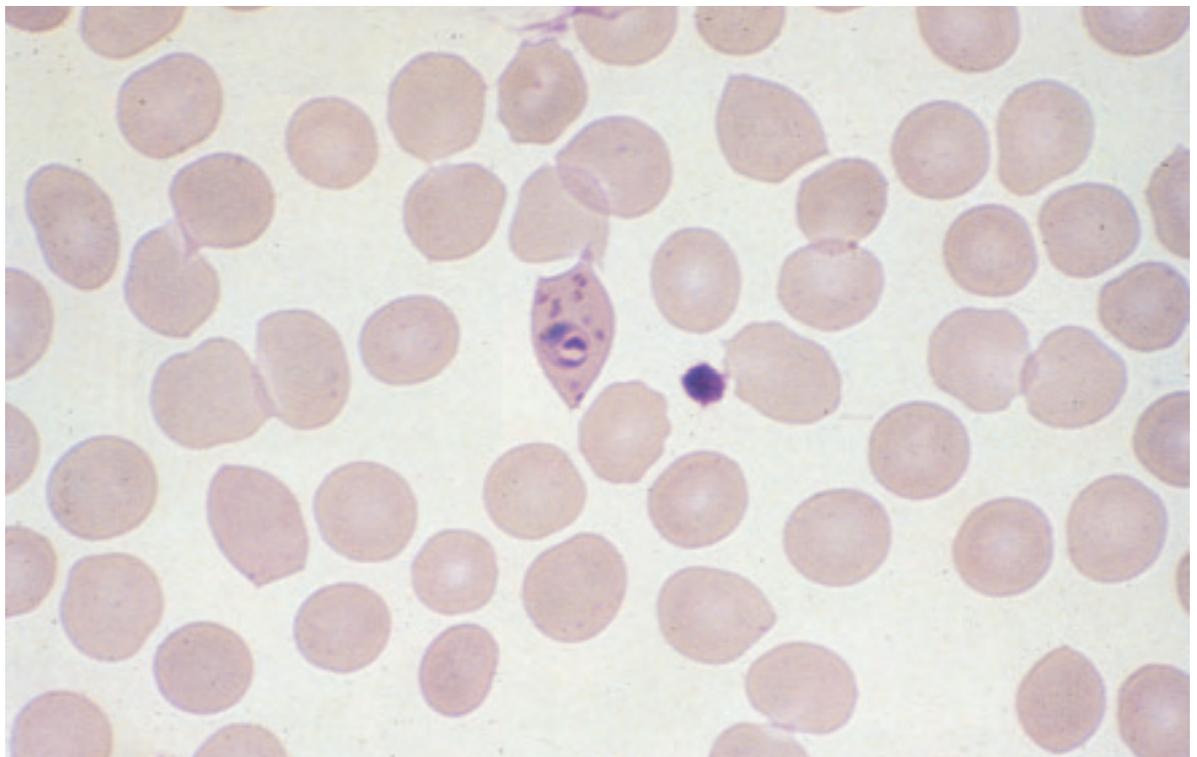


Photo n° 23 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Hématie ovalisée, trophozoïte âgé avec présence de taches de Maurer, ce qui élimine le diagnostic de *Plasmodium ovale*.
Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

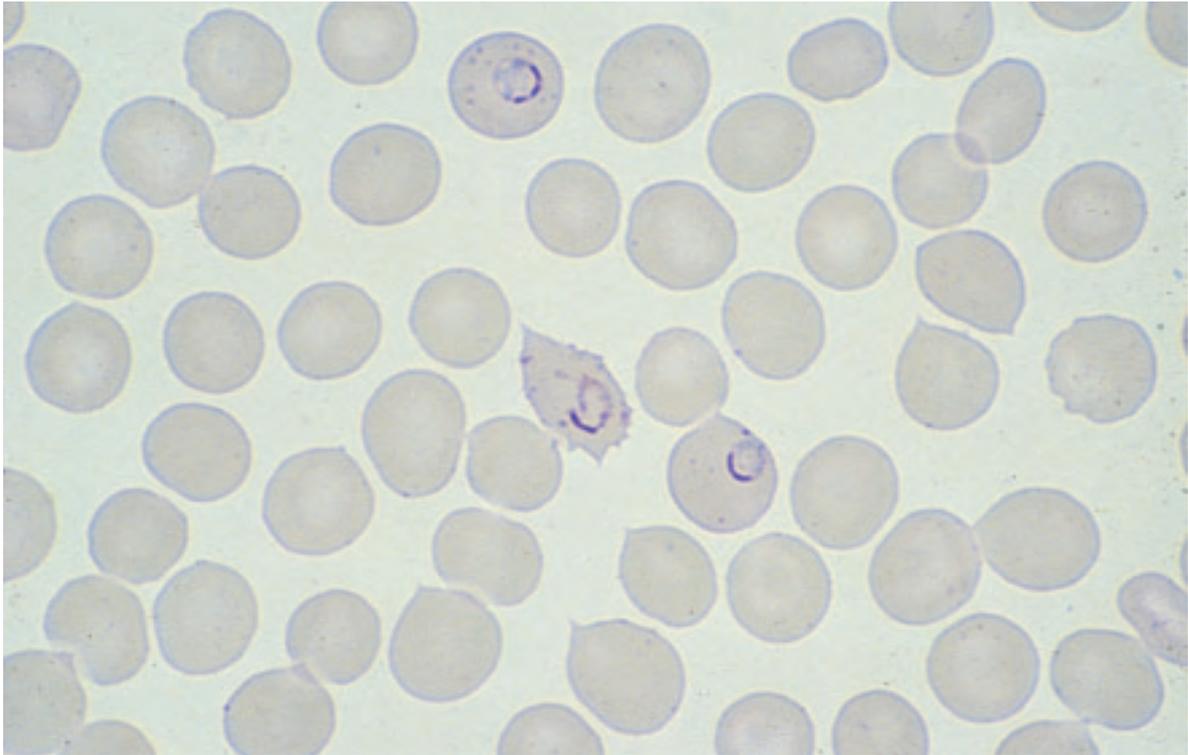


Photo n° 24 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Trois hématies dont une ovalisée, parasitées par des trophozoïtes âgés avec présence de taches de Maurer. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

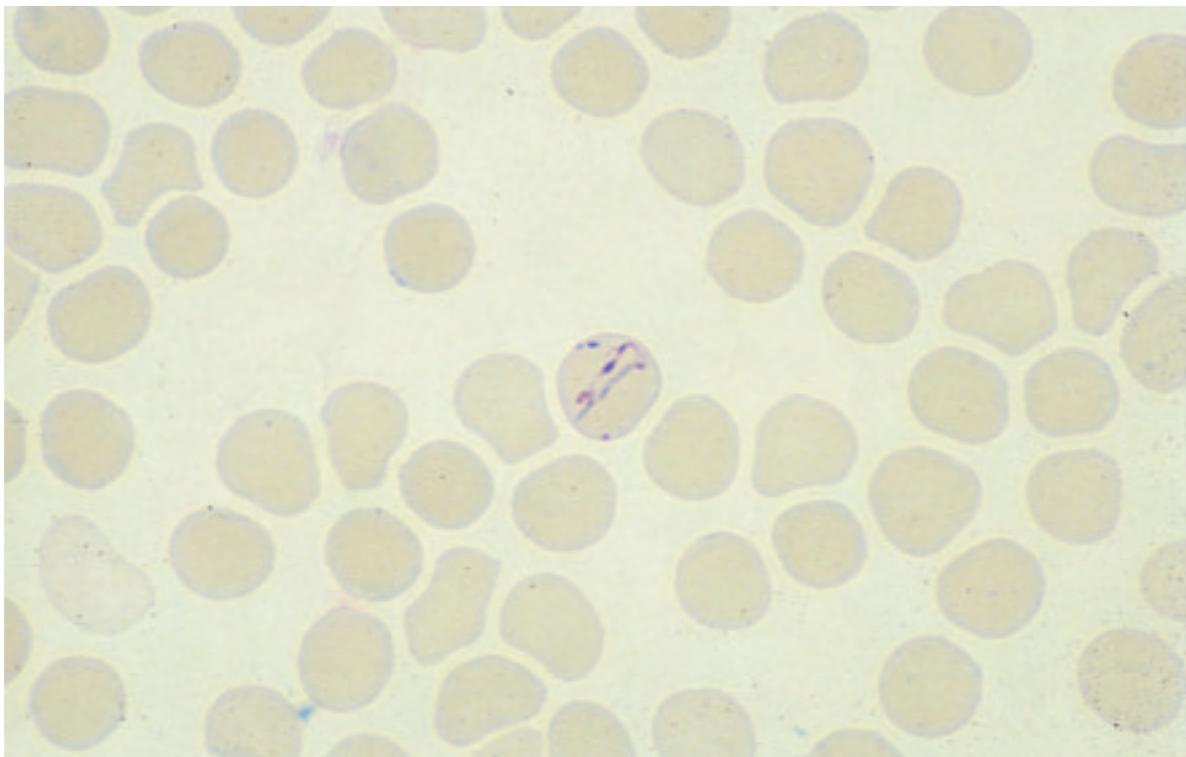


Photo n° 25 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Hématie parasitée par un trophozoïte âgé en bande équatoriale. Absence de pigment, présence de taches de Maurer. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

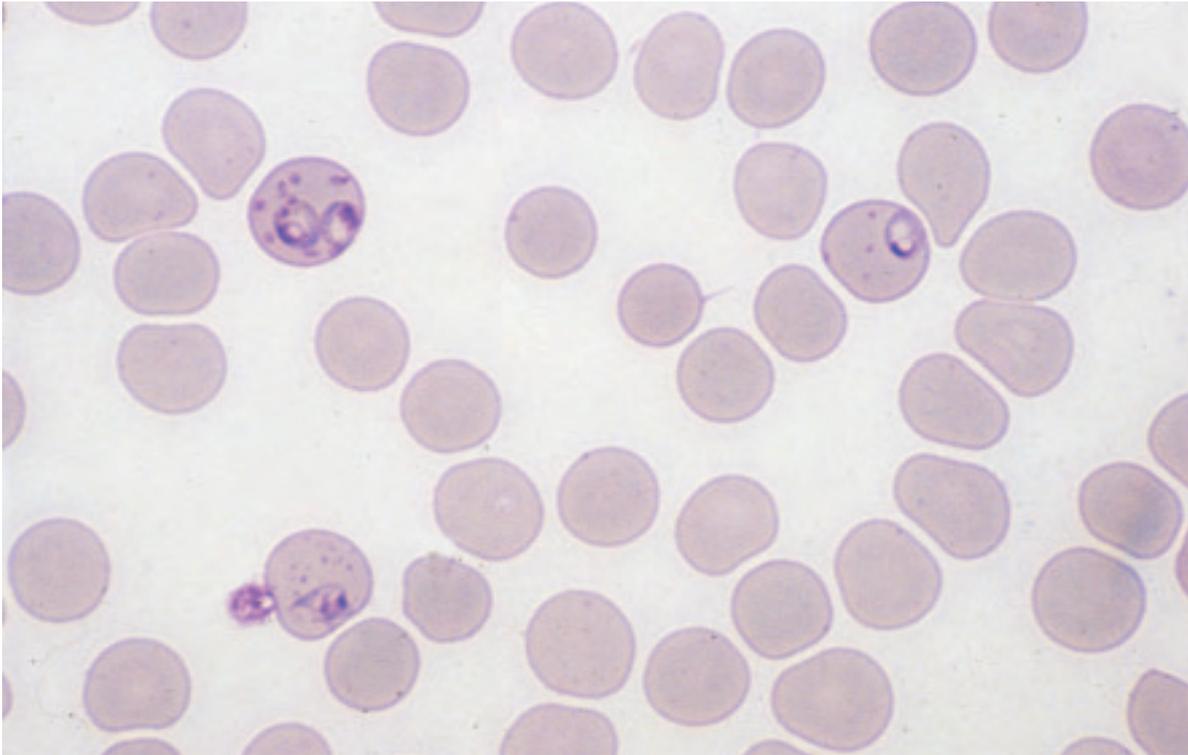


Photo n° 26 : Plasmodium falciparum. Frottis. Trois hématies avec taches de Maurer, parasitées par des trophozoïtes âgés. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

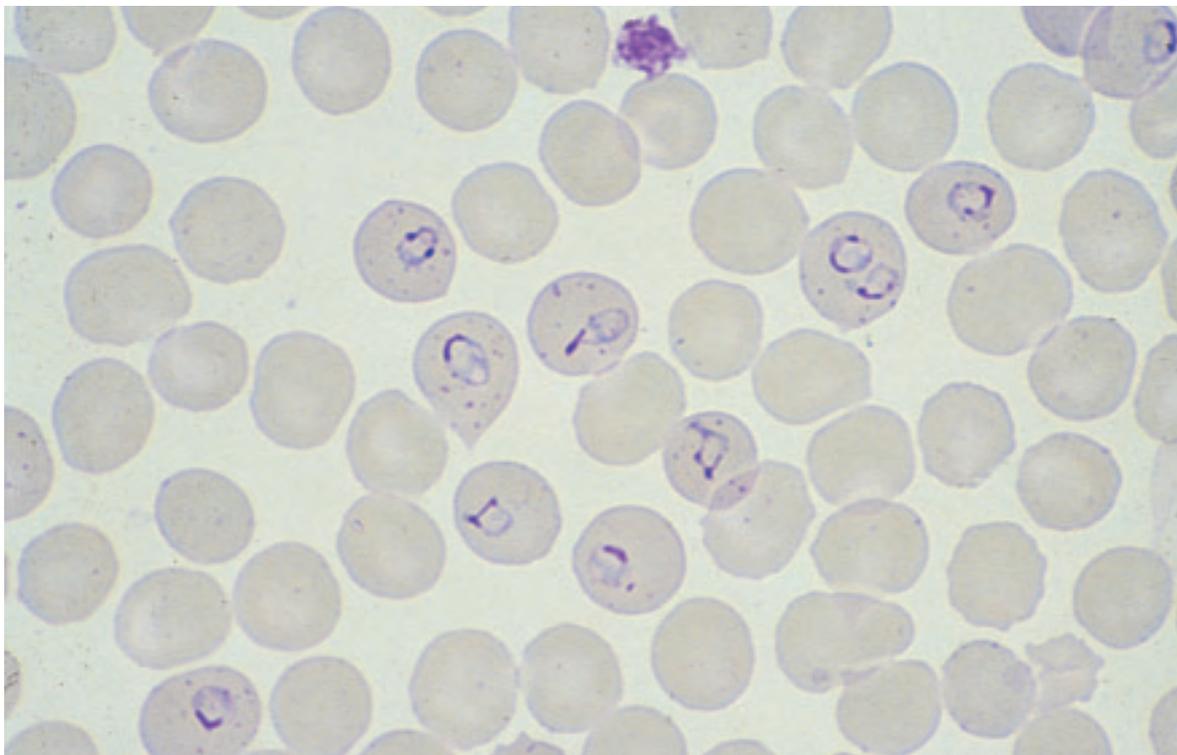


Photo n° 27 : Plasmodium falciparum. Frottis. Neuf hématies avec taches de Maurer, parasitées par des trophozoïtes âgés. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

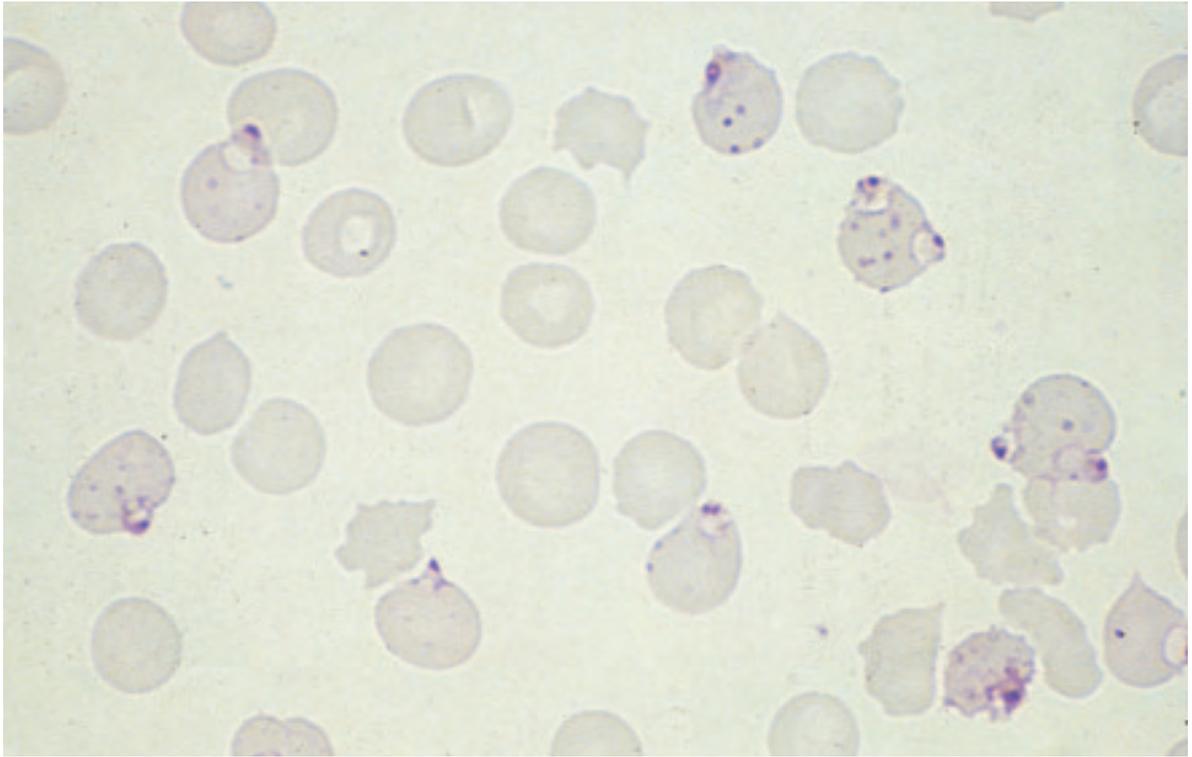


Photo n° 28 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Huit hématies avec taches de Maurer, parasitées par des trophozoïtes âgés. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

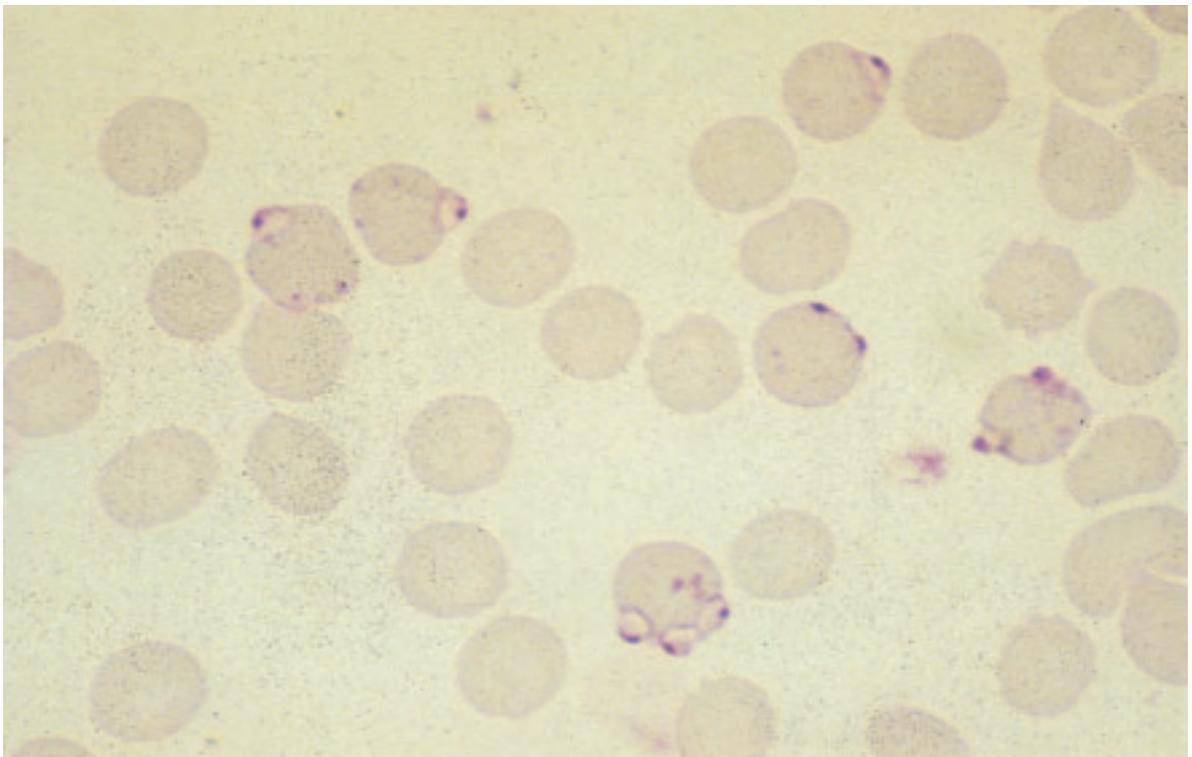


Photo n° 29 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Six hématies avec taches de Maurer, parasitées par des trophozoïtes âgés, cinq par des formes extra-terrestres (une tri-parasitée), une autre hématie avec une forme marginée aplatie. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

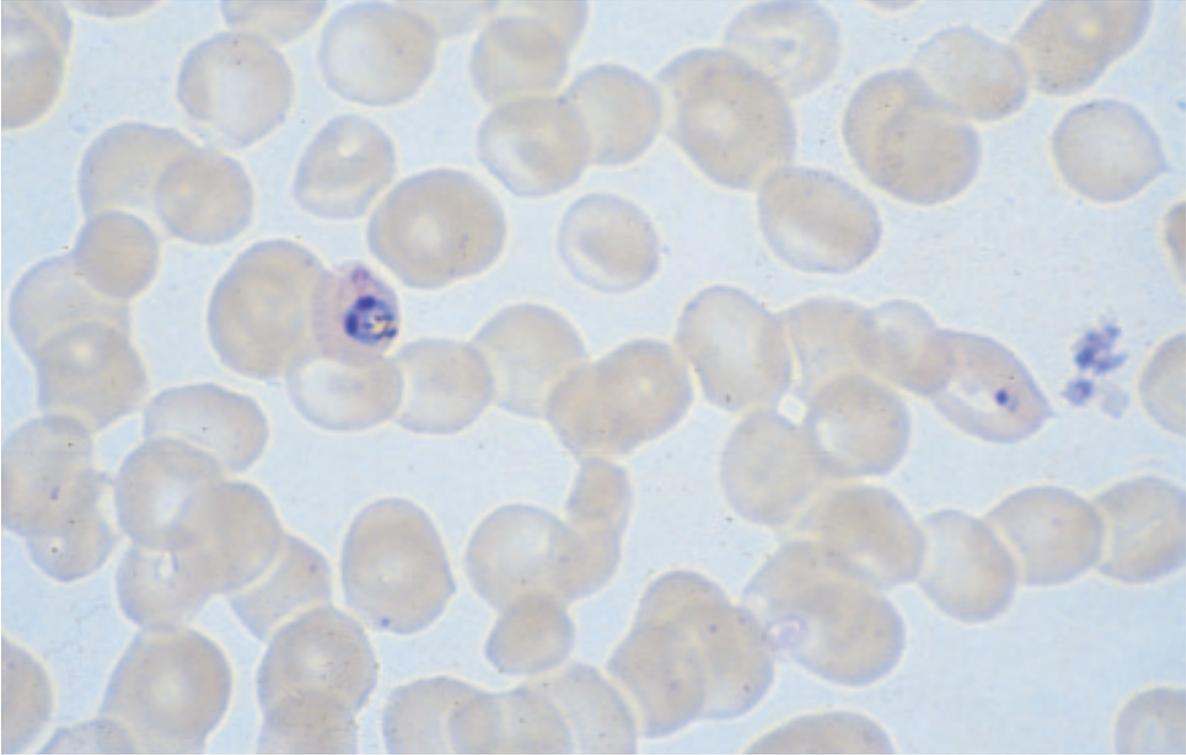


Photo n° 30 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Schizonte à 2 noyaux avec pigment visible.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.

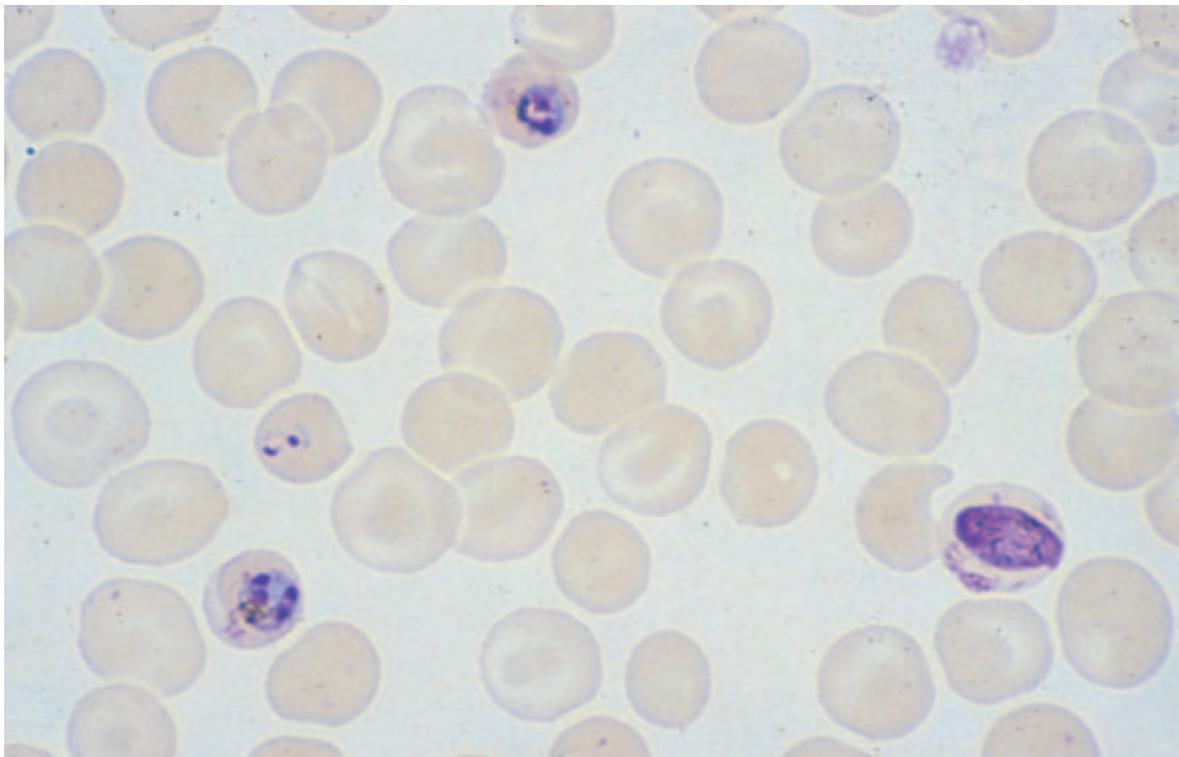
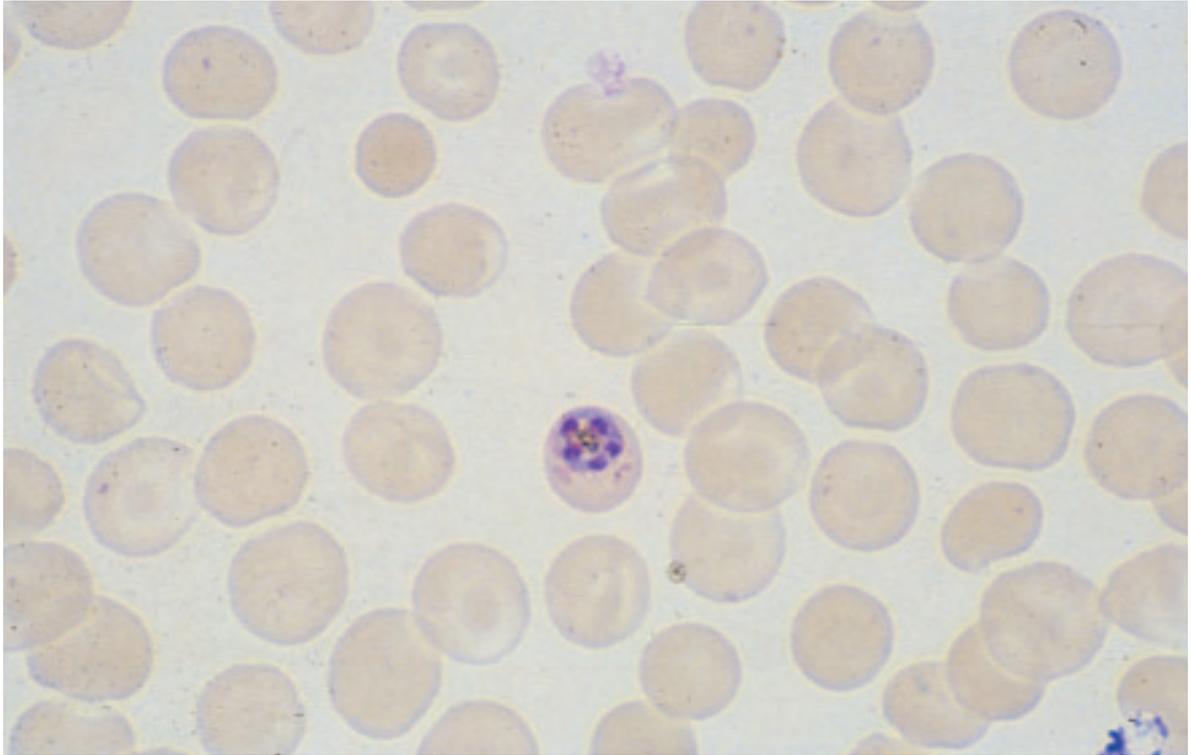
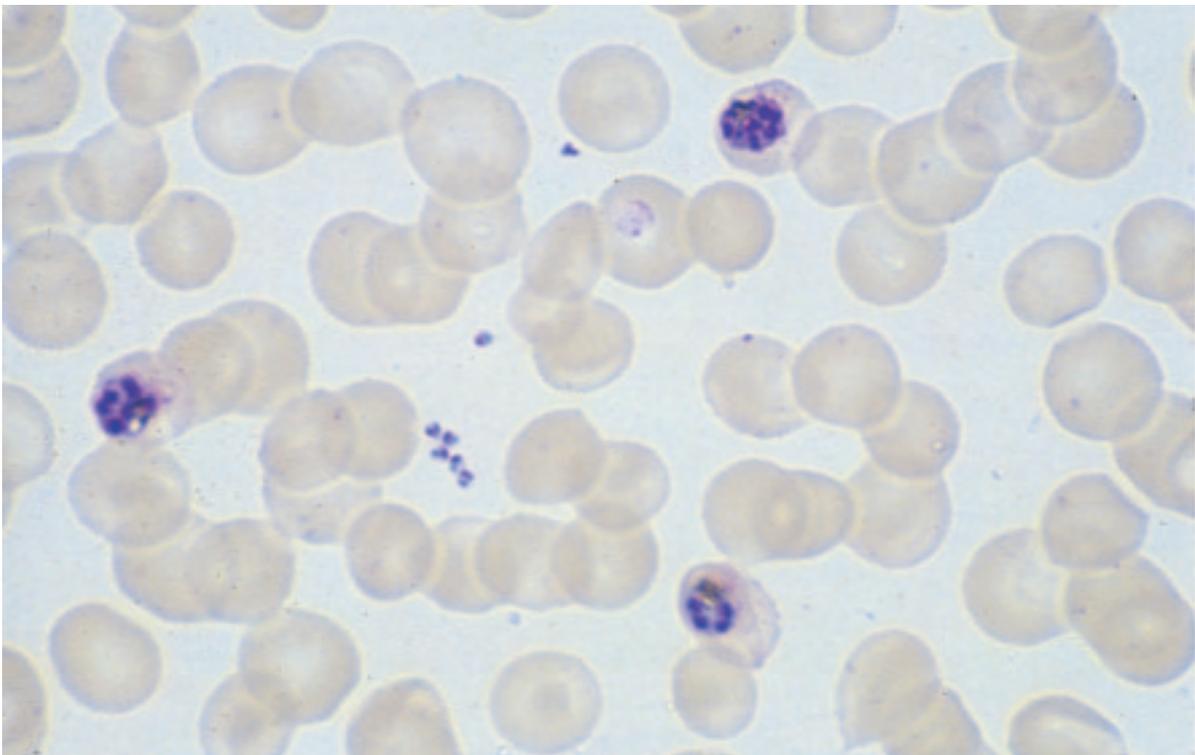


Photo n° 31 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Un schizonte à 2 noyaux,
un schizonte à 4 noyaux avec pigment. Une hématie parasitée par 2 trophozoïtes jeunes.
Un jeune gamétocyte. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

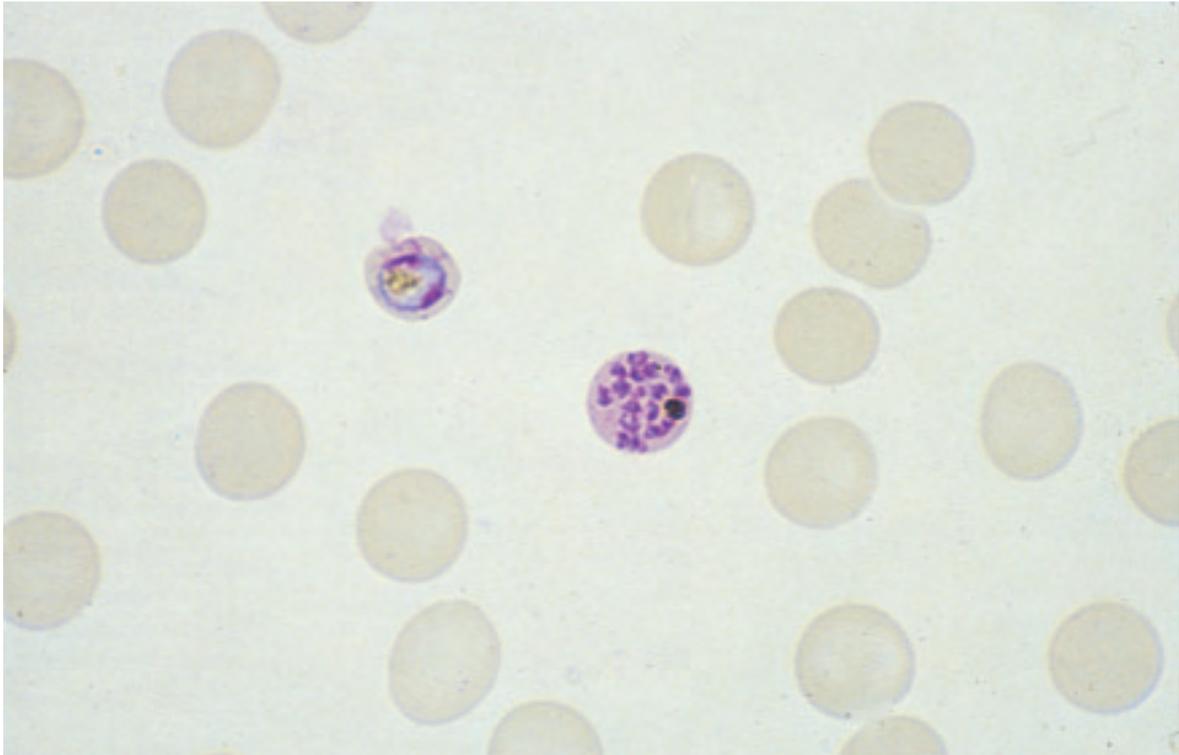


*Photo n° 32 : Plasmodium falciparum. Frottis. Schizonte à 5 noyaux.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

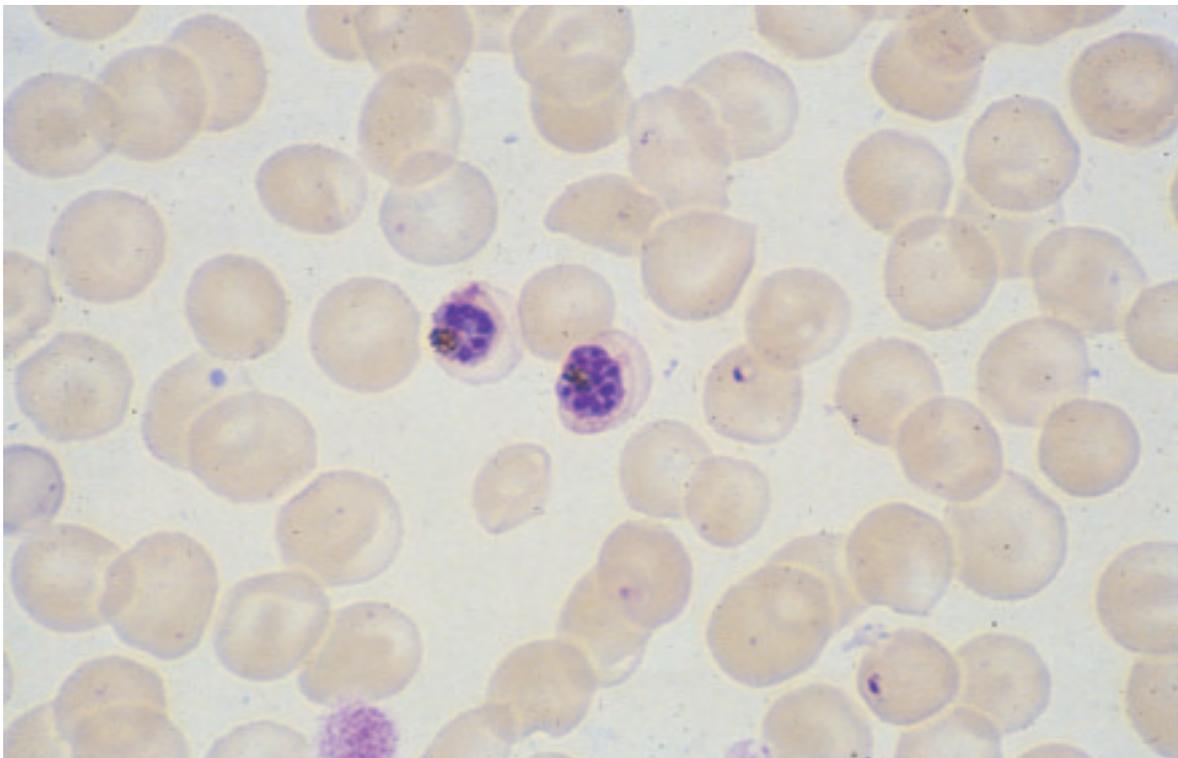
CAHIER **BIOFORMA**
DE
Formation
version numérique



*Photo n° 33 : Plasmodium falciparum. Frottis. Schizontes à 4, 6 et 8 noyaux.
Présence de quelques mérozoïtes libres. Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



*Photo n° 34 : Plasmodium falciparum. Frottis. Schizontes à 2 et 16 noyaux.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



*Photo 35 : Plasmodium falciparum. Frottis. Schizontes à 6 et 14 noyaux.
Présence également de deux jeunes trophozoïdes.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

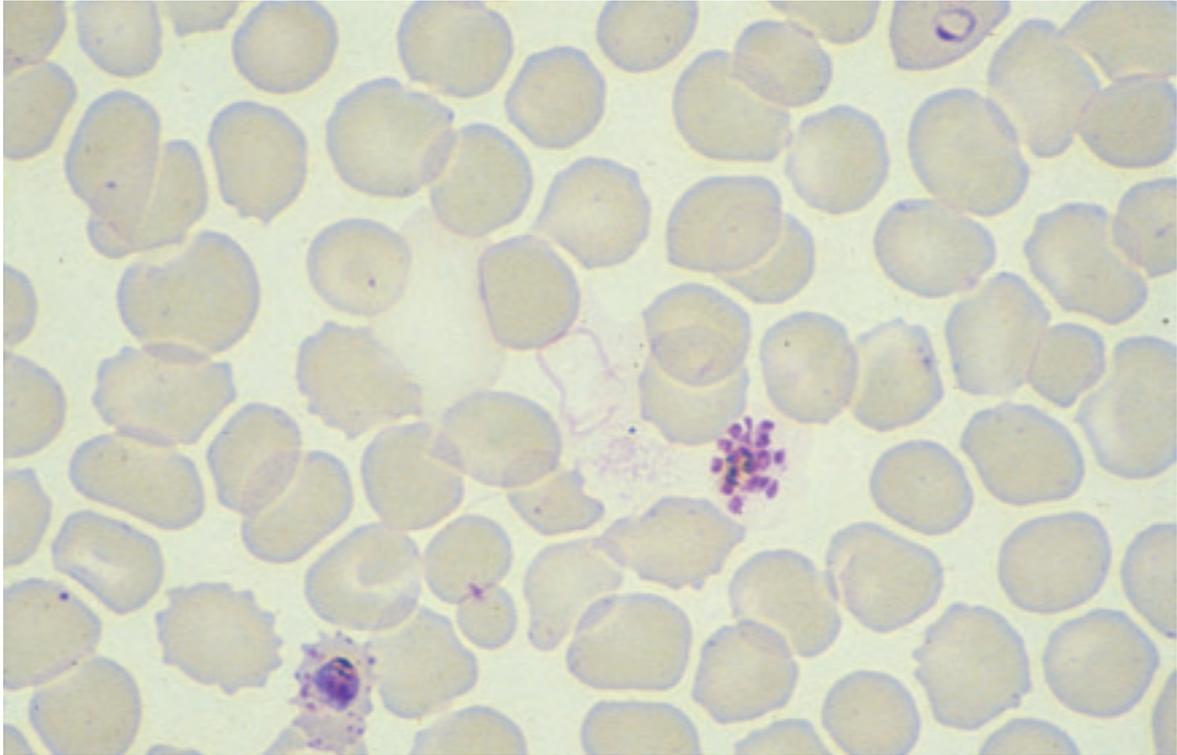


Photo n° 36 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Schizonte mûr = corps en rosace avec amas de pigment central. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

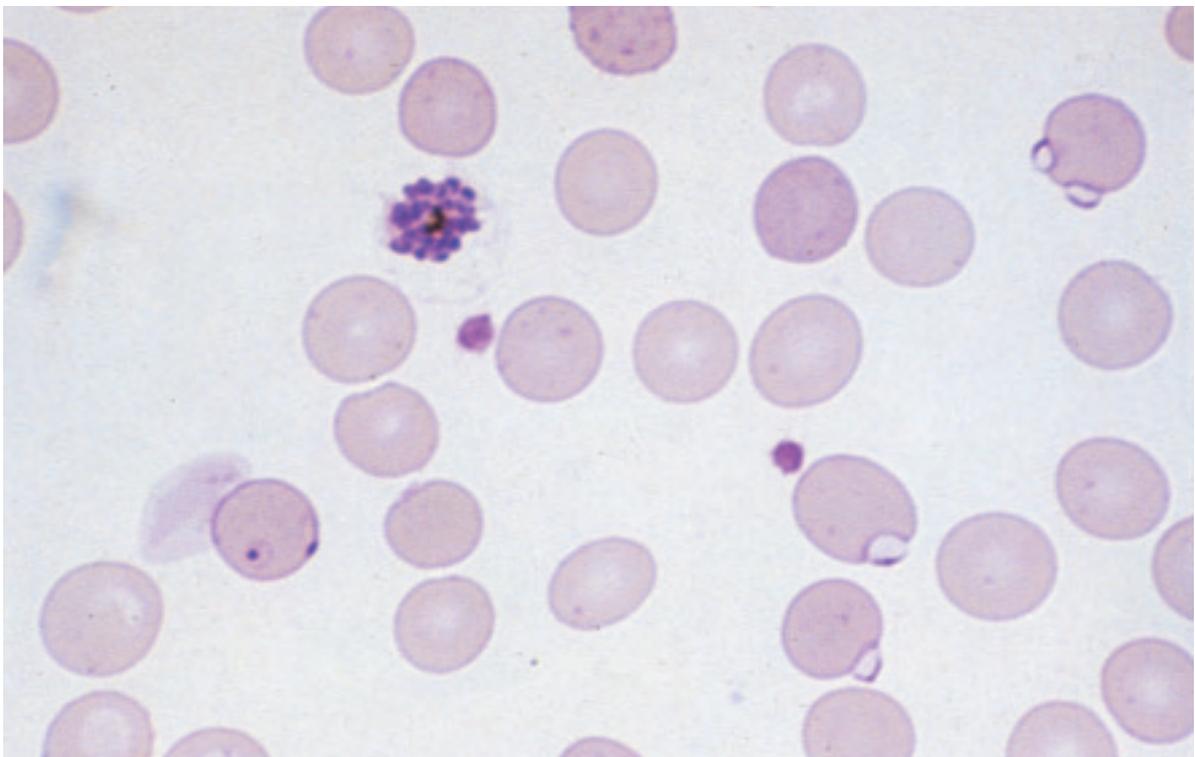


Photo n° 37 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Schizonte mûr = corps en rosace avec amas de pigment central. Quatre hématies parasitées par des trophozoïtes. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

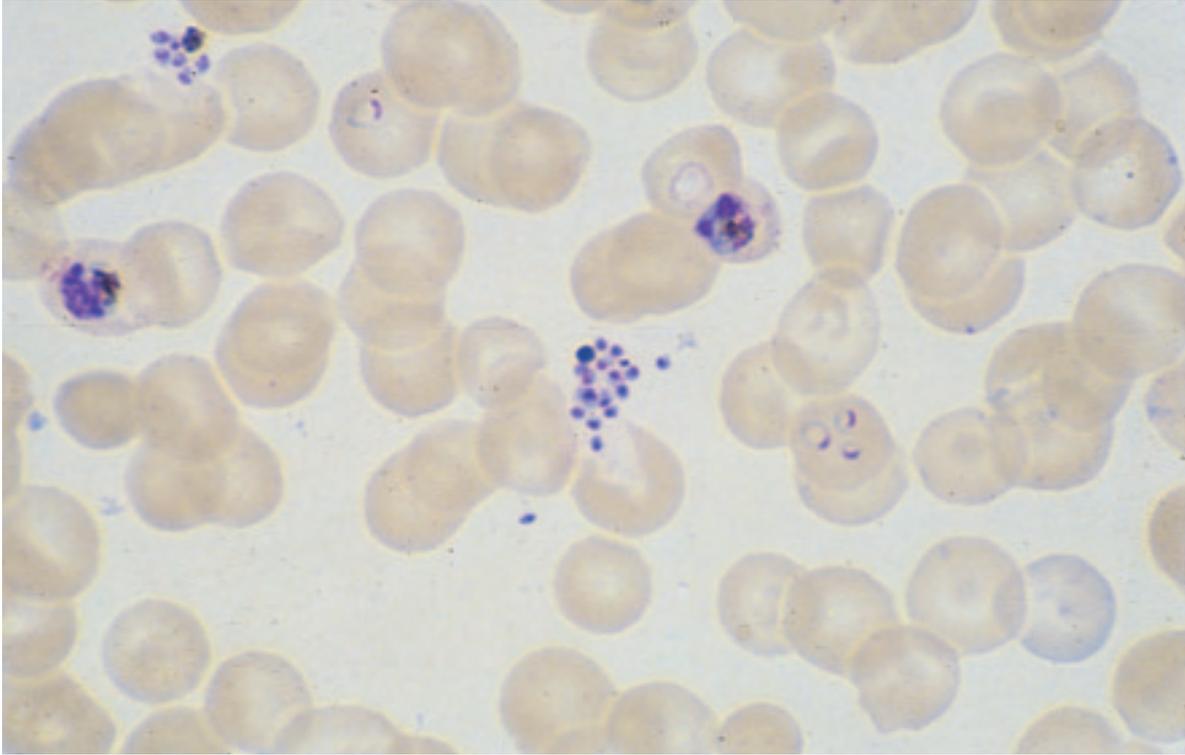


Photo n° 38 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Rosace éclatée libérant des mérozoïtes.
Une hématie triparasitée et un schizonte à 2 noyaux. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

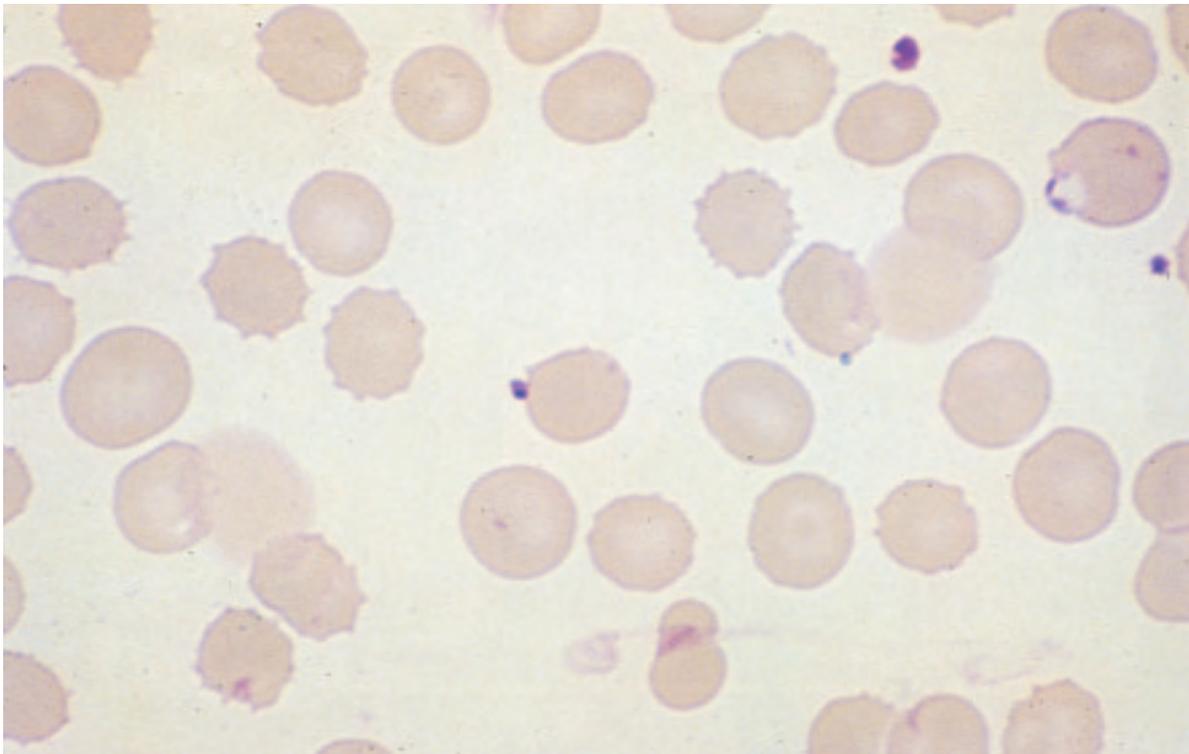


Photo n° 39 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Un mérozoïte accolé à une hématie.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.

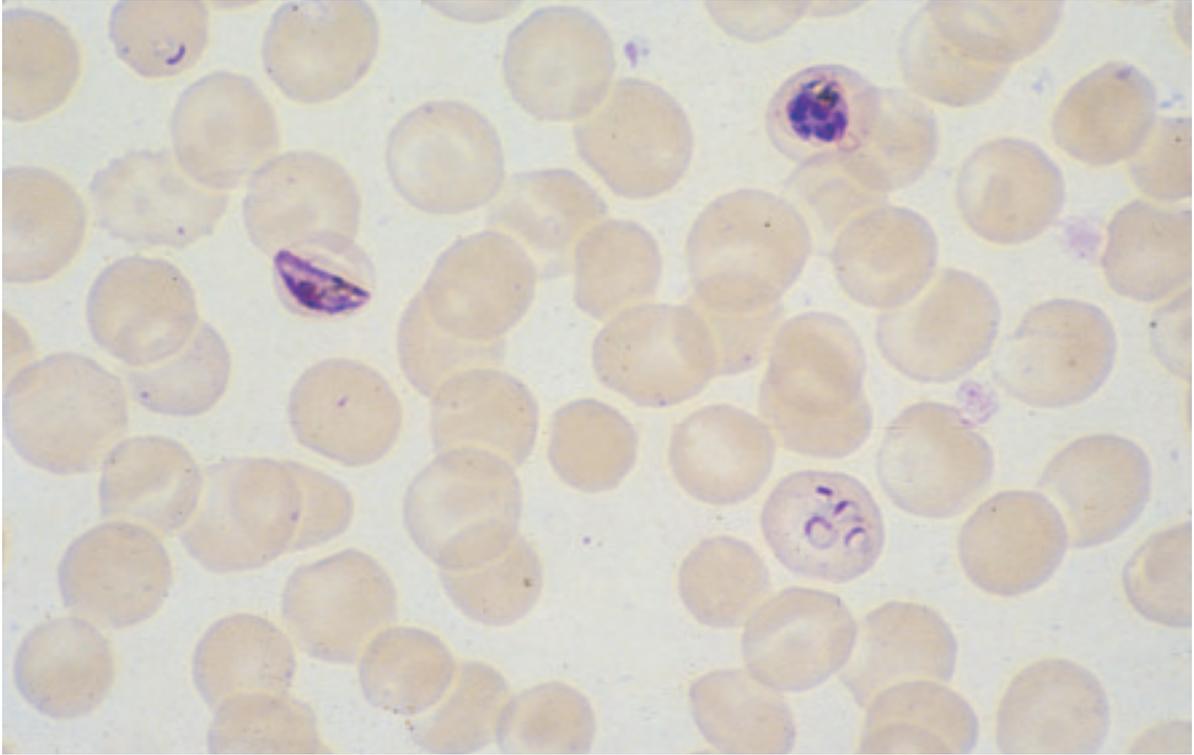


Photo n° 40 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. À gauche jeune gamétocyte en forme de « grain d'orge ». En haut à droite schizonte à six noyaux, en bas à droite hématie contenant 4 jeunes trophozoïtes. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

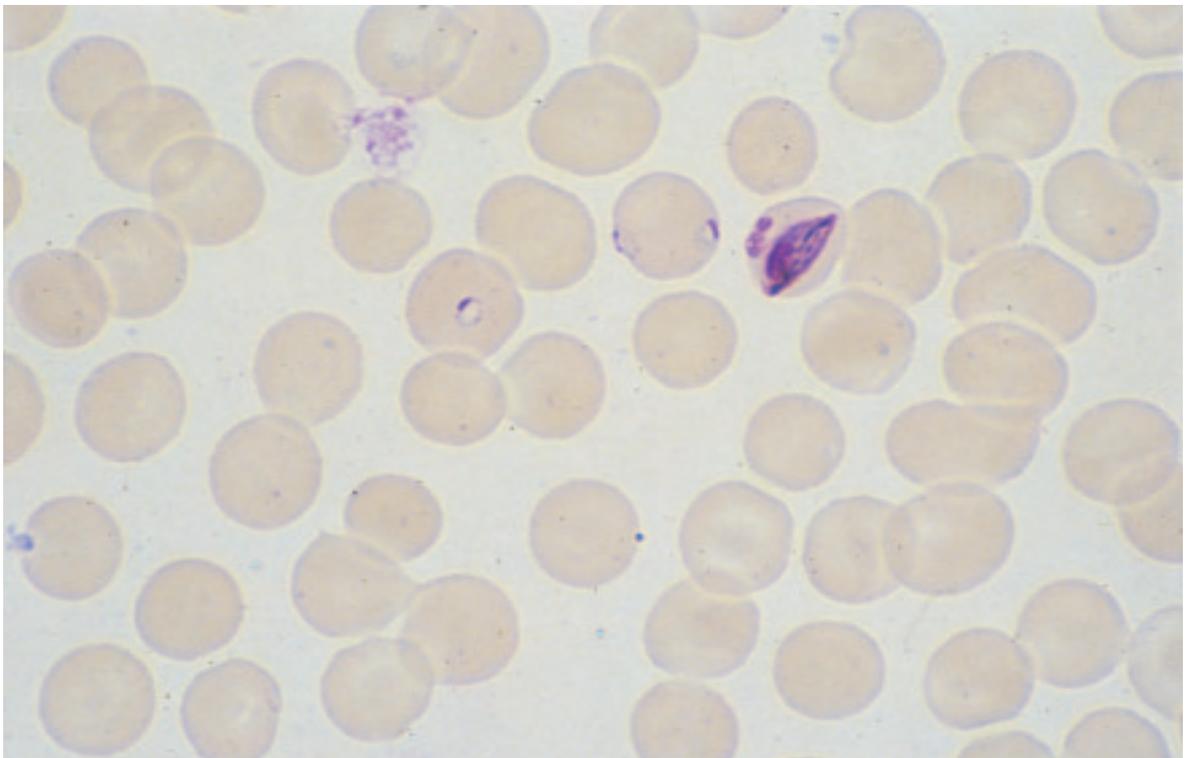


Photo n° 41 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Jeune gamétocyte en forme de « grain d'orge » avec un corps de Garnham. Deux hématies parasitées l'une par un jeune trophozoïte, l'autre par deux jeunes trophozoïtes marginés. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



Photo n° 42 : Plasmodium falciparum. Frottis. Gamétoocyte femelle, couleur bleu légèrement rosé, pigment et chromatine dispersés. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

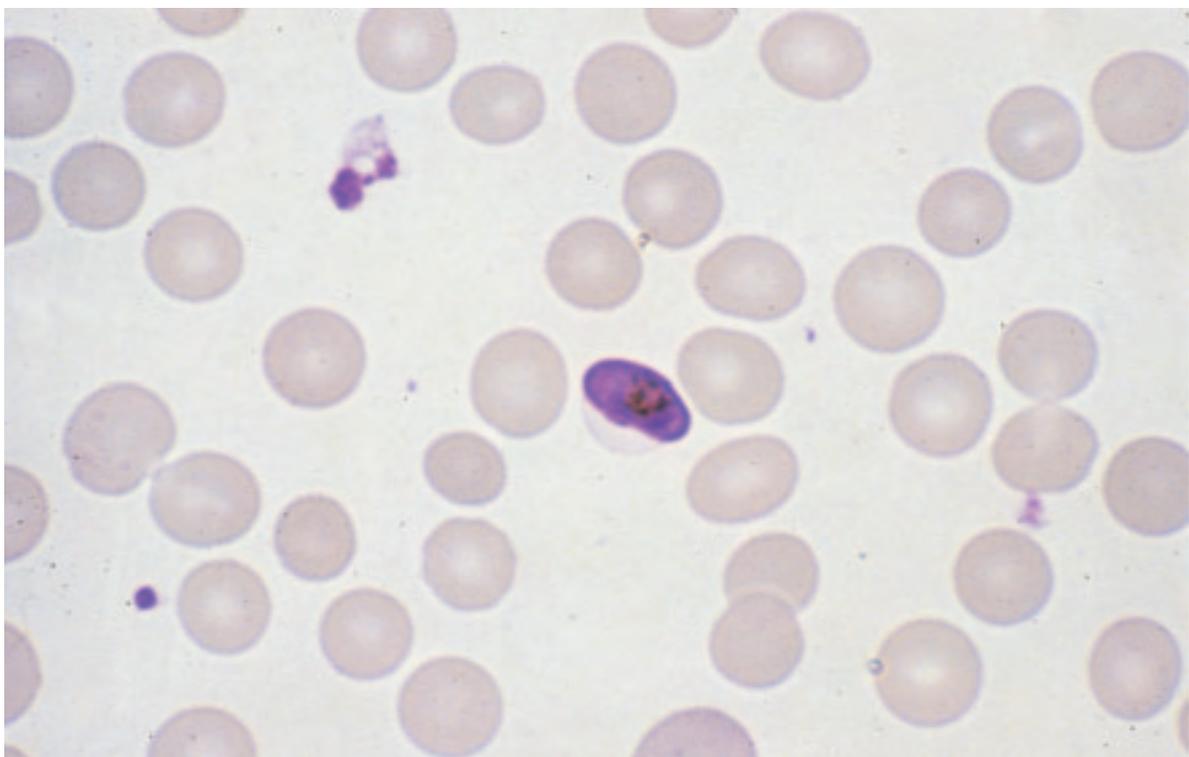


Photo n° 43 : Plasmodium falciparum. Frottis. Gamétoocyte, couleur bleu, pigment et noyau condensés au centre. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

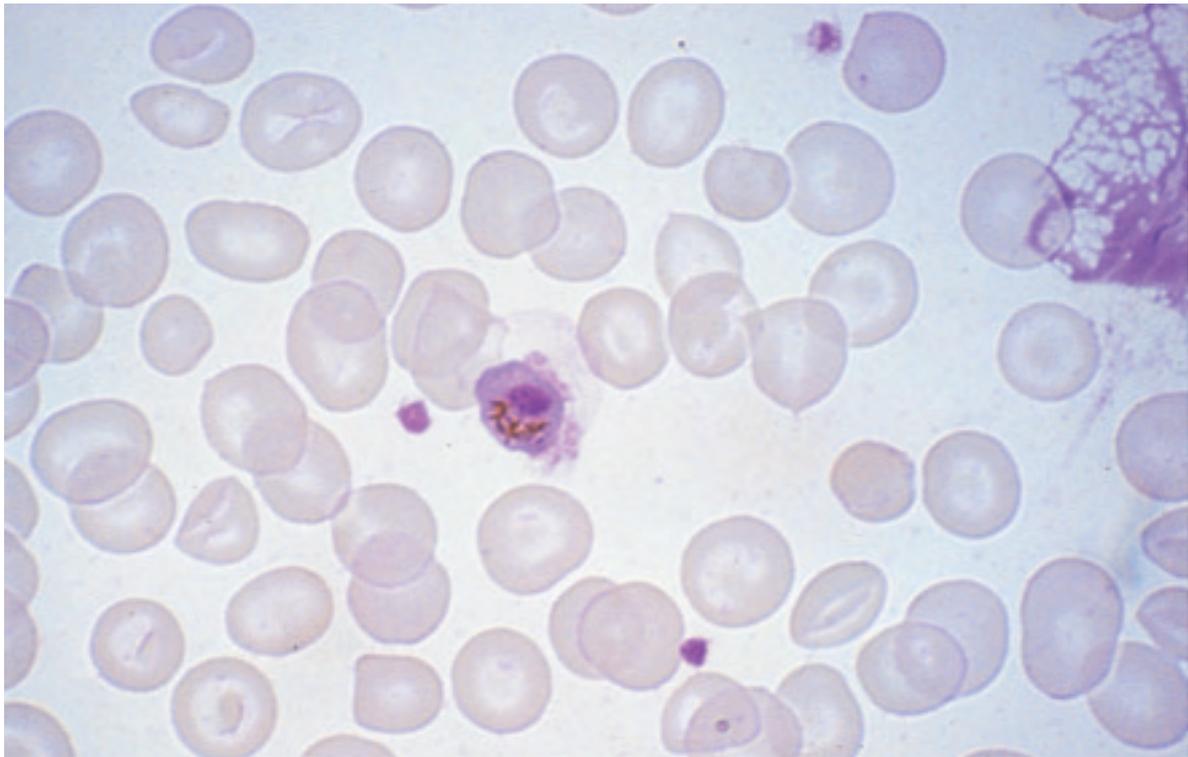


Photo n° 44 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Gamétocyte mâle arrondi avant l'exflagellation.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.

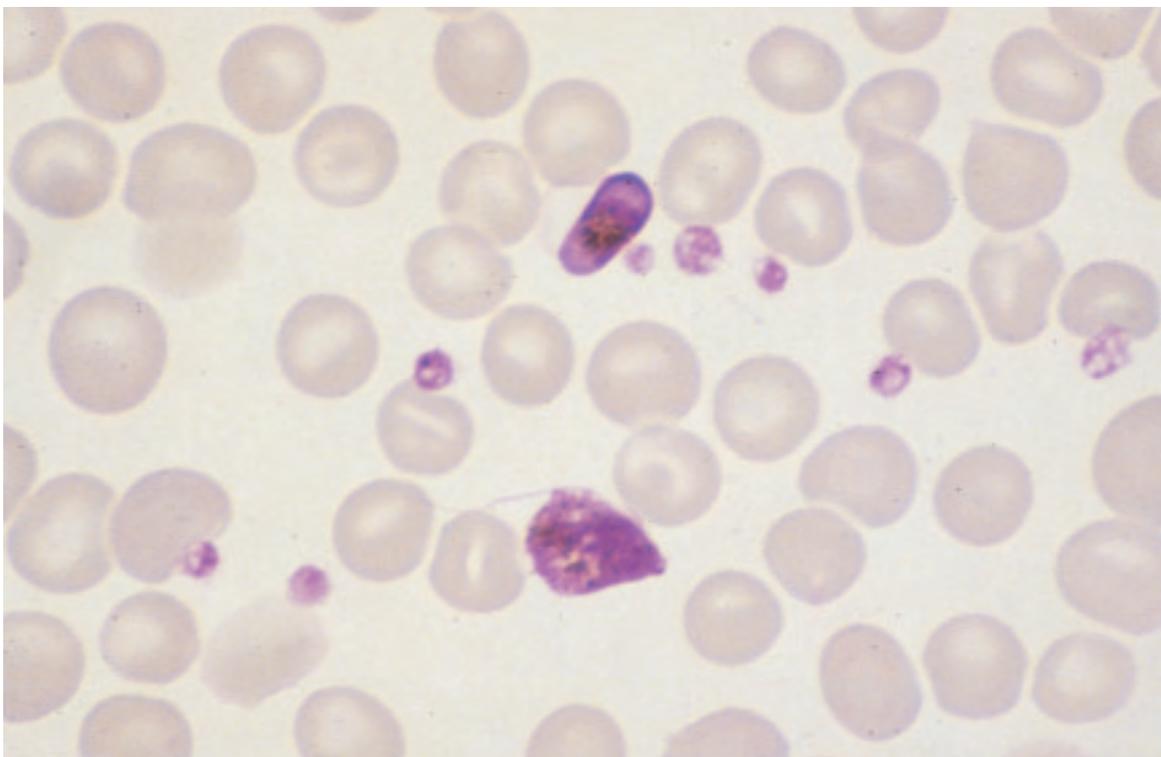


Photo n° 45 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. En bas gamétocyte mâle, cytoplasme rose, pigment et chromatine dispersés, déformé, émission d'un flagelle. En haut un autre gamétocyte.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.

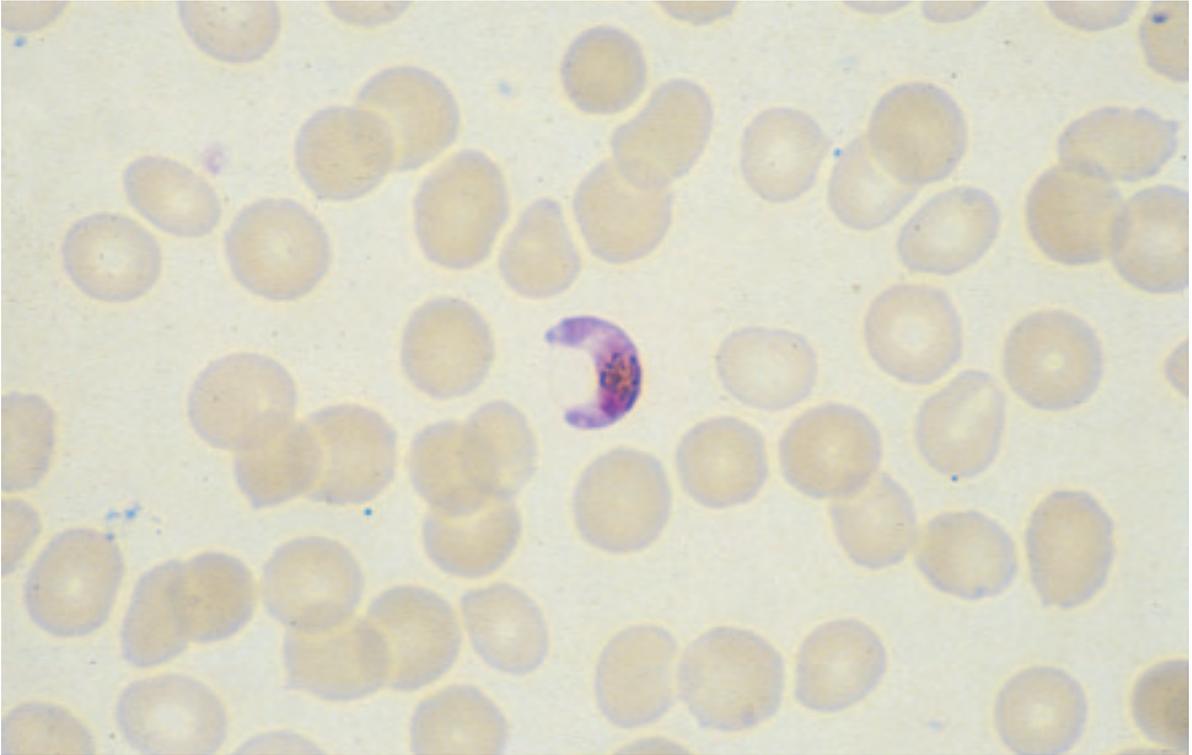


Photo n° 46 : Plasmodium falciparum. Frottis. Gamétocyte en forme de croissant, contenu à l'intérieur d'une hématie dont on voit le contour dans la concavité du croissant. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

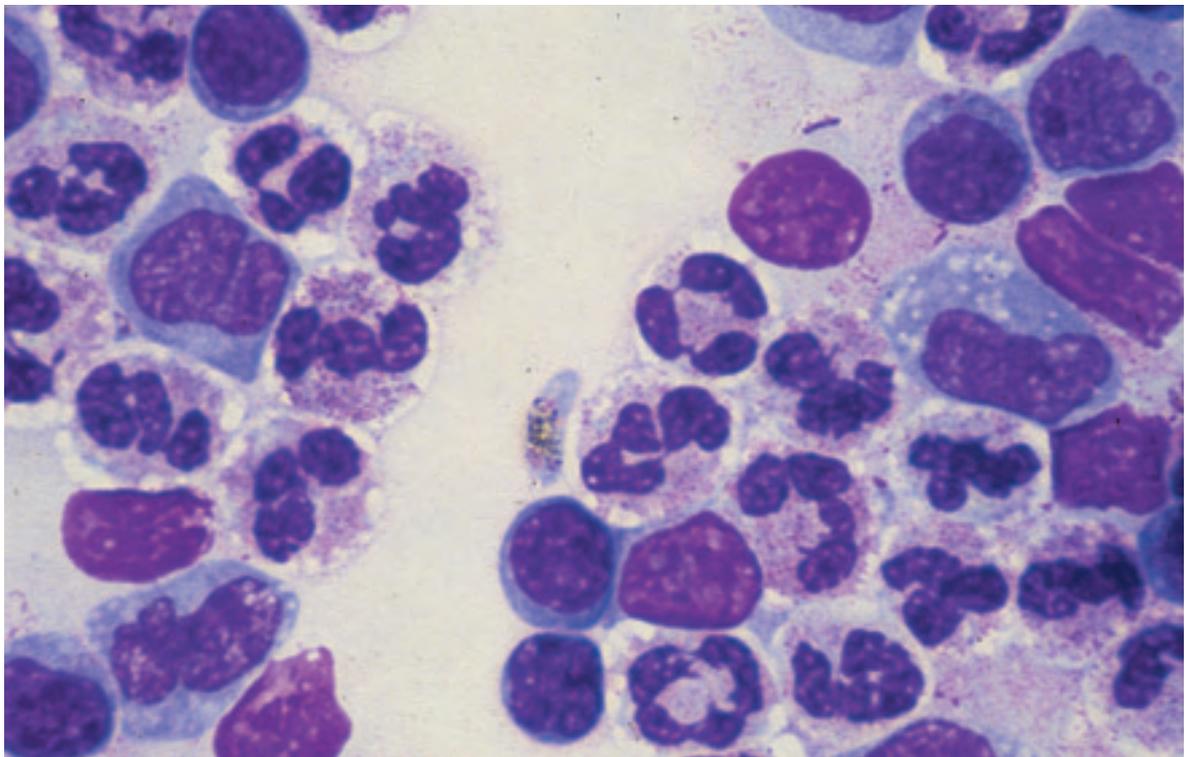


Photo n° 47 : Plasmodium falciparum. Cyto-concentration. Gamétocyte en banane. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

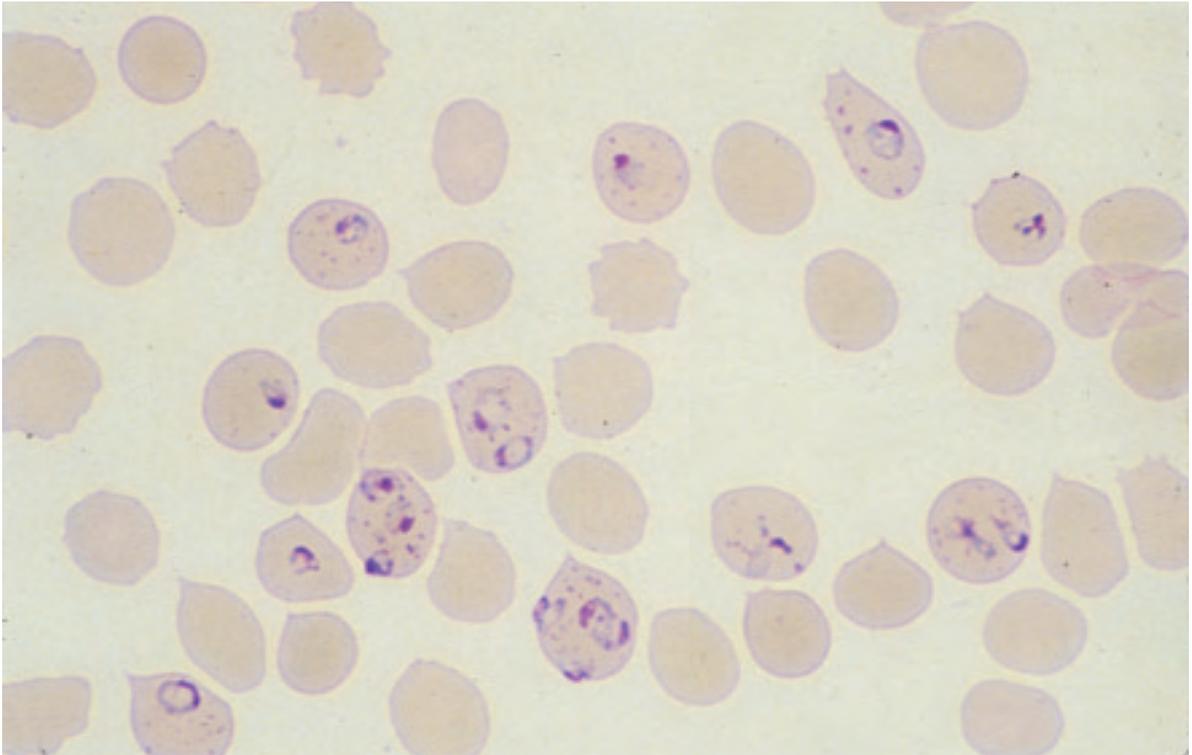


Photo n° 48 : Plasmodium falciparum. Frottis. Accès pernicieux. Nombreux trophozoïtes jeunes et âgés et hématies polyparasitées. Taches de Maurer présentes pour les trophozoïtes âgés. En haut à droite une hématie ovalisée. Parasitémie élevée. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

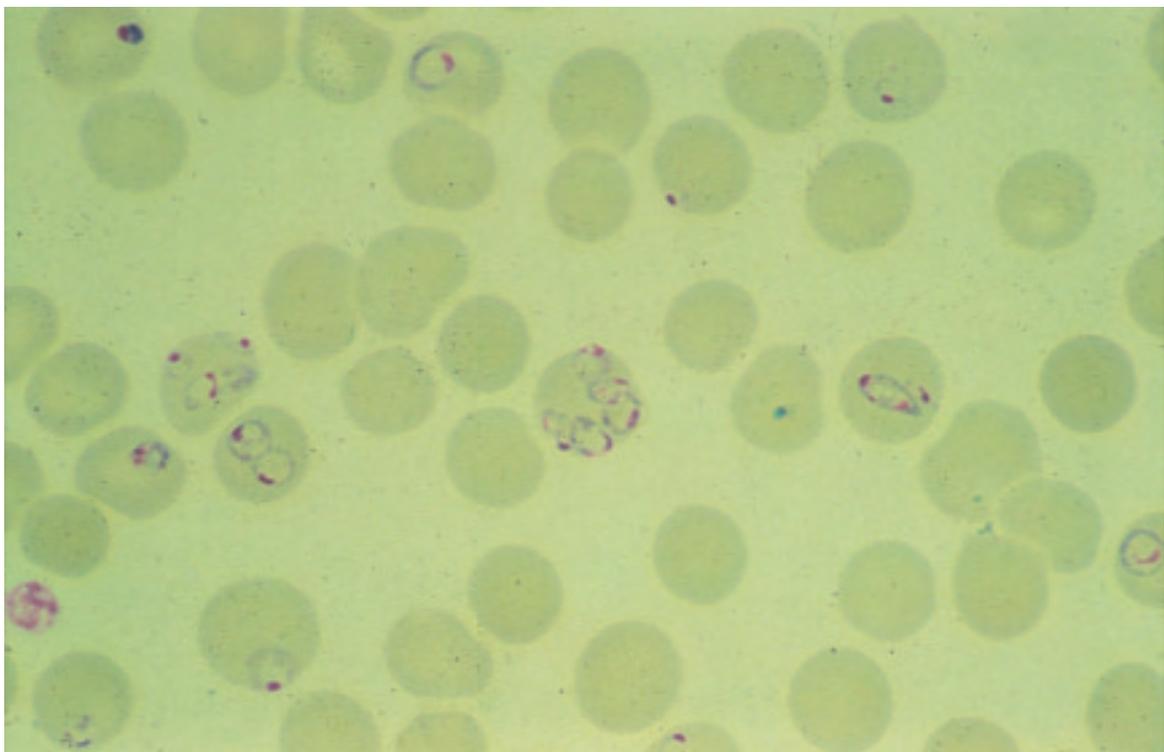
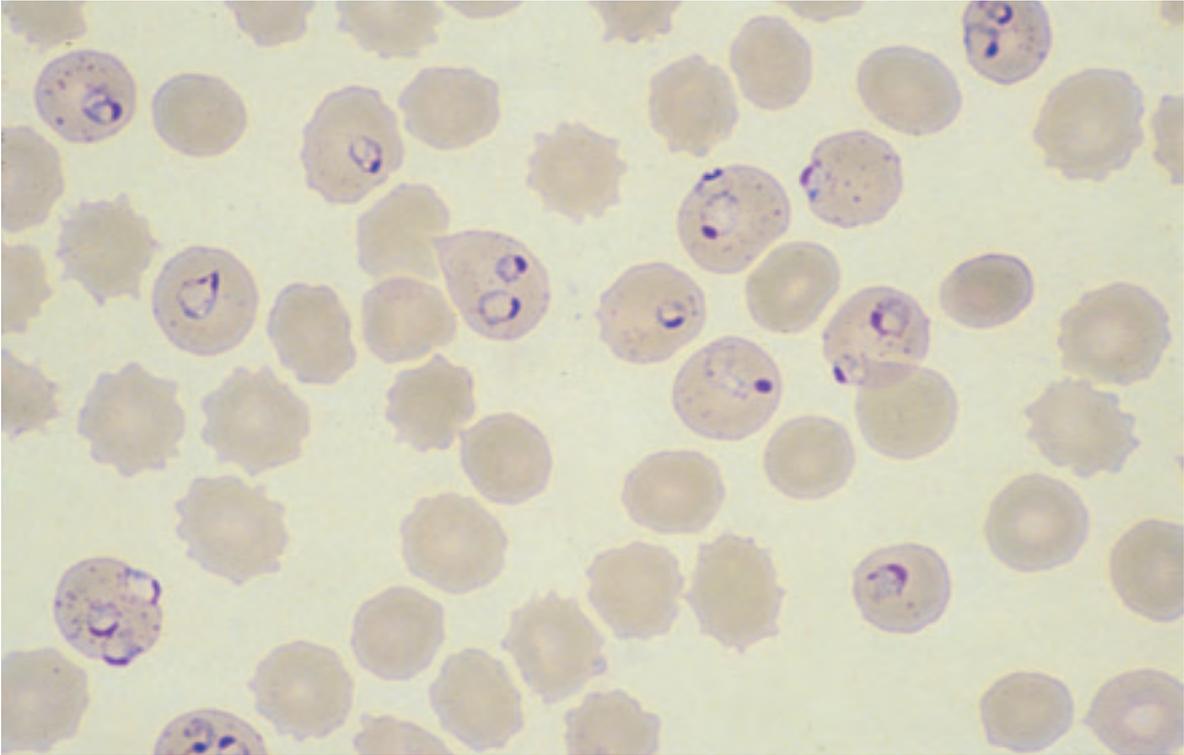
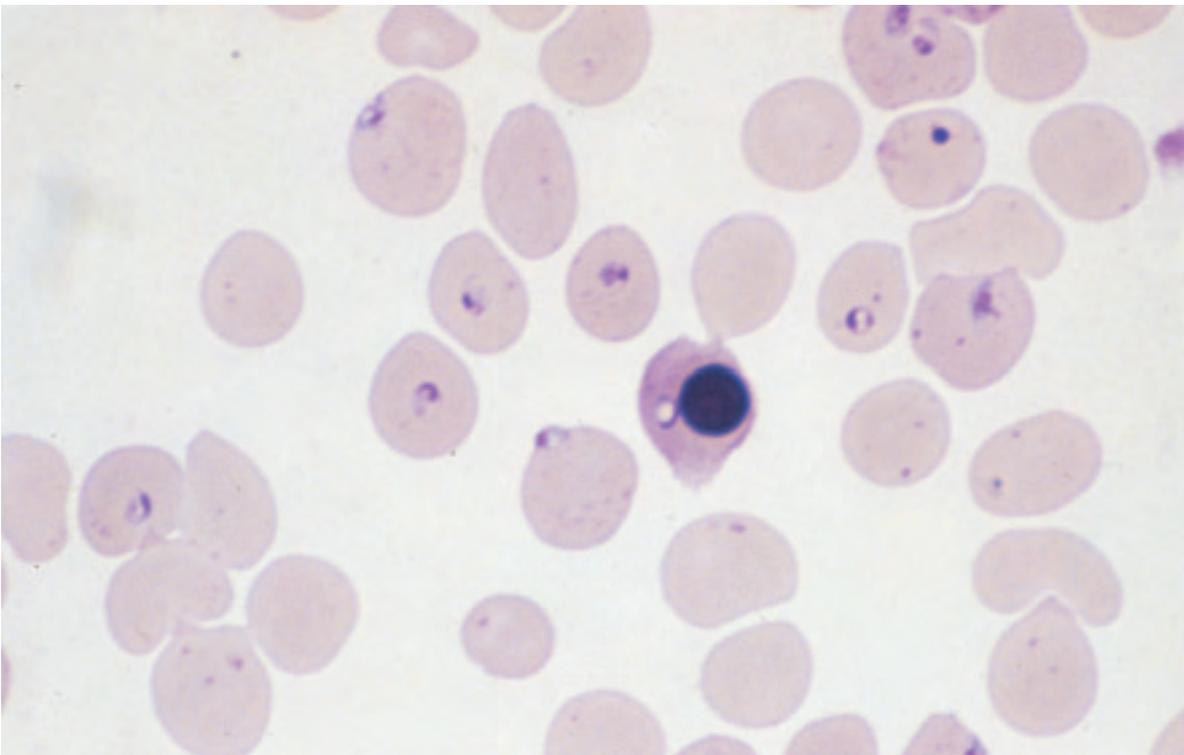


Photo n° 49 : Plasmodium falciparum. Frottis. Accès pernicieux. Autre malade. Une hématie parasitée par cinq trophozoïtes. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



*Photo n° 50 : Plasmodium falciparum. Frottis. Accès pernicieux. Autre malade.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



*Photo n° 51 : Plasmodium falciparum. Frottis. Accès pernicieux. Anémie, anisocytose,
présence d'une hématie nucléée. Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

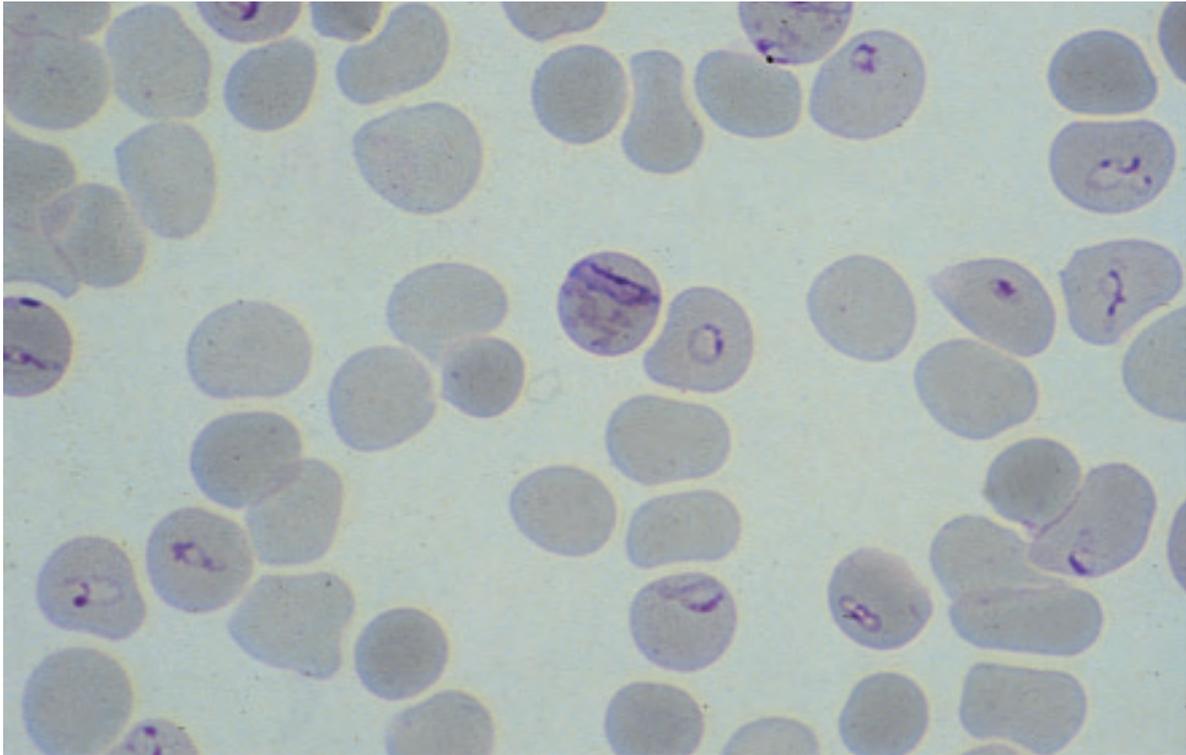


Photo n° 52 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Accès pernicieux. Trophozoïtes jeunes, sauf un âgé en « fausse bande équatoriale ». Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

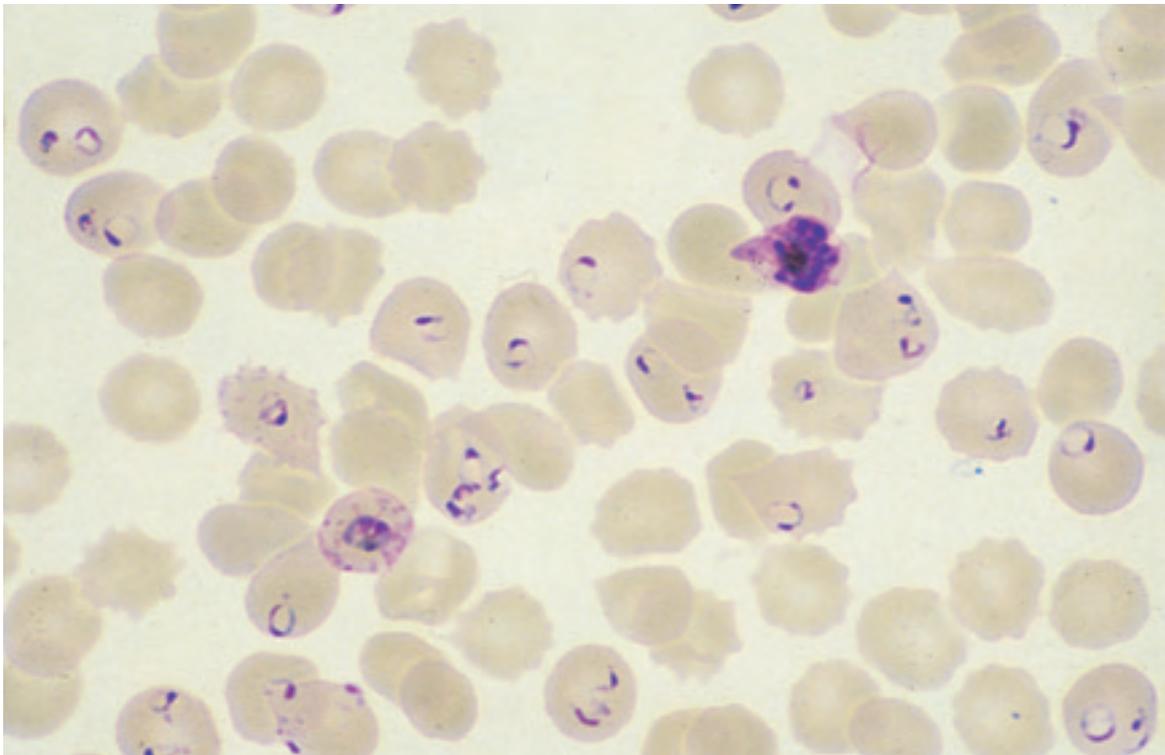


Photo n° 53 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Accès pernicieux. Nombreux trophozoïtes jeunes. Un schizonte à 2 noyaux et un corps en rosace. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

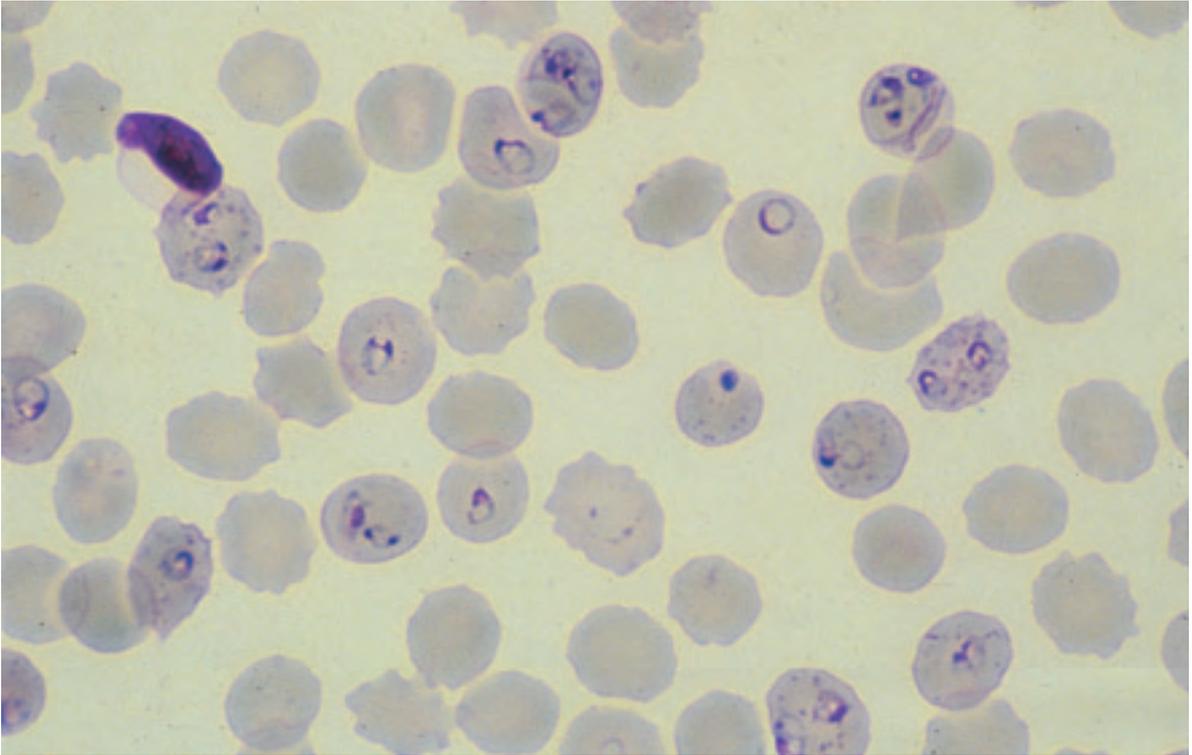


Photo n° 54 : Plasmodium falciparum. Frottis. Accès pernicieux. Nombreux trophozoïtes jeunes et âgés, un gamétocyte en haut et à gauche. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

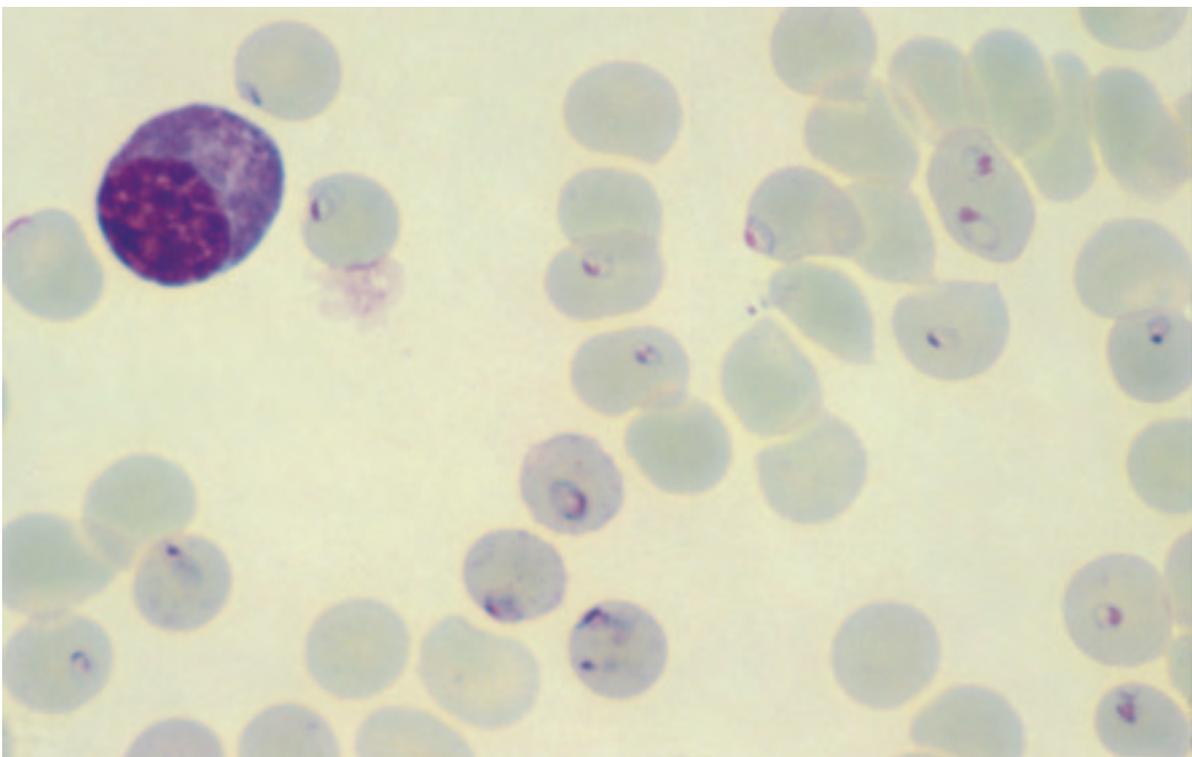


Photo n° 55 : Plasmodium falciparum. Frottis. Accès pernicieux. Nombreux trophozoïtes, présence d'un plasmocyte. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

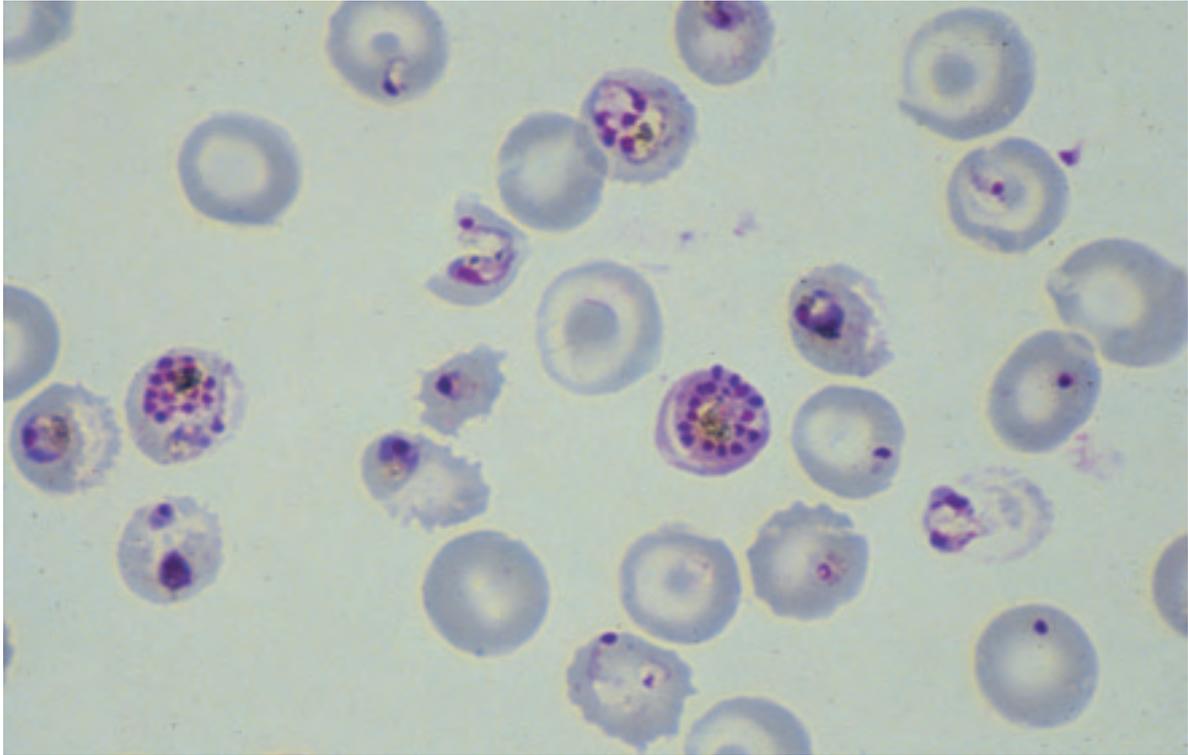


Photo n° 56 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Accès pernicieux. Anisocytose et poikilocytose des hématies. Schizontes à différents stades dont deux en rosaces. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

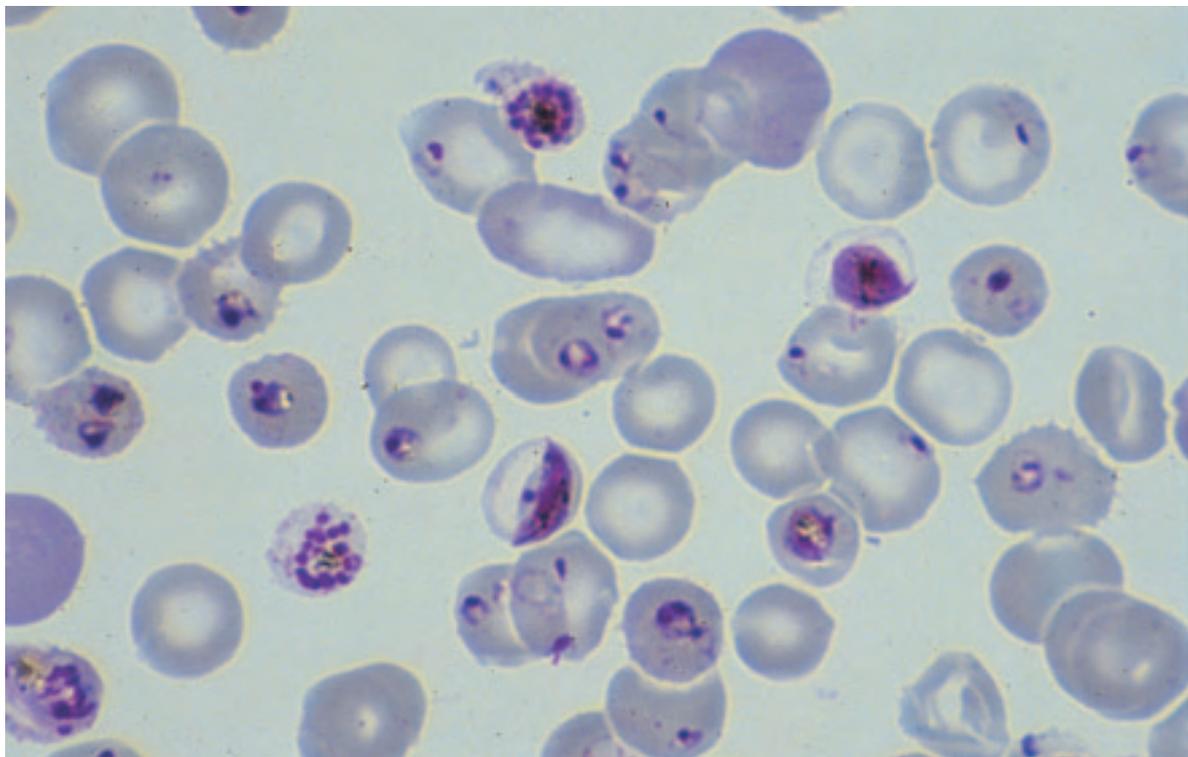


Photo n° 57 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Accès pernicieux. Anisocytose et poikilocytose des hématies. Schizontes à différents stades. Deux jeunes gamétocytes, l'un rond, l'autre en « grain d'orge ». Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

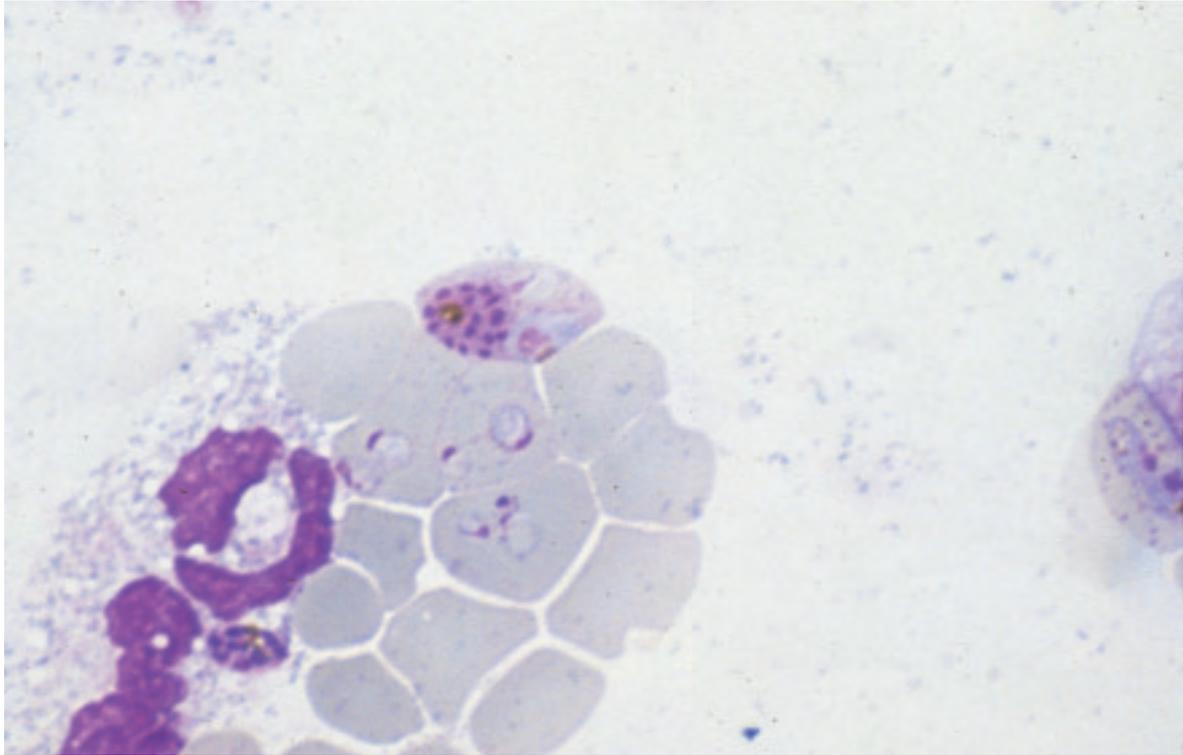


Photo n° 58 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Accès pernicieux. Trophozoïtes jeunes et âgés et une hématie contenant un corps en rosace et un élément à un autre stade, jeune gamétocyte ? pseudoparthogénèse ? Coloration M.G.G. Obj. × 100.

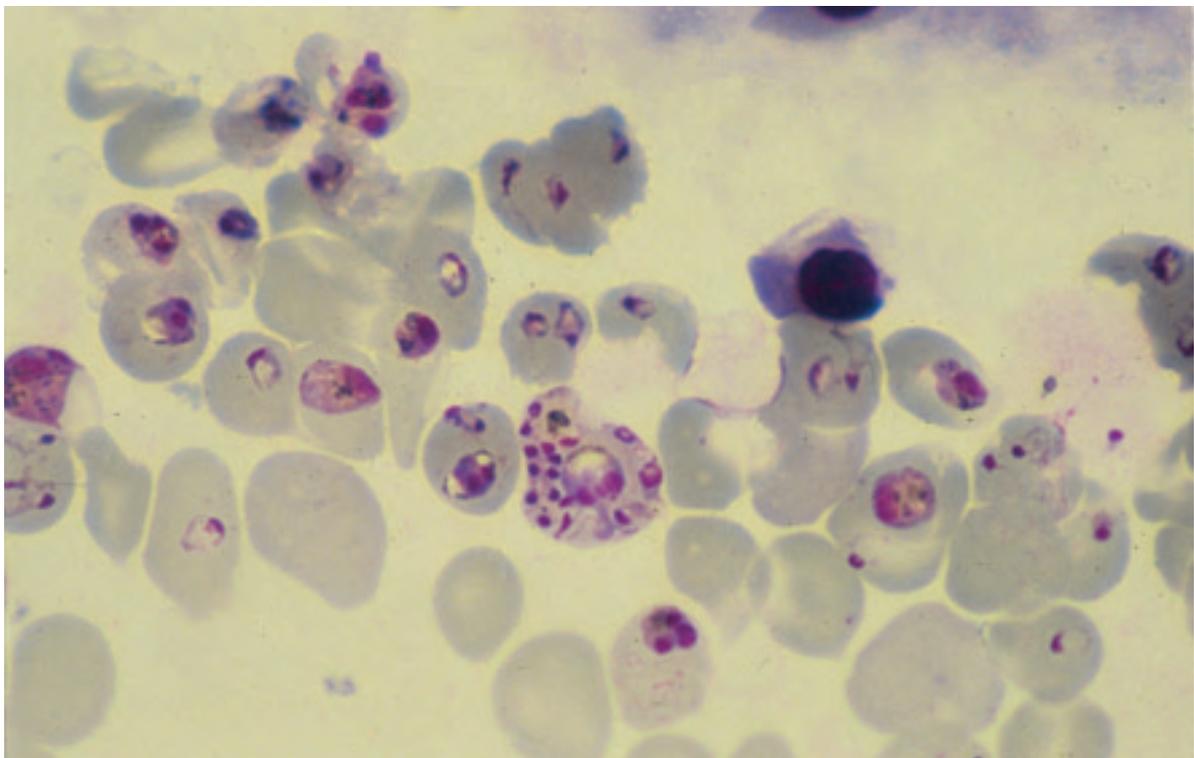
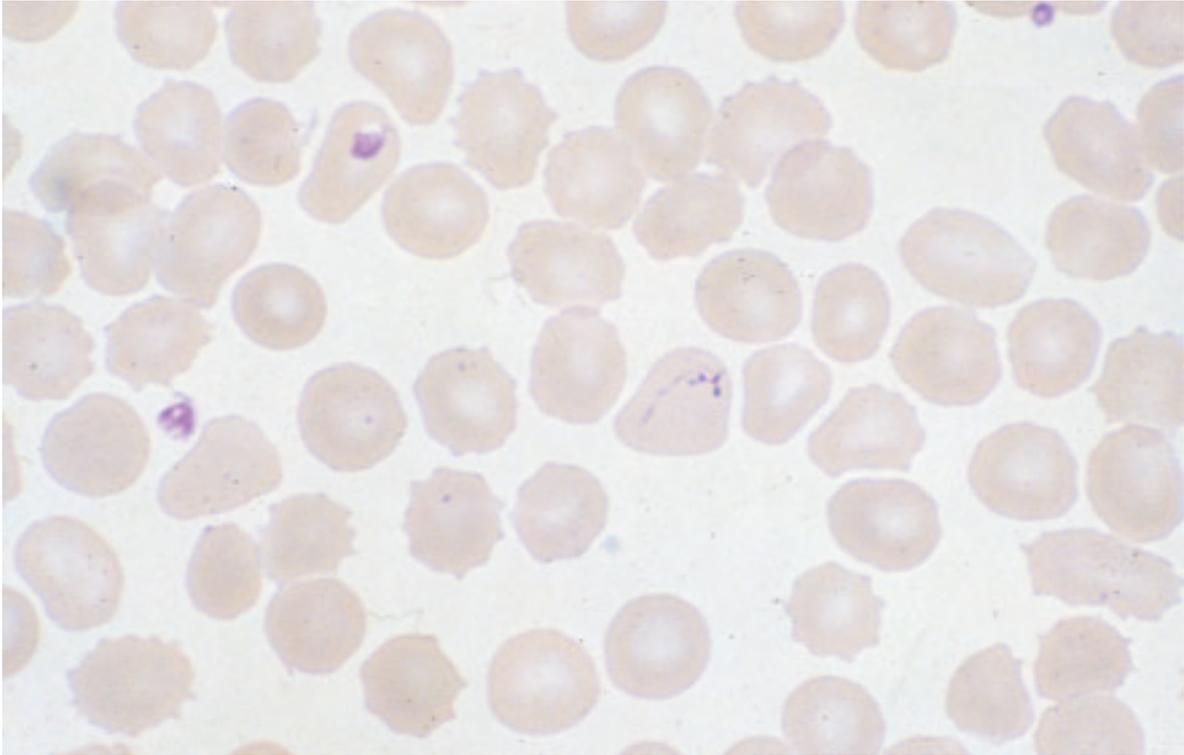
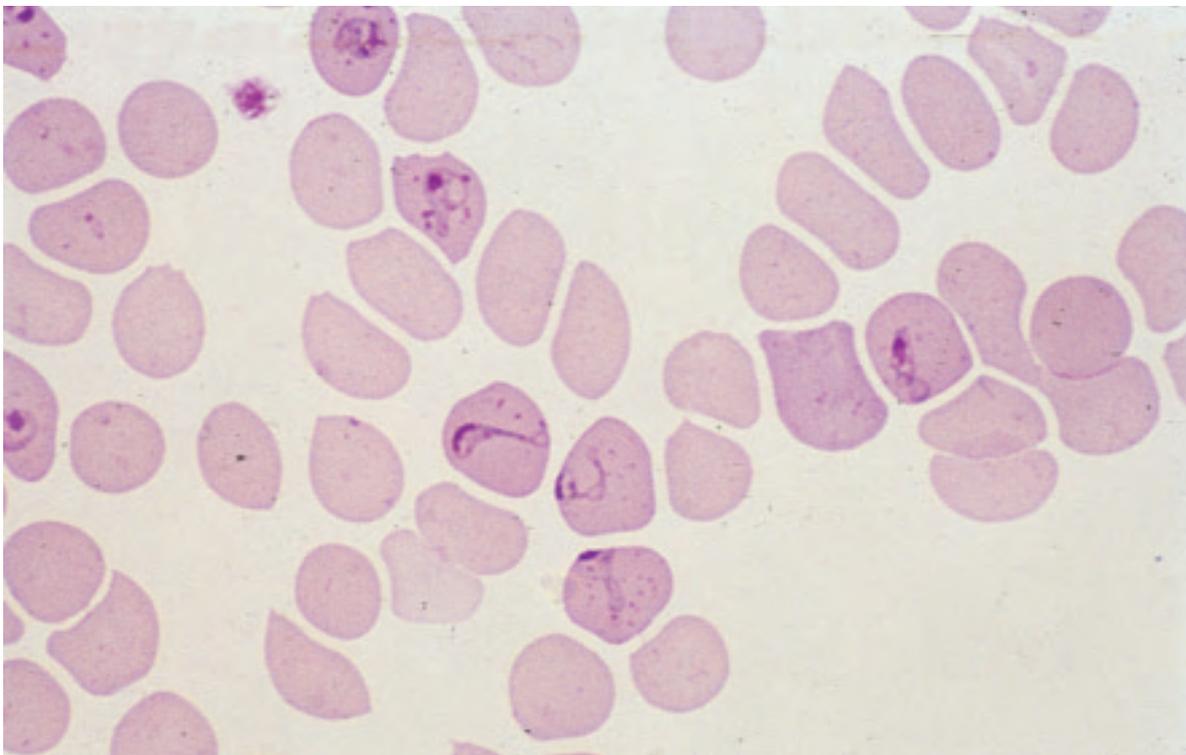


Photo n° 59 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Accès pernicieux. Nombreuses hématies parasitées. Trophozoïtes et schizontes à divers stades. Au centre une hématie contenant un schizonte à 2 noyaux et un corps en rosace. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



*Photo n° 60 : Plasmodium falciparum (variété tenue ?). Frottis.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



*Photo n° 61 : Plasmodium falciparum (variété tenue ?). Frottis.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

■ *PLASMODIUM VIVAX*

Tableau IX : Plasmodium vivax : résultats des 10 tests du Contrôle National de Qualité en Parasitologie en France.

DATE D'ENVOI	NOMBRE DE RÉPONSES	RICHESSSE*	STADES	RÉSULTATS CONFORMES	DEUXIÈME RÉPONSE	TROISIÈME RÉPONSE
06/81	1 543	0,5 à 3	Trophozoïtes, schizontes jeunes ou âgés et gamétocytes	77,75 %	<i>Plasmodium ovale</i> 7,7 %	<i>Plasmodium malariae</i> 5,05 %
11/82	1 030	0,5 à 3	Trophozoïtes, schizontes jeunes âgés ou mûrs et gamétocytes	79,6 %	<i>Plasmodium ovale</i> 6,2 %	<i>Plasmodium malariae</i> 5,9 %
02/86	650	0,02 à 0,1	Trophozoïtes, schizontes jeunes et gamétocytes	60,8 %	<i>Plasmodium ovale</i> 25,4 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 5,5 %
03/87	1 604	0,02 à 0,1	Trophozoïtes et gamétocytes	83,5 %	<i>Plasmodium ovale</i> 10,8 %	<i>Plasmodium malariae</i> 2,8 %
07/90	1 118	0,2 à 0,5	Trophozoïtes et gamétocytes	71,2 %	<i>Plasmodium ovale</i> 19,4 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 3,1 %
11/91	1 189	0,2 à 0,8	Trophozoïtes, gamétocytes et schizontes	73,9 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 14,5 %	<i>Plasmodium ovale</i> 8,1 %
11/96	1 331	0,05 à 0,2	Trophozoïtes et gamétocytes	80,4 %	<i>Plasmodium ovale</i> 12,6 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 3,8 %
11/97	1 217	0,5 à 2	Trophozoïtes, schizontes et gamétocytes	82 %	<i>Plasmodium ovale</i> 10,1 %	<i>Plasmodium malariae</i> 3,4 %
11/97 (Bioforma)	3 662	0,5 à 2	Trophozoïtes et gamétocytes	88,6 %	<i>Plasmodium ovale</i> 9 %	<i>Plasmodium malariae</i> 1,3
06/99	1 323	0,5 à 2	Trophozoïtes, schizontes et gamétocytes	72,2 %	<i>Plasmodium ovale</i> 15,2 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 15,5 %
Richesse moyenne statistique des 10 cas : 0,81 % Intervalle de confiance 0,24 à 1,34 %						

* La richesse moyenne est exprimée en pourcentage d'hématies parasitées

Agent de la fièvre tierce bénigne, remarquable par la grande fréquence des rechutes après l'accès initial.

Cette espèce est en régression dans l'ensemble du monde, et n'occupe que la troisième place derrière *P. falciparum* et *P. ovale* dans les cas importés en France. Plusieurs types de *P. vivax* ont été décrits (174, 186).

RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE

P. vivax est l'espèce qui a la plus large répartition géographique dans les régions chaudes et tempérées (Russie). Elle est présente dans de nombreuses zones tempérées, mais aussi

subtropicales et tropicales, en particulier Afrique du Nord, Afrique de l'Est, Proche-Orient, Sud-Est Asiatique, Amérique Centrale et Amérique du Sud.

P. vivax est très rare en Afrique tropicale occidentale, les cas qui sont attribués à cette espèce semblent habituellement être dus à des confusions avec d'autres hématozoaires, principalement *P. ovale*. Cette distribution particulière est liée au groupe sanguin Duffy (voir page 169).

En 1994, la répartition de cette espèce dans le monde était, selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) la suivante :

Europe : Turquie *P. vivax* seulement est présent : il est passé de 9 000 cas en 1990 à 90 000 cas en 1994 dans les régions du Sud-Est Anatolie et Amikova dans le Sud (Onori). Azerbaïdjan et Tadjikistan en 1995 (182), sont également touchés par cette espèce. Le nombre de cas est passé de 20 en 1969 à plus de 10 000 en 1995 pour ce dernier pays.

Afrique : Afrique du Nord : *P. vivax* est présent mais rare au Maroc (150 cas de *P. vivax* seulement) , en Algérie et en Egypte (El Faiyûm). Absent en Tunisie.

Afrique de l'Ouest : absent : presque 100 % de la population est Duffy négatif.

Afrique Centrale et Afrique de l'Est : présent dans différents pays en particulier en Ethiopie (173), et à Djibouti.

Présent à Madagascar. Eradiqué de l'île de la Réunion et de l'île Maurice.

Asie : Asie du Sud-Ouest (Proche Orient) : Afghanistan, Pakistan (60 000 cas), Iran, Iraq (100 000 cas annuels de *P. vivax* seulement), Oman, Arabie Saoudite, Syrie, Afghanistan, Emirats arabes où il est seul présent.

Asie Méridionale (Moyen Orient) : Rare en Chine : il vient de réapparaître dans la province de Henandou où il avait été presque éradiqué en 1992 (189), il est également réapparu en Corée du Sud en 1993 où il avait été éradiqué en 1970 (179 et 180).

Inde, Bangladesh, Bhoutan, Indonésie, Népal, Nouvelle Guinée.

Iles Philippines, Papouasie Nouvelle Guinée.

Pacifique occidental (Extrême Orient) : Présent en Malaisie, îles Salomon, Vanuatu, Viet-Nam, Cambodge, Laos.

Amérique du Nord : De très rares observations de transmission locale par moustiques ont été faites aux U.S.A. au New Jersey 2 cas en 1994 (175), Michigan 1 cas en 1995 (181), Georgie 1 cas en 1996 (182), Suffolk County 1 cas en 1999 (183).

Mexique. Antilles : a été éradiqué de la Martinique et de la Guadeloupe.

Amérique du Sud : Brésil fréquent, Bolivie, Colombie, Equateur, Pérou, Vénézuéla, Paraguay rare, Argentine rare, Surinam, Guyane française, il y représente un tiers des cas (176, 177, 184 et 185). Il est présent à Haïti.

Honduras, Nicaragua, Guatemala, Costa Rica, Panama, El Salvador.

PHYSIOPATHOLOGIE

Incubation parasitaire habituelle : sept jours (6 à 8) (103)

Période de prépatence (intervalle séparant la piqûre infectante de l'apparition de la parasitémie (104) : 11-13 jours (forme classique). Cette période correspond à un cycle préérythrocytaire, hépatique (103 et 187). Les sporozoïtes hépatiques de *P. vivax* se divisent alors en schizontes ou en hypnozoïtes (178), ces derniers responsable des rechutes.

Incubation clinique, deux formes :

– forme classique (Afrique du Nord, Inde par exemple, *P. vivax* des pays chauds ou tempérés) de quinze jours à plusieurs semaines.

– forme à incubation prolongée pendant 8-10 mois, observés en Russie, en Corée du Nord où le paludisme contracté en automne ne se déclare qu'au printemps suivant (*P. vivax* des pays froids), *P. vivax* subsp. *hibernans* (188).

Seuil pyrétogène : 100 à 200 par μl , donc très bas. Mais au cours des rechutes, le seuil est dix fois plus élevé.

La fièvre de primo-invasion, quand elle existe, peut durer de 3-4 jours à une semaine. Elle est rarement continue et en plateau mais souvent se présente sous la forme d'accès quotidiens dits « double tierce ». Après une accalmie de quelques jours à deux semaines surviennent les accès francs intermittents de type tierce, dite tierce bénigne qui évoluent au même rythme que ceux de *P. falciparum*.

Les recrudescences ou réviviscences précoces sont fréquentes (quelques vagues d'accès par mois ou tous les 2-3 mois au cours de la première année par exemple). Elles sont attribuées aux parasites résiduels du sang. Les rechutes tardives dues aux formes parasitaires intra-hépatiques hypnozoïtes surviennent au bout d'un ou deux ans et peuvent continuer encore un ou deux ans (2 à 4 ans en tout).

Les rechutes sont donc possibles pendant quatre ans. Comme avec *P. falciparum*, après les dernières crises fébriles, le sujet est guéri cliniquement mais pas tout à fait parasitologiquement (à cause des formes hépatiques, hypnozoïtes) et ne doit pas être recruté comme donneur de sang.

Densité parasitaire : en moyenne moins forte que pour *P. falciparum* 100 000/ μl au maximum, moyenne de 5 000 à 25 000 par μl ; la recherche microscopique des parasites peut donc être longue et difficile.

HÉMATIES PARASITÉES

Ce sont préférentiellement les réticulocytes.

Taille : augmentée (photos n° 63 à 69).

Couleur : diminuée donc hématies de grande taille et pâle

Forme : conservée ou quadrangulaire, trapézoïdale

GRANULATIONS CARACTÉRISTIQUES qui ne s'observent que chez *P. vivax* et *P. ovale*.

– elles sont nombreuses : l'hématie est remplie de centaines de petits grains presque réguliers, très nets, colorés en rouge comparables aux granulations azurophiles des cellules sanguines ou médullaires, appelées granulations de SCHÜFFNER.

– elles sont constantes, présentes dans toutes les hématies parasitées à l'exception de celles renfermant un parasite trop jeune (forme annulaire au début) : c'est un élément de différenciation avec *P. ovale*.

– elles ne sont bien mises en évidence que lorsque la coloration a été faite avec une eau neutre ou légèrement alcaline. Avec une eau acide, on ne les voit pas et l'on se prive ainsi de l'élément le plus facile pour reconnaître *P. vivax* (ou *P. ovale*).

Noter que les granulations de Schüffner de *P. ovale* sont peut-être plus difficiles à mettre en évidence que celles de *P. vivax*. Elles exigent une coloration plus prolongée et parfois même une surcoloration suivie d'une différenciation (voir : coloration des frottis).

Aspect selon le stade évolutif de la maladie

On peut voir parfois en France une fièvre de primo-invasion à *P. vivax* qui correspond du point de vue parasitologique à la présence dans le sang de trophozoïtes à tous les stades évolutifs, appartenant à des vagues de schizogonies différentes. Mais le plus souvent, compte-tenu des délais de retour depuis le pays d'endémie le malade est vu plus tardivement, au stade des accès francs ou au cours de rechutes, les parasites se développent alors de façon plus synchrone et sont donc au même stade évolutif dans le sang : juste après l'accès fébrile, rien que des formes

annulaires, 24 heures plus tard : surtout des formes amiboïdes et quelques heures avant l'accès : surtout des corps en rosace.

La présence précoce de gamétocytes facilite dans une certaine mesure l'identification de l'espèce.

Une lame de *P. vivax* est souvent bigarrée : trophozoïtes dont le stade dépend du moment du prélèvement, associées presque toujours aux formes sexuées.

TROPHOZOÏTES JEUNES : (photos n° 62 à 65) annulaires, mais les anneaux sont de grande taille occupant 1/2 ou 2/3 de l'hématie, avec un cytoplasme épais, un noyau plus gros que dans l'anneau de *P. falciparum*. Pas encore de granulations de Schüffner.

TROPHOZOÏTES ÂGÉS : (photos n° 66 et 70) le parasite s'étire, se déforme et devient amiboïde avec des pseudopodes. La chromatine nucléaire se compose d'un ou deux blocs irréguliers, la vacuole occupant l'espace laissé libre entre les pseudopodes. Granulations de Schüffner très nombreuses.

SCHIZONTES : La schizogonie se faisant dans le sang périphérique, on peut rencontrer tout au long du cycle de 48 heures des schizontes à différents stades.

SCHIZONTES JEUNES : plusieurs masses nucléaires irrégulières, à l'intérieur d'un cytoplasme peu vacuolaire, de forme irrégulière. Pigment abondant et dispersé.

SCHIZONTES MÛRS OU CORPS EN ROSACE (photos n° 75, 76 et 77) : (on l'appelle encore corps mûrifforme) la rosace remplit complètement l'hématie dont le liseré périphérique est bourré de granulations de Schüffner. Elle contient 16-18, jusqu'à 24 mérozoïtes bien individualisés avec un noyau assez gros et irrégulier. Un amas de pigment au centre (photos n° 78 et 79).

GAMÉTOCYTES

Les gamétocytes apparaissent très rapidement dès les premiers accès, après quelques jours de fièvre. Le traitement les fait disparaître rapidement.

Ils sont arrondis ou ovalaires, massifs, sans vésicules (photos n° 80 à 82). Le gamétocyte mûr occupe presque la totalité de l'hématie.

Gamétocyte mâle (photo n° 81) : lilas, noyau allongé en écharpe, en général. Pigment abondant et dispersé. C'est dans le paludisme à *P. vivax*, surtout quand le sang est conservé quelques heures (ou plus) à la température du laboratoire, que l'on observe le plus fréquemment des exflagellations de gamétocytes mâles (photos n° 83, 84 et 85).

Gamétocyte femelle (photo n° 82) : bleu, arrondi ou ovalaire, de même taille. Noyau en général plus petit, plus compact, plus marginal. Pigment abondant et dispersé aussi.

PIGMENT : en fins bâtonnets, bacilliformes, dispersés, brun foncé dans les trophozoïtes âgés.

LE SANG DANS LE PALUDISME À *P. VIVAX*

Comme pour *P. falciparum*, la fièvre de première invasion et les accès s'accompagnent de leucocytose avec polynucléose neutrophile. Les formes chroniques s'accompagnent, au contraire, de leucopénie avec monocytose.

Il y a toujours des parasites dans le sang quel que soit le moment du cycle : on voit sur le même frottis des trophozoïtes de même âge, des schizontes de même âge ou des rosaces, en même temps que des gamétocytes. La parasitémie est, maximum vers la 8^e heure après l'accès fébrile. Plus tard, la phagocytose détruit une grande quantité de parasites.

Si le sang a été prélevé juste après un accès fébrile, on risque de rencontrer beaucoup de formes annulaires graciles qui font hésiter entre *P. vivax* et association *P. vivax* + *P. falciparum*. En refaisant un autre prélèvement 24 heures plus tard on pourrait mettre en évidence les formes amiboïdes et les granulations de Schüffner caractéristiques de l'espèce.

Groupe Duffy et *Plasmodium vivax* voir page 169

Souches de *P. vivax* et sous espèces

Six souches de *P. vivax* ont été isolées, entretenues sur singes et utilisées dans un but thérapeutique ou expérimental (188) :

Dans l'hémisphère Nord *P. vivax hibernans* originaire du Nord de la Russie. Les premières manifestations cliniques surviennent 8 à 9 mois après l'infestation.

Souche Madagascar, isolée à Londres, d'un marin l'ayant contracté lors d'une escale à Madagascar. Elle a été très employée dans la malaria thérapie des paralysés généraux.

Souche Nord Coréenne.

Souche Dutch, de Hollande.

Souche Ste Elizabeth de Washington USA.

Souche Chesson de Nouvelle Guinée.



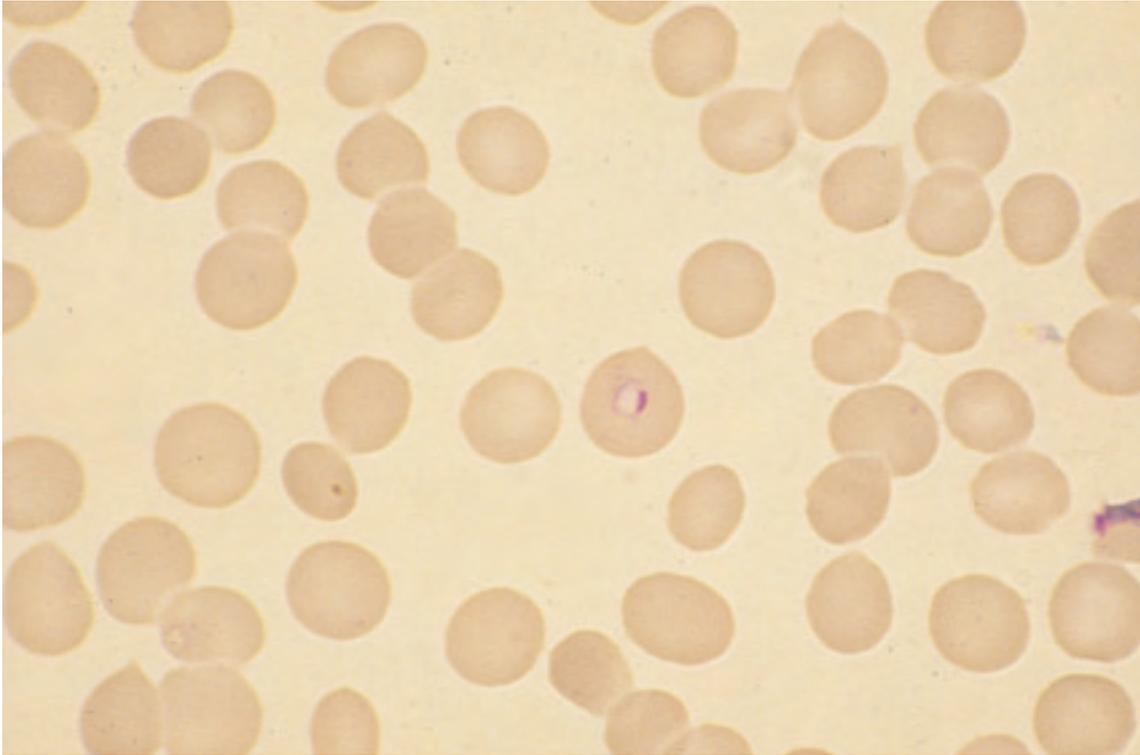


Photo n° 62 : Plasmodium vivax. Frottis. Trophozoïte jeune à noyau allongé dans une hématie légèrement augmentée de taille sans granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

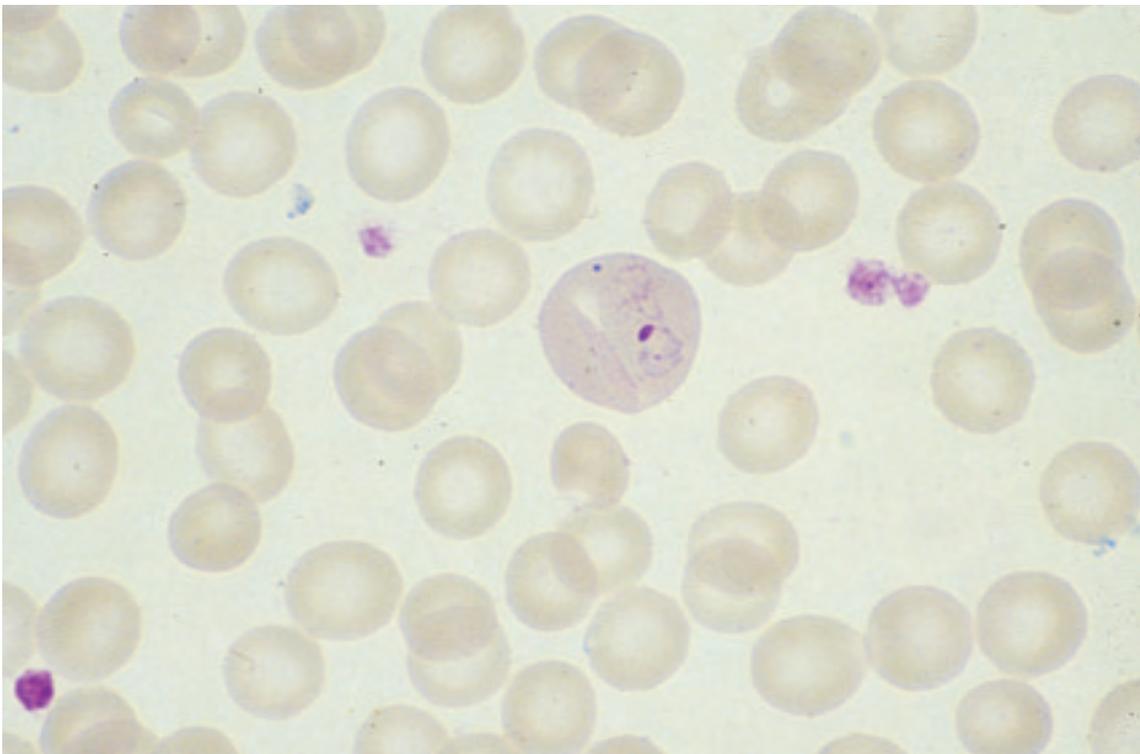


Photo n° 63 : Plasmodium vivax. Frottis. Trophozoïte jeune dans une très grande hématie ou commencent à apparaître les granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



Photo n° 64 : Plasmodium vivax. Frottis. Deux trophozoïtes jeunes dans une hématie de grande taille sans granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

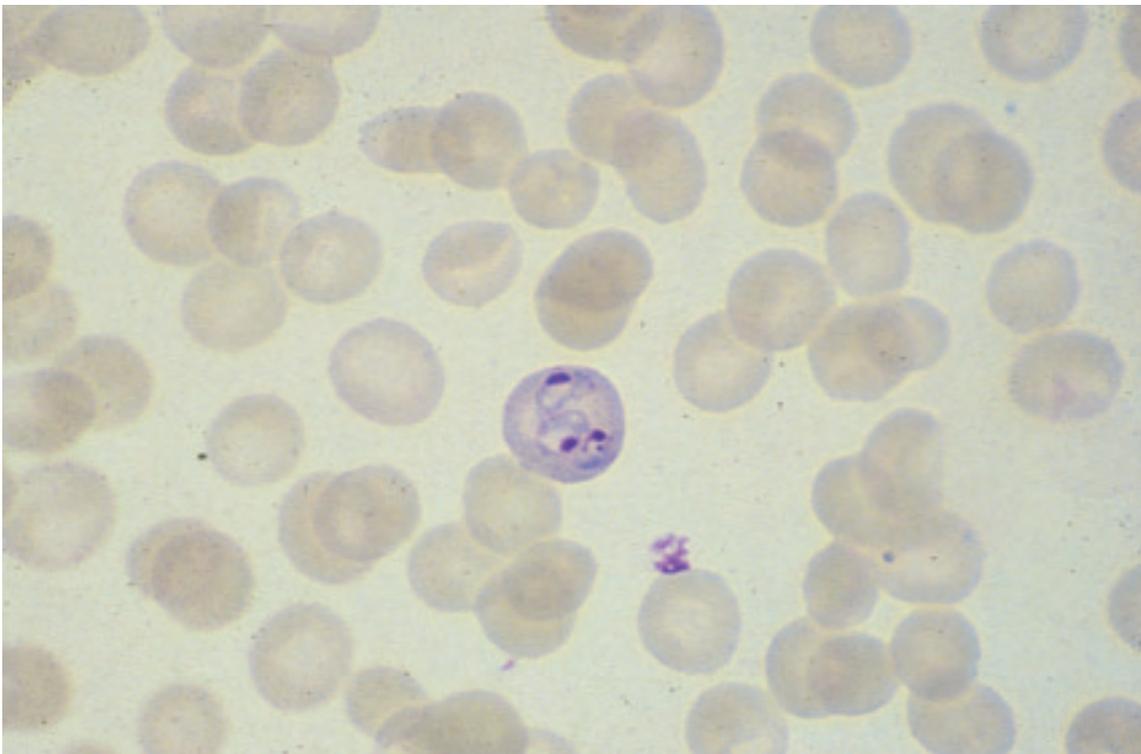


Photo n° 65 : Plasmodium vivax. Frottis. Hématie tri-parasitée par des trophozoïtes jeunes, pas de granulations de Schüffner visibles. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

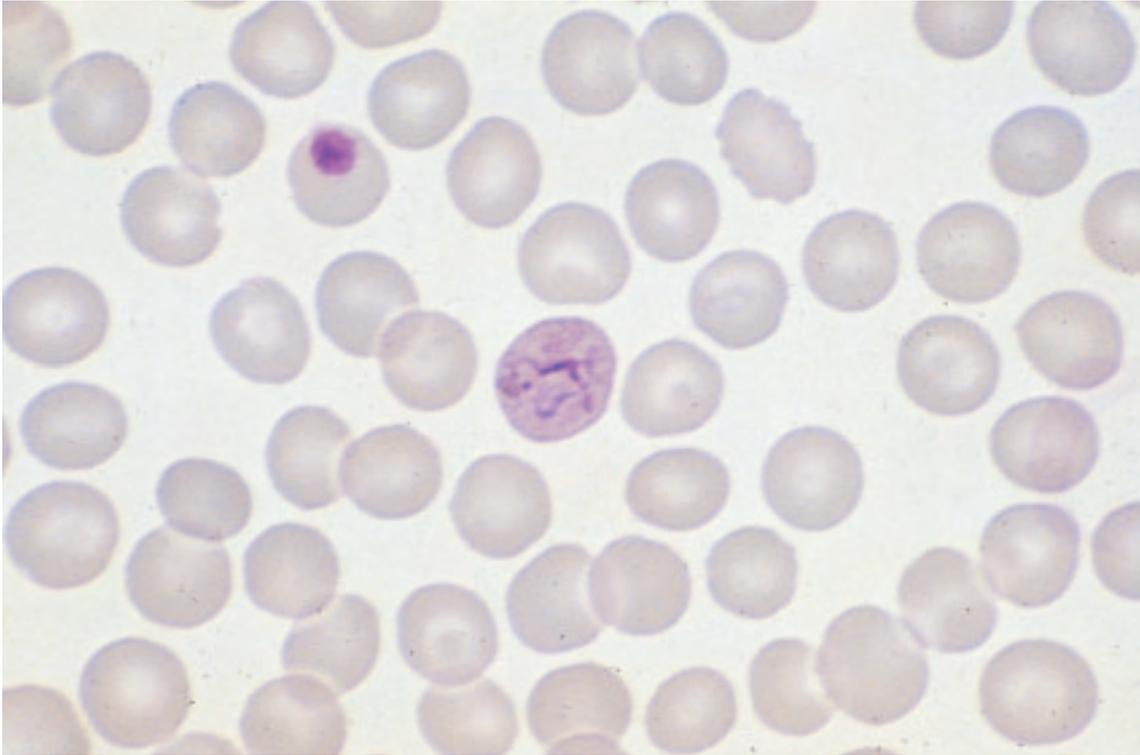


Photo n° 66 : *Plasmodium vivax*. Frottis. Trophozoïte amiboïde, apparition des granulations de Schüffner. Plaquette sur une autre hématie. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

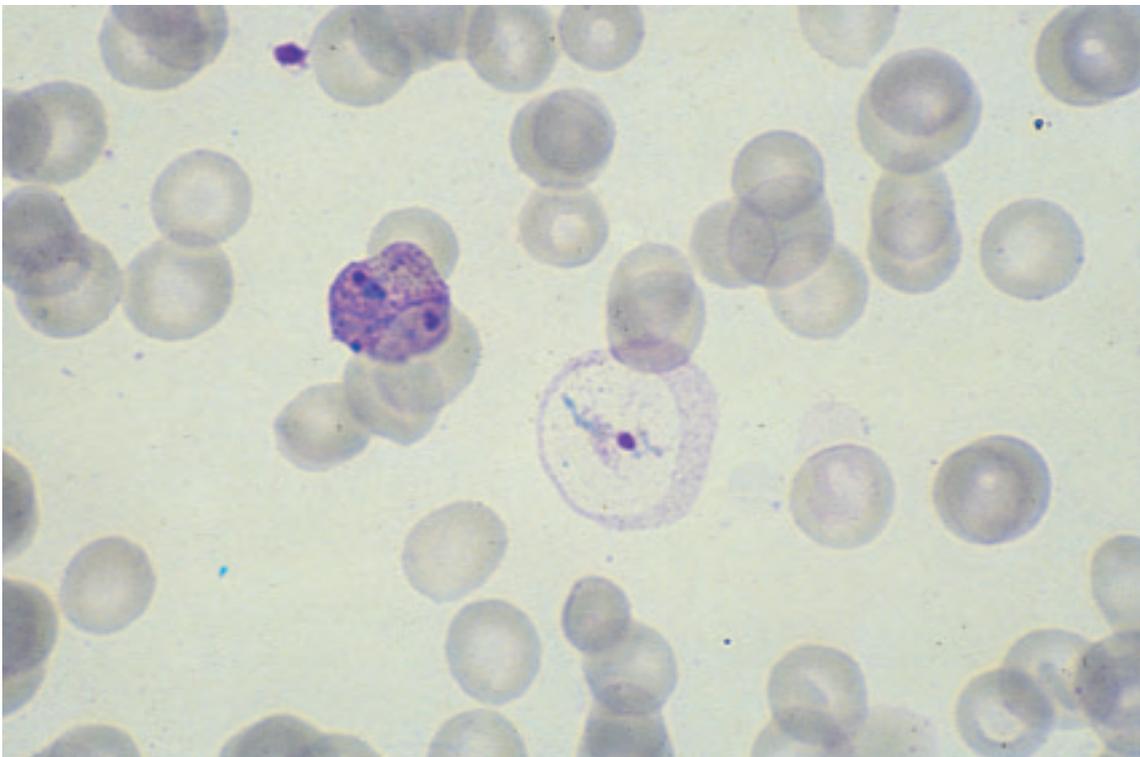


Photo n° 67 : *Plasmodium vivax*. Frottis. Trophozoïte amiboïde dans une hématie en « demi-lune » observée parfois dans le paludisme et diverses anémies. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

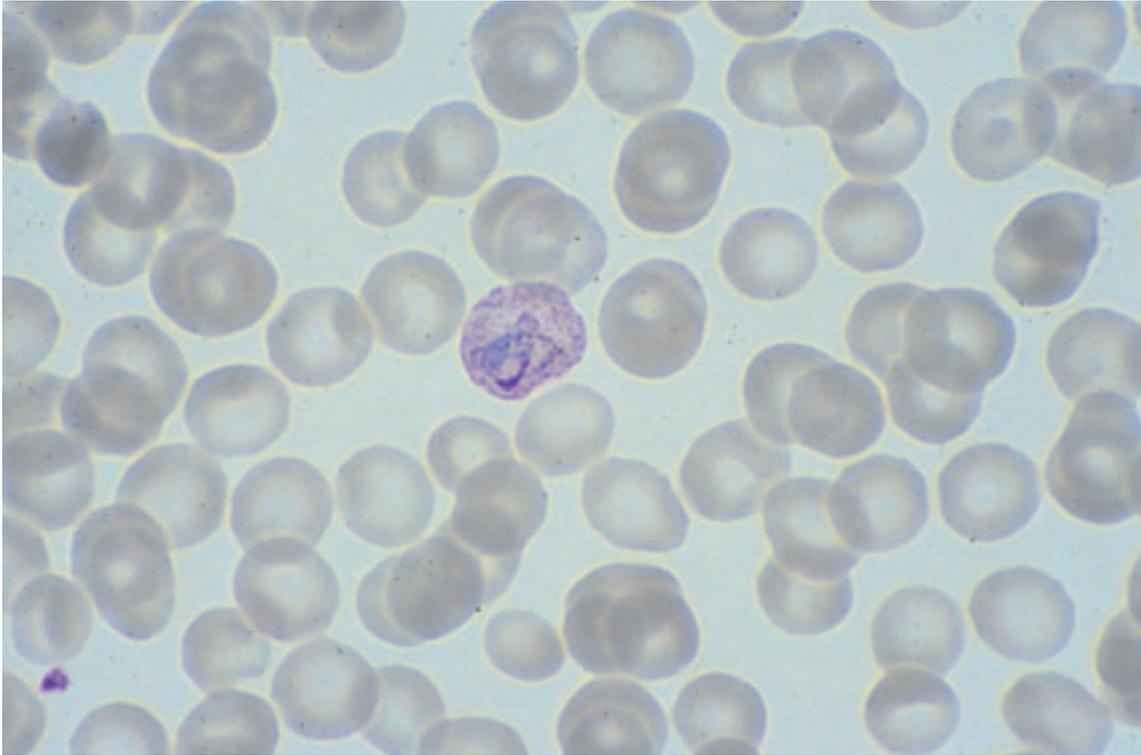


Photo n° 68 : *Plasmodium vivax*. Frottis. Trophozoïte âgé amiboïde dans une hématie de grande taille avec de nombreuses granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

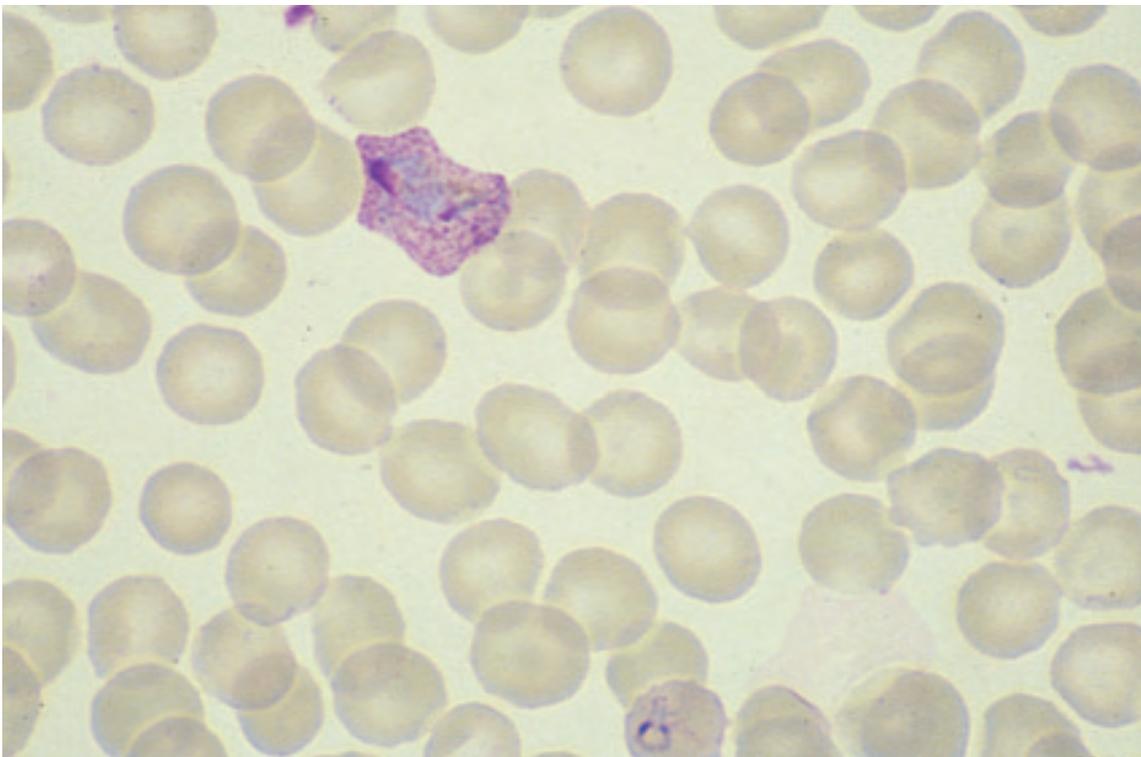


Photo n° 69 : *Plasmodium vivax*. Frottis. Corps amiboïde dans une hématie de très grande taille de forme géométrique (polygonale) caractéristique de *P. vivax*. Nombreuses granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

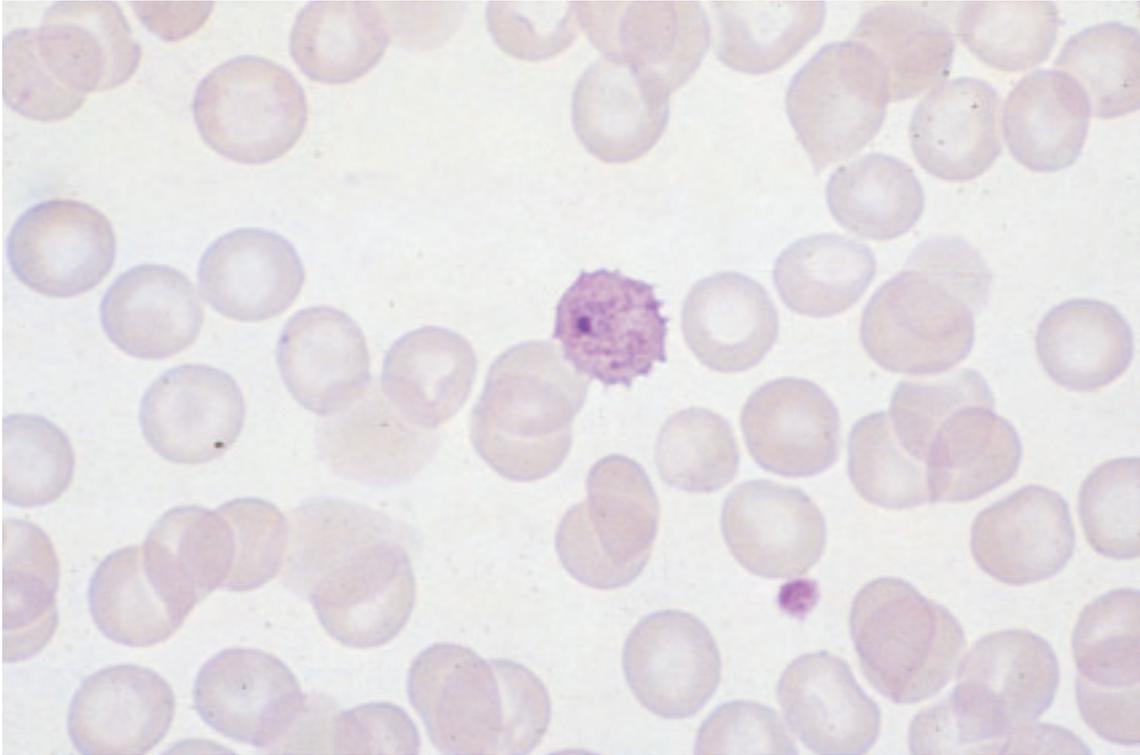


Photo n° 70 : Plasmodium vivax. Frottis. Trophozoïte âgé dans une hématie crénelée d'assez grande taille avec de nombreuses granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

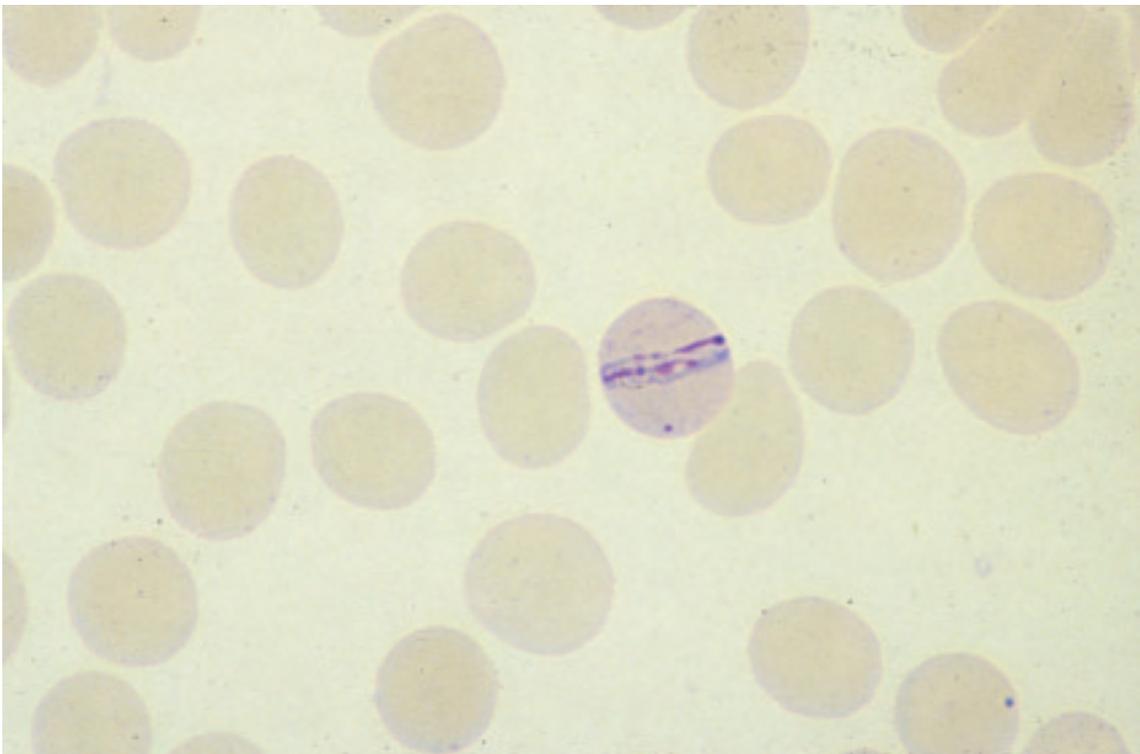


Photo n° 71 : Plasmodium vivax. Frottis. Bande équatoriale dans une assez grande hématie avec granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

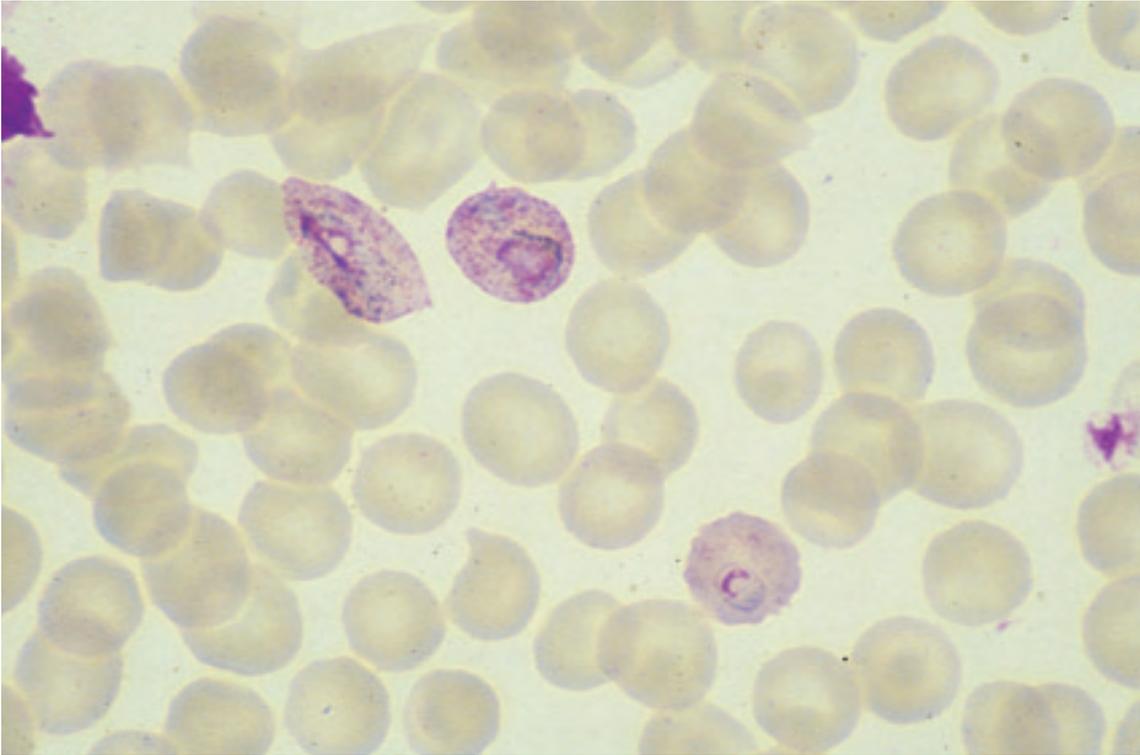


Photo n° 72 : Plasmodium vivax. Frottis. Trois hématies avec granulations de Schüffner parasitées, dont deux voisines, avec des trophozoïtes de forme amiboïde. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

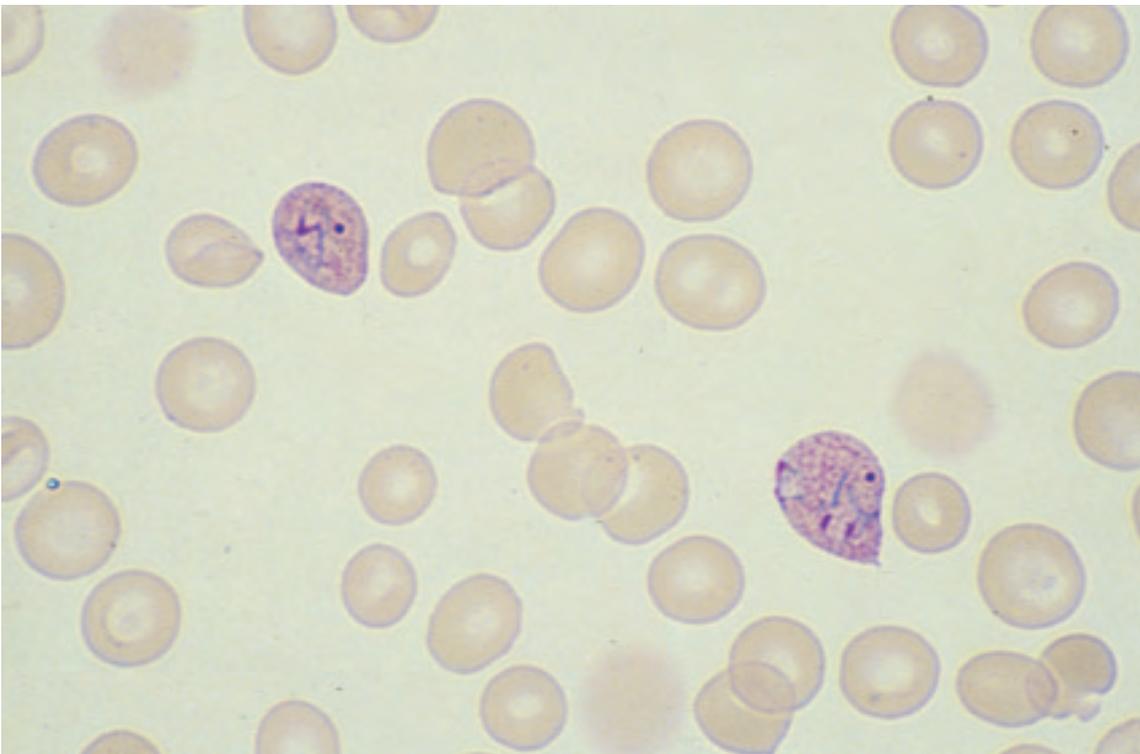


Photo n° 73 : Plasmodium vivax. Frottis. Deux hématies ovoïdes contenant des corps amiboïdes avec granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

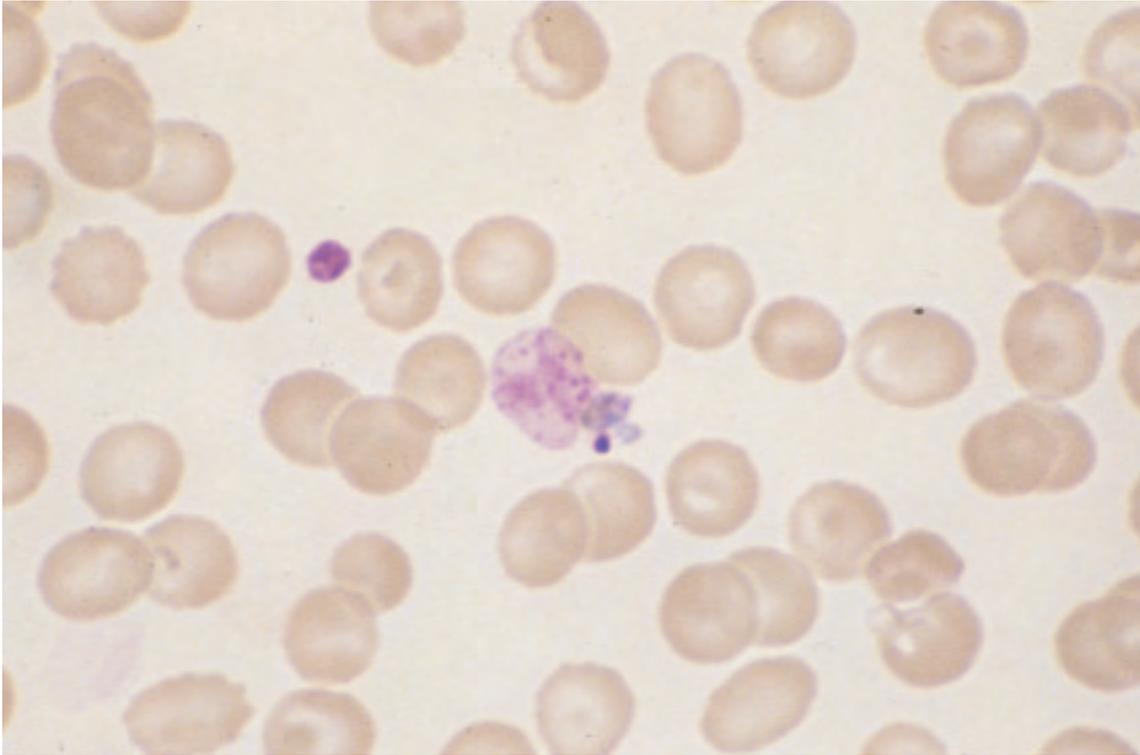


Photo n° 74 : *Plasmodium vivax*. Frottis. Trophozoïte sorti de l'hématie qu'il avait parasité. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

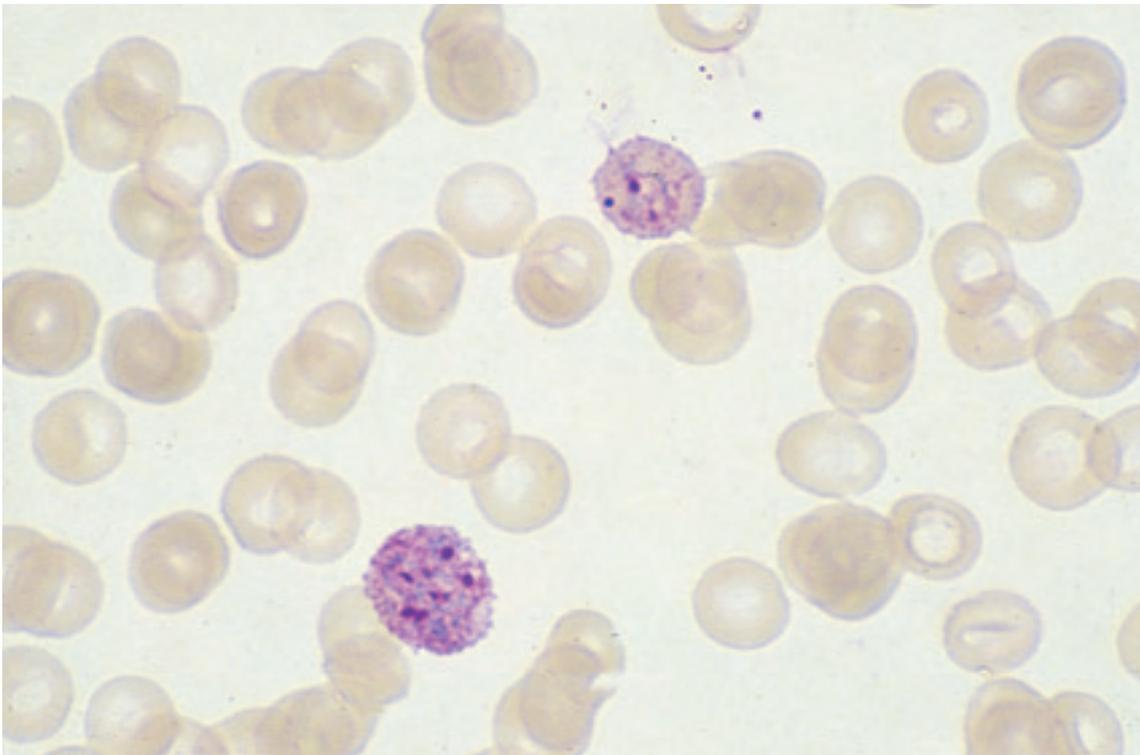


Photo n° 75 : *Plasmodium vivax*. Frottis. Une hématie à peine augmentée de volume contenant un corps amiboïde et des granulations de Schüffner. Une autre de grande taille contenant un schizonte à 6 noyaux. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

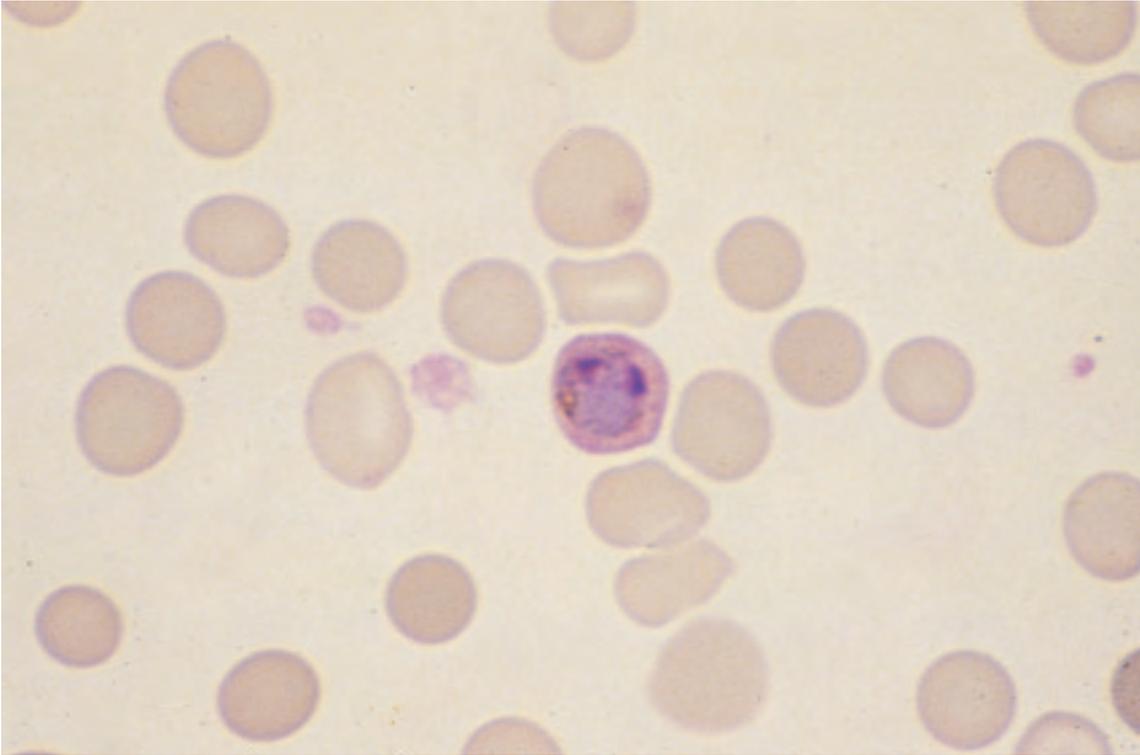


Photo n° 76 : Plasmodium vivax. Frottis. Schizonte à 2 noyaux dans une assez grande hématie avec granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

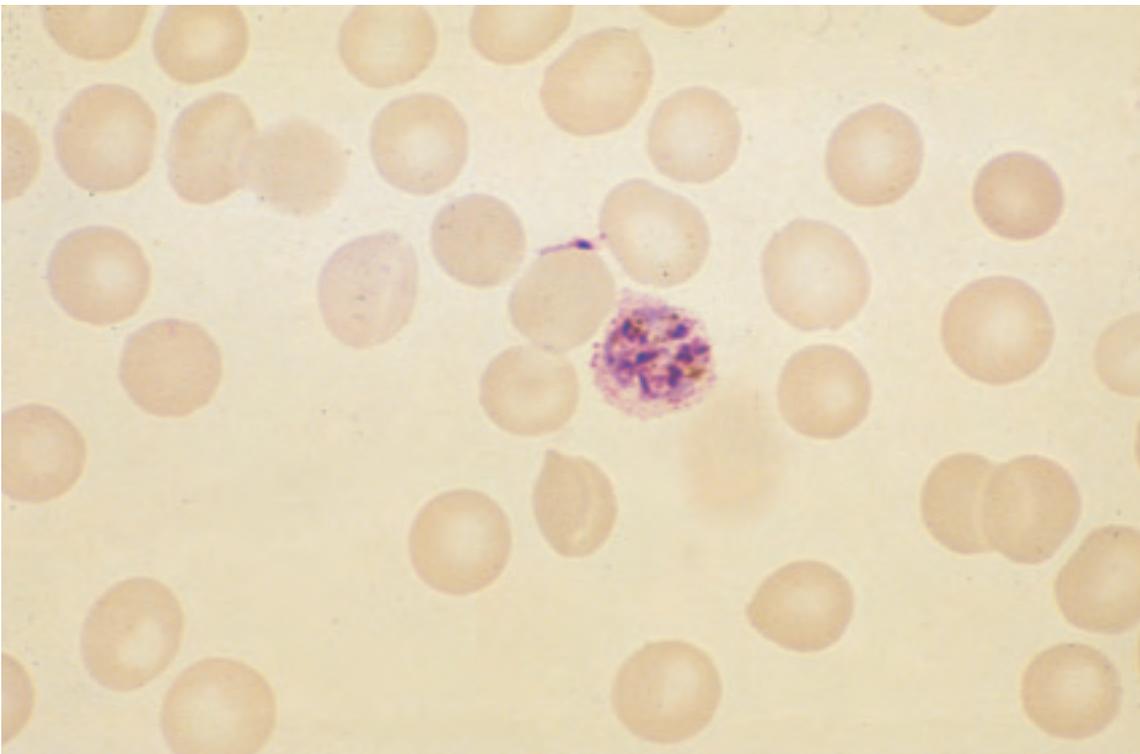
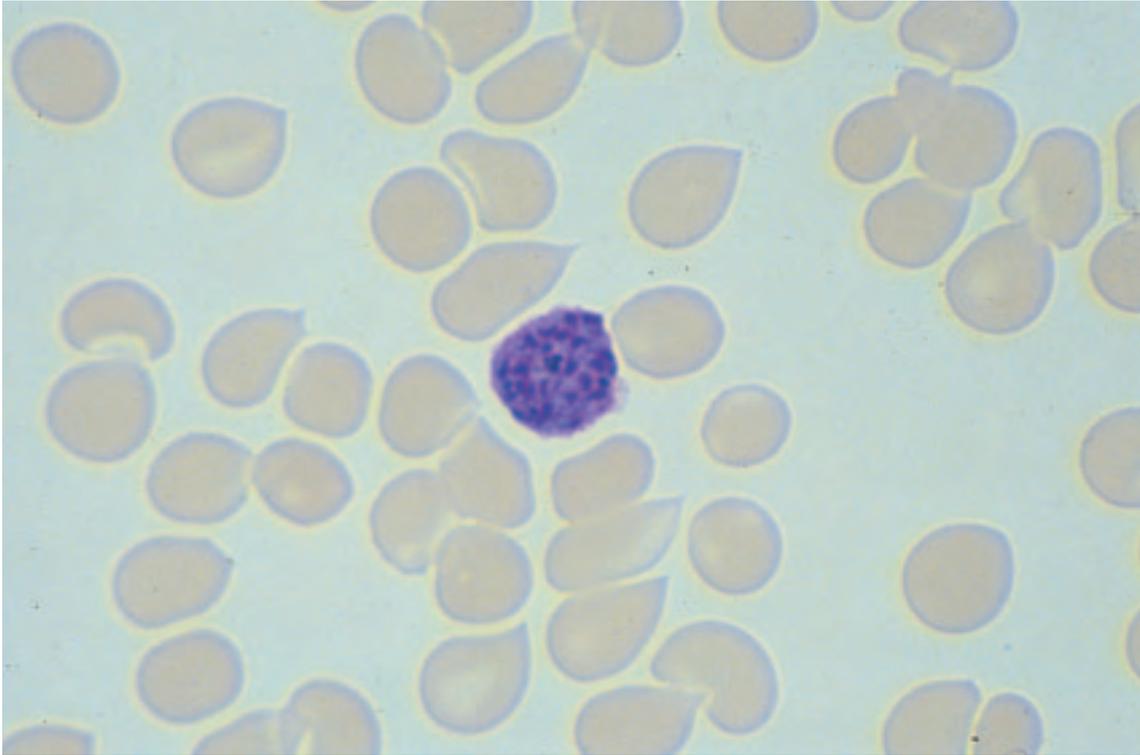
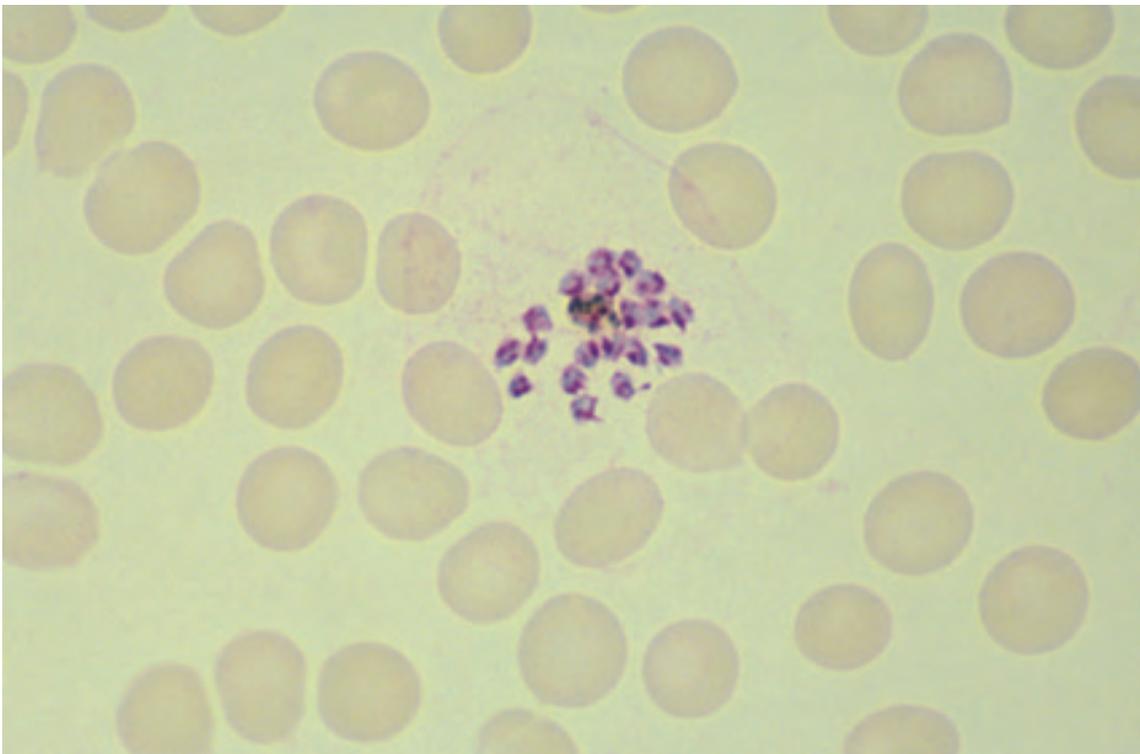


Photo n° 77 : Plasmodium vivax. Frottis. Schizonte à 8 noyaux. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



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



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

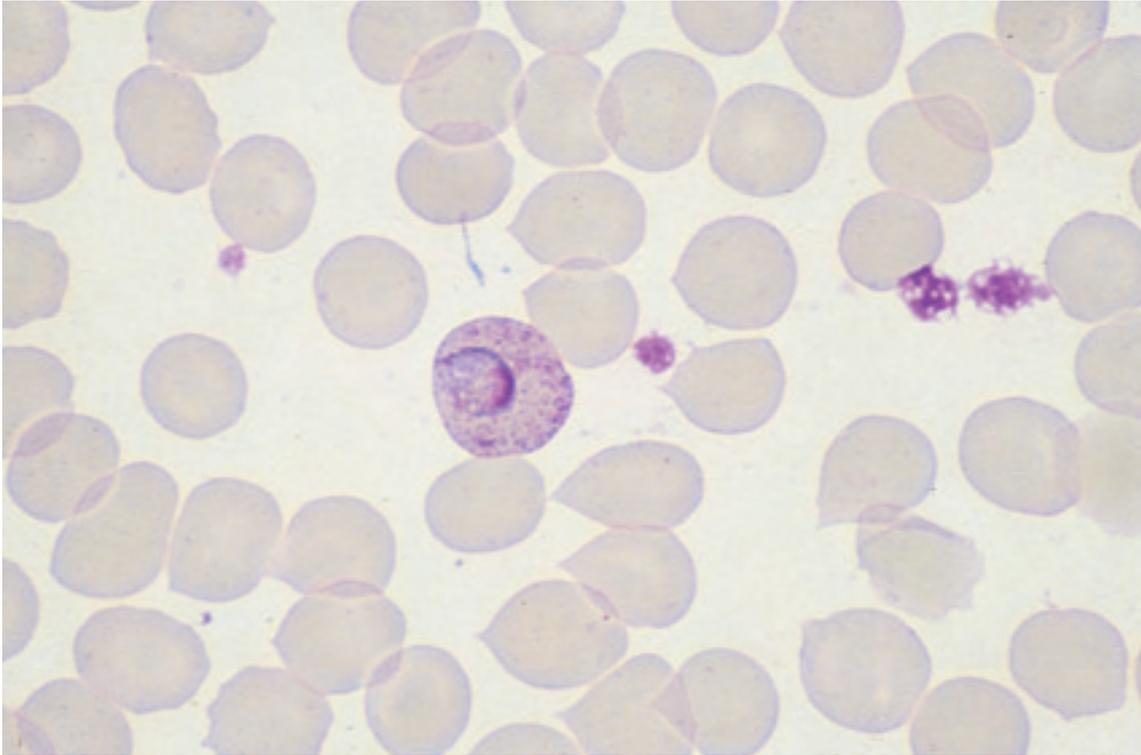


Photo n° 80 : Plasmodium vivax. Frottis. Jeune gamétoocyte. Présence de granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

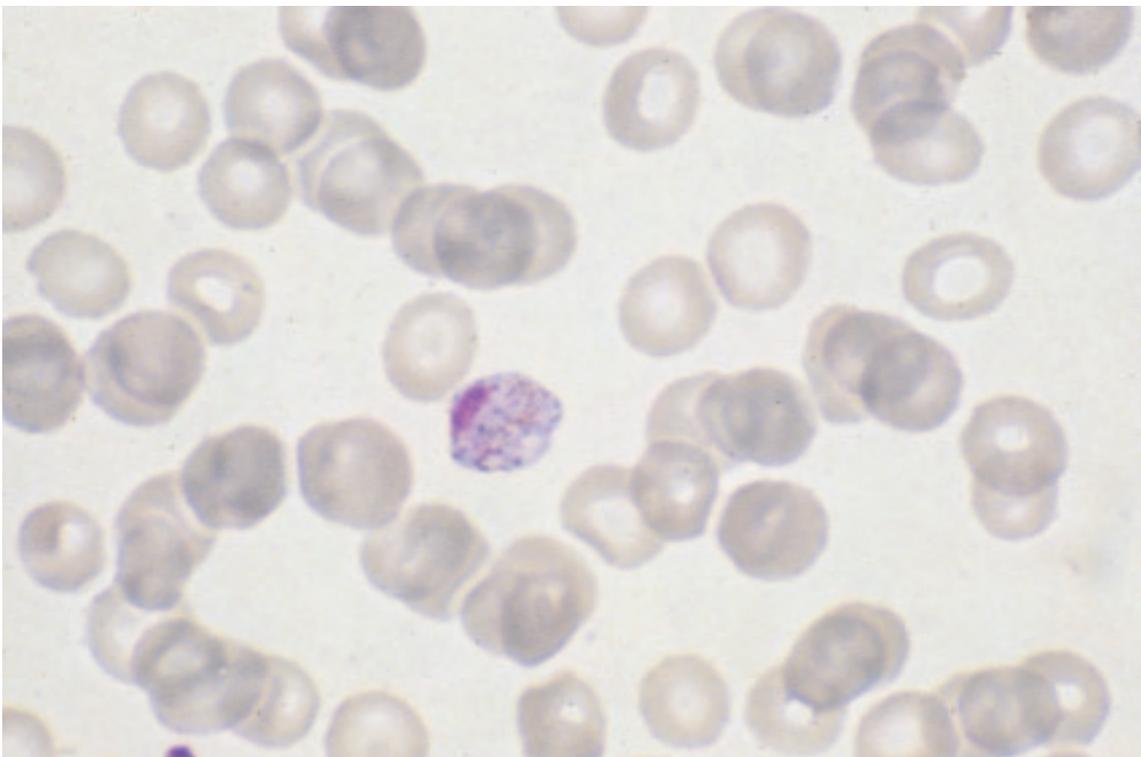
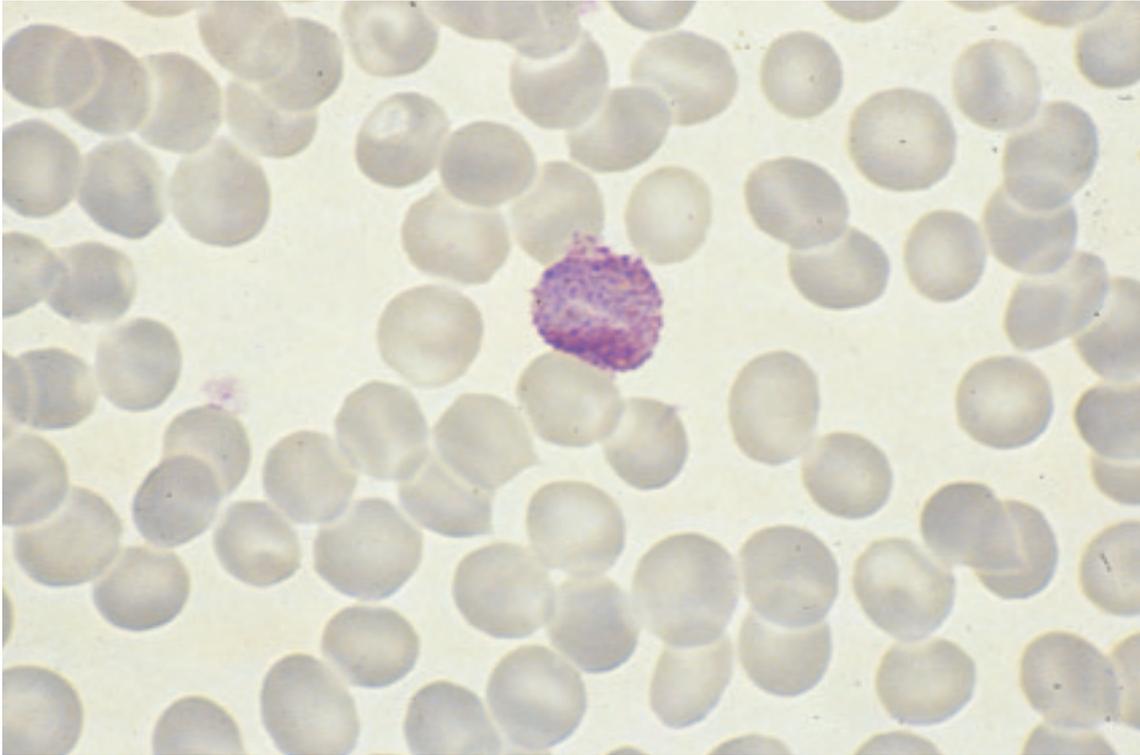
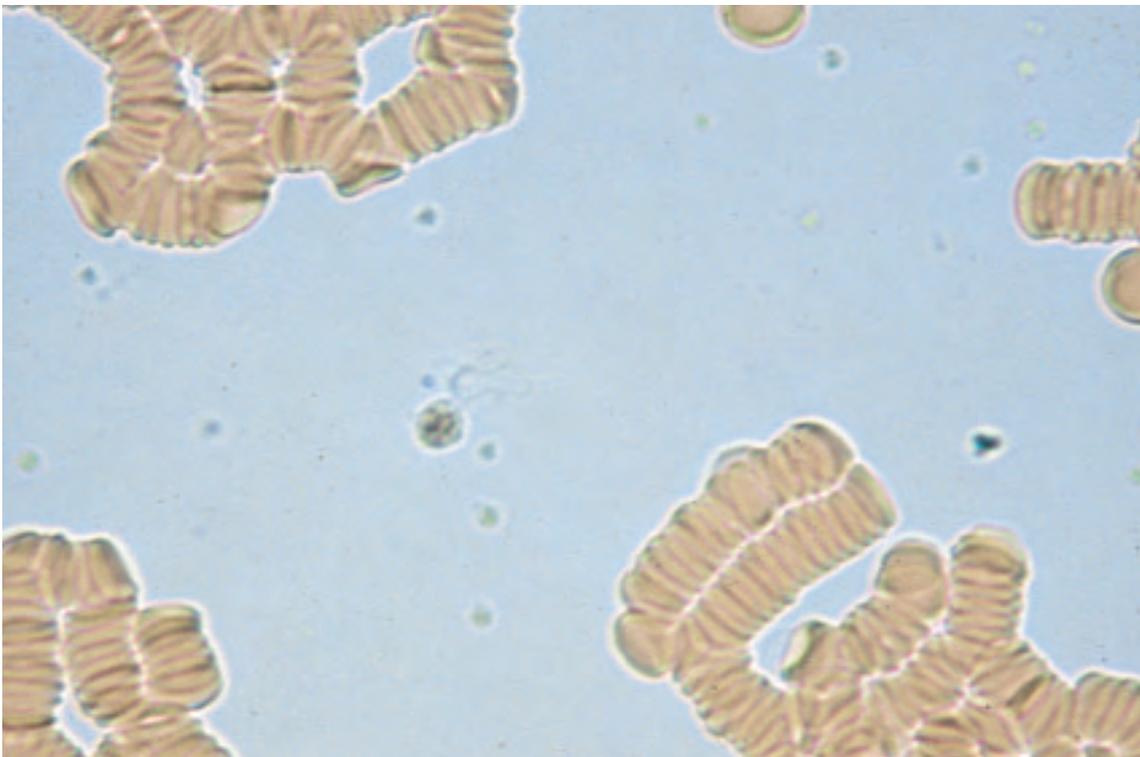


Photo n° 81 : Plasmodium vivax. Frottis. Gamétoocyte mâle = microgamétoocyte. Cytoplasme violet-bleu, pigment granuleux dispersé. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



*Photo n° 82 : Plasmodium vivax. Frottis. Gamétoyte femelle = macrogamétoyte.
Cytoplasme bleu, pigment granuleux. Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



*Photo n° 83 : Plasmodium vivax. Sang entre lame et lamelle (état frais). Au centre exflagellation.
Cet aspect correspond à celui observé par Laveran lors de sa découverte des Plasmodium.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

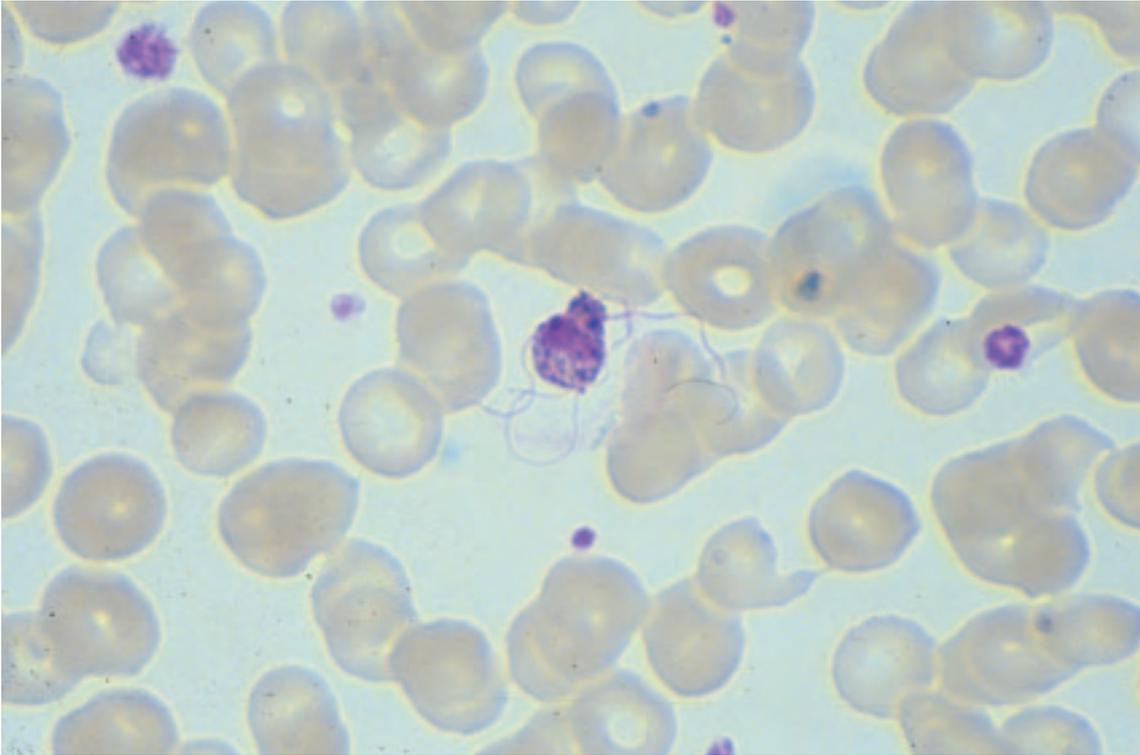


Photo n° 84 : Plasmodium vivax. Frottis. Gamétoocyte mâle = microgamétoocyte. Exflagellation en cours, cinq flagelles visibles. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

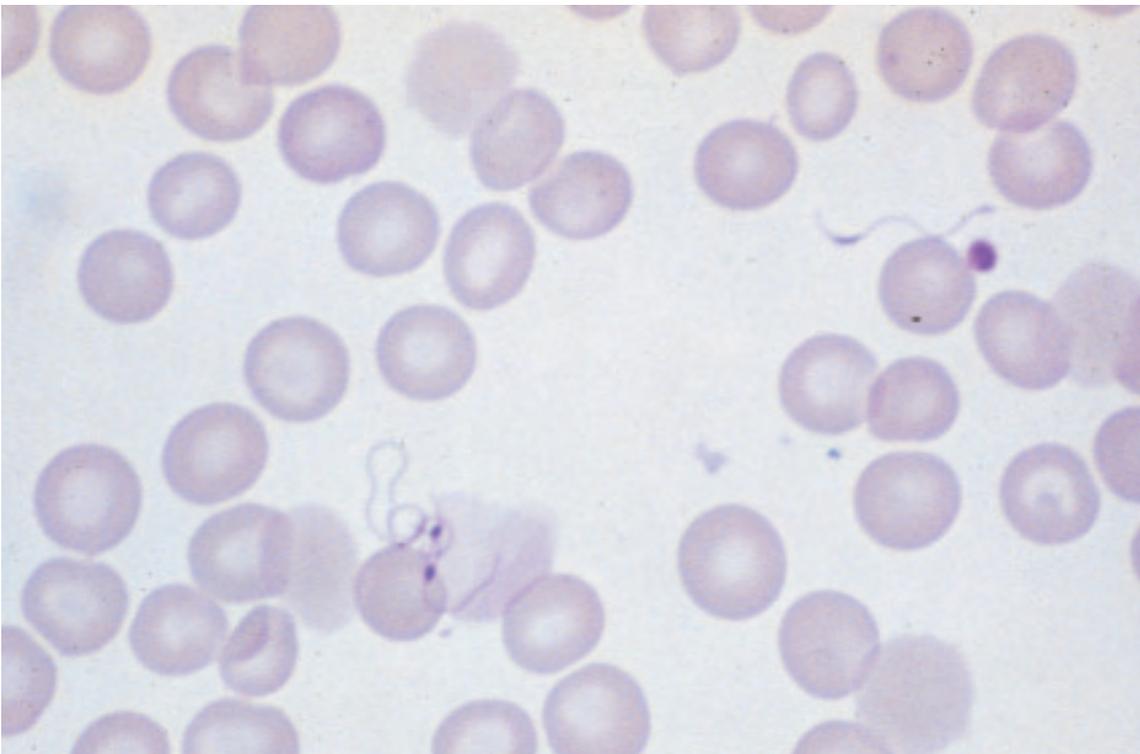


Photo n° 85 : Plasmodium vivax. Frottis. Flagelles libres : 3 groupés et un isolé à ne pas confondre avec des Borrelia sp. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

■ *PLASMODIUM OVALE*

**Tableau X : Plasmodium ovale : résultats des 11 tests
du Contrôle National de Qualité en Parasitologie en France.**

DATE D'ENVOI	NOMBRE DE RÉPONSES	RICHESSSE*	STADES	RÉSULTATS CONFORMES	DEUXIÈME RÉPONSE	TROISIÈME RÉPONSE
11/81	1 525	0,1 à 1	Trophozoïtes	29,6 %	<i>Plasmodium vivax</i> 32,8 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 12,6 %
03/83	1 042	0,1 à 1	Trophozoïtes	49,15 %	<i>Plasmodium vivax</i> 29,3 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 10,65 %
06/85	1 022	< 0,1	Trophozoïtes, schizontes jeunes et âgés et gamétocytes	48,7 %	<i>Plasmodium vivax</i> 35 %	<i>Plasmodium malariae</i> 9 %
07/88	1 125	0,1 à 0,5	Trophozoïtes et schizontes jeunes	70,75 %	<i>Plasmodium vivax</i> 23,2 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 5,9 %
10/89	1 073	0,1 à 0,3	Trophozoïtes et gamétocytes	60,6 %	<i>Plasmodium vivax</i> 20,8 %	<i>Plasmodium malariae</i> 3,7 %
03/93	1 236	0,2 à 0,5	Trophozoïtes jeunes et âgés, rares schizontes et rosaces	75,3 %	<i>Plasmodium vivax</i> 12,3 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 5,9 %
06/95	1 267	0,05 à 0,2	Trophozoïtes, schizontes et gamétocytes	65,7 %	<i>Plasmodium vivax</i> 19,4 %	<i>Plasmodium malariae</i> 2,7 %
03/96	1 272	0,1 à 0,3	Trophozoïtes et gamétocytes	72,6 %	<i>Plasmodium vivax</i> 21,6 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 2 %
11/97 (Bioforma)	3 671	0,02 à 0,05	Trophozoïtes, schizontes et gamétocytes	91,5 %	<i>Plasmodium vivax</i> 5,5 %	<i>Plasmodium malariae</i> 1,9 %
10/98	1 307	0,05 à 0,2	Trophozoïtes, schizontes et gamétocytes	85,7 %	<i>Plasmodium vivax</i> 10,1 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 1,2 %
10/00	1 288	0,1 à 0,3	Trophozoïtes, schizontes et gamétocytes	79,3 %	<i>Plasmodium vivax</i> 15,8 %	<i>Plasmodium malariae</i> 2,4 %
Richesse moyenne statistique des 11 cas : 0,27 % Intervalle de confiance 0,13 à 0,41 %						

* La richesse moyenne est exprimée en pourcentage d'hématies parasitées

L'espèce *Plasmodium ovale* a été décrite avec beaucoup de précision en 1922 par J.W. Stephens à Londres, principalement chez un malade venant de l'Afrique de l'Est (194 et 203). *P. ovale* était, jusqu'aux années 60, considéré comme une espèce rare particulièrement en France.

HO THI SANG fit en 1964 le diagnostic de deux cas et confectionna des centaines de frottis à partir du sang qu'on lui avait apporté de ces malades. Ces frottis servirent à l'enseignement post-universitaire et permirent aux parasitologues et biologistes français de bien connaître cette espèce plasmodiale. Nous continuons cet enseignement dans le cadre du Contrôle National de Qualité en Parasitologie.

Le diagnostic biologique de l'espèce *P. ovale* montre dans les envois successifs du Contrôle National de Qualité en Parasitologie un net et très significatif progrès mais montre également que le diagnostic différentiel surtout avec *P. vivax* présente des difficultés. Sa prévalence parmi les cas de paludisme importé en France est donc maintenant précisément évaluée à 7 % (193), 6 % (143), du même niveau ou légèrement supérieure que celle de *P. vivax*. L'importance de l'endémie de ce parasite en Afrique tropicale explique ce chiffre relativement élevé.

Cette importante amélioration des résultats est un élément très positif pour l'action de formation continue que nous réalisons.

SYMPTOMATOLOGIE : *P. ovale* donne une fièvre tierce, qui revient tous les trois jours (le premier jour accès de fièvre, le deuxième jour sans accès, le troisième jour nouvel accès). Il s'agit habituellement d'un paludisme bénin, comme celui de *P. vivax*. Des formes sévères peuvent être observées : formes avec douleurs musculaires sévères ou atteinte cardiaque (199).

RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE : c'est une espèce principalement africaine.

Afrique (197) : *P. ovale* y est répandu dans l'ensemble des pays tropicaux africains. Toutes les races y sont sensibles en particulier les mélanodermes qui ont une résistance constitutionnelle à *Plasmodium vivax*. Il est présent en particulier :

- au Nord : Tchad, Soudan, Egypte. Nous l'avons observé chez un français ayant fait un séjour dans le Sud-Marocain.
- Afrique Centrale : Cameroun + + +, République Centrafricaine, Gabon, Zaïre, Congo Brazzaville, Nigeria.
- Afrique Occidentale : Haute-Volta, Mali, Sénégal, Gambie, Guinée, Sierra Léone, Libéria, Côte-d'Ivoire, Ghana, Togo, Bénin.
- Afrique de l'Est : Ouganda + + +, Kenya, Somalie, Tanganyika (207), Erythrée (201).
- au Sud : Rhodésie (192), Nyassaland, Mozambique.

Il est absent de Madagascar, mais a été signalé à l'Ile Maurice.

Asie : *P. ovale* a été diagnostiqué dans des pays d'Asie proches de l'Afrique comme le Koweït (200). Il est présent mais peu abondant aux Philippines, en Nouvelle Guinée, à Manille. Les cas publiés en Indonésie, dans le Sud de la Chine, aux Indes, au Pakistan, en Indochine sont douteux (205). Il n'existe pas en Malaisie (21)..

Il est à noter que l'étude comparative de la souche Donaldson provenant d'Asie (Philippines) et la souche Liberian provenant d'Afrique de l'Ouest n'a pas montré de différences morphologiques significatives (196).

Autres Régions : Les observations concernant sa présence dans d'autres pays sont rares et ne comportent souvent pas de précisions quant à l'aspect de l'hématozoaire : quelques-unes de ces identifications ne sont pas absolument certaines (7 et 191).

Richesse : La parasitémie est en général moins élevée que celle provoquée par *P. vivax* (195). Pour les envois faits dans le cadre du Contrôle National de Qualité en Parasitologie elle était en moyenne de 0,27 % contre 0,81 % pour *P. vivax*.

HÉMATIES PARASITÉES COLORÉES AU MAY-GRÜNWARD-GIEMSA

L'intérêt de cette technique de coloration a été soulignée (206). L'emploi d'autres techniques peut faire apparaître des différences artificielles (206).

Taille : les hématies parasitées sont de taille normale ou modérément augmentée, moins que celles de *P. vivax*. Au stade schizonte leur surface est augmentée en moyenne d'un quart, alors qu'elle l'est de moitié pour *P. vivax* (206).

Couleur : la coloration de l'hématie est parfois normale ou souvent légèrement pâle, comme pour *P. vivax*. (203)

Granulations de Schüffner : les hématies montrent la présence de nombreuses granulations de Schüffner, comme les hématies parasitées par *P. vivax*. L'aspect des granulations de ces deux espèces plasmodiales est pratiquement le même en particulier pour leur taille.

Elles apparaissent plus précocement dans les hématies contenant de jeunes trophozoïtes que pour *P. vivax* (195). En fait, à la suite du métabolisme du parasite elles sont visibles 12 heures environ après que le mérozoïte ait pénétré dans l'hématie mais le jeune trophozoïte ne se modifie pas avant 18 heures (103).

Leur mise en évidence dépend de la neutralité (pH 7 à 7,4) de l'eau utilisée pour la coloration et les variations de teintes parfois observées sont liées aux variations du pH.

Pour *P. ovale* les granulations de Schüffner sont dans certains cas apparemment absentes du frottis alors que les autres données morphologiques et épidémiologiques sont en faveur de cette espèce : il convient alors de reprendre un frottis non coloré, ou le frottis déjà coloré, et de le surcolorer en prolongeant l'action du Giemsa pendant 1 heure. Les granulations de Schüffner apparaissent alors dans la plupart des cas.

Forme : leur forme souvent ovale est à l'origine du nom donné à ce parasite par Stephens. Elle est présente pour une grande partie des hématies parasitées, mais pas pour toutes : 30 % à 85 %.

Dans le sang examiné entre lame et lamelle les hématies parasitées ne sont pas ovales et n'ont pas d'extrémités frangées. Elles ne peuvent s'ovaliser que lorsque les globules rouges sont disposés sur une seule couche. L'ovalisation des hématies est donc artificielle, et pour un même malade leur proportion peut varier d'un frottis à l'autre, alors même qu'ils ont été confectionnés et colorés simultanément. Dans les frottis colorés au M.G.G. leur présence est favorisée par la rapidité du séchage et la finesse du frottis. (103 et 202).

Les différents aspects des hématies parasitées de forme ovale sont :

- ovale régulier, ou pointu à une extrémité (photos n° 89, 90, 91, 96 et 106).
- ovale avec des spicules, 1, 2 ou 3, répartis irrégulièrement à la périphérie de l'hématie, pour un tiers des hématies,
- ovale avec une extrémité frangée (= fimbriée) (204) pour environ un quart des hématies. Les formes ovales frangées (photos n° 87, 92, 95 et 102) aux deux extrémités sont moins fréquentes (photos n° 98, 102 et 103).

Les autres hématies parasitées sont soit déformées comme sont celles de *P. vivax* soit de forme ronde avec parfois des spicules.

Il convient de souligner également que pour les 3 autres espèces de *Plasmodium* ainsi qu'avec du sang normal on peut occasionnellement rencontrer de **rares** hématies ovales ou elliptocytaires, produites lors de la confection du frottis.

La forme ovale des hématies parasitées est le meilleur critère morphologique du diagnostic de l'espèce *Plasmodium ovale*.

Goutte épaisse : l'hémolyse des hématies en goutte épaisse fait disparaître les hématies ovalisées, et donc le meilleur critère diagnostique. Le diagnostic de *Plasmodium ovale* est donc très difficile ou impossible dans ce cas (195).

TROPHOZOÏTES (photos n° 86 à 93)

JEUNES : les formes annulaires ont une taille de 2 à 2,5 µm, intermédiaire entre celle de *P. falciparum* et *P. vivax*. Le noyau est plus grand que celui des autres espèces. Le polyparasitisme est possible, ce qui conduit à des confusions avec *P. falciparum* : on peut y voir jusqu'à 5 trophozoïtes par hématie (190) et les granulations de Schüffner apparaissent dès ce stade.

ÂGÉS : il n'y a **pas de forme amiboïde** (203 et 204) (sauf rares exceptions photo n° 87), ce qui constitue un très bon caractère de différenciation avec *P. vivax*, mais des trophozoïtes compacts, ovalaires ou arrondis avec un pigment granuleux abondant. Le noyau de grande taille est souvent grossièrement triangulaire (203). Les granulations de Schüffner sont nombreuses et nettes.

SCHIZONTES JEUNES (2 – 3 ou 4 noyaux) (photos n° 94 à 97) : compacts, n'occupent que les 2/3 ou les 4/5^e de l'hématie. Les schizontes peuvent être ronds ou ovalaires. Le pigment est dispersé.

SCHIZONTES MÛRS OU ROSACES (photos n° 98 et 99) : occupent la majeure partie de l'hématie. Les mérozoïtes pourvus d'un gros noyau sont assez régulièrement disposés autour d'un amas granuleux de pigment central, le tout ayant parfois un aspect en « marguerite (204) ». Il y a, en général, 8 mérozoïtes (maximum 12) qui sont plus gros que chez les autres espèces, pouvant atteindre 3 µm. Le corps en rosace remplit complètement l'hématie ce qui le fait ressembler à celui de *P. malariae*.

Au cours des rechutes, certaines rosaces montrent 12 à 16 mérozoïtes et l'hématie hôte est nettement hypertrophiée (103).

Des aspects en bande équatoriale semblables à celles de *P. malariae* peuvent être observées mais sont très rares (204).

GAMÉTOCYTES (photos n° 100 à 106) : Les gamétocytes peuvent apparaître 4 à 5 jours après la parasitémie asexuée. Ils sont ronds ou ovalaires, d'assez petite taille, plus petits que ceux de *P. vivax*, peu nombreux en général. Ils ressemblent à un trophozoïte âgé mais le cytoplasme est plus pâle et sans vacuole, le noyau moins net et les pigments y sont dispersés surtout à la périphérie. L'hématie contient des granulations de Schüffner.

Les gamétocytes sont fréquemment présents, dans la moitié des cas (198) et ils ont été diagnostiqués dans 5 des 9 frottis envoyés dans le cadre du Contrôle National de Qualité (Tableau X).

PIGMENT : il est grossier, abondant, foncé, ressemblant à celui de *P. malariae* (204).

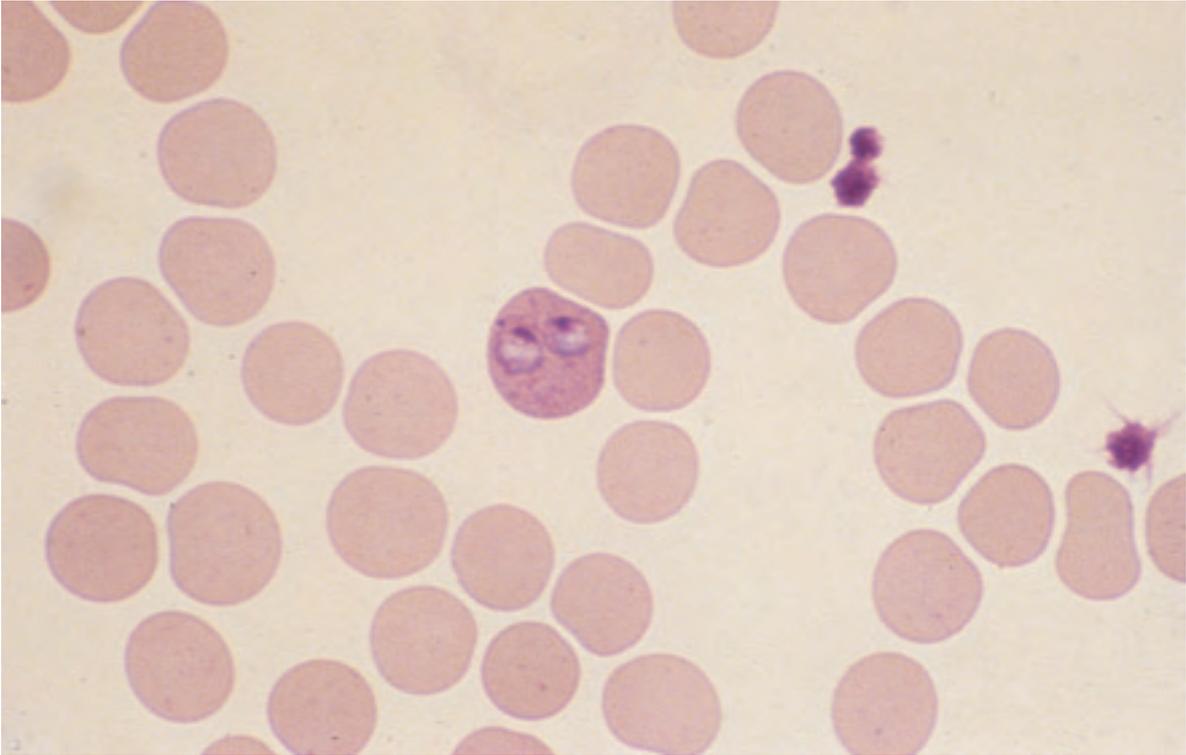


Photo n° 86 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie d'assez grande taille avec granulations de Schüffner contenant 2 trophozoïtes. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

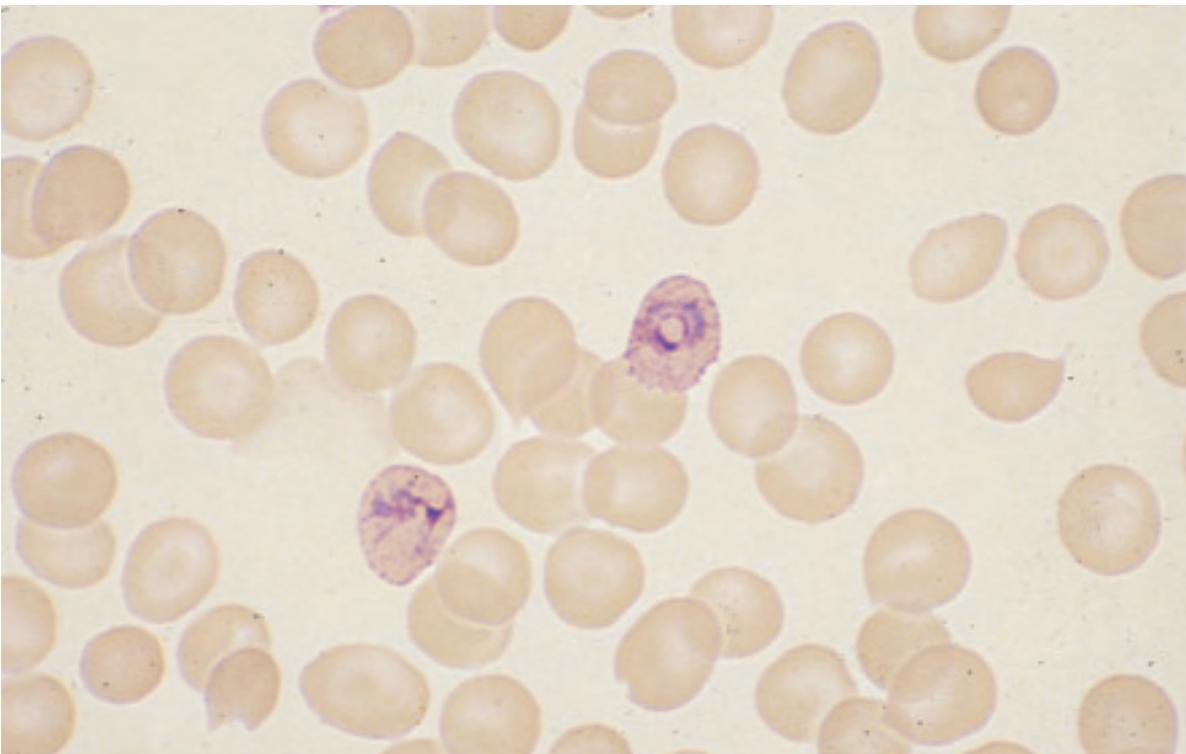


Photo n° 87 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie ovale à extrémité frangée avec granulations de Schüffner et contenant un trophozoïte. Une autre hématie ovalisée avec granulations de Schüffner contenant un trophozoïte de forme amiboïde. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

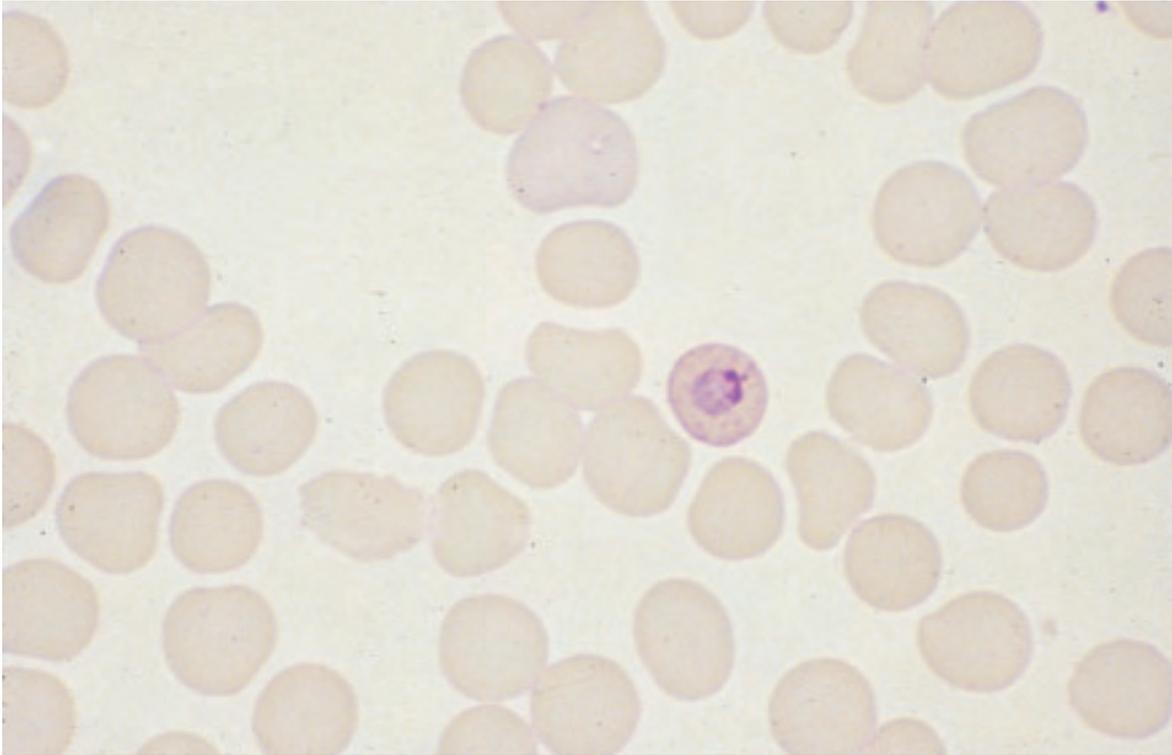


Photo n° 88 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Trophozoïte avec noyau allongé, apparition des granulations de Schüffner dans une hématie ronde de taille normale. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.



Photo n° 89 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Hématie ovale pointue à une extrémité avec un trophozoïte. Absence de granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

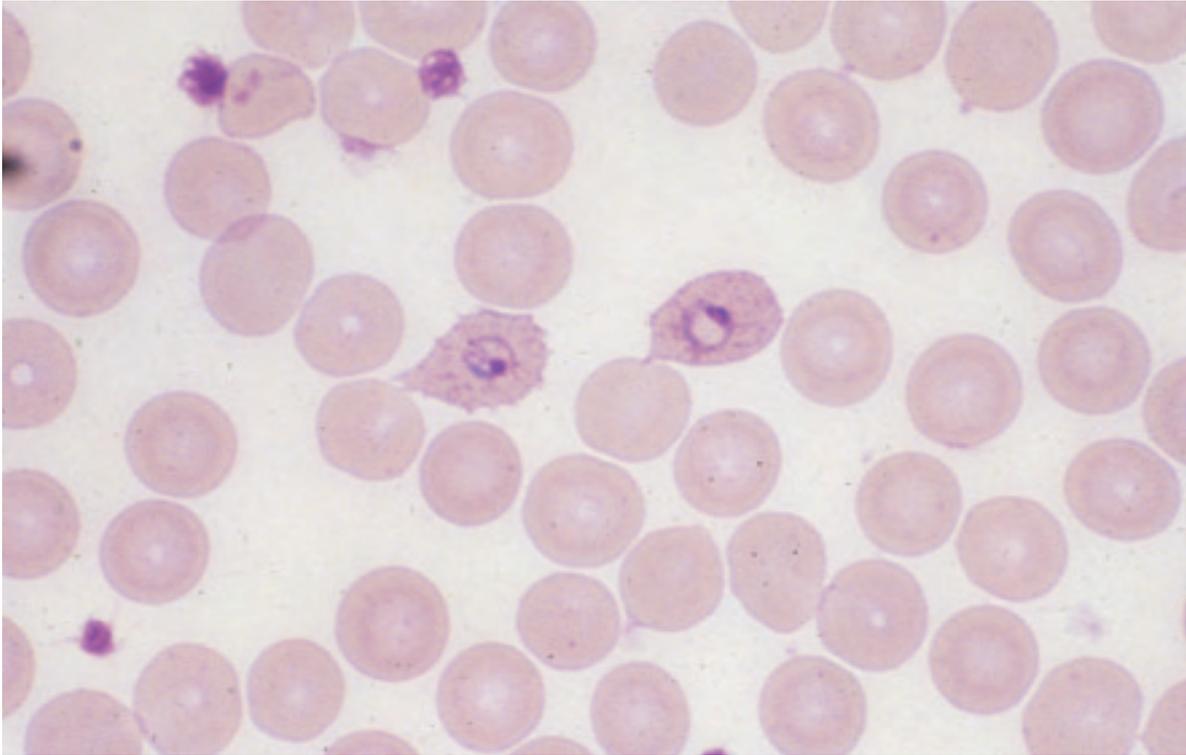


Photo n° 90 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie ovale à extrémité pointue, crénelée sur le bord, une autre ovale avec de nombreuses granulations de Schüffner, contenant chacune un trophozoïte. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

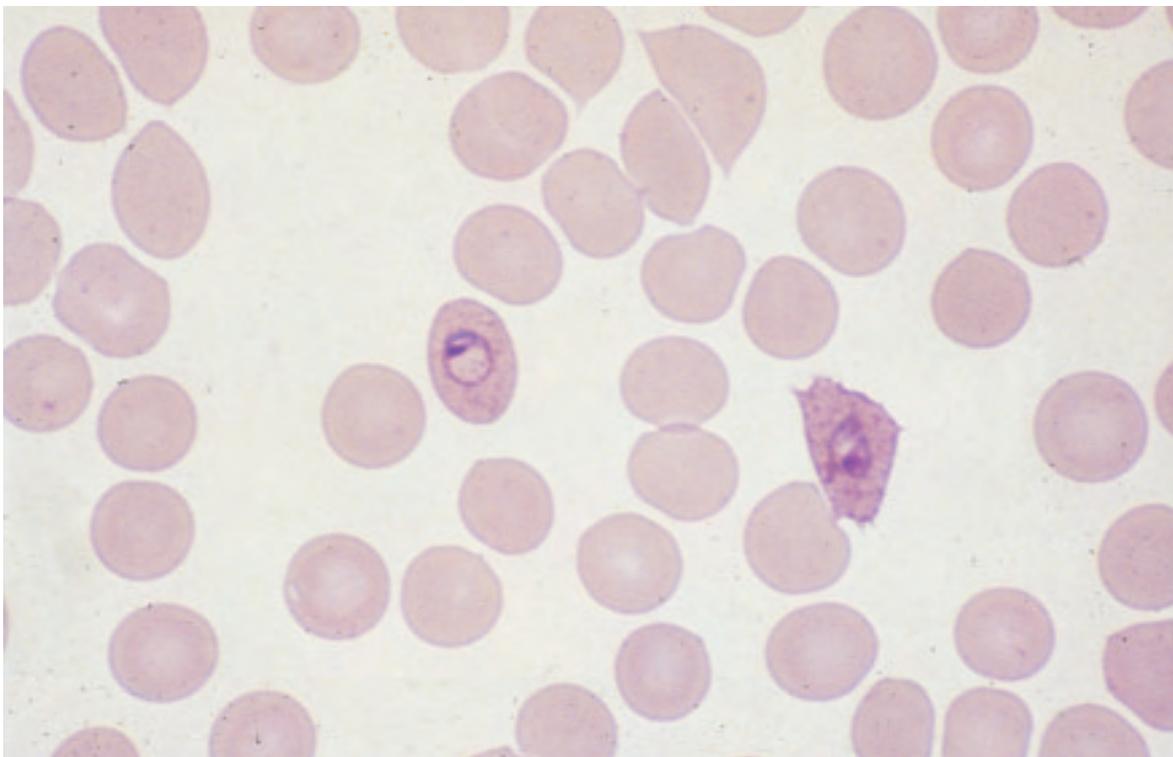


Photo n° 91 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie de forme ovale, une autre triangulaire frangée aux 2 extrémités avec de nombreuses granulations de Schüffner et contenant chacune un trophozoïte. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

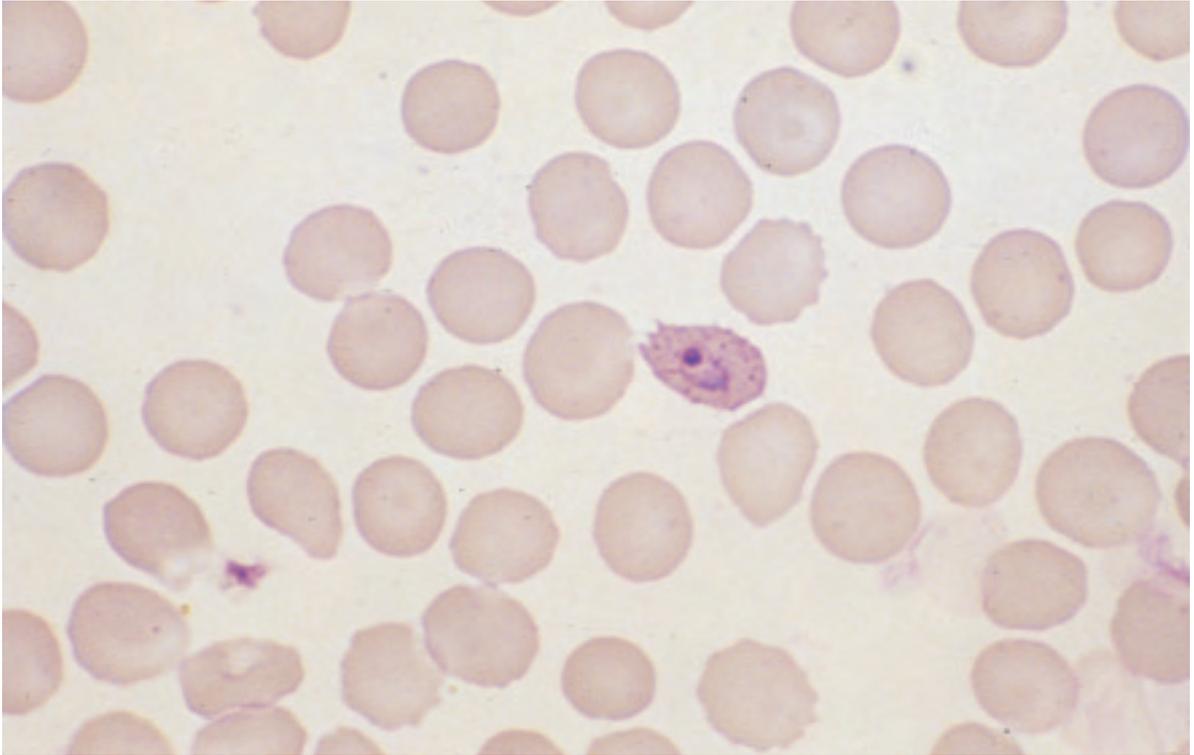


Photo n° 92 : Plasmodium ovale. Frottis. Une hématie ovale frangée à une extrémité, avec granulations de Schüffner et contenant un trophozoïte. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

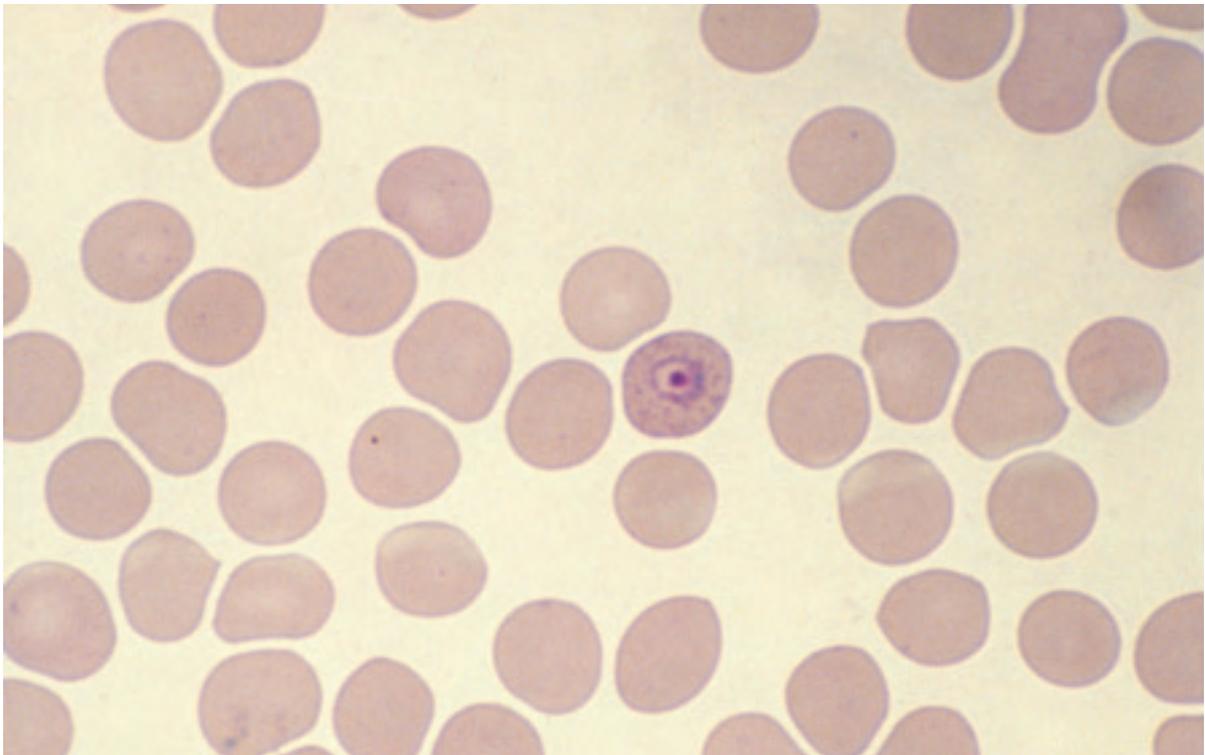


Photo n° 93 : Plasmodium ovale. Frottis. Une hématie de forme arrondie de taille normale avec granulations de Schüffner contenant un trophozoïte en cocarde. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

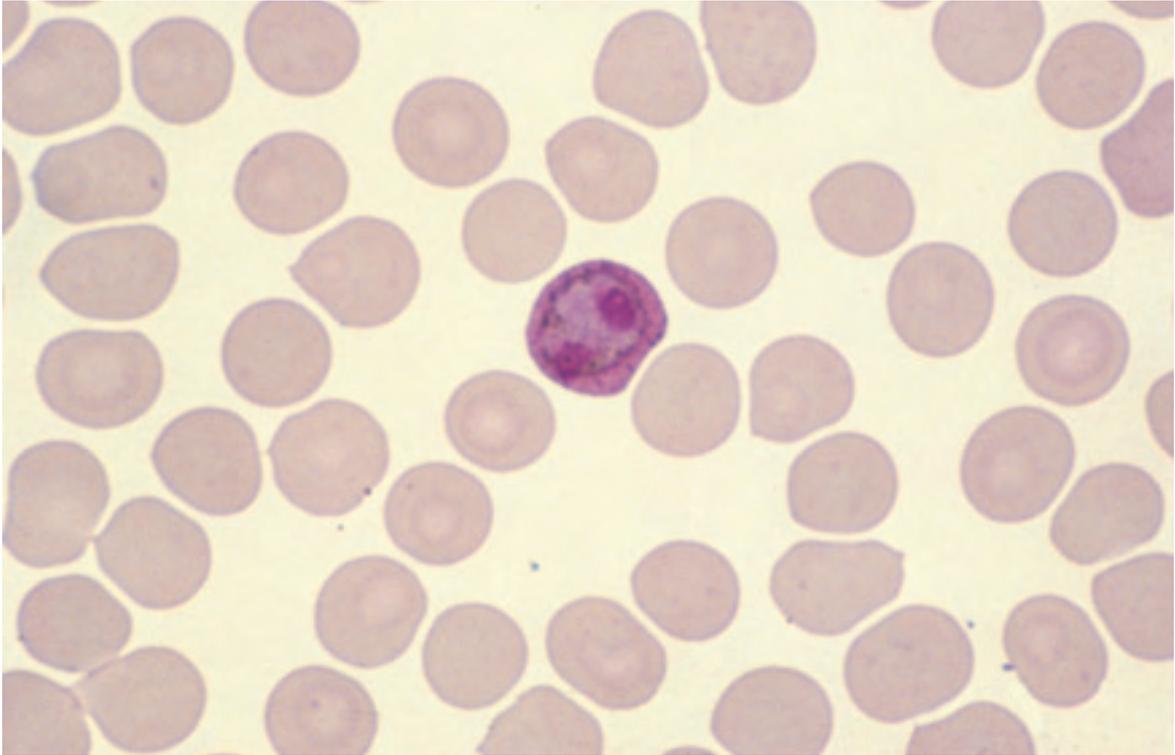


Photo n° 94 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie de grande taille, ronde avec granulations de Schüffner et pigment contenant un schizonte à 2 noyaux. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

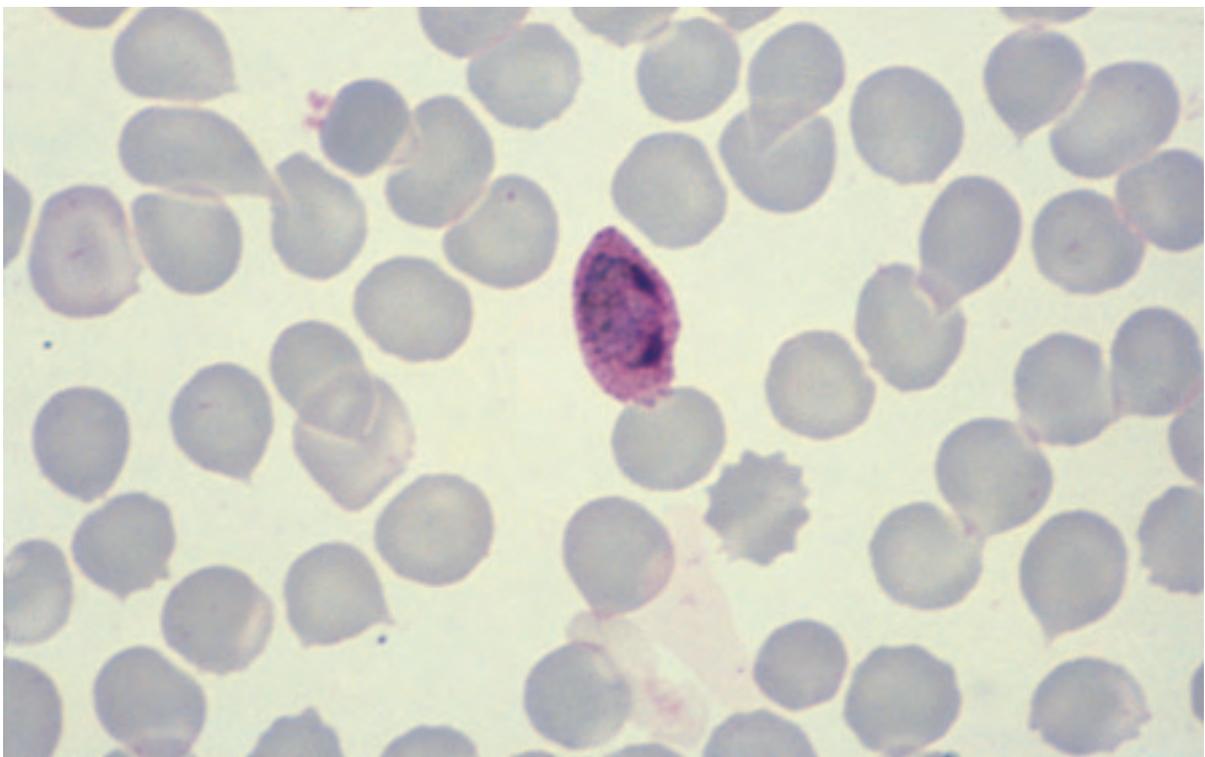


Photo n° 95 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie ovale avec granulations de Schüffner et pigment contenant un schizonte à 2 noyaux. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

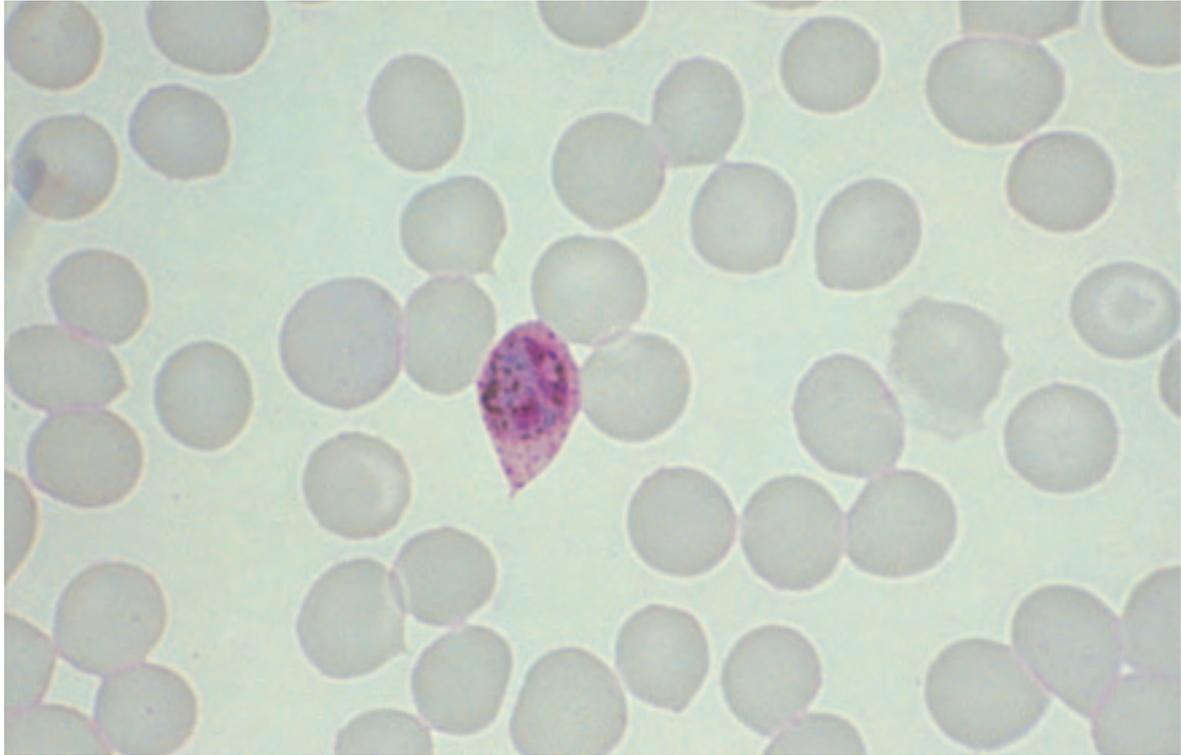


Photo n° 96 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie ovale pointue à une extrémité contenant un schizonte à 3 noyaux. Nombreux grains de pigment et granulations de Schüffner.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.

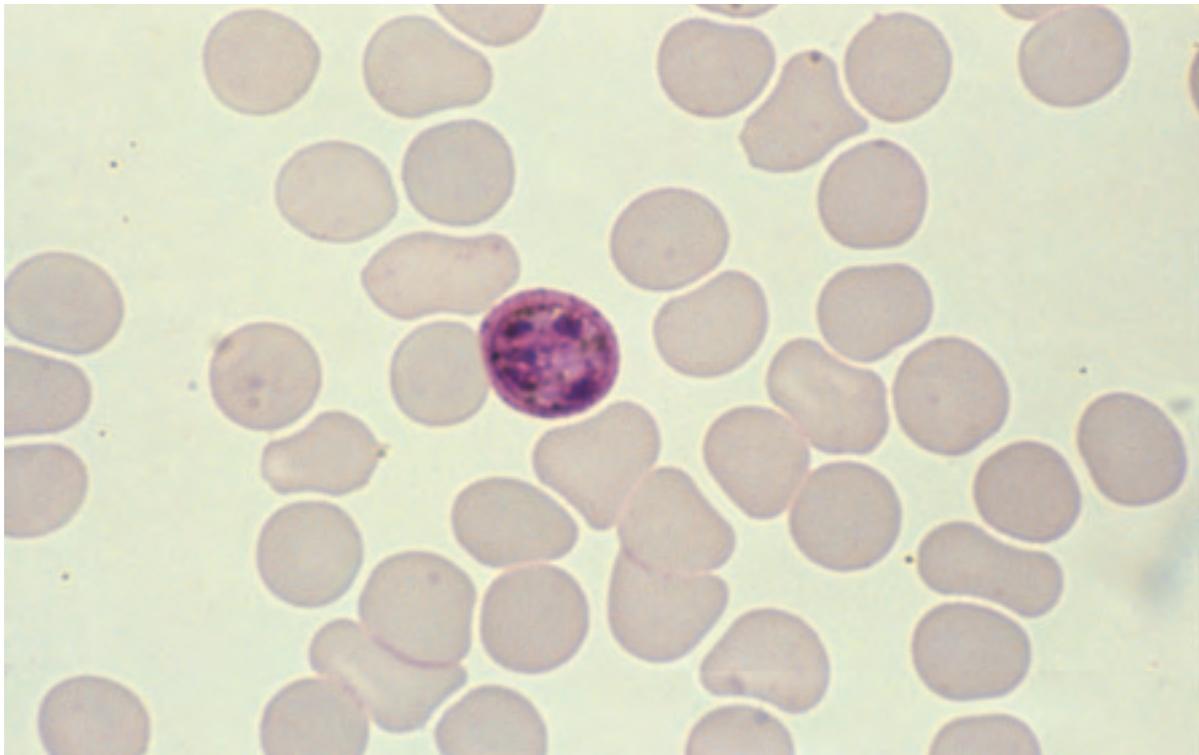


Photo n° 97 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie arrondie de grande taille contenant un schizonte à 5 noyaux. Nombreux grains de pigment et quelques granulations de Schüffner.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.

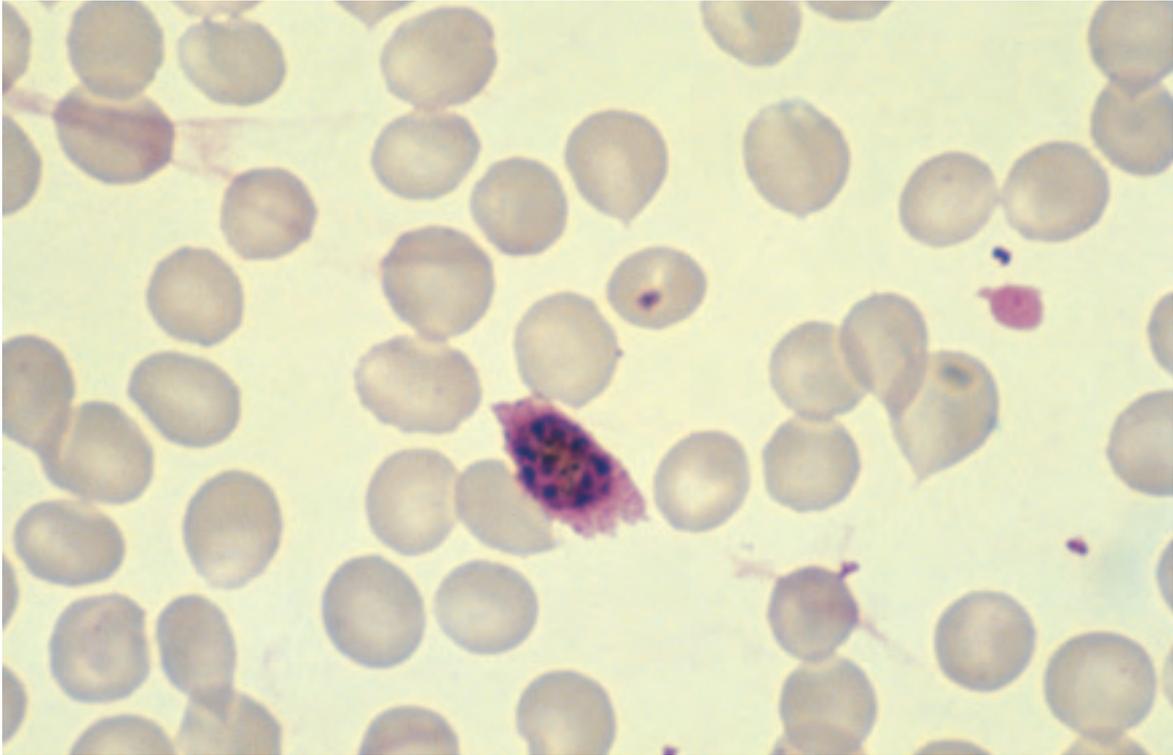


Photo n° 98 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie frangée aux deux extrémités, contenant un corps en rosace avec 8 noyaux et un amas de pigment central et quelques granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

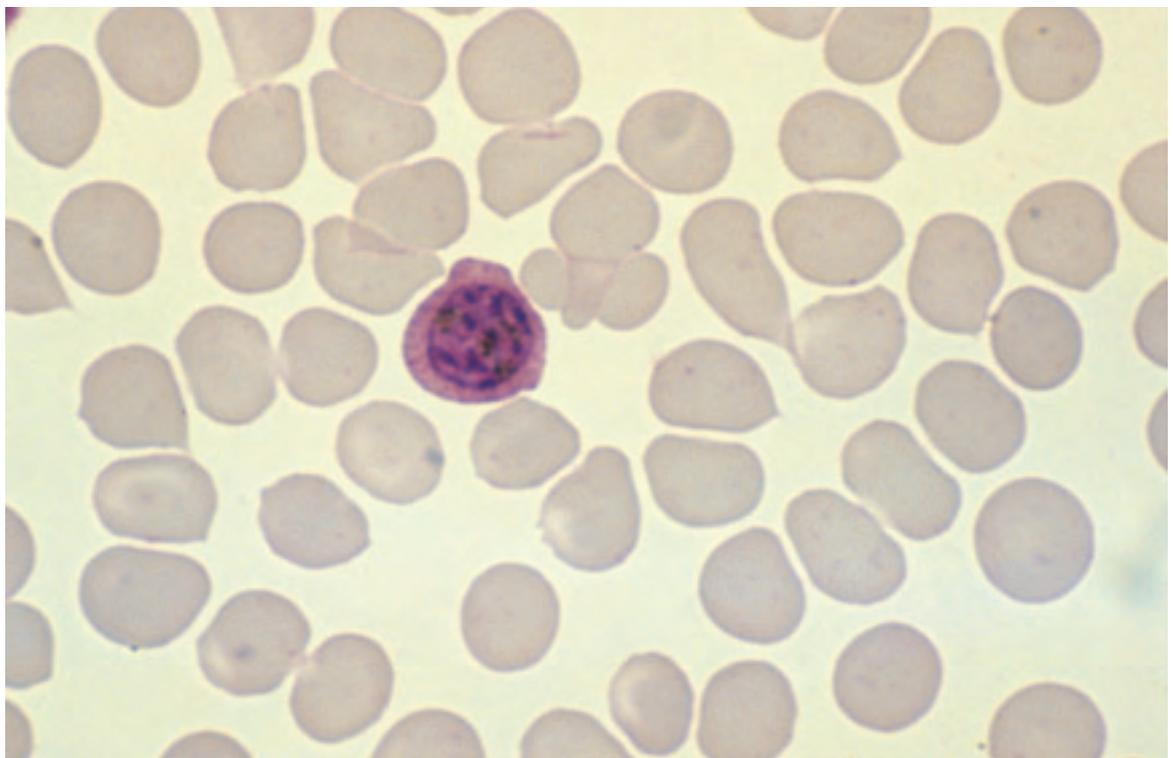


Photo n° 99 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie arrondie de grande taille contenant un corps en rosace avec 8 noyaux au moins et quelques granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

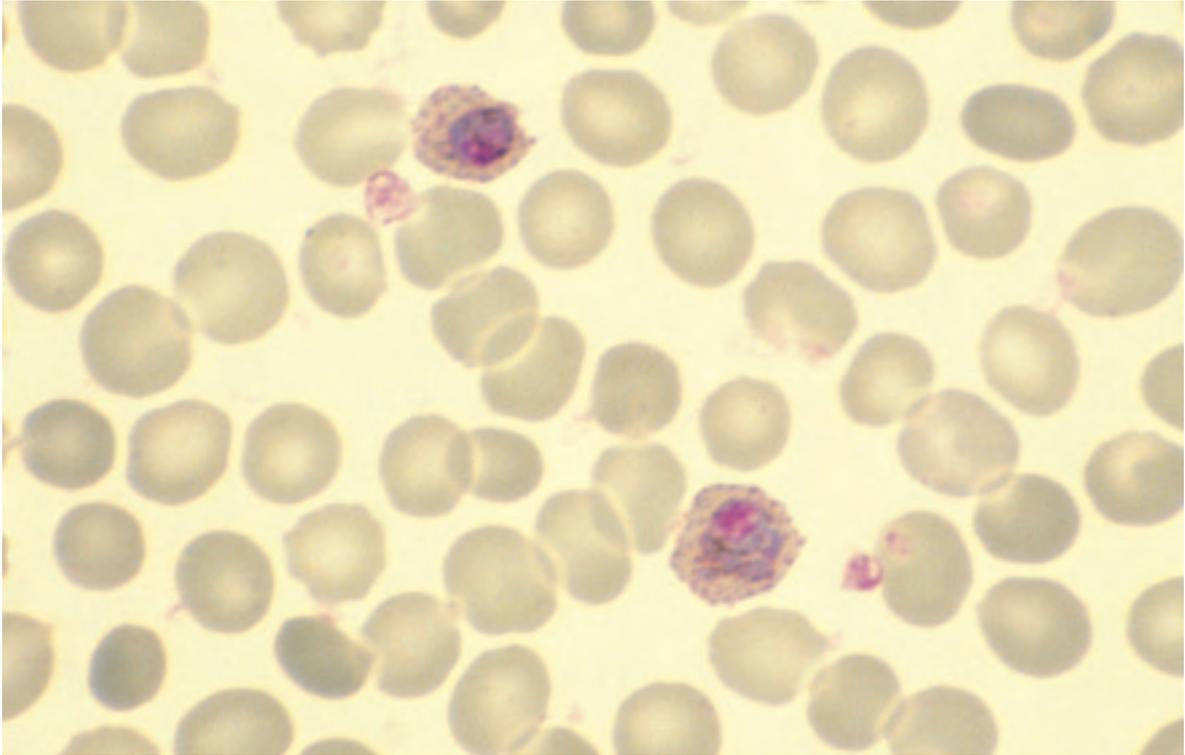


Photo n° 100 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie de taille normale arrondie contenant un très jeune gamétocyte et des granulations de Schüffner. Une autre hématie d'assez grande taille contenant un jeune gamétocyte, granulations de Schüffner et pigment.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.

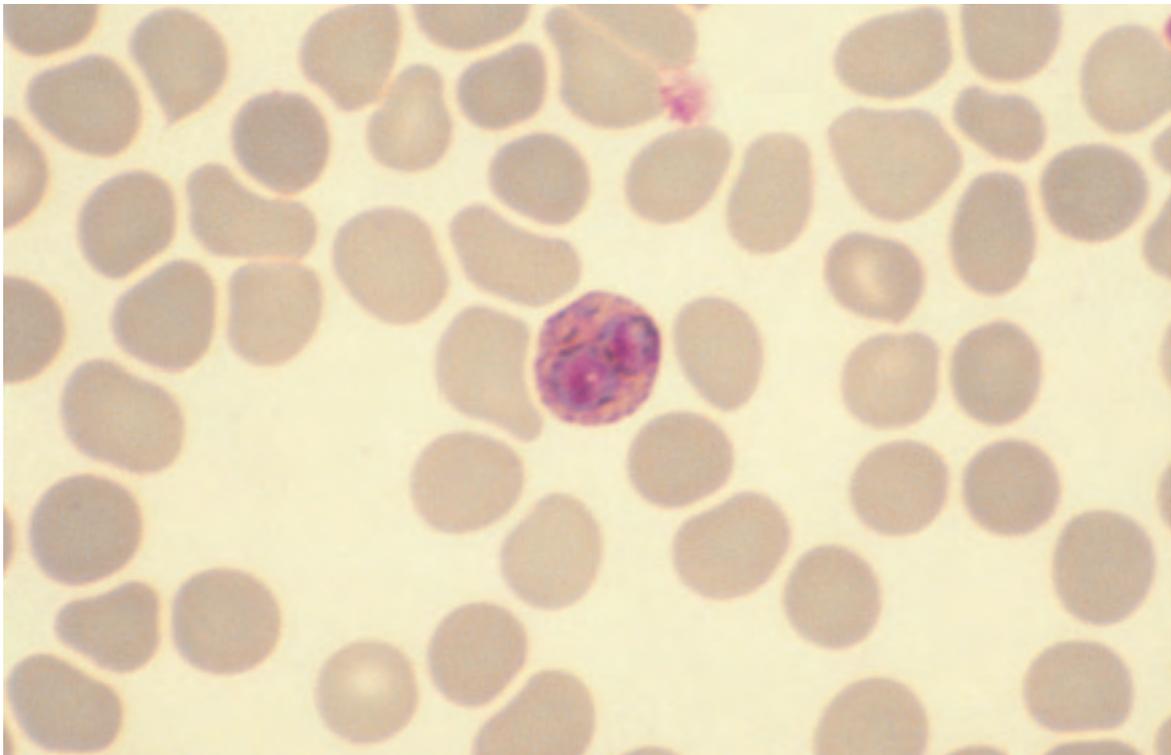


Photo n° 101 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie d'assez grande taille, arrondie contenant deux jeunes gamétocytes, importants grains de pigment, granulations de Schüffner.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.

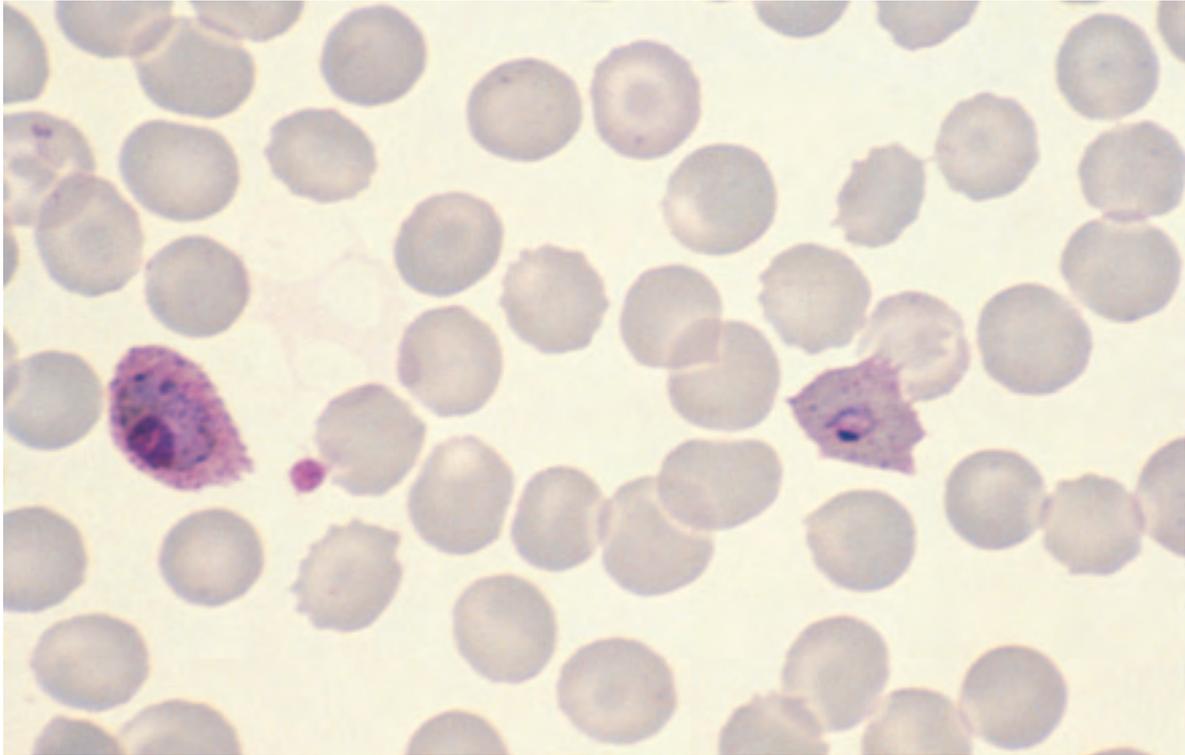


Photo n° 102 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie ovalisée contenant un gamétoocyte avec noyau excentré, cytoplasme bleu, gros grains de pigment. Une deuxième hématie contient un trophozoïte avec des granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

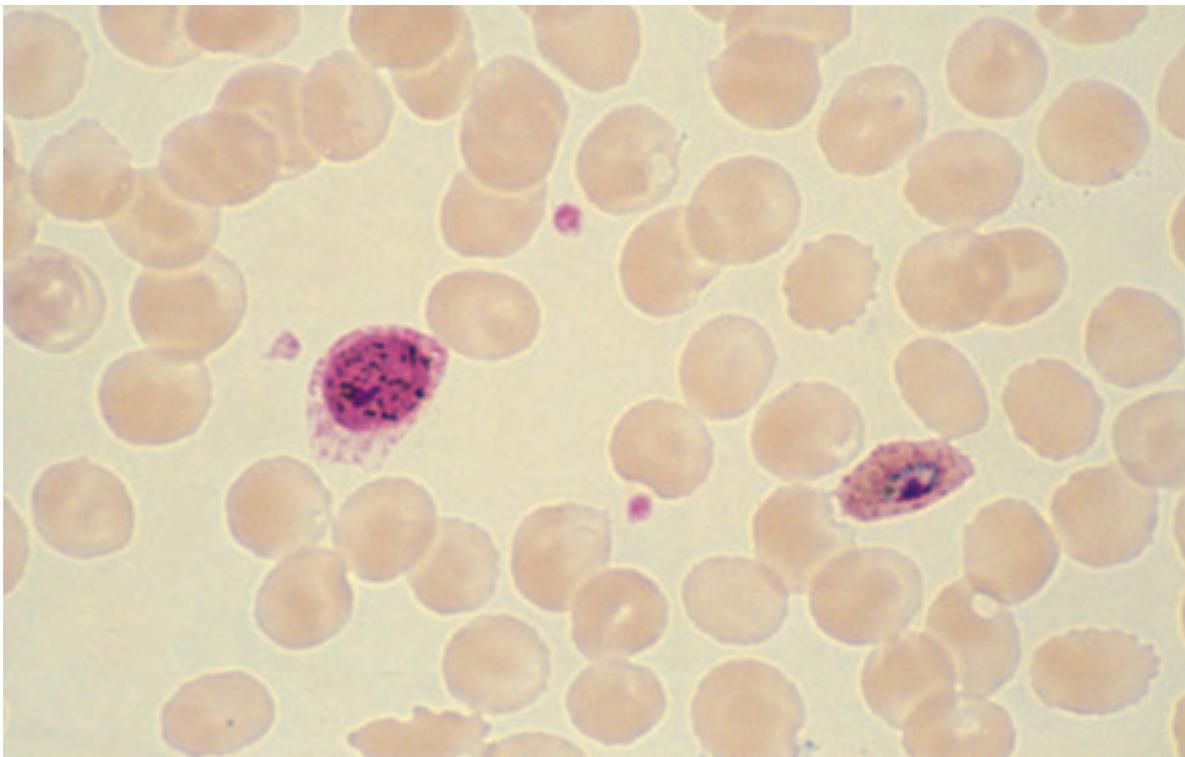


Photo n° 103 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie d'assez grande taille contenant un gamétoocyte avec pigment et noyau dispersé de couleur bleu-rosé. Une autre hématie de forme ovale contient un trophozoïte, nombreuses granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

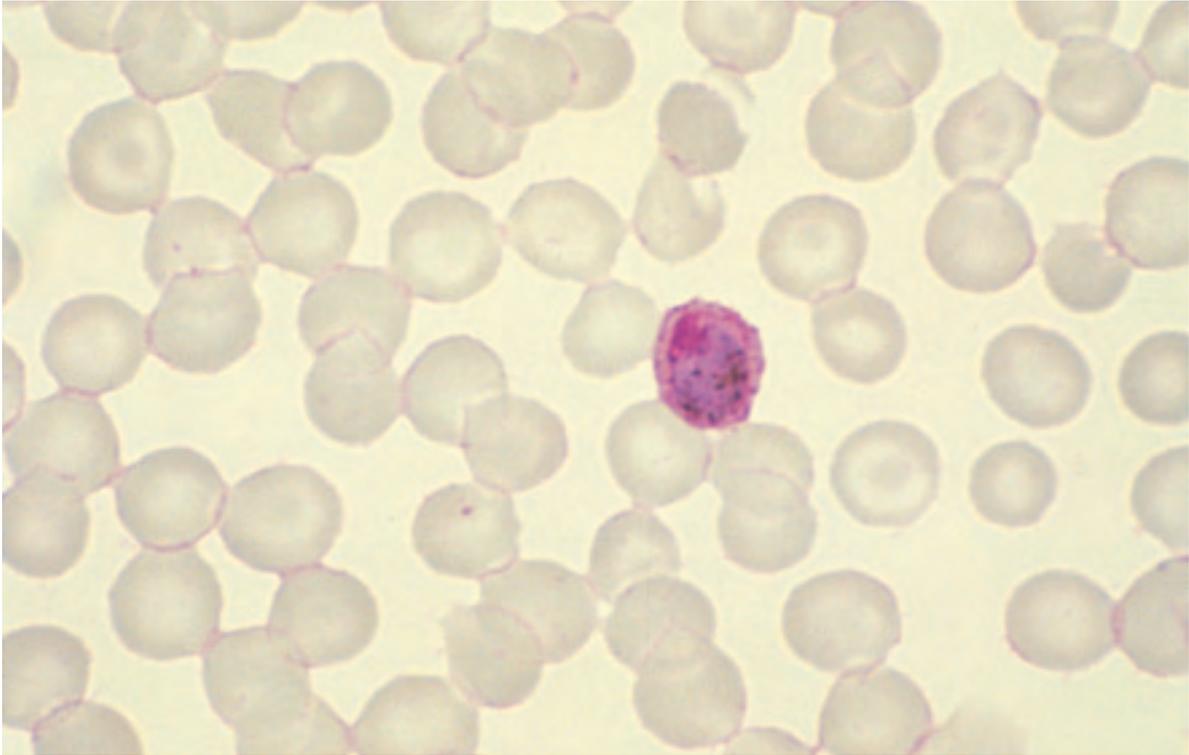


Photo n° 104 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Hématie arrondie d'assez grande taille contenant un gamétocyte avec noyau excentré, cytoplasme bleu et des grains de pigment dispersés. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

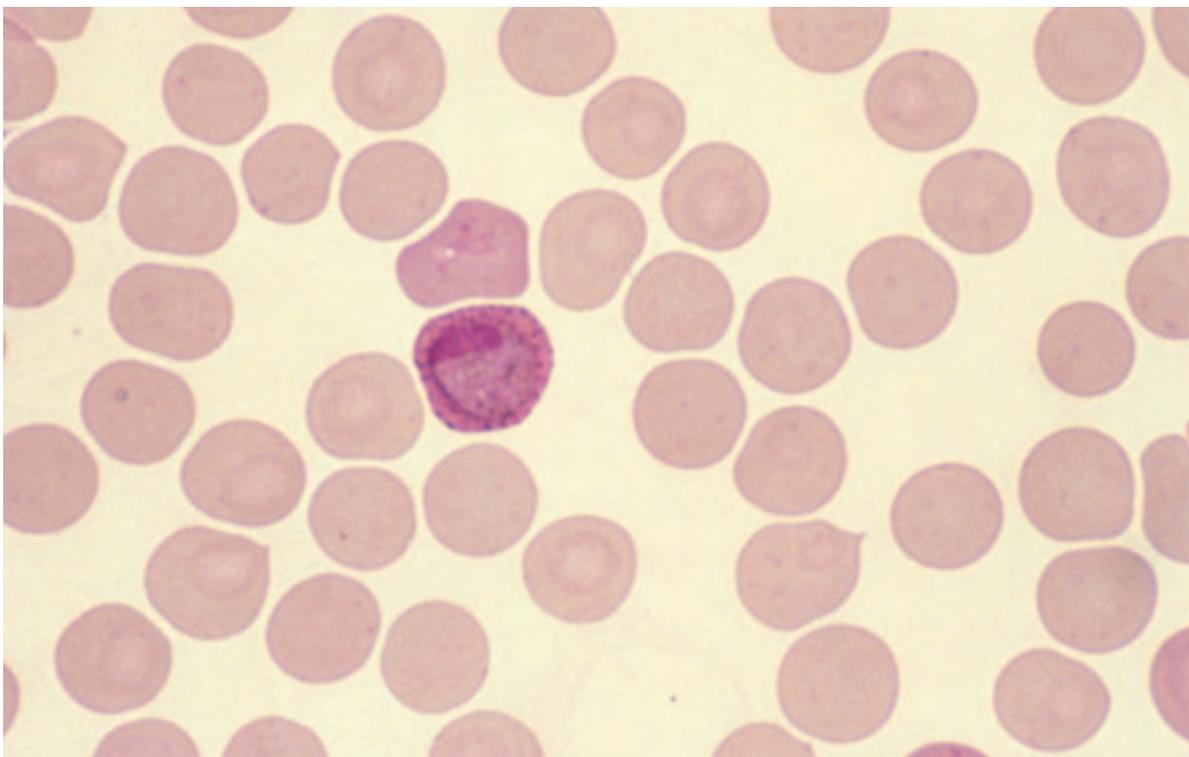


Photo n° 105 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Hématie d'assez grande taille contenant un gamétocyte de coloration bleu pale-rosé. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

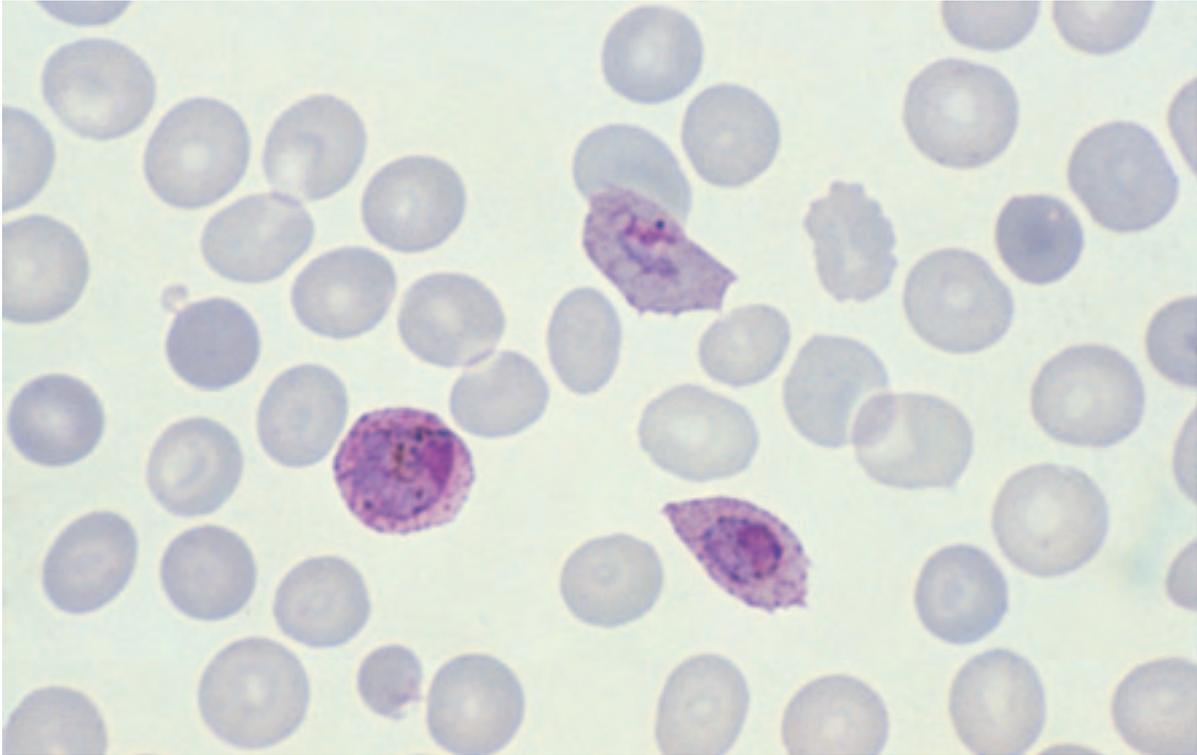


Photo n° 106 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Une hématie ovalisée à extrémité pointue contenant un jeune gamétocyte, nombreuses granulations de Schüffner. Une assez grande hématie arrondie contenant un gamétocyte mûr au cytoplasme bleu. Une 3^e hématie de forme allongée contient un trophozoïte et des granulations de Schüffner.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.

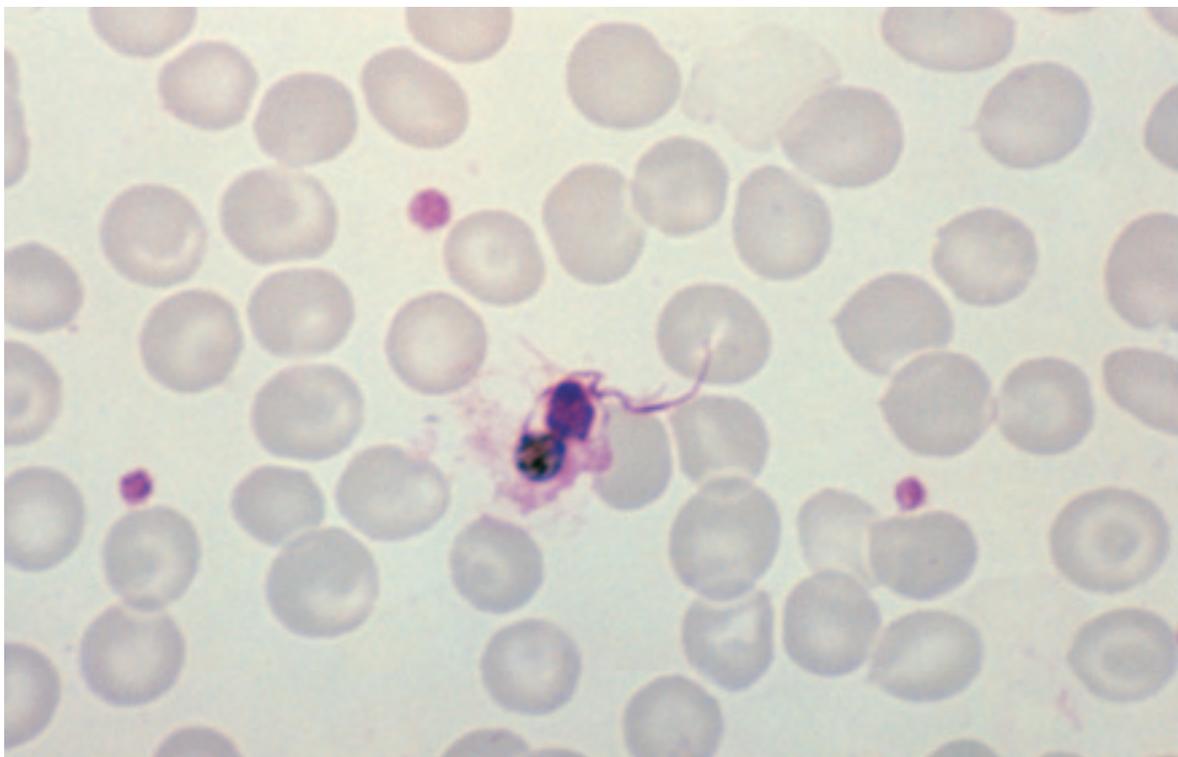


Photo n° 107 : *Plasmodium ovale*. Frottis. Exflagellation d'un gamétocyte mâle.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.

Tableau XI : Plasmodium malariae : résultats des 5 tests du Contrôle National de Qualité en Parasitologie de France.

DATE D'ENVOI	NOMBRE DE RÉPONSES	RICHESSSE*	STADES	RÉSULTATS CONFORMES	DEUXIÈME RÉPONSE	TROISIÈME RÉPONSE
06/84	952	1 à 4	Trophozoïte, schizonte jeune âgé ou mûr, gamétocytes	81,9 %	<i>Plasmodium vivax</i> 8,6 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 4,9 %
11/92	1 239	2 à 40	Schizonte âgé ou mûr	65,6 %	<i>Plasmodium vivax</i> 13,1 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 4,2 %
11/94	1 189	3 à 5	Trophozoïte, gamétocyte	76,4 %	<i>Plasmodium vivax</i> 12 %	<i>Plasmodium ovale</i> 4,5 %
11/97 (Bioforma)	3 651	5 à 20	Trophozoïte, gamétocyte	92,1 %	<i>Plasmodium vivax</i> 2,7 %	<i>Plasmodium ovale</i> 1,8 %
05/00	1 305	2 à 20	Trophozoïte, schizonte, gamétocyte	55,4 %	<i>Plasmodium vivax</i> 27,2 %	<i>Plasmodium ovale</i> 11,9 %

* La richesse moyenne est exprimée en nombre de champs à l'objectif X 100 pour trouver une hématie parasitée en raison de la rareté habituelle de cet hématozoaire.

Pour les frottis des 5 malades infestés par *P. malariae* envoyés au Contrôle National de Qualité en Parasitologie il fallait en moyenne examiner 10 champs microscopiques à l'immersion pour trouver un parasite, ce qui correspond à une parasitémie moyenne des 5 cas de l'ordre de 0,06 %.

Agent de la fièvre quarte dont les accès reviennent toutes les 72 heures. Trois faits caractérisent *P. malariae* :

- c'est une maladie presque toujours bénigne
- qui persiste pendant des dizaines d'années, éventuellement toute la vie,
- avec une très faible parasitémie.

PHYSIOPATHOLOGIE

Incubation parasitaire 13 jours

Incubation clinique 28 jours au minimum.

Cette période d'incubation clinique peut être prolongée pendant des mois.

Seuil pyrétogène 100 par µl, donc très bas.

Densité parasitaire faible. Les parasites sont, en général, rares dans le sang : moins de 5 000 par µl, exceptionnellement plus de 50 000.

La fièvre de primo-invasion, quand elle existe, peut durer 3-4 jours à une semaine. Comme avec *P. vivax*, elle est rarement continue, en plateau, plus souvent sous la forme d'oscillations ou d'anarchie fébrile, d'accès plus ou moins quotidiens dits triple quarte (qui reviennent tous les jours) ou double quarte (2 accès tous les 3 jours, par exemple à J1, J2 puis J4).

Ensuite, on peut observer une période d'apyrexie plus ou moins prolongée avant la survenue des accès francs intermittents de type quarte qui reviennent toutes les 72 heures, par exemple J1, J4, J7... et qui évoluent comme avec *P. falciparum* vers l'atténuation et l'espacement progressif avant de disparaître.

Les rechutes, qui sont en fait des recrudescences, peuvent être observées pendant des années car le sujet cliniquement guéri reste porteur dans son sang de *P. malariae* pendant presque toute sa vie d'où réapparition d'accès (par exemple 55 ans plus tard à cause d'une splénectomie) et surtout transmission transfusionnelle après 30-40 ans ou plus.

La remarquable longévité de *P. malariae* est uniquement due à la parasitémie résiduelle qui persiste ainsi tout au long de la vie du sujet atteint. On n'a pas trouvé chez cette espèce de formes parasitaires secondaires (cycle exoérythrocytaire) au niveau du foie (104).

RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE

Assez disparate. On en trouve en Afrique tropicale, en Afrique du Nord, en Asie (Indes, Ceylan, Malaisie), en Europe centrale.

HÉMATIES PARASITÉES : ce sont, en général, des hématies âgées.

Taille : subnormale, parfois normale

Couleur : plus foncée à l'inverse de *P. vivax*.

Forme : inchangée

Granulations appelées pointillé de ZIEMANN difficilement visibles avec la coloration au May-Grünwald-Giemsa.

Pluriparasitisme : exceptionnel.

TROPHOZOÏTES JEUNES (photo n° 108) : annulaires comme dans les autres espèces. L'anneau du cytoplasme est parfois aplati donnant au trophozoïte un aspect ailé comme pour *P. falciparum*. La chromatine nucléaire est formée d'un seul amas, qui peut être situé au milieu de la vacuole centrale, donnant l'aspect en « œil d'oiseau ». Le pigment n'est en général pas encore visible.

TROPHOZOÏTES ÂGÉS (photos n° 109 à 115, 127, 128 et 129) : le cytoplasme s'incurve, s'épaissit et le trophozoïte devient plus massif avec un gros noyau irrégulier et une petite vacuole. Le pigment noir apparaît et devient de plus en plus abondant, en grains relativement gros. Il peut devenir tellement abondant qu'il dissimule le cytoplasme bleu et le parasite apparaît jaune-brun.

FORMES TYPIQUES (photos n° 111, 112 et 113) : quadrangulaires, en bande équatoriale, en drapeau avec cytoplasme, noyau et pigment allongés dans le même sens. Les trophozoïtes âgés, arrondis sans vacuole, sont difficiles à différencier des gamétocytes.

SCHIZONTES JEUNES (photos n° 116, 117, 118 et 126).

SCHIZONTES MÛRS (photos n° 119 et 120) : la rosace est petite et ne remplit pas, en général, complètement l'hématie. Elle contient un gros amas de pigment noir au centre. Autour, se disposent 6 à 8 mérozoïtes, maximum 12, assez gros dont les contours dessinent un feston périphérique rappelant les pétales d'une fleur, d'où le nom de CORPS EN MARGUERITE.

GAMÉTOCYTES (photos n° 122, 123 et 126)

Les gamétocytes apparaissent assez précocement. Lorsqu'ils sont mûrs leur aspect est arrondi ou ovalaire et remplissent toujours l'hématie, mais ils sont plus petits que ceux de *P. vivax*. Pigment très abondant, grossier et brun noir. La différence entre les sexes des gamétocytes est difficile.

LE SANG DANS LE PALUDISME À *P. MALARIAE*

Le sang contient très peu de parasites ; c'est l'espèce plasmodiale qui donne la plus faible infestation sanguine. La parasitémie est habituellement inférieure à 5 000/ μ l (# 0,1 % d'hématies parasitées) quelquefois 25 000/ μ l (# 0,5 % d'hématies parasitées et rarement plus de 50 000/ μ l (# 1 % d'hématies parasitées) (21). Pour 171 cas de *P. malariae* observés en Malaisie, la plus forte parasitémie trouvée a été de 30.000/ μ l (# 0,6 % d'hématies parasitées) (21). Si l'on fait un prélèvement au début du cycle schizogonique, on a une plus grande proportion de formes annulaires qui peuvent rendre le diagnostic plus difficile, bien que la présence de pigment noir puisse orienter le diagnostic. Les cycles peuvent se chevaucher entraînant la présence simultanée de différents stades parasitaires dans le sang comme par exemple jeunes trophozoïtes et schizontes mûrs.

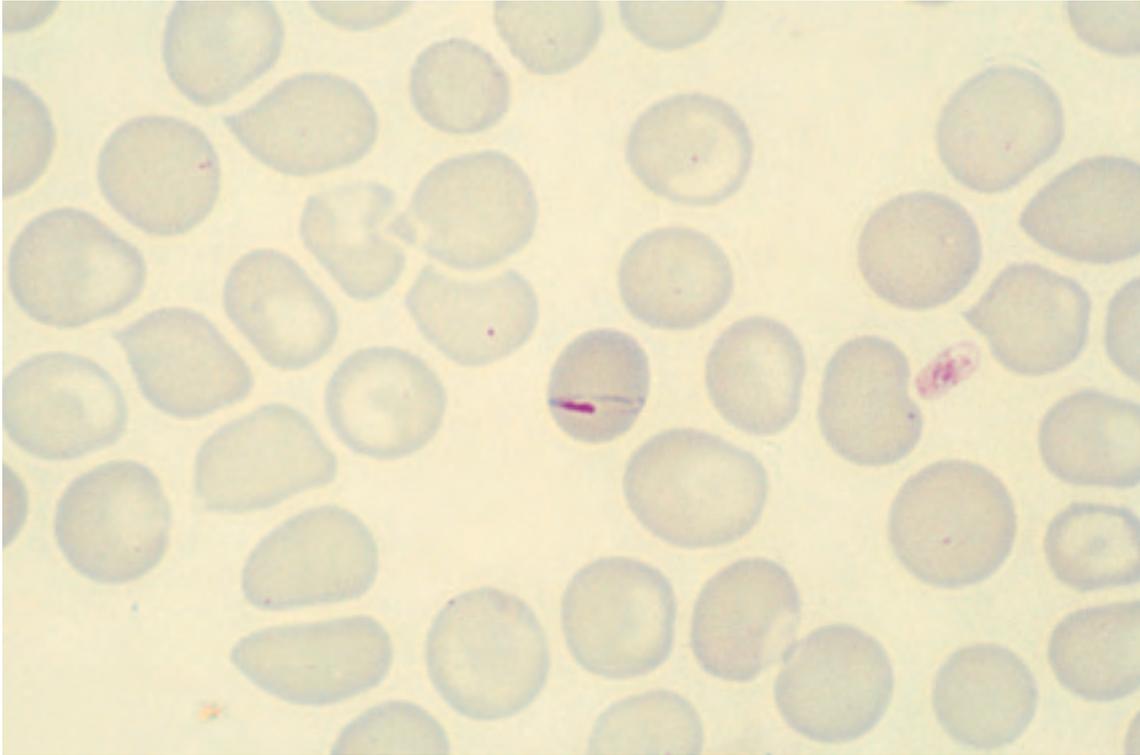


Photo n° 108 : *Plasmodium malariae*. Frottis. Hématie de taille surnormale. Trophozoïte jeune, sans pigment, allongé transversalement. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

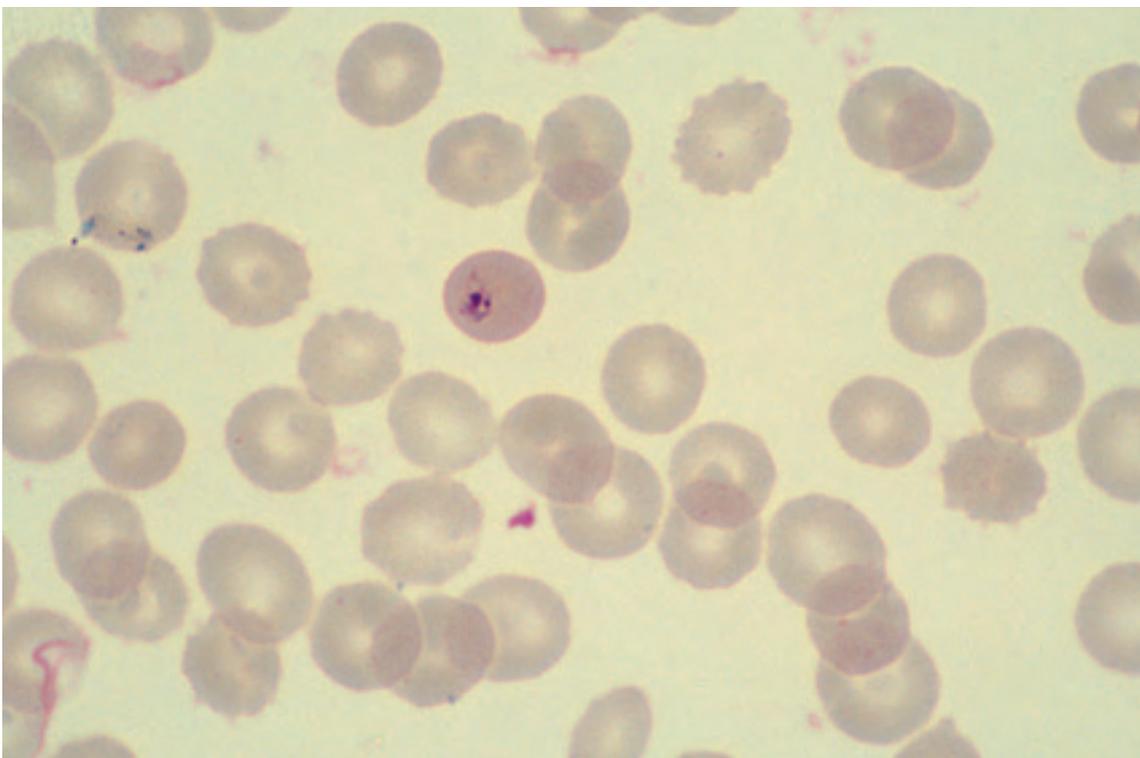


Photo n° 109 : *Plasmodium malariae*. Frottis. Hématie de taille surnormale, avec pointillé de Ziemann, contenant un trophozoïte d'âge intermédiaire avec un grain de pigment. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

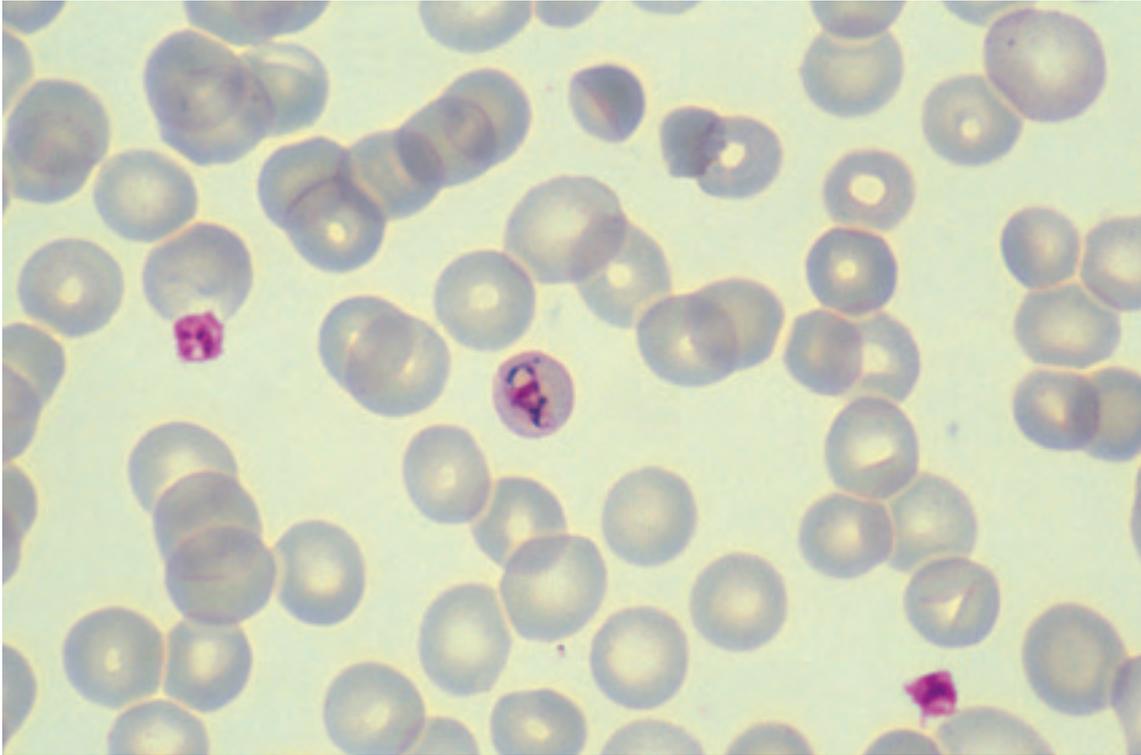


Photo n° 110 : *Plasmodium malariae*. Frottis. Hématie de taille surnormale. Trophozoïte d'âge intermédiaire, pointillé de Ziemann, présence de pigment. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

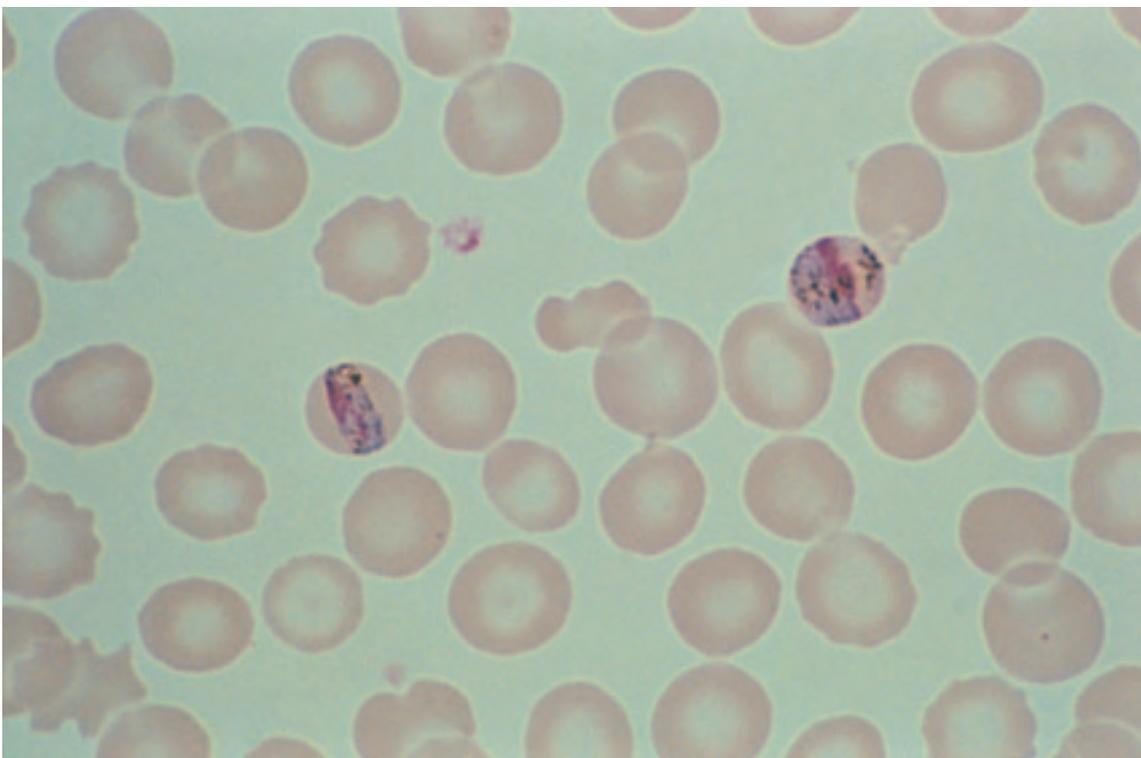


Photo n° 111 : *Plasmodium malariae*. Frottis. Dans deux hématies de taille surnormale, trophozoïtes âgés en bande équatoriale avec pigment abondant. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

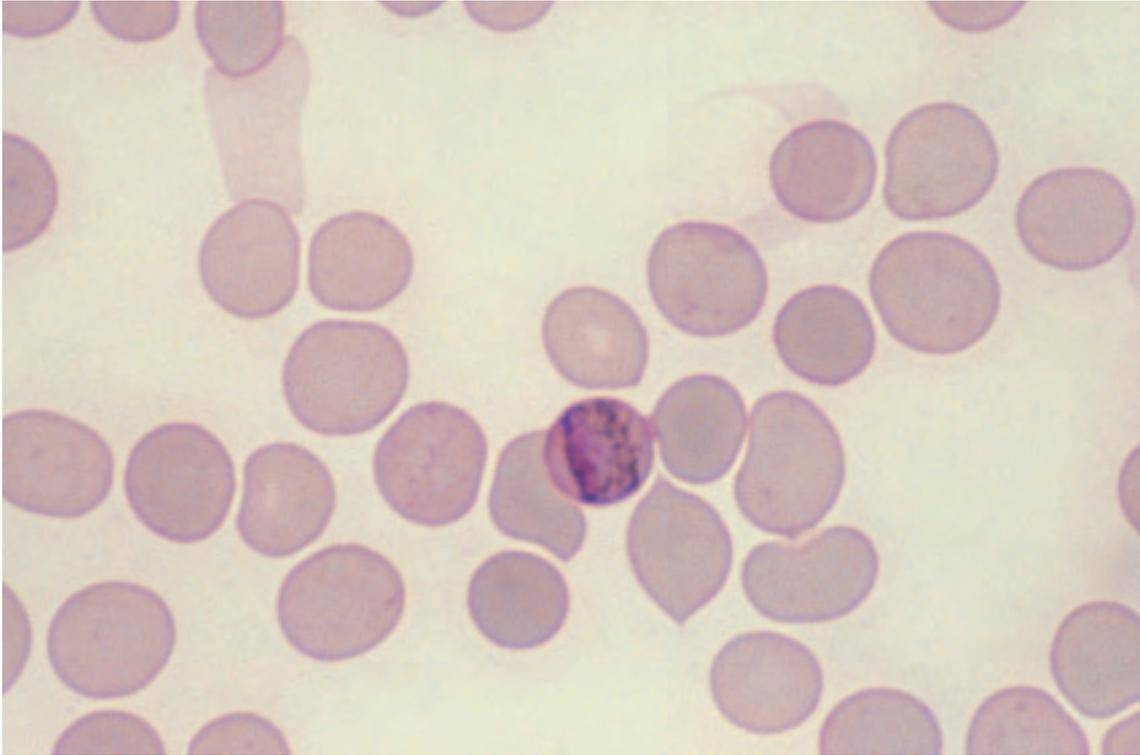


Photo n° 112 : *Plasmodium malariae*. Frottis. Hématie de taille normale. Trophozoïte âgé en forme de large bande équatoriale, pigment abondant. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

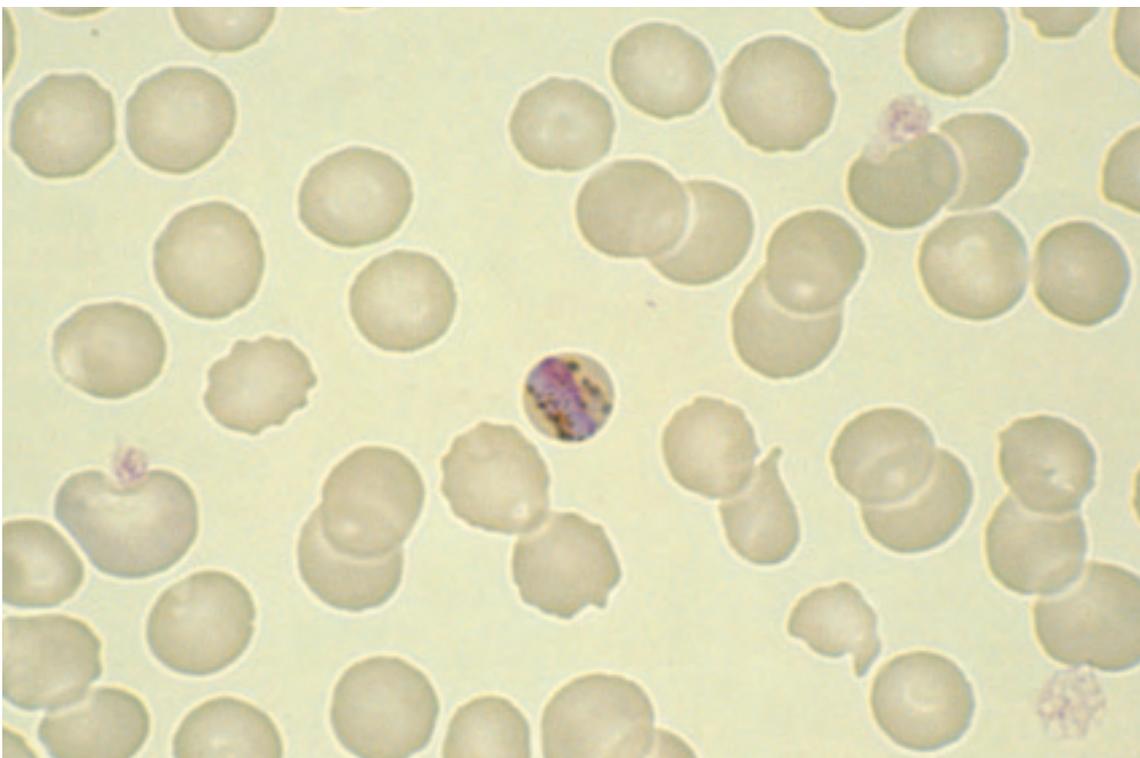


Photo n° 113 : *Plasmodium malariae*. Frottis. Hématie de taille surnormale. Trophozoïte âgé en bande équatoriale, pigment abondant situé en partie en dehors du trophozoïte. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

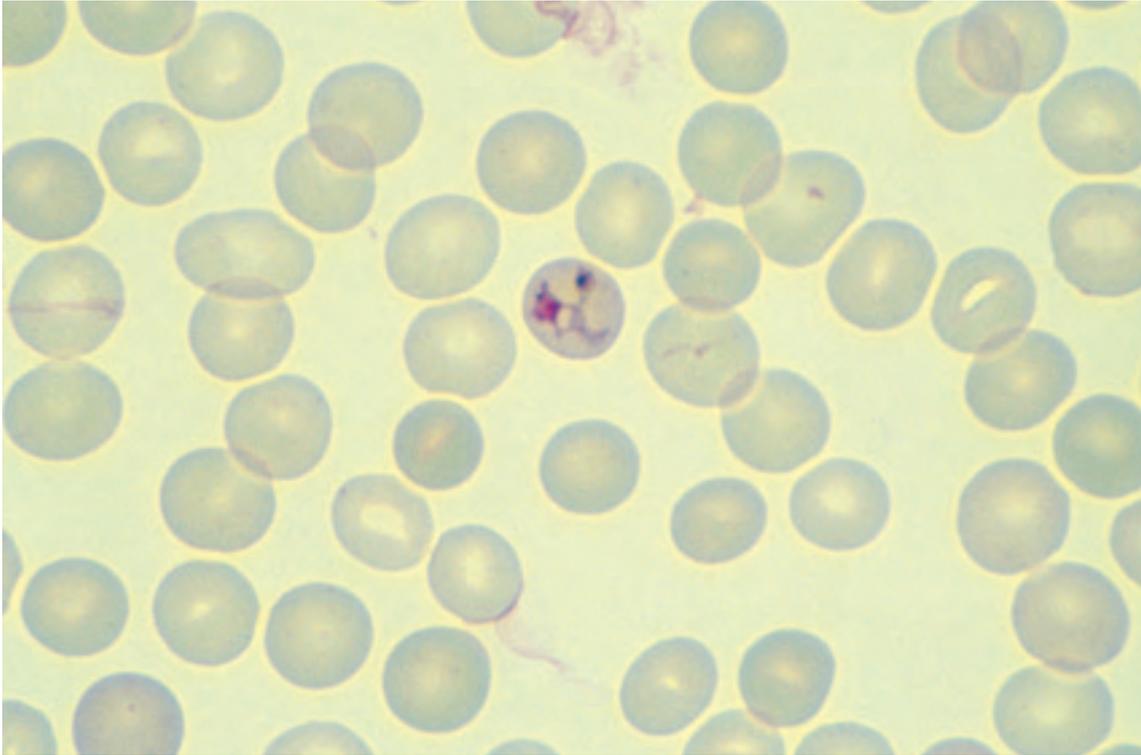


Photo n° 114 : Plasmodium malariae. Frottis. Hématie de taille normale. Trophozoïte de forme amiboïde avec gros grain de pigment. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

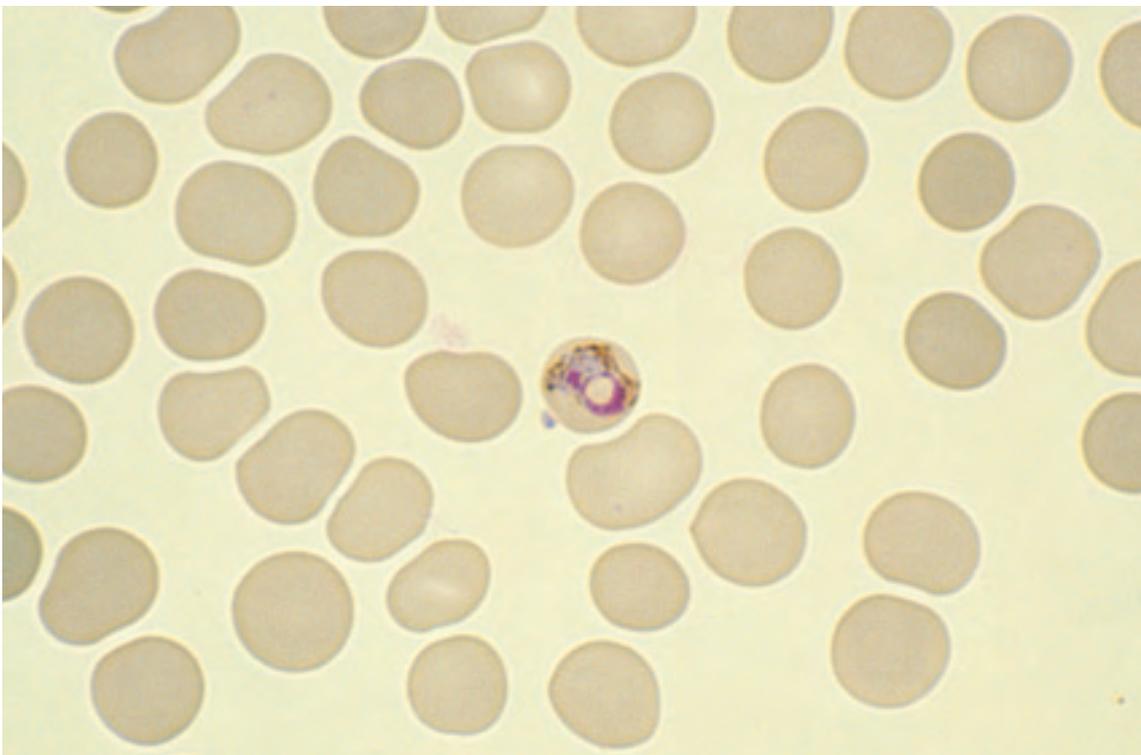


Photo n° 115 : Plasmodium malariae. Frottis. Hématie de taille surnormale. Un trophozoïte âgé avec une grande vacuole, pigment abondant. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

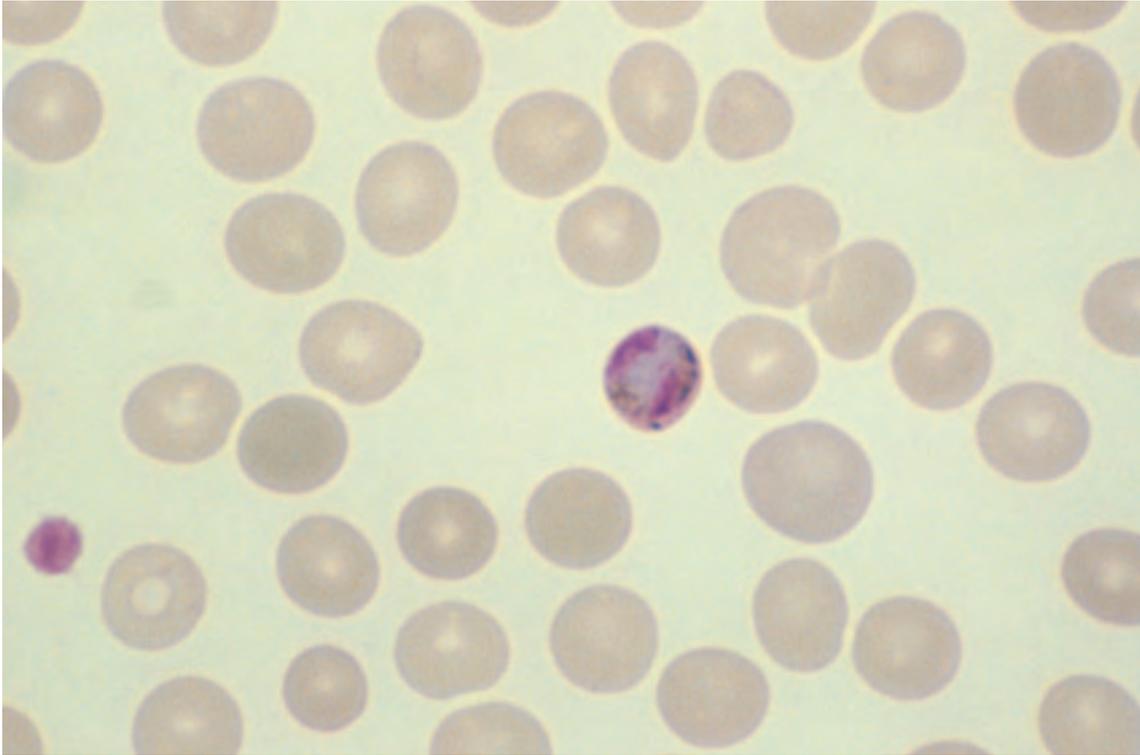


Photo n° 116 : Plasmodium malariae. Frottis. Hématie de taille normale. Schizonte à 2 noyaux avec pigment. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

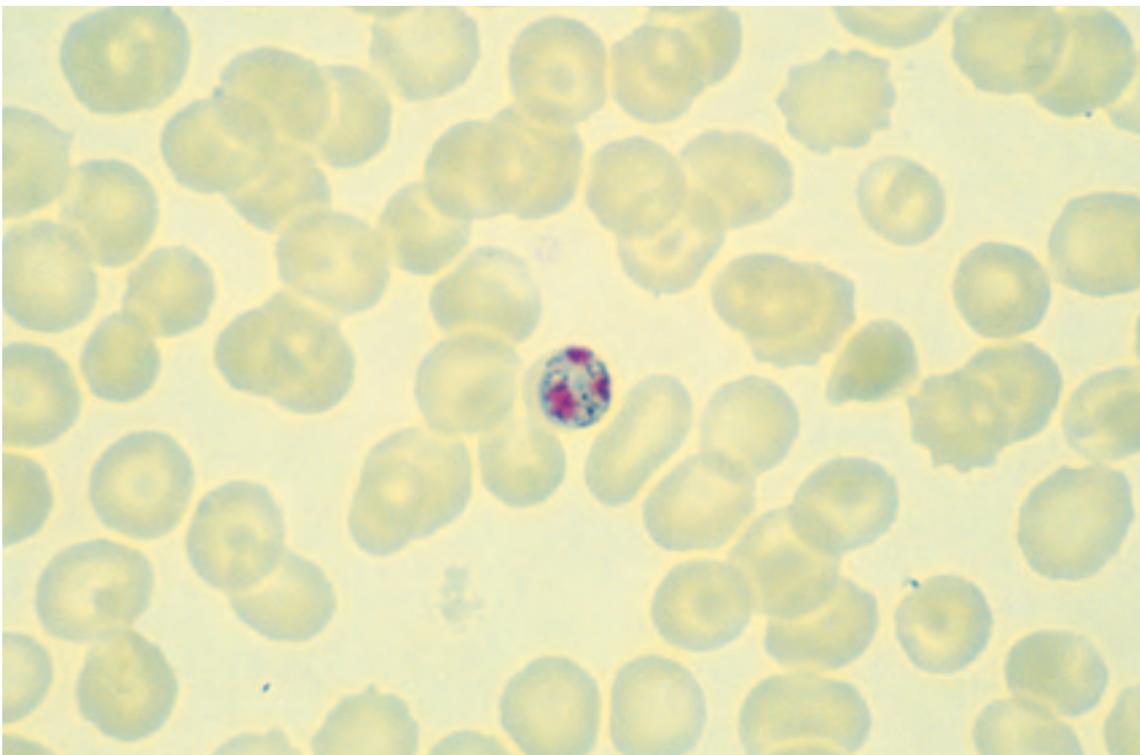


Photo n° 117 : Plasmodium malariae. Frottis. Hématie de taille subnormale. Schizonte à 3 noyaux, pigment abondant. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

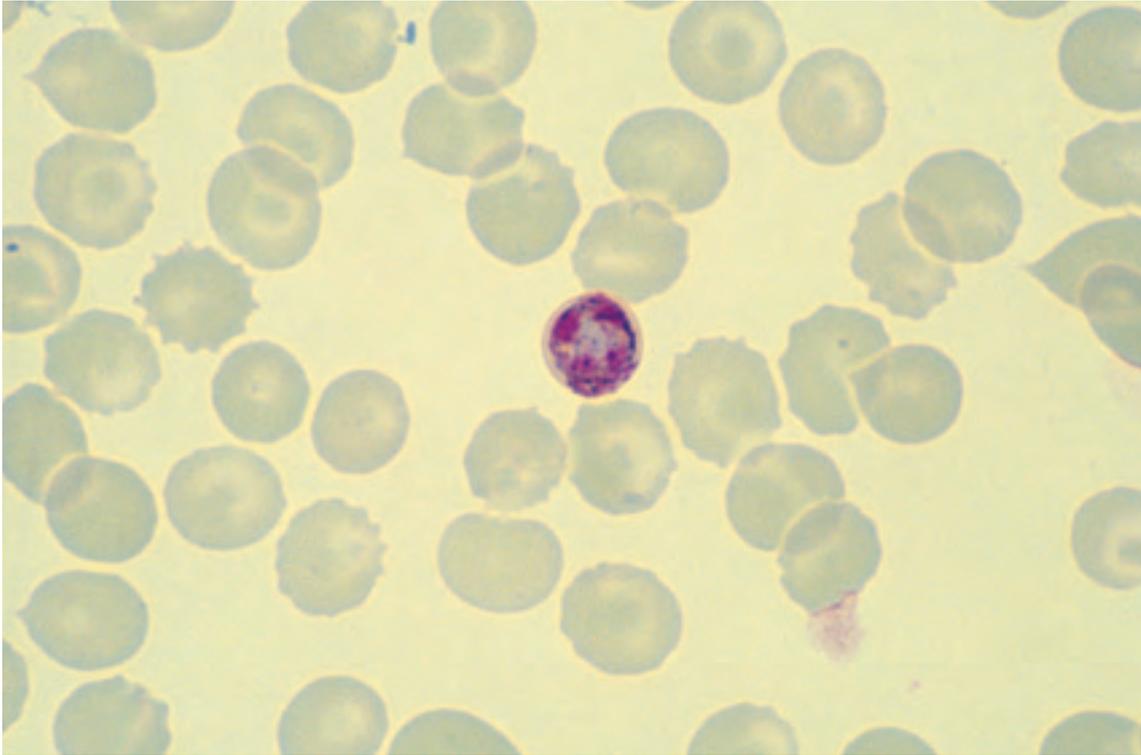


Photo n° 118 : Plasmodium malariae. Frottis. Hématie de taille normale. Schizonte à 4 noyaux. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

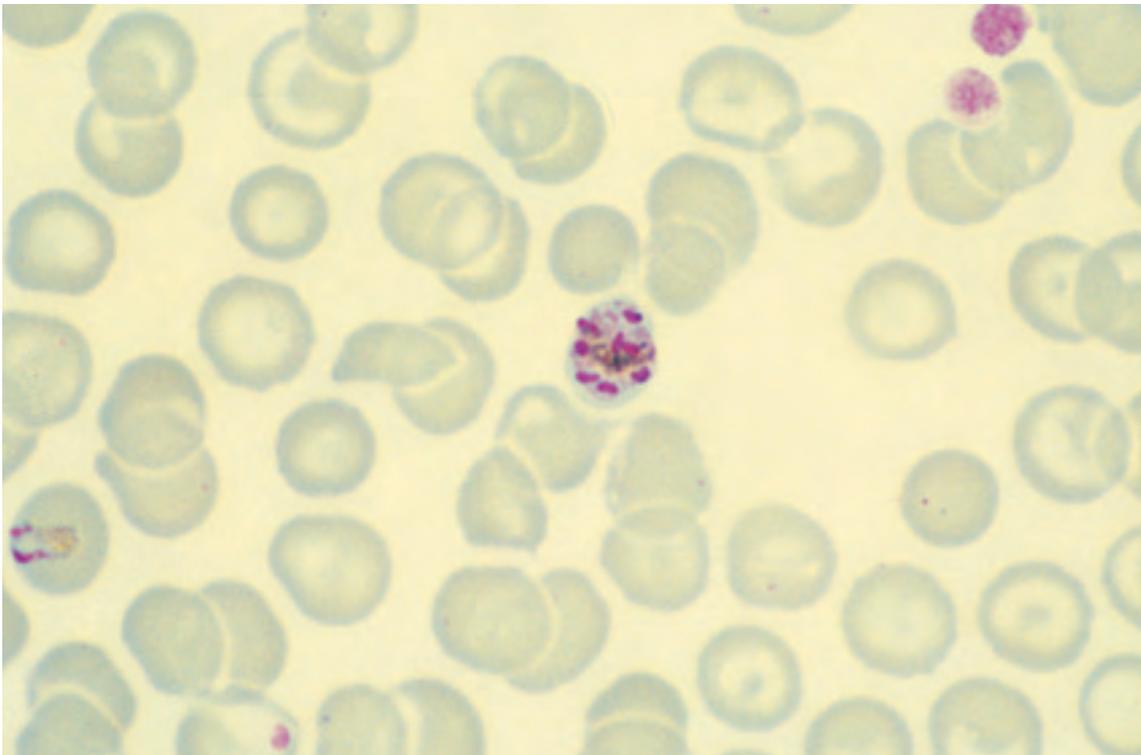


Photo n° 119 : Plasmodium malariae. Frottis. Hématie de taille normale. Schizonte mûr = corps en rosace à 8 noyaux. Gros amas de pigment central. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

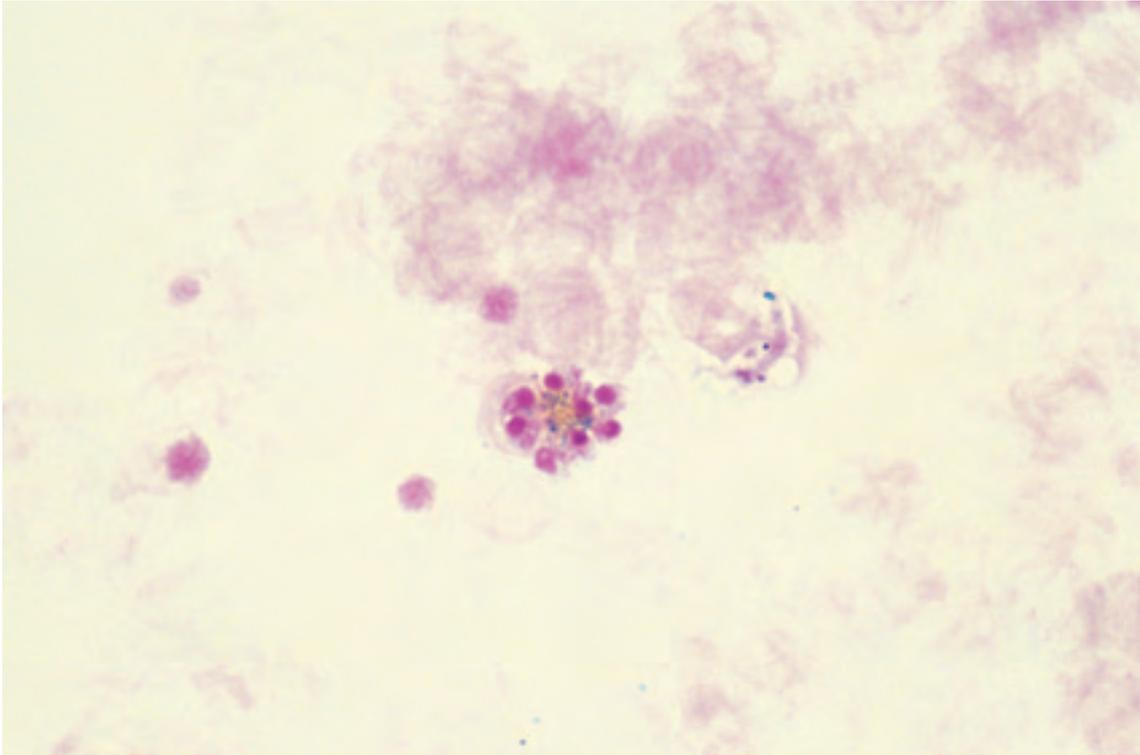


Photo n° 120 : Plasmodium malariae. Cytoconcentration. Schizonte mûr = corps en rosace à 8 noyaux. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

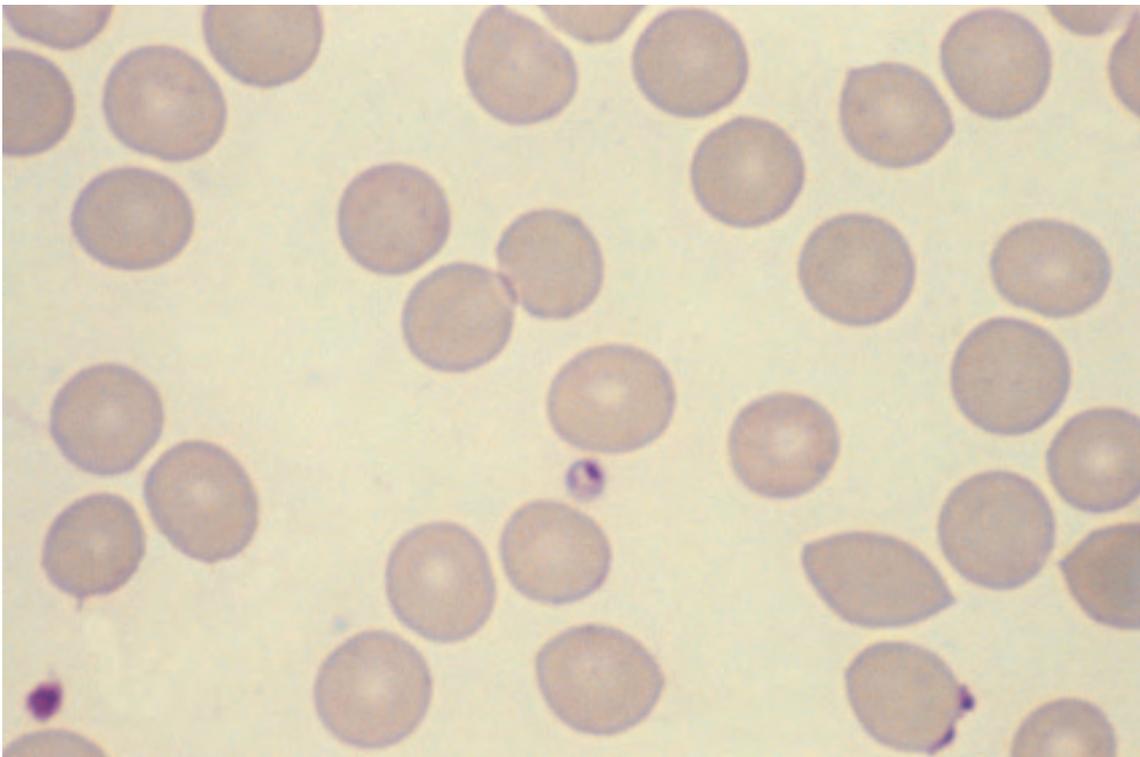


Photo n° 121 : Plasmodium malariae. Frottis. Mérozoïte isolé. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

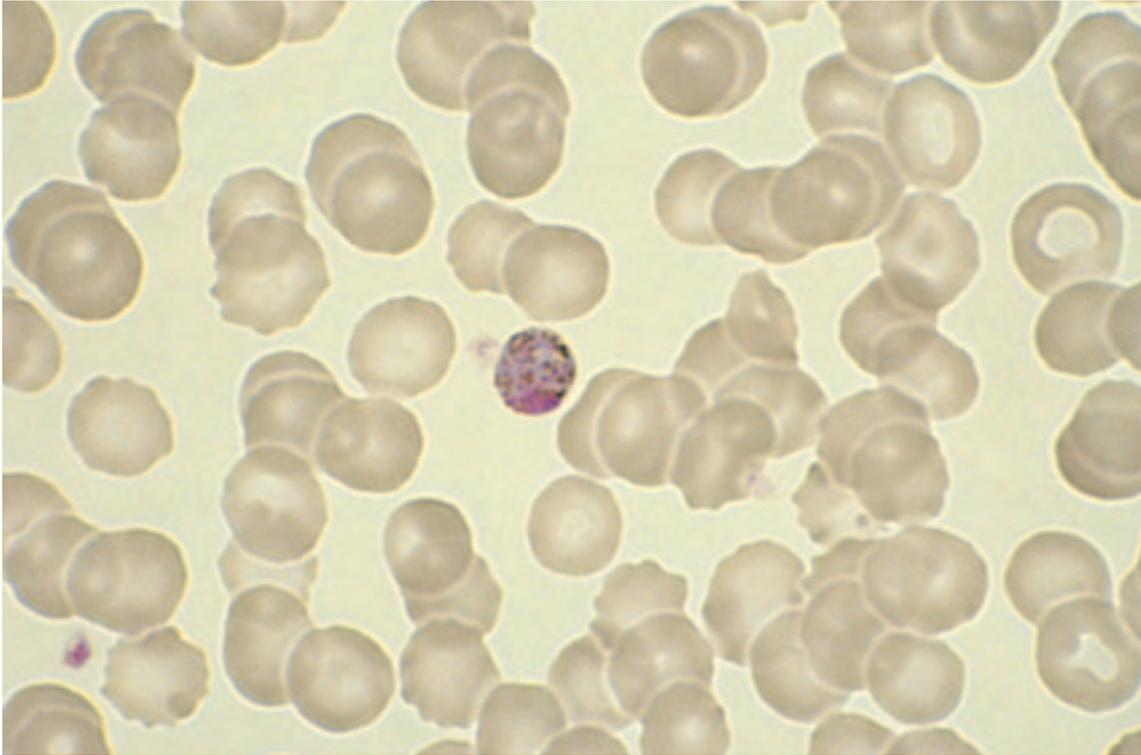


Photo n° 122 : Plasmodium malariae. Frottis. Gamétocte, pigment abondant et dispersé, noyau excentré. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

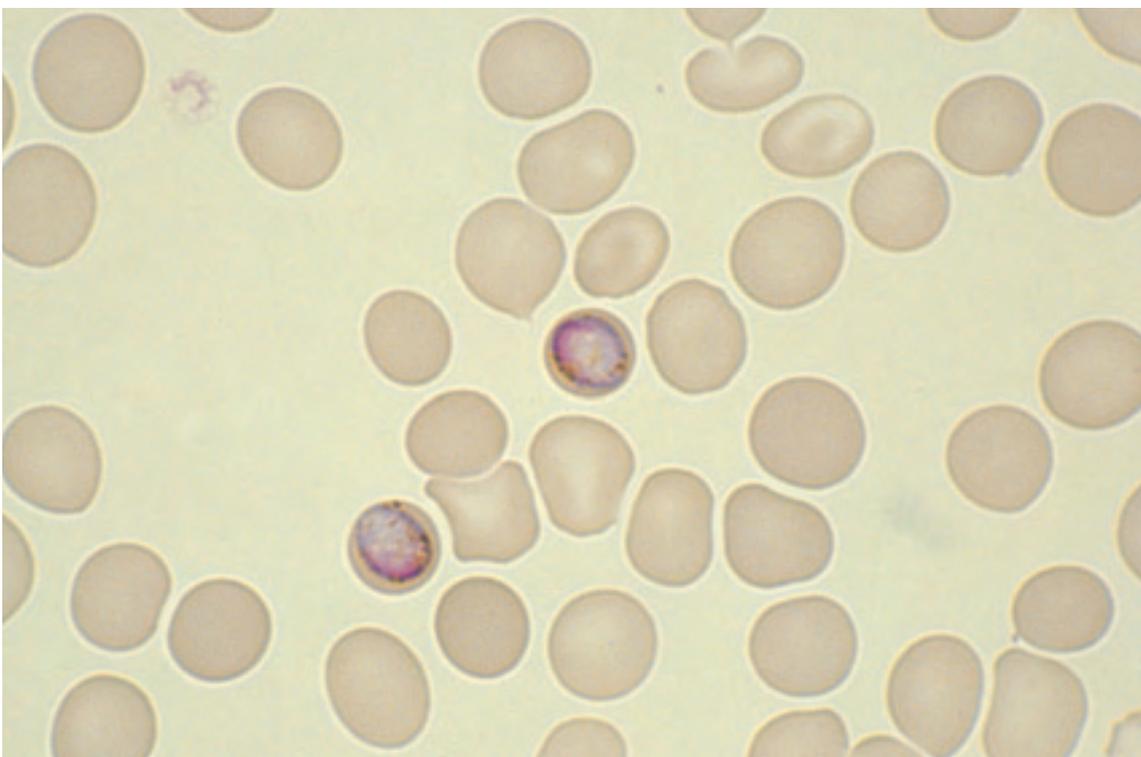


Photo n° 123 : Plasmodium malariae. Frottis. Deux gamétoctes occupant presque toute l'hématie de taille surnormale. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

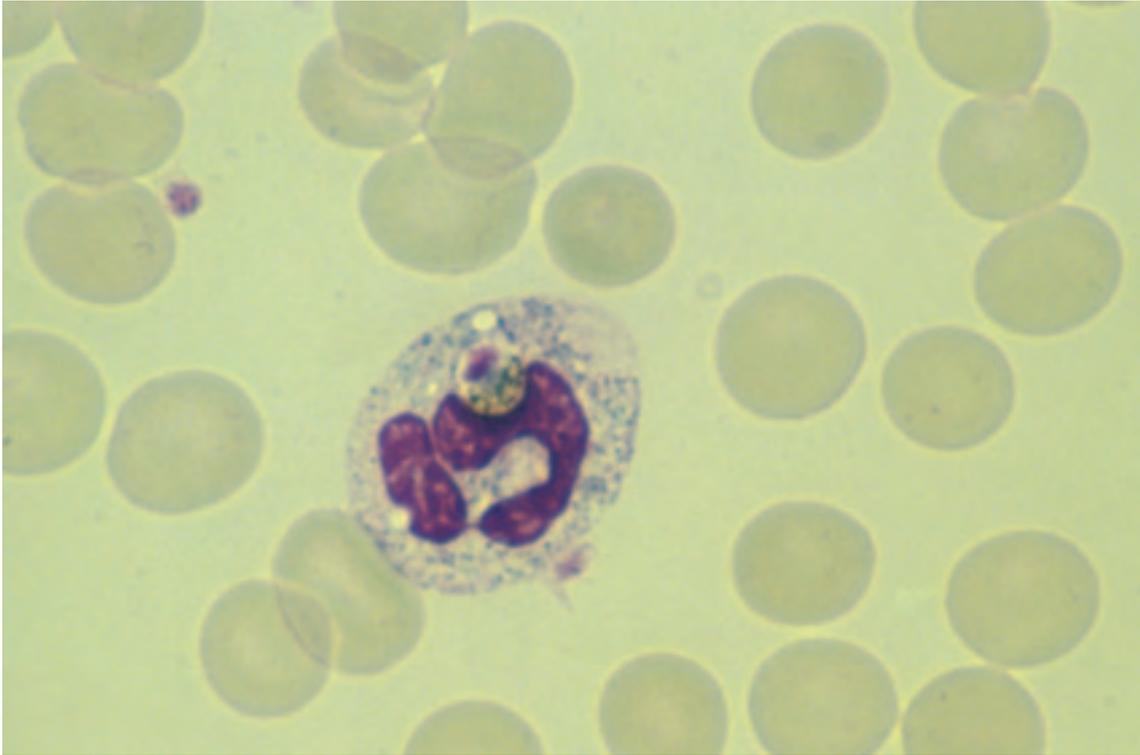


Photo n° 124 : *Plasmodium malariae*. Frottis. Polynucléaire neutrophile ayant phagocyté une hématie parasitée, en cours de digestion (trophozoïte ?). Pigment abondant persistant. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

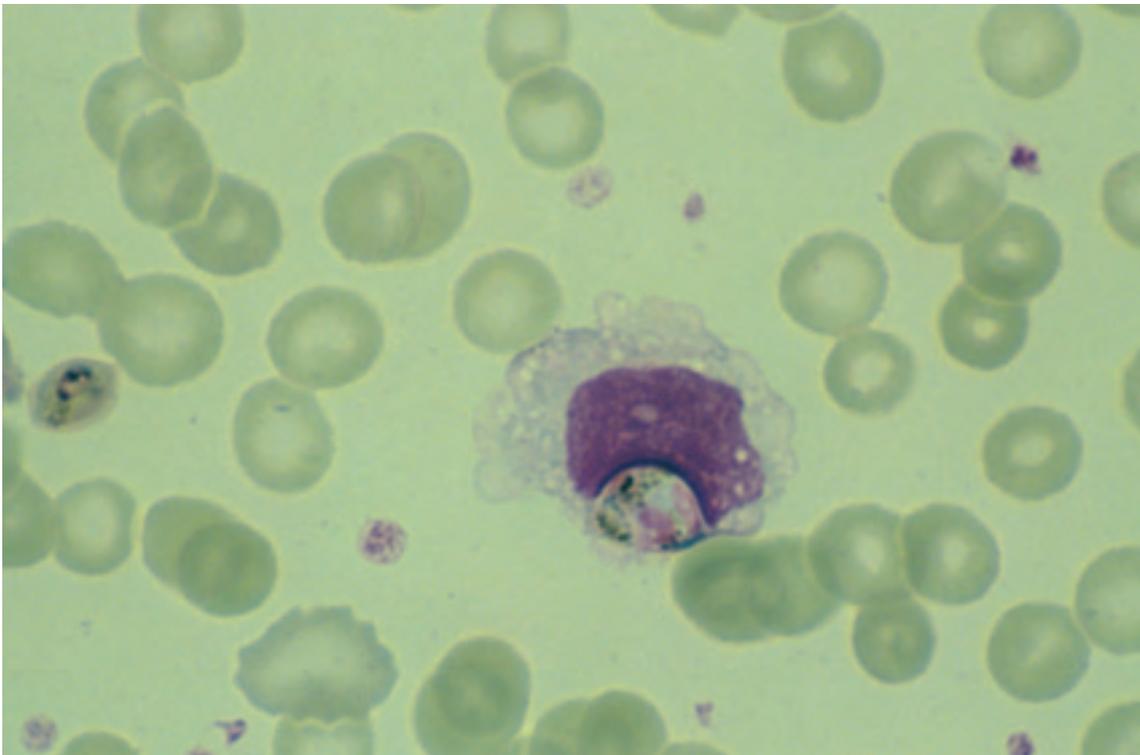


Photo n° 125 : *Plasmodium malariae*. Frottis. Monocyte ayant phagocyté une hématie parasitée, en cours de digestion (schizonte à 2 noyaux ?). Pigment abondant. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.

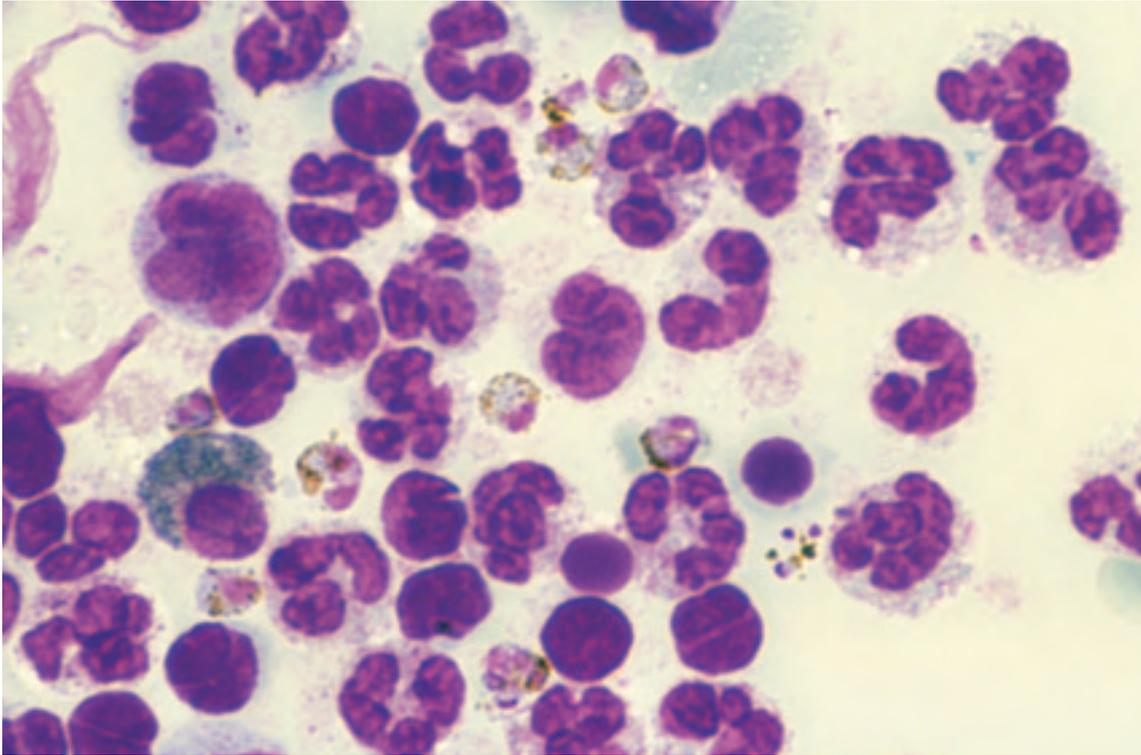


Photo n° 126 : Plasmodium malariae. Cytoconcentration. Nombreux schizontes et gamétocytes, pigment abondant. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

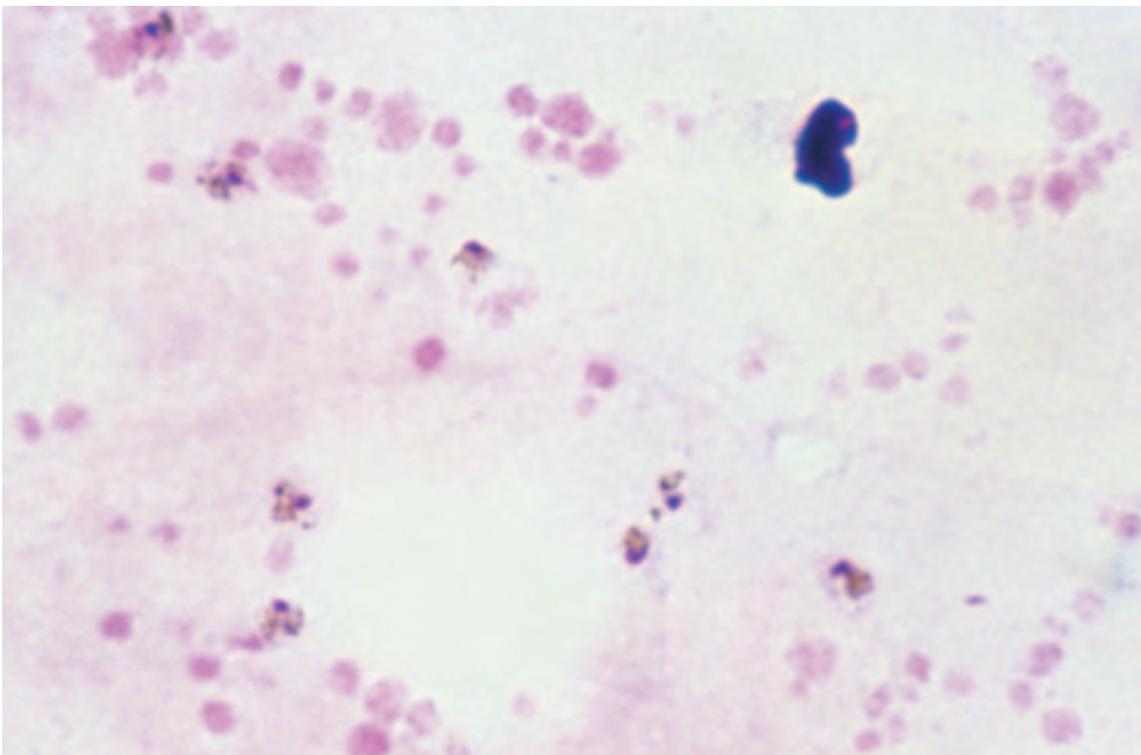


Photo n° 127 : Plasmodium malariae. Goutte épaisse. Sept trophozoïtes avec pigment abondant. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

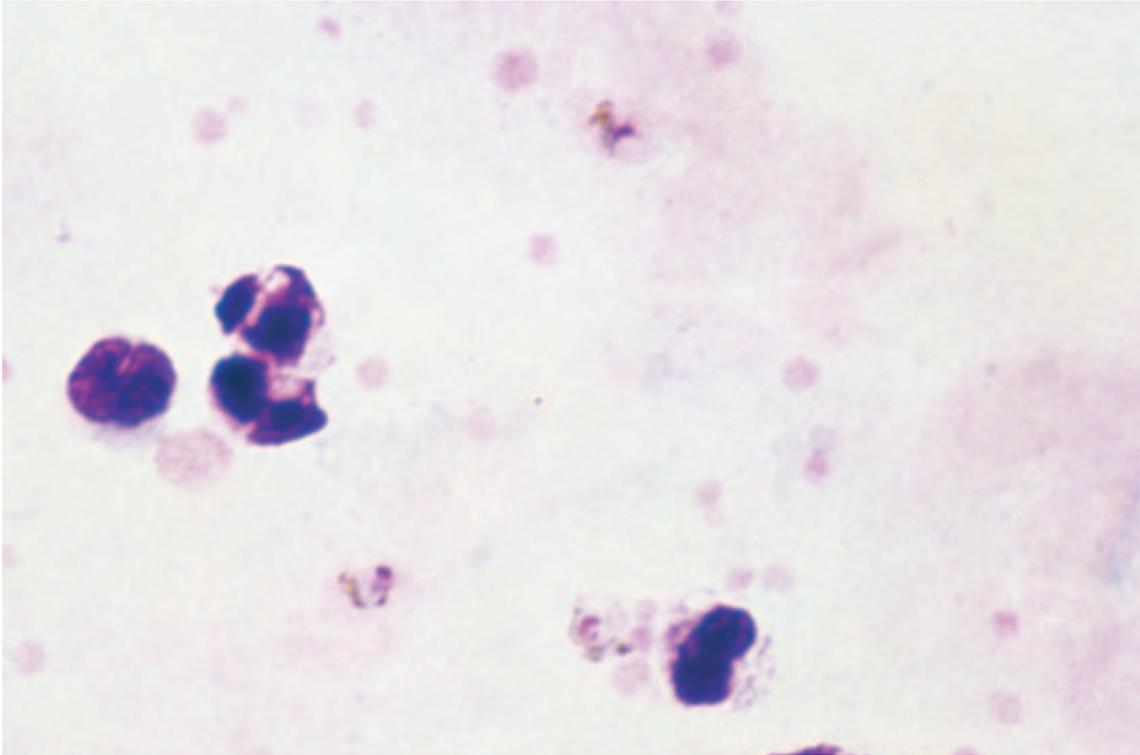


Photo n° 128 : Plasmodium malariae. Goutte épaisse. Quelques trophozoïtes avec pigment abondant. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

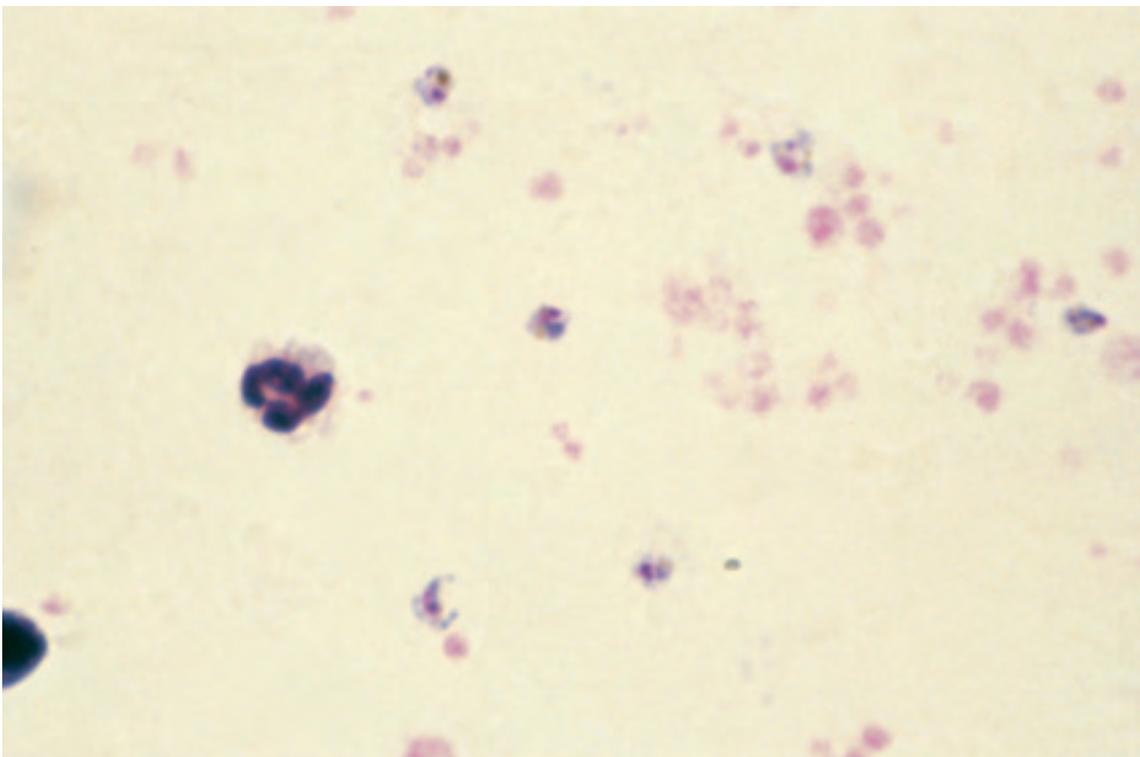


Photo n° 129 : Plasmodium malariae. Goutte épaisse. Six trophozoïtes, pigment difficilement visible rendant le diagnostic d'espèce discutable dans ce champs microscopique. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

■ DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DES DIFFÉRENTS STADES DES QUATRE ESPÈCES DE *PLASMODIUM*

Les caractéristiques de ces différents stades, déjà étudiées successivement pour les quatre espèces plasmodiales, sont résumées dans le tableau n° XII.

Nous avons ici réuni sur une même page l'aspect microscopique de chacun des stades pour les quatre espèces afin d'en faciliter la comparaison (photos n° 130 à 157).

Les photos sont en général d'un seul élément parasitaire, mais proviennent de frottis où les autres hématies parasitées étaient assez nombreuses et typiques pour assurer avec certitude le diagnostic d'espèce. Elles ont toutes été prises après coloration au May-Grünwald-Giemsa, objectif X 100.

Le diagnostic d'espèce est, nous le rappelons, souvent difficile à faire sur un seul élément, et il faut toujours, quand cela est possible, en examiner une dizaine au moins et mieux plusieurs dizaines, pour assurer ce diagnostic. Un examen approfondi de la lame de sang parasitée permet aussi de découvrir (rarement) des associations de deux ou trois espèces.

La page intitulée « trophozoïtes jeunes » contient ceux à un stade très jeune, avec un noyau simple, sans granulations ni tache, ni déformation de l'hématie hôte. Un diagnostic d'espèce est dans ce cas pratiquement impossible à faire.

La page intitulée « trophozoïtes intermédiaires » correspond au fait que les trophozoïtes jeunes ne deviennent pas brusquement âgés, mais qu'ils vieillissent progressivement, et que par exemple, les granulations deviennent de plus en plus nombreuses.

La page intitulée « trophozoïtes âgés » permet une différenciation facile des espèces, surtout par les taches de Maurer pour *P. falciparum*, la richesse en pigment pour *P. malariae*, les granulations de Schüffner et la forme ovale de l'hématie pour *P. ovale*, les granulations de Schüffner pour *P. vivax*.

La page intitulée « trophozoïtes avec pigment », illustre d'abord la richesse de *P. malariae* en pigment, mais montre aussi que même à ce premier stade toutes les espèces peuvent en posséder.

La page intitulée « schizontes à deux noyaux » : ce sont encore les caractères de l'hématie, leur taille, les granulations, les taches, le pointillé, et le pigment qui sont les meilleurs caractères différentiels.

La page intitulée « rosaces » montre la différence du nombre de mérozoïtes entre les quatre espèces.

La page intitulée « gamétocytes » montre côte à côte un gamétocyte « en banane » caractéristique de *P. falciparum* et un gamétocyte dans une hématie de petite taille avec beaucoup de pigment également caractéristique d'une autre espèce : *P. malariae*. Par contre les gamétocytes et *P. vivax* et *P. ovale* sont plus difficiles à différencier malgré leur différence de taille.

Tableau XII : Morphologie comparée des quatre espèces de Plasmodium humains

		<i>P. FALCIPARUM</i>	<i>P. VIVAX</i>	<i>P. OVALE</i>	<i>P. MALARIAE</i>
MODIFICATIONS DE L'HÉMATIE PARASITÉE	Âge	Jeune	Réticulocyte, jeune	Réticulocyte, jeune	Normale (ou âgée)
	Taille	Normale	Augmentée (= réticulocytes)	Légèrement augmentée ou normale	Normale ou diminuée
	Forme	Normale, rarement crénelée	Normale, ou irrégulière, polygonale	Ovale avec une extrémité effilochée « en comète » 25 %	Normale
	Coloration	Normale	Diminuée, pâle	Diminuée	Parfois foncée cuivrée
	Granulations, taches ou piqueté	Présence de taches de Maurer, rouge à rouge brun, peu nombreuses, grandes, arrondies ou triangulaires	Granulations de Schüffner, azurophiles, nombreuses, petites, apparaissant dans les trophozoïtes âgés	Granulations de Schüffner apparaissant dès le stade de trophozoïtes jeunes, annulaires	Piqueté de Ziemann, à la limite de la visibilité, rouge
FORMES SEXUÉES (GAMÉTOGONIE)	Parasitémie par µl (# un frottis)				
	Moyenne	20 000-500 000	20 000	10 000	5 000
	Maximum	2 000 000	50 000	30 000	20 000
	Durée du cycle érythrocytaire (en heures)	48	44 à 48	50	72
	Périodicité des accès	tierce maligne	tierce	tierce	quarte
Gamétocytes	Forme allongée caractéristique soit droit en cigare soit arqué en banane, en forme de faux Pigment abondant	Forme arrondie ou ovale, occupe la totalité ou presque de l'hématie. Pigment abondant	Semblable à <i>P. malariae</i> plus petit que le GR cytoplasme pâle, pigment abondant, dispersé	Remplit l'hématie Arrondi ou ovale massif. Pigment abondant, grossier	
Délai d'apparition des gamétocytes après l'apparition des trophozoïtes et schizontes (en jours)	8 à 10	3 à 5	5 à 6	10 à 14	

Gamétocyte femelle : cytoplasme bleu foncé, noyau condensé au centre, peu visible, pigment rassemblé au centre.

Gamétocyte mâle : Cytoplasme lilas, rosé, noyau éparpillé, pigment diffus.

Tableau XIII : Morphologie comparée des quatre espèces de Plasmodium humains (suite)

		<i>P. FALCIPARUM</i>	<i>P. VIVAX</i>	<i>P. OVALE</i>	<i>P. MALARIAE</i>
FORMES ASEXUÉES (SCHIZOGONIE)	TROPHOZOÏTE JEUNE, ANNULAIRE	Petits environ 2 microns : 1/3 du diamètre de l'hématie. Noyau petit punctiforme. Éléments binucléés en haltère fréquents. Présence de formes marginales. Polyparasitisme fréquent	Grand : 2 à 5 microns, cytoplasme épais. Noyau plus gros que <i>P. falciparum</i>	Assez grand : 2 à 4 microns. Noyau assez gros et net. Présence de granulations de Schüffner. Polyparasitisme fréquent	Assez grand. Assez gros noyau. Présence d'un grain de pigment noir.
	TROPHOZOÏTE ÂGÉ	plus gros, piriforme, atteignant 4 microns. Présence fréquente de taches de Maurer et rarement d'un grain de pigment	granulations de Schüffner et du pigment. Cytoplasme étiré en tout sens : corps amiboïde	plus gros, rond, pas d'aspect amiboïde	rond ou ovale. Aspect en bande équatoriale caractéristique : cytoplasme, noyau et pigment sont allongés transversalement.
	PIGMENT	Grains irréguliers foncés (noirs) absent dans les trophozoïtes jeunes	Fin, bacilliforme brun jaune	Gros grains brun foncé dans les trophozoïtes et les schizontes. Bacilliformes dans les gamétocytes	Gros grains brun foncé très abondants et très précoces
	SCHIZONTE	Absent du sang périphérique sauf en cas d'accès pernicieux			
	SCHIZONTE MÛR = CORPS EN ROSACE	(dans les vaisseaux profonds : 12 à 24 mérozoïtes)	Grande taille 12 à 18 mérozoïtes, maximum 24, amas de pigment. noir	Petite taille. 8 gros mérozoïtes en moyenne, 16 au maximum	Petite taille, 8 à 12 mérozoïtes maximum. Contour festonné comme une fleur de marguerite. Pigment central.

TROPHOZOÏTES JEUNES

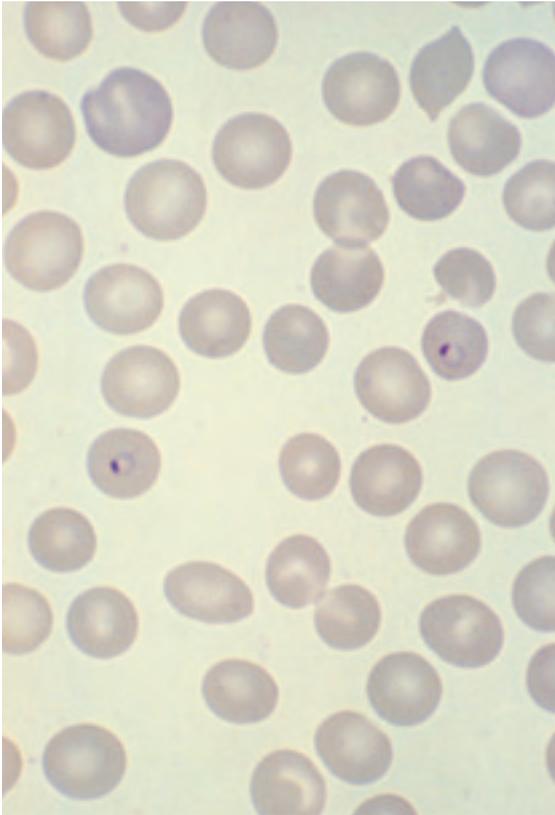


Photo n° 130 : P. FALCIPARUM

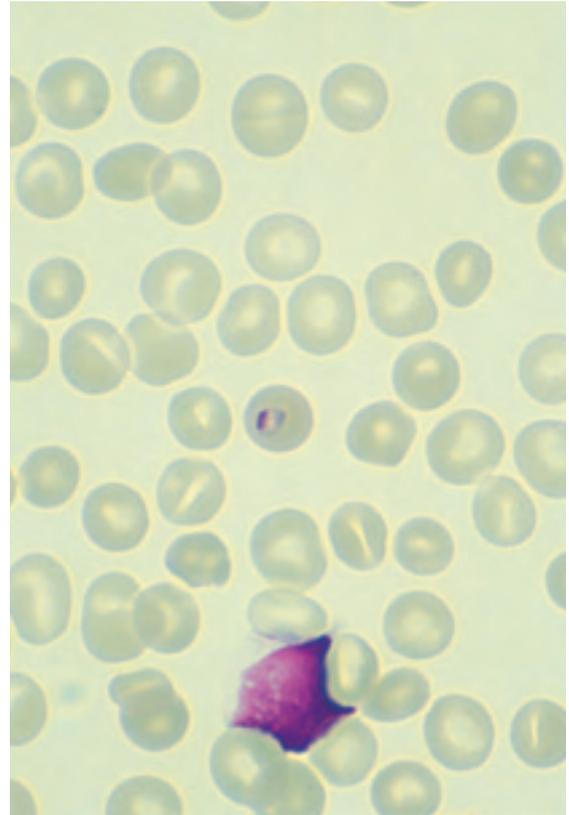


Photo n° 131 : P. MALARIAE

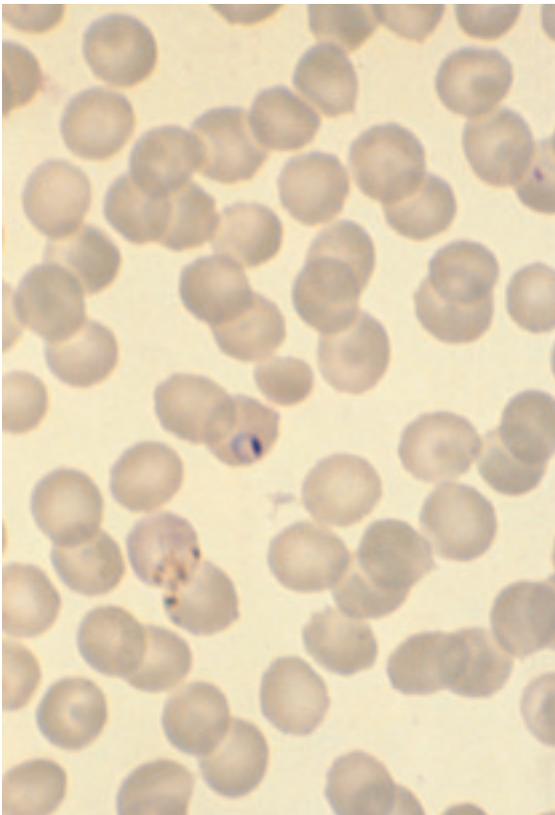


Photo n° 132 : P. OVALE

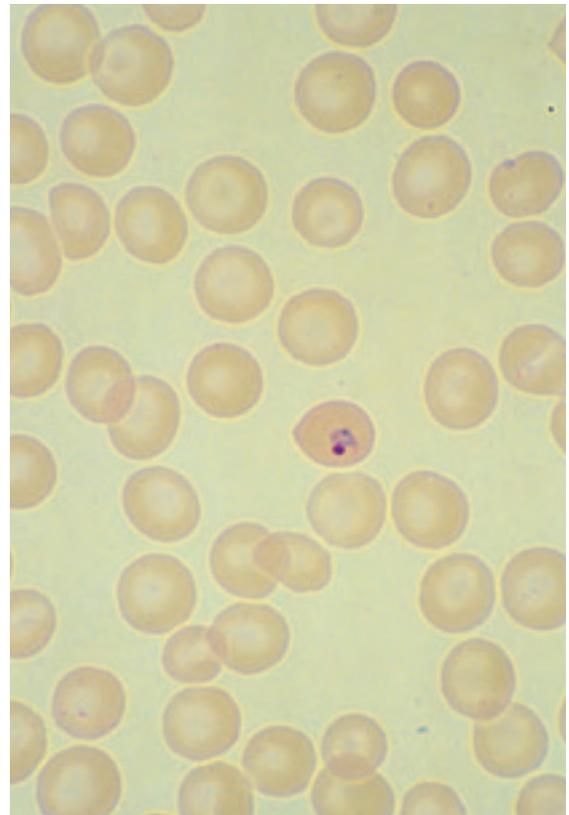


Photo n° 133 : P. VIVAX

TROPHOZOÏTES INTERMÉDIAIRES

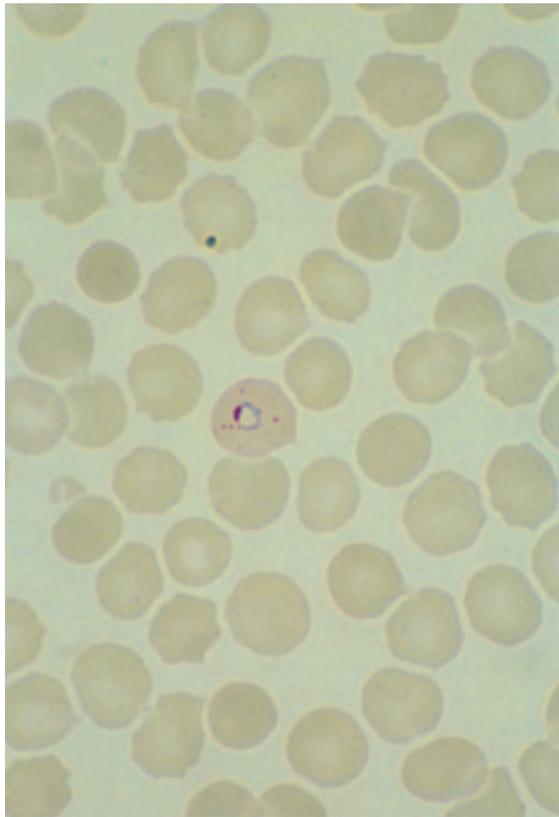


Photo n° 134 : P. FALCIPARUM

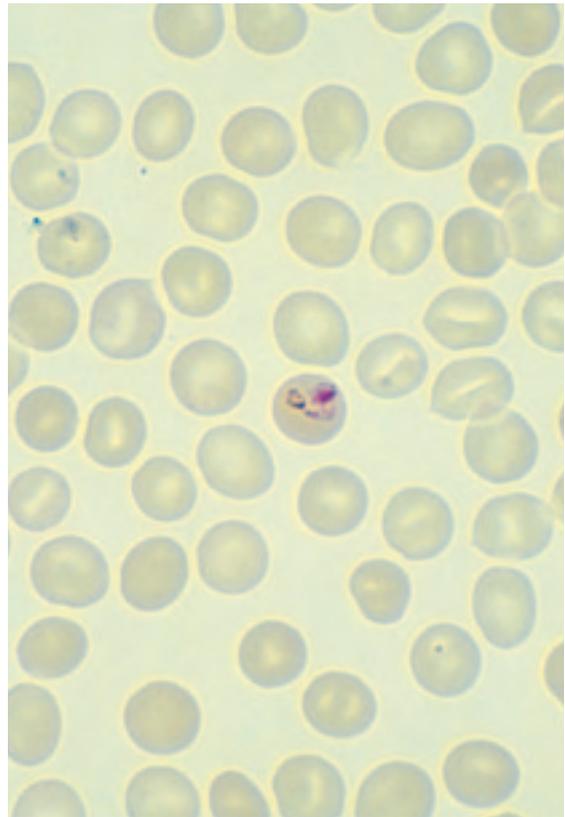


Photo n° 135 : P. MALARIAE

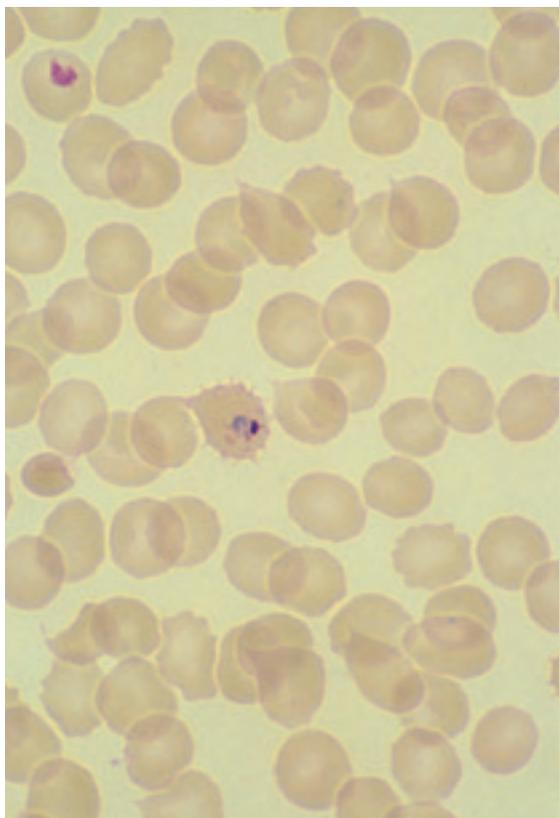


Photo n° 136 : P. OVALE

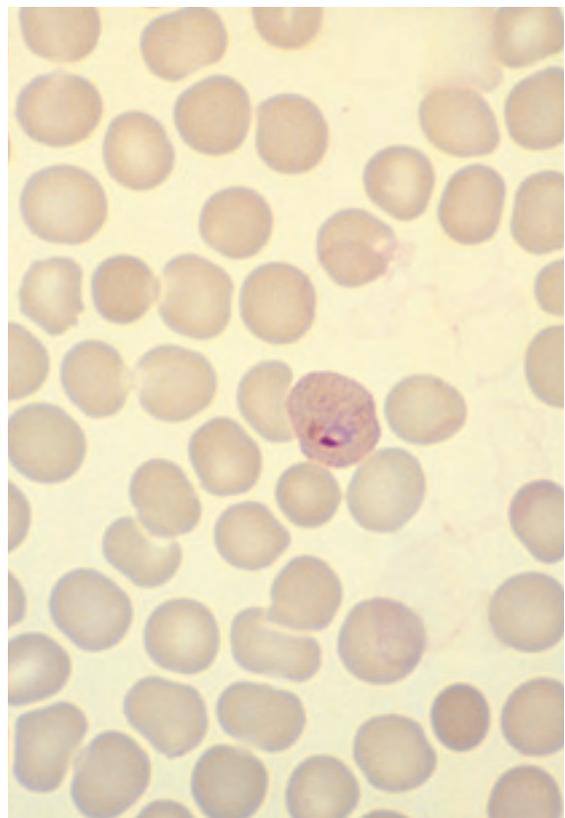


Photo n° 137 : P. VIVAX

TROPHOZOÏTES ÂGÉS

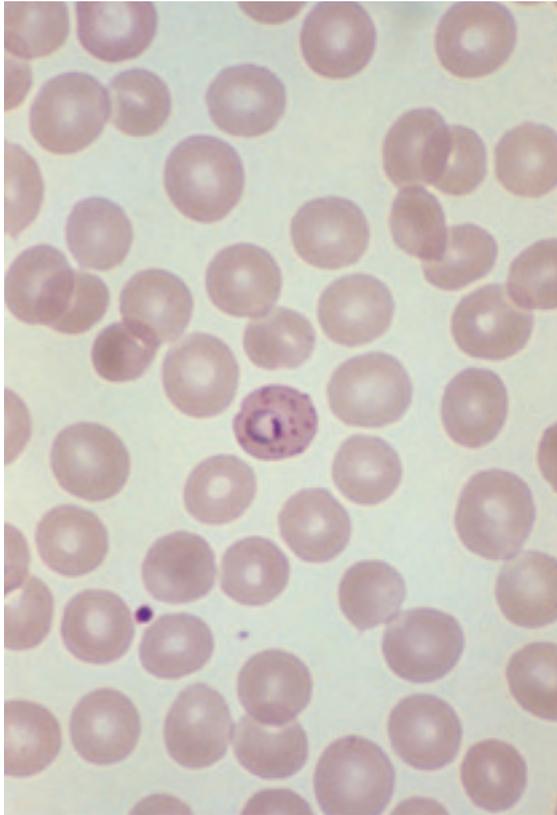


Photo n° 138 : P. FALCIPARUM

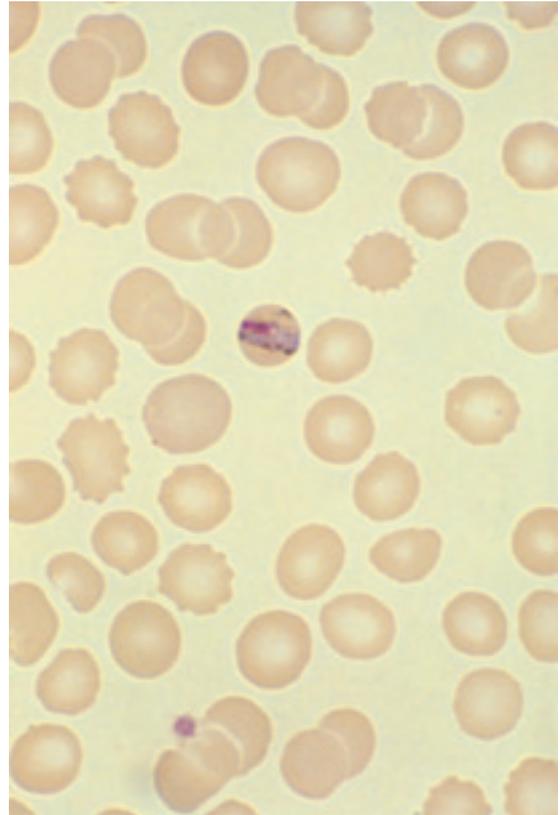


Photo n° 139 : P. MALARIAE

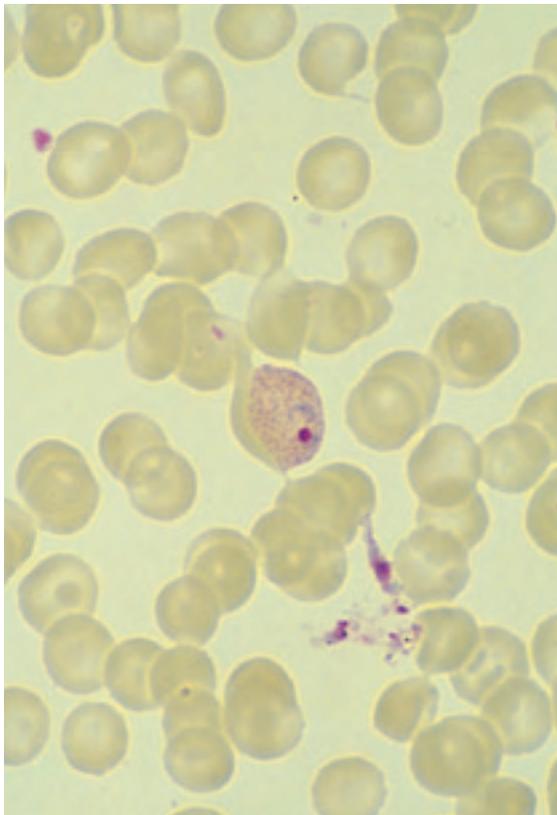


Photo n° 140 : P. OVALE

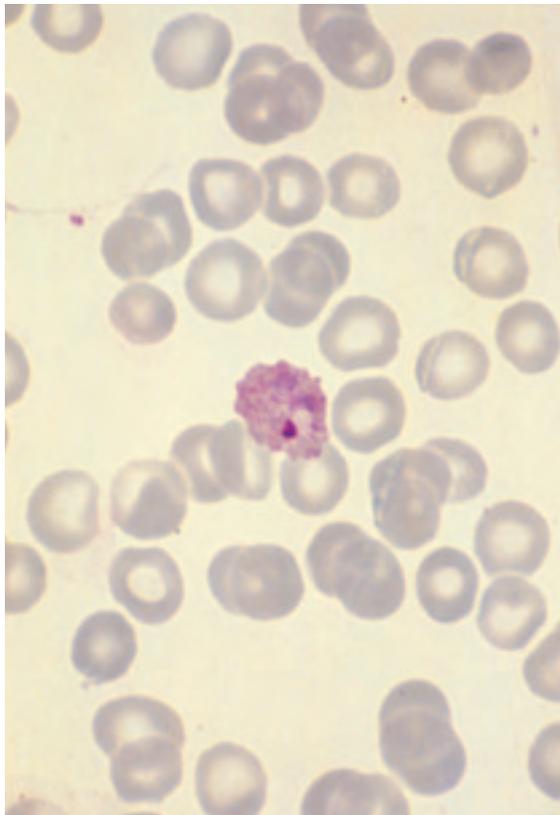


Photo n° 141 : P. VIVAX

TROPHOZOÏTES AVEC PIGMENT

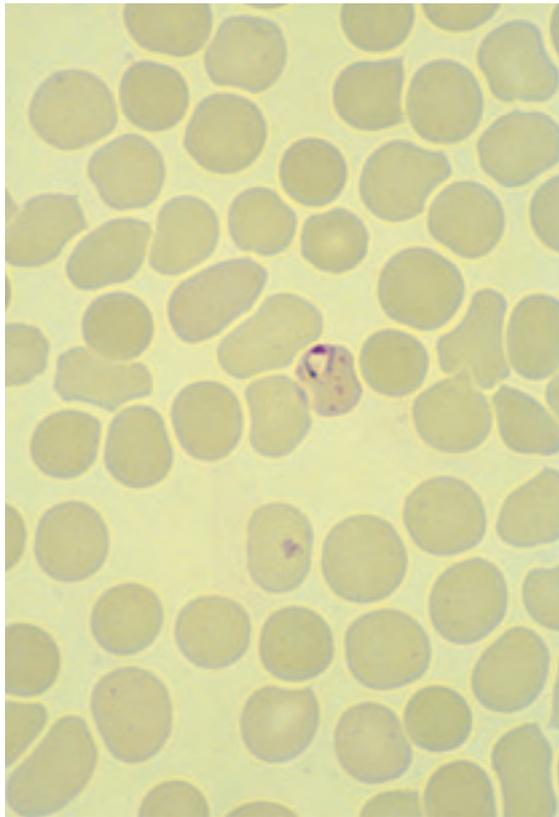


Photo n° 142 : P. FALCIPARUM

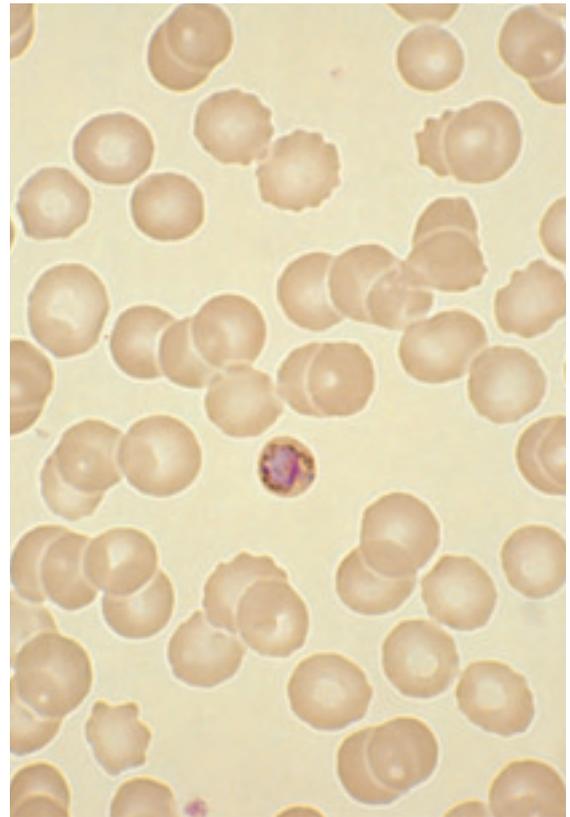


Photo n° 143 : P. MALARIAE

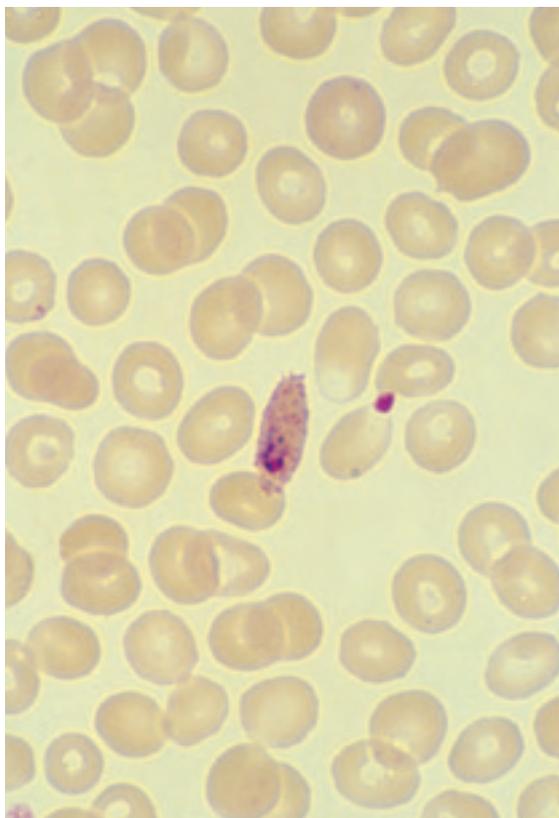


Photo n° 144 : P. OVALE

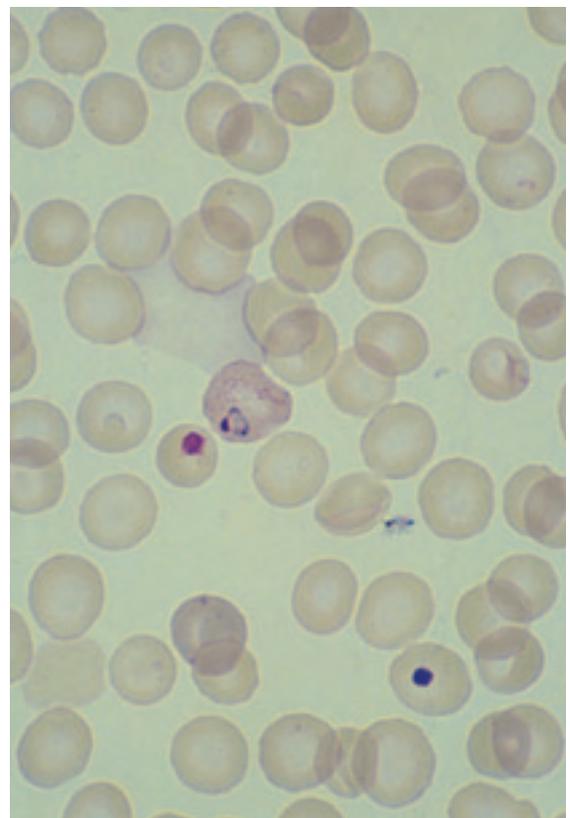


Photo n° 145 : P. VIVAX

SCHIZONTES À DEUX NOYAUX

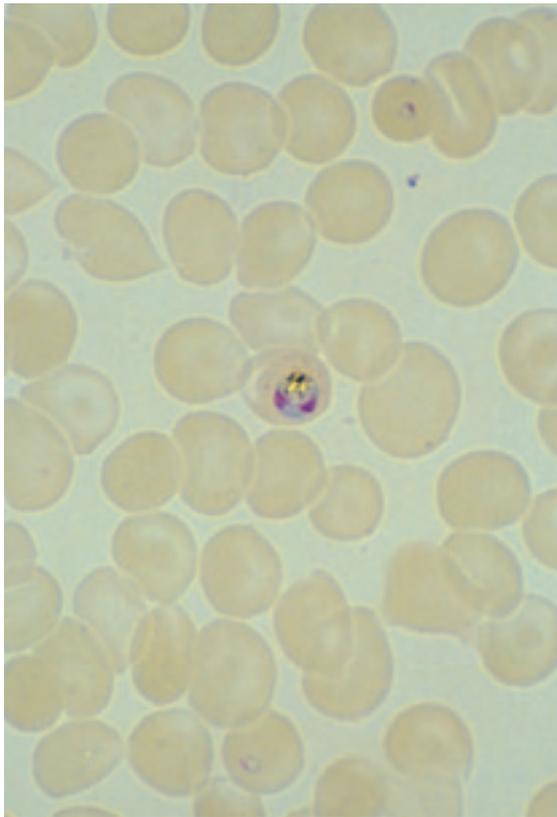


Photo n° 146 : P. FALCIPARUM

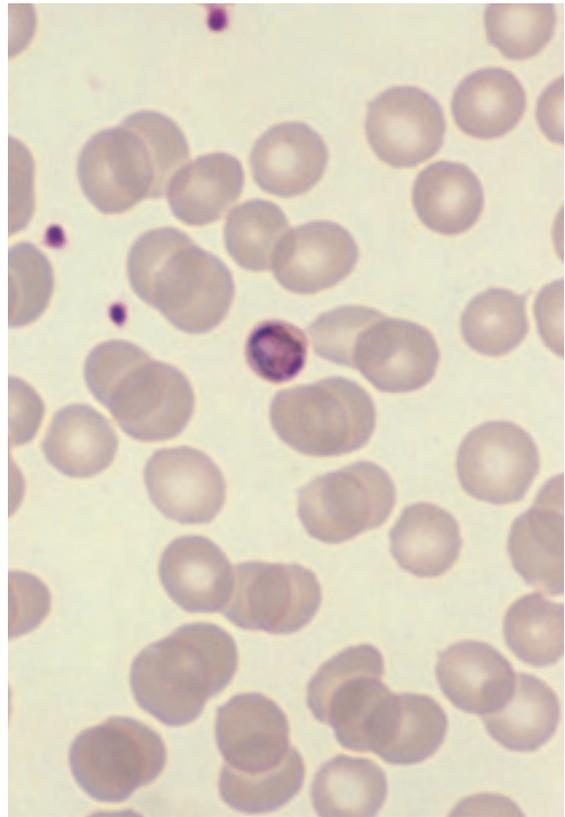


Photo n° 147 : P. MALARIAE

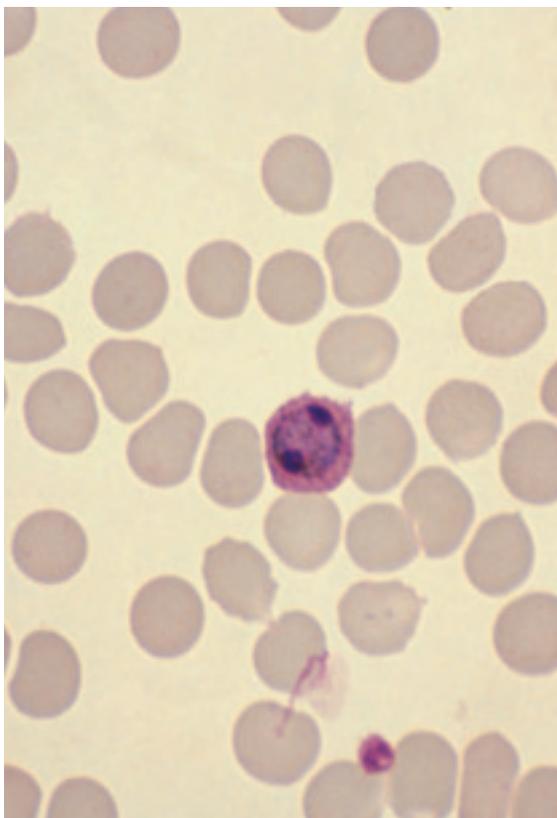


Photo n° 148 : P. OVALE

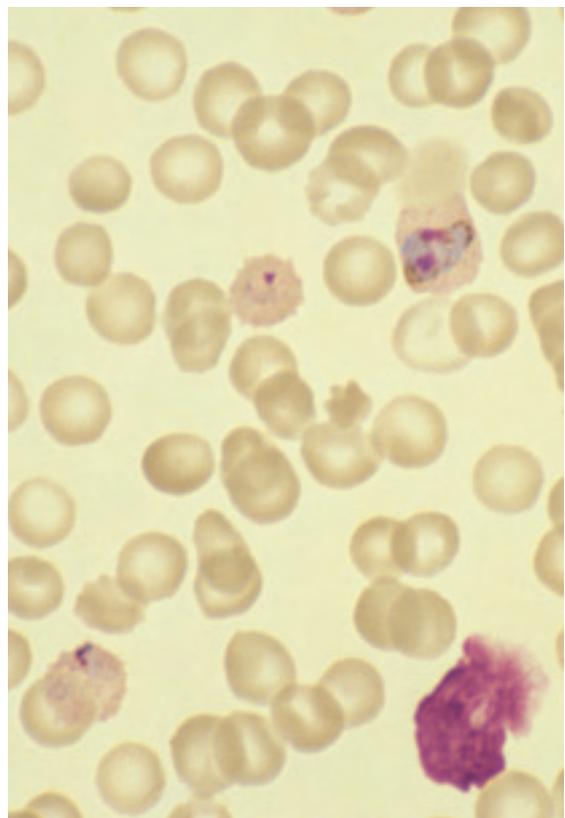


Photo n° 149 : P. VIVAX

ROSACES

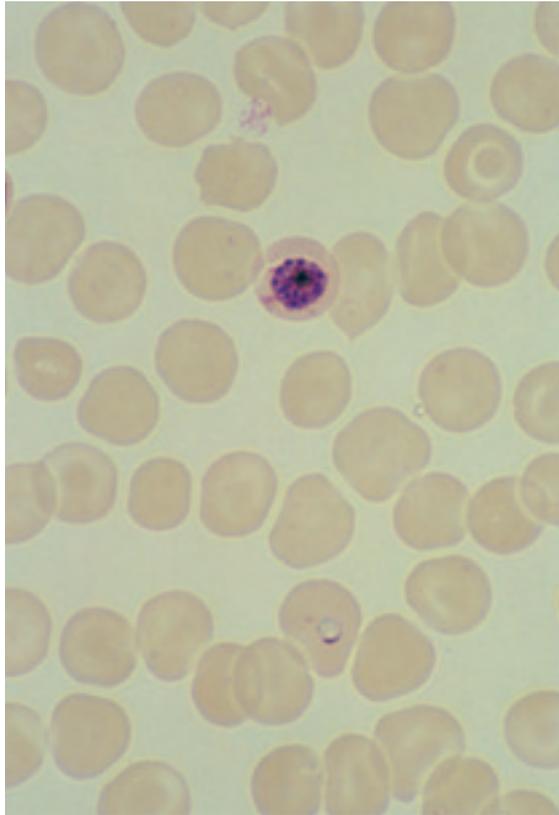


Photo n° 150 : P. FALCIPARUM

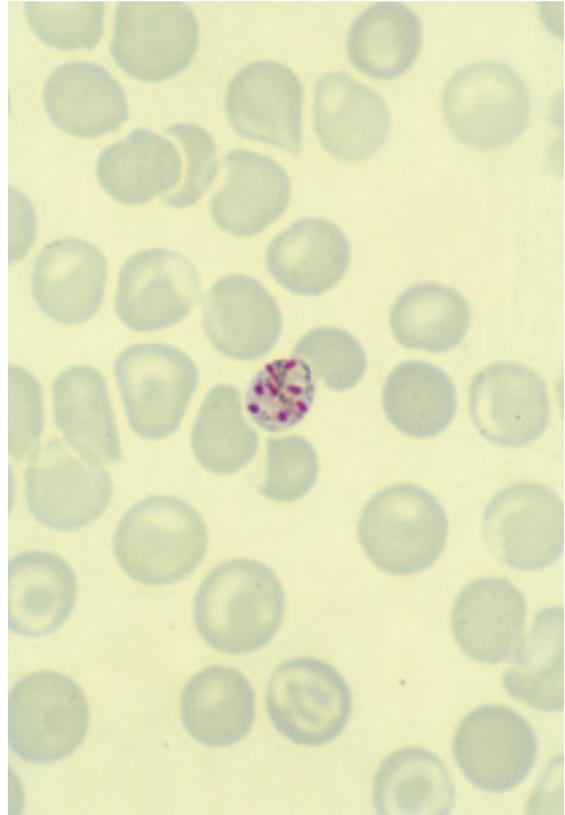


Photo n° 151 : P. MALARIAE

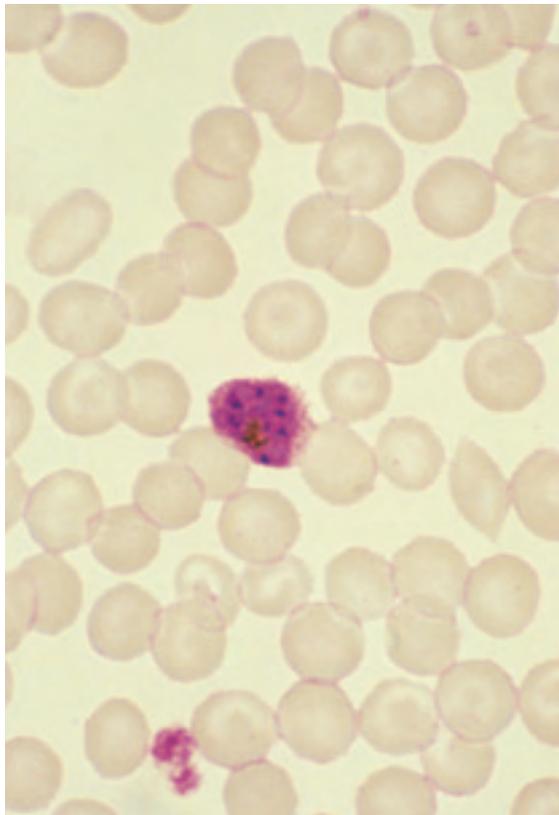


Photo n° 152 : P. OVALE

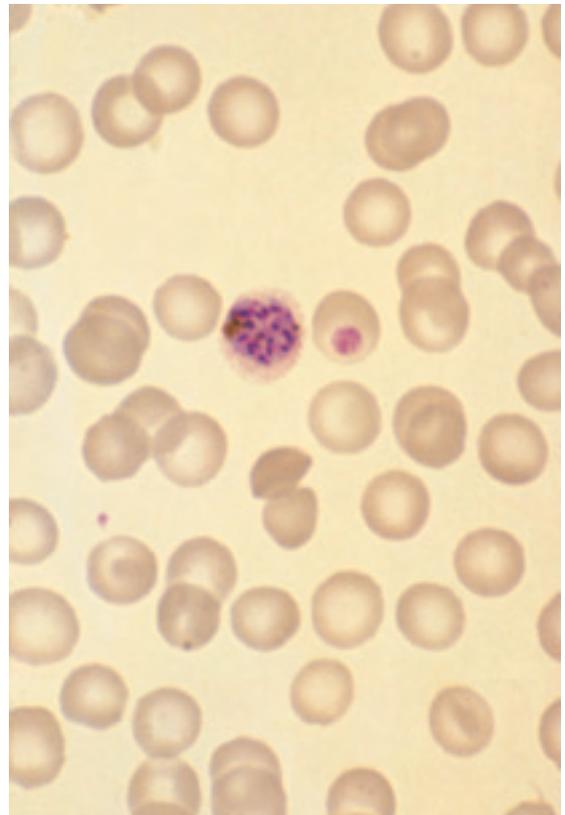


Photo n° 153 : P. VIVAX

GAMÉTOCYTES

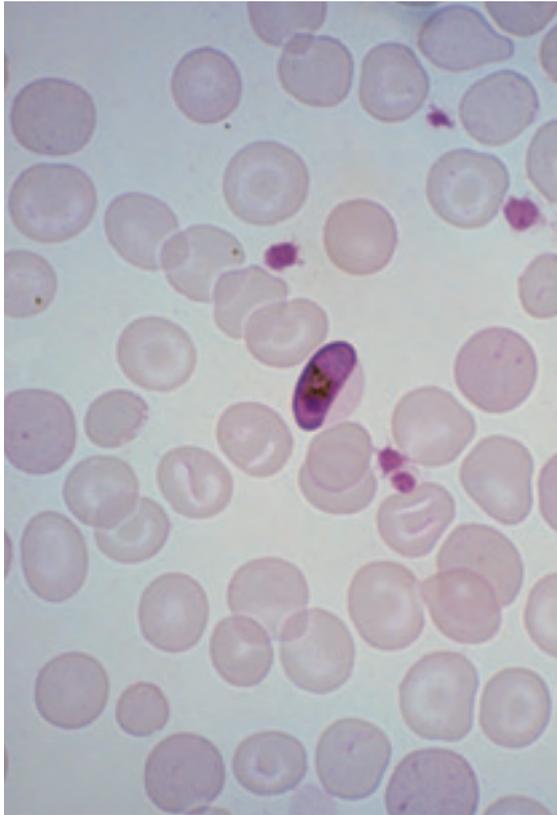


Photo n° 154 : P. FALCIPARUM

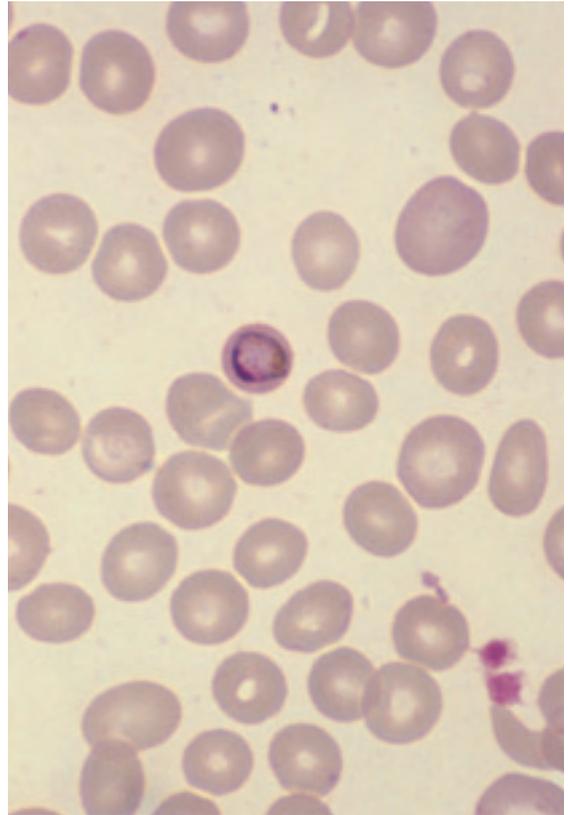


Photo n° 155 : P. MALARIAE

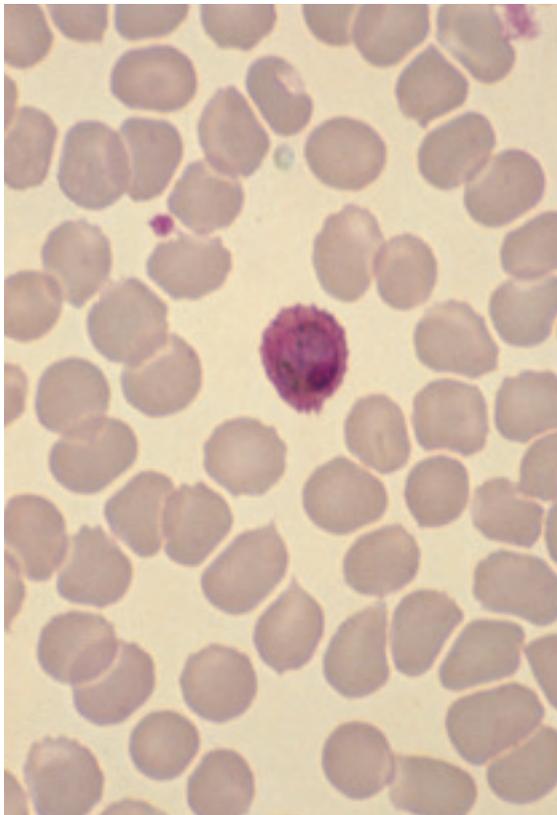


Photo n° 156 : P. OVALE

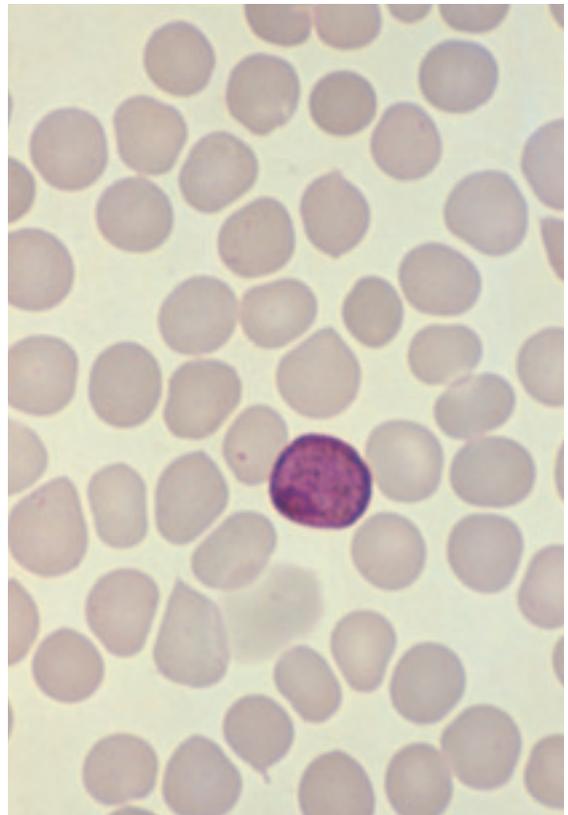


Photo n° 157 : P. VIVAX

POLYINFESTATIONS

Des infestations simultanées par 2 ou 3 espèces de *Plasmodium* peuvent être observées (142, 208, 209 et 211). L'existence de l'association des quatre espèces a été publiée, mais les photographies correspondantes ne sont pas convaincantes quant à la présence de *P. vivax* (210).

Par la technique de la goutte épaisse il est très difficile de faire le diagnostic d'association.

Au microscope, sur frottis, le diagnostic de deux ou trois espèces peut être fait, mais est aussi parfois difficile, et même impossible.

Le diagnostic de l'espèce dominante est habituellement évident mais l'espèce secondaire, en petit nombre, ne peut être identifiée que si des formes caractéristiques sont présentes.

La photo n° 158 montre ensemble une double association de *P. falciparum* et *P. ovale* chez un malade.

Les photos n° 159, 160 et 161 montrent l'association de *P. malariae*, *P. ovale* et *P. falciparum* chez une petite fille de 4 ans.

La photo n° 162 de sa sœur montre ensemble *P. malariae* et *P. ovale*.

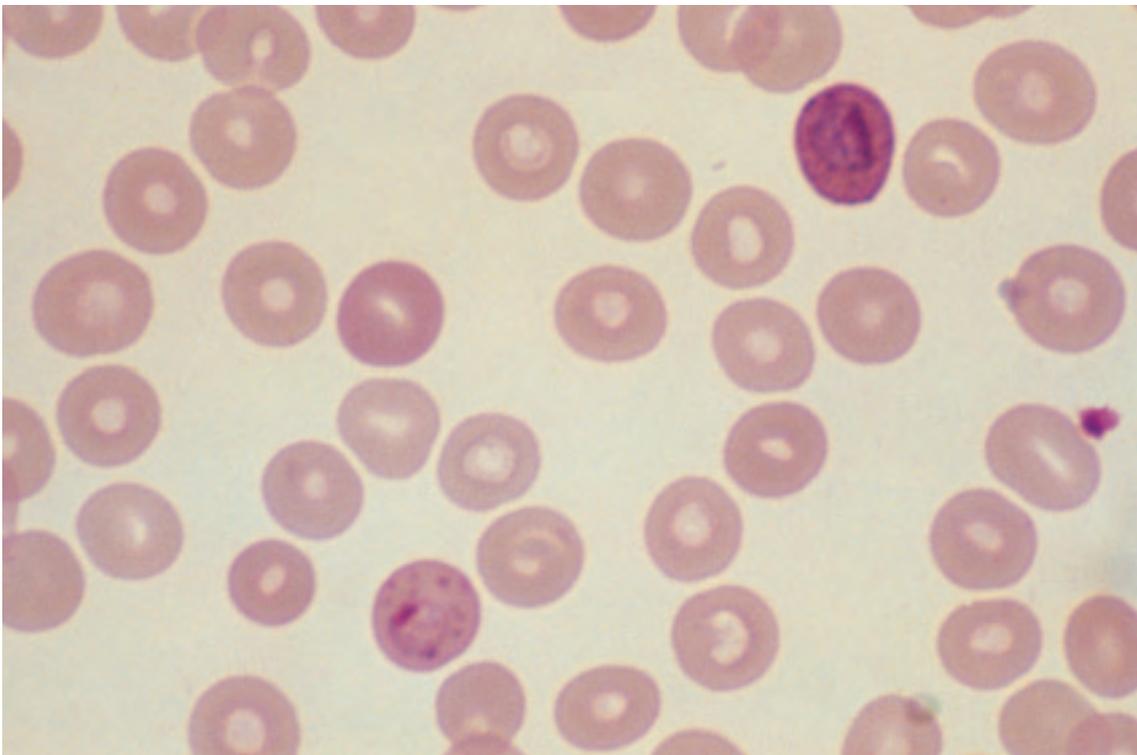


Photo n° 158 : Double association *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*. Ici trophozoïte âgé de *P. falciparum* avec taches de Maurer et trophozoïte âgé de *Plasmodium ovale* avec granulations de Schüffner dans le même champ. Coloration M.G.G. Obj. X 100.

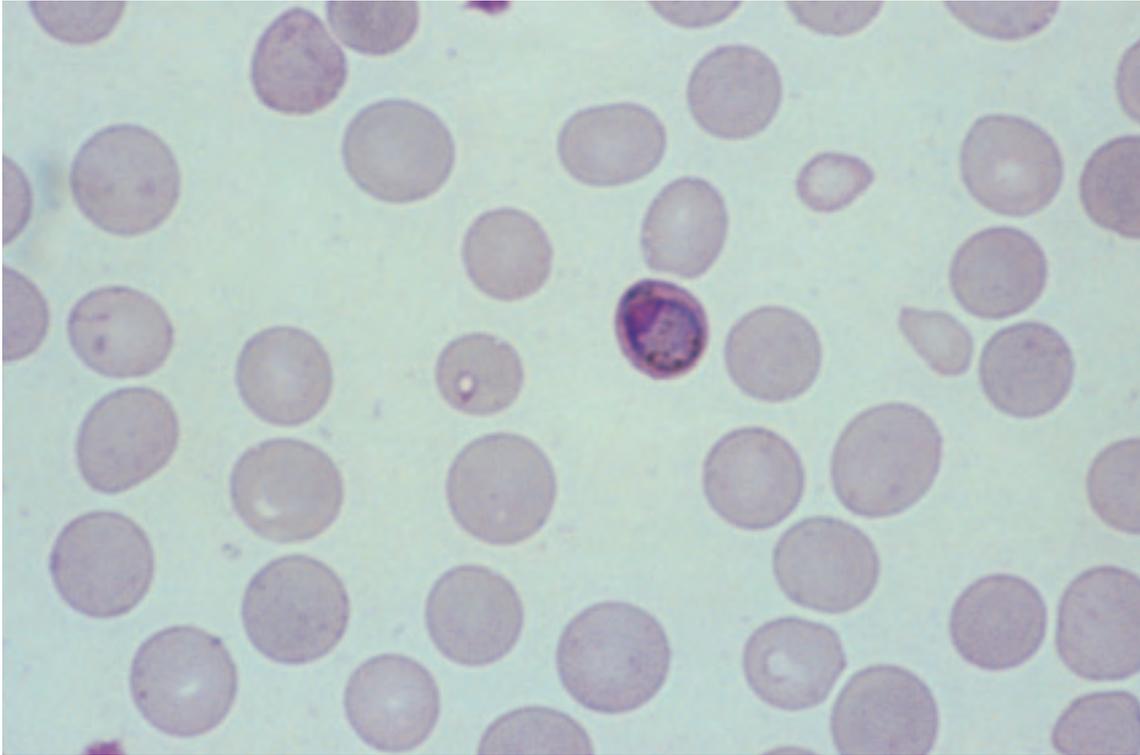


Photo n° 159 : Triple association *Plasmodium malariae*, *P. falciparum*, *P. ovale*. Frottis de la malade Randy L. ici gamétocyte typique de *P. malariae*. Coloration M.G.G. Obj. X 100.

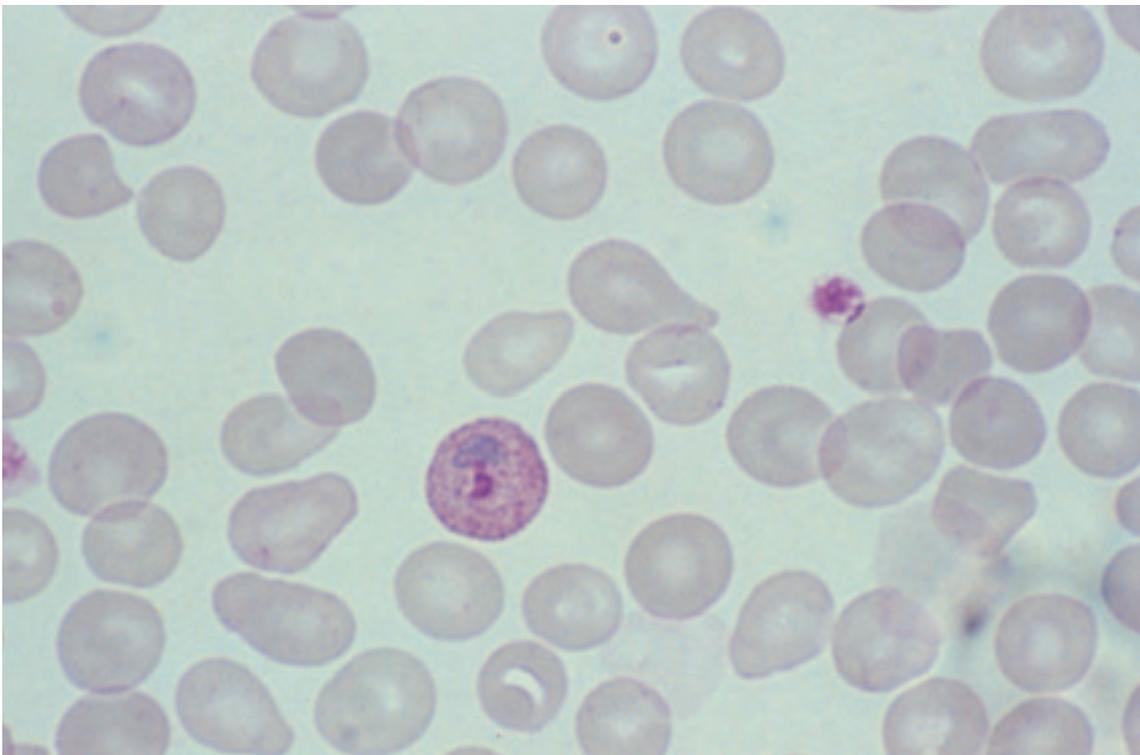


Photo n° 160 : Même frottis que la photo n° 159, ici trophozoïte âgé de *Plasmodium ovale* typique avec granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. X 100.

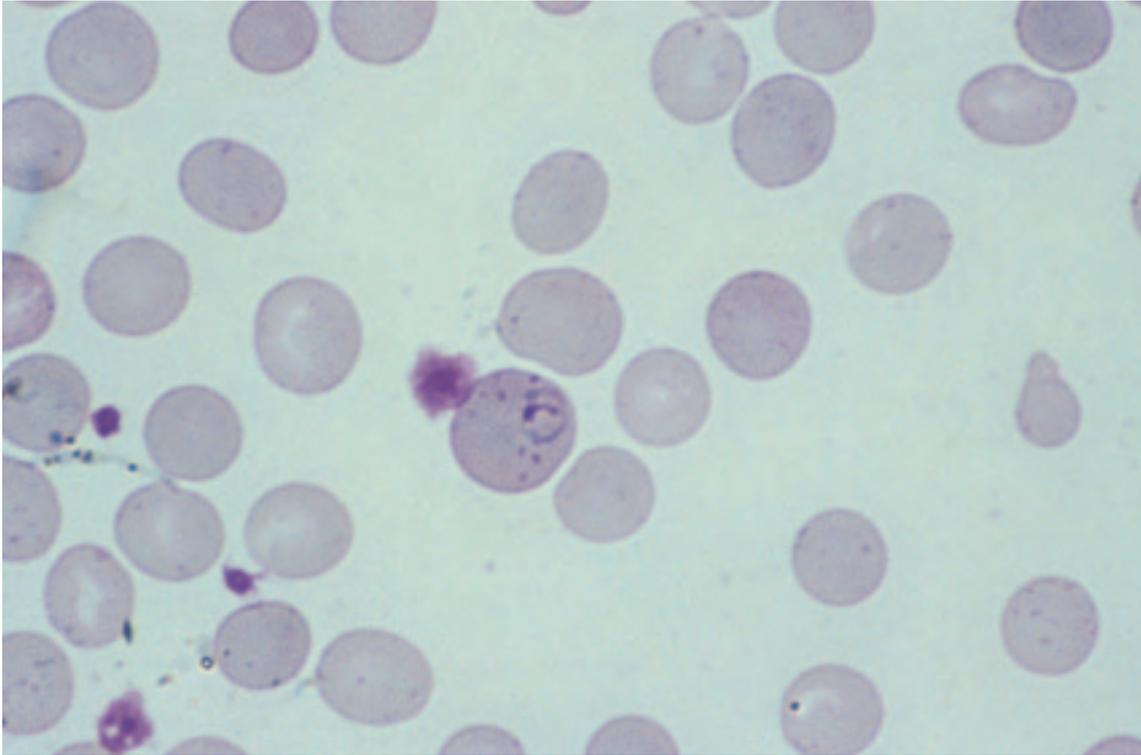


Photo n° 161 : Même frottis que les photos n° 159 et 160, ici trophozoïte âgé de *Plasmodium falciparum* avec taches de Maurer. Coloration M.G.G. Obj. X 100.

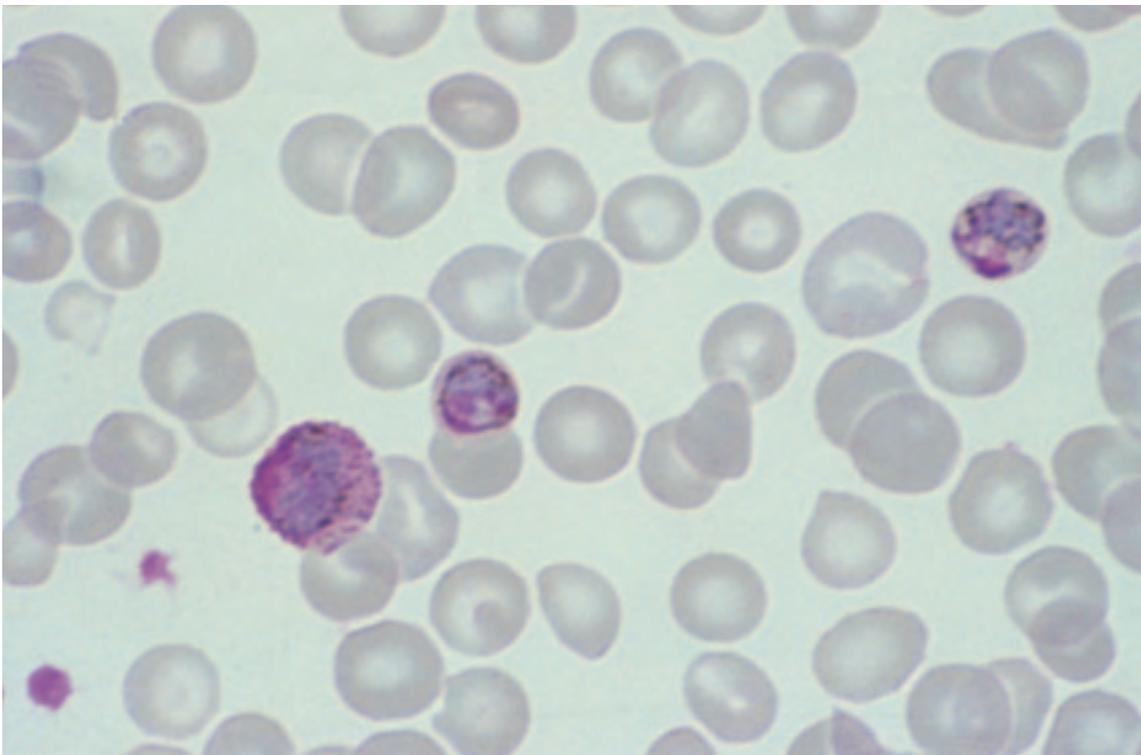


Photo n° 162 : Triple association *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium falciparum*. Frottis de la malade Rana L. Ici dans ce même champ gamétocyte et schizonte de *P. malariae* et gamétocyte de *P. ovale* avec granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. X 100.

Accès palustre

À une incubation variant de 9 à 20 jours en général, succède alors une phase d'invasion, où la fièvre a un rythme irrégulier, mais est progressivement croissante : la parasitémie va elle aussi en augmentant. Des cycles schizogoniques différents se chevauchent et l'on observe donc pour *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* différents stades : trophozoïtes jeunes ou âgés, schizontes jeunes ou âgés simultanément.

Après une dizaine de jours apparaissent alors les accès palustres typiques : fièvre tierce pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* : accès fébrile le premier jour, température normale le deuxième jour, nouvel accès fébrile le troisième jour.

Dans la fièvre quarte due à *P. malariae* la température normale dure deux jours.

L'accès palustre comprend un bref stade de frissons avec sensation de froid, où la température atteint 39 °C. Il est suivi d'un stade de chaleur, de quelques heures avec une température de 40 °C à 41 °C. Enfin un stade de sueurs, de même durée pendant lequel la température redevient normale ou en dessous.

Ces accès correspondent à la durée du cycle schizogonique qui est de quarante huit heures (72 heures pour *P. malariae*). L'accès fébrile correspond à l'éclatement des rosaces, avec présence surtout dans le sang de trophozoïtes jeunes, dont le diagnostic d'espèce est difficile (voir prélèvements page 59). Ceux-ci pendant l'intervalle entre deux accès, évoluent progressivement en trophozoïtes âgés, schizontes jeunes à 2-4 noyaux, schizontes mûrs ou corps en rosace. Les gamétocytes apparaissent en général après la période d'invasion.

Accès pernicleux (graves) voir page 77

Fièvre bilieuse hémoglobinurique = blackwater fever = malarial hemoglobinuria = vomito negro.

C'est un syndrome d'hémolyse intra-vasculaire accompagnée d'hémoglobinémie et d'hémoglobinurie survenant occasionnellement dans des cas de paludisme aigu à *P. falciparum* à répétition.

Elle a été particulièrement étudiée par Maegraith (212 et 213) et Bruce-Chwatt (7).

Épidémiologie : elle est observée en Afrique rarement en Asie. Les migrants non immunisés y sont particulièrement exposés. Sa prévalence a considérablement diminué depuis l'emploi généralisé d'une chimioprophylaxie, et l'utilisation systématique de médicaments anti-paludiques de synthèse à la place de la quinine, qui joue un rôle majeur dans l'hémolyse.

Clinique : début brutal par céphalées, nausées, vomissement bilieux, douleurs, prostration, fièvre continue à plus de 39 °C.

Les urines deviennent noires en raison de l'importance de l'hémoglobinurie. Jaunisse importante. Hépatomégalie. Décès fréquent si l'évolution se poursuit.

Diagnostic biologique : outre l'hémoglobinémie, le bilan biochimique rénal (hémoglobinurie), hépatique (hyperbilirubinémie), électrolytique et de l'anémie, il est important de rechercher un déficit en G6PD.

Par contre la parasitémie est habituellement absente ou faible. La sérologie anti Plasmodium est positive.

■ CULTURE DE *PLASMODIUM*

Sa mise au point a été réalisée par Trager 1976, 1981 (216, 218 et 219). On arrive à cultiver certains hématozoaires, surtout *P. knowlesi* du singe mais aussi *P. falciparum*, à 38 °C, en milieu complexe (tampon bicarbonate/CO₂ ; pH 7,4) contenant des hématies qui apportent ATP (adénosine triphosphate) et coenzyme A indispensables, renouvelé en permanence, sous atmosphère contenant CO₂ 3 %, O₂ 2 %, N₂ 95 %. Une multiplication importante des parasites a pu être obtenue. Cela donne la possibilité de préparation d'antigènes pour la sérologie ou pour des essais de vaccination : ce sont les mérozoïtes qui paraissent les plus immunogènes (219). L'action des amino-4-quinoléines et autres antipaludéens peut être étudiée in vitro vis-à-vis des souches sensibles ou résistantes de *P. falciparum* à l'égard de la Chloroquine (217) ou d'autres médicaments anti-palustres. En cas de souches sensibles, les parasites sont détruits pour une concentration inférieure à 1 mg/l. Les souches résistantes nécessitent une concentration au moins 10 fois plus forte. L'étude de la chimio-résistance de *P. falciparum* est l'utilisation pratique de la culture de *Plasmodium*. Cependant les applications de la culture au diagnostic biologique direct ne peuvent pas encore être envisagées.

MÉTHODE :

Milieu de culture : (214 et 218)

- Dissoudre dans 900 ml d'eau bidistillée de la poudre de RPMI 1640 pour un litre.
- Ajouter 5,94 g de N-2-Hydroxyéthylpipérazine-N'-2-ethane sulfonic acid (HEPES).
- Vérifier le pH de 6,75
- Stériliser par filtration à travers un filtre Millipore® de 0,22 microns. Répartir par 100 ml et conserver à + 4 °C.
- Pour l'emploi, ajouter à 100 ml : 4,2 ml de NaHCO₃ à 5 % stérile pour avoir un pH de 7,4. Ce milieu est dénommé RP.
- Ajouter 11 ml de sérum humain stérile compatible avec les hématies qui doivent être utilisées. On obtient ainsi le milieu RD + HS. Le sérum peut être remplacé par du plasma prélevé sur C.P.D. mais ne peut pas être remplacé par du sérum animal (215).

Hématies neuves :

Sang humain récolté sur ACD (acide citrate dextrose) ou CPD (citrate phosphate dextrose). Il est centrifugé 10 minutes à 1000 g. Le plasma et la couche leucocytaire sont éliminés. Remettre en suspension dans le milieu RP, centrifuger à nouveau. Faire deux lavages. Mettre en suspension à 50 % dans le milieu RP + HS.

Hématies infectées :

Laver de même que les hématies neuves et mettre en suspension à 50 % dans le milieu RP + HS.

Culture :

Diluer les hématies parasitées avec les hématies saines pour avoir 0,1 % à 0,5 % d'hématies parasitées. Diluer avec le milieu RP – HS pour avoir un hémocrite d'environ 10 %. Mettre la suspension dans le récipient destiné à la culture : boîtes de Pétri ou récipient spécial.

Température : 38 °C.

Atmosphère : elle doit contenir (219) 3 % de CO₂, 2 % d'O₂ et 95 % de N₂.

Renouvellement du milieu : le milieu de culture doit être lentement renouvelé au-dessus de la couche leucocytaire.

On peut pour cela utiliser une installation spéciale qui permet ce renouvellement en permanence, lentement, le milieu de culture en employant une pompe péristaltique, systèmes représentés dans la publication (219). On peut aussi utiliser des boîtes de Pétri, où l'on renouvelle le milieu de culture, tous les jours. On place les boîtes de Pétri dans

une « Jar » (214), où l'on obtient une atmosphère satisfaisante par une bougie allumée et qui s'éteint après que l'on ait fermé hermétiquement le récipient.

Récolter les hématies parasitées trois fois par semaine. On les remplace par des hématies saines pour obtenir une parasitémie de 1 %. Deux jours plus tard, elle est, à nouveau, de 10 %.

Les parasites obtenus dans ces conditions sont à tous les stades de maturation.

Pour obtenir une production synchrone, on ajoute du sorbitol qui détruit toutes les formes plus âgées que les anneaux. On renouvelle cette opération.

Les techniques précédentes sont défavorables à la formation de gamétocytes.

Pour obtenir des gamétocytes, il faut renouveler les hématies seulement une fois par semaine, ou mieux, conserver les mêmes hématies pendant trois semaines (219).

■ MODIFICATIONS BIOLOGIQUES

CYTOLOGIE SANGUINE

HÉMATIES : une ANÉMIE est fréquemment associée au paludisme. Son degré est variable mais habituellement en relation avec la gravité et/ou la chronicité de la maladie. Elle est plus marquée pour *P. falciparum*.

Les caractères de l'anémie sont variables, en relation avec son importance et aussi avec des facteurs associés : dénutrition, hémoglobinopathies... Il peut y avoir une hypochromie, des hématies nucléées, des hématies avec corps de Jolly, des hématies à ponctuations basophiles (photo n° 163)...

MÉCANISME DE L'ANÉMIE

La lyse mécanique par éclatement des hématies parasitées au stade rosace est le premier facteur mis en cause. Ce facteur est important pour *P. falciparum* qui est abondant et qui pénètre dans des hématies de tout âge. *P. vivax* préfère les réticulocytes, ce qui limite ce mode d'action étant donné que ces hématies ne représentent qu'une faible proportion du total des globules rouges. Il est presque nul pour *P. malariae* qui s'attaque aux hématies âgées et c'est une espèce dont la parasitémie est faible. L'éclatement des hématies parasitées ne suffit pas à expliquer seul l'importance de l'anémie.

– Anémie hémolytique auto-immune : est parfois observée dans le paludisme chronique. Le test de COOMBS direct est positif, souvent de type complément. Un auto-anticorps froid IgM de spécificité anti-I peut être élué de la surface des hématies. La recherche des hématozoaires est souvent négative, mais l'immunofluorescence toujours positive. Le traitement par Chloroquine peut arrêter l'hémolyse (223).

Un facteur immunologique important de l'anémie palustre est la présence d'immuns complexes, contenant du complément, sur la surface des hématies (261).

La présence de « knobs » à la surface des hématies infestées interfère avec la circulation du sang dans les capillaires.

– Hypersplénisme : joue un rôle. L'érythrophagocytose splénique est augmentée.

– L'érythropoïèse médullaire est légèrement déprimée (261).

RÉSISTANCE GLOBULAIRE : dans le paludisme à *P. vivax*, elle est augmentée (243).

PALUDISME ET ANOMALIES GÉNÉTIQUES DES GLOBULES ROUGES (237)

1) DRÉPANOCYTOSE :

Allison en 1954 (220), partant d'un travail de Beet (221), avait trouvé que le paludisme en Rhodésie du Nord était plus fréquent chez les sujets sains que chez les drépanocytaires.

Ce fait, joint à l'incidence élevée du gène drépanocytaire là où le paludisme à *P. falciparum* est endémique, les conduisirent à conclure au rôle protecteur de la sicklémie.

De nombreuses autres études comparatives ont été faites : dans leur majorité, elles ne sont pas statistiquement significatives (233).

Allison en particulier avait fait une erreur dans le calcul du chi², le trouvant à 19,349 alors qu'en fait, il n'est que de 1,64, non significatif (233).

Les hématies AS sont défavorables à la culture de *P. falciparum* (256).

Le rôle protecteur de l'hémoglobine S à l'égard de *P. falciparum* reste donc discuté (photo n° 164).

2) THALASSÉMIE :

Dans la culture « in vitro » la croissance de *P. falciparum* se fait avec un taux de multiplication réduit dans les globules rouges de thalassémie, particulièrement d'alpha thalassémie par rapport aux globules rouges normaux (246). Les différentes thalassémies sont des maladies génétiques différentes en Méditerranée, Moyen Orient, Inde et Sud Est de l'Asie. Seul l'alpha-thalassémie procure une protection, peut être parce qu'elle permet une contamination précoce des très jeunes enfants (257).

3) ELLIPTOCYTOSE HÉRÉDITAIRE = OVALOCYTOSE

Le gène elliptocytaire semble apporter une meilleure résistance vis-à-vis de l'infection palustre (229 et 236). L'anémie n'est alors pas plus sévère que chez les sujets normaux (226). La morphologie des elliptocytes parasités peut induire en erreur dans le diagnostic d'espèce plasmodiale en faisant conclure à *P. ovale* (photo n° 165).

4) DÉFICIT EN G6 PD

Les déficits en G6 PD (mâles hétérozygotes, femelles homozygotes) ont aussi été considérés comme jouant un rôle protecteur à l'égard du paludisme (222). Ce fait est également discuté (237 et 238).

5) GROUPE DUFFY : *P. vivax* OU *P. ovale*

L'antigène Fy est le récepteur de membrane avec les ligands de *P. vivax*.

P. vivax est absent de l'Afrique de l'Ouest où la population noire est presque à 100 % Fy (-) Fy (-). Par contre *P. ovale* y est fréquent. Les cas de *P. vivax* qui y ont été diagnostiqués sont sujet à caution, surtout si le groupe Duffy n'a pas été étudié dans ces cas.

Il est connu depuis longtemps (224) que la population noire de l'Afrique de l'Ouest est réfractaire à *P. vivax*.

Miller L. et Coll. ont montrés en 1973-1975 que les hématies Duffy négatives sont résistantes à l'infection par *P. knowlesi*, plasmodium de singe qui infecte les hématies Duffy positives (240 et 241). Le fait que le groupe Duffy soit le facteur de résistance à *P. vivax* fut confirmé par l'infestation expérimentale au moyen de *P. vivax* : cinq noirs Duffy négatifs résistèrent et six blancs Duffy positifs furent infestés (242).

La population de 2 villages de Gambie soit 1 170 personnes fut étudiée, un tiers était parasité par *P. falciparum*, *P. malariae* ou *P. ovale* les groupes sanguins Fy a et Fy b étaient négatifs à 100 % : il n'y avait aucun cas de paludisme à *P. vivax* (258). Par contre en Éthiopie la population Hamito-Semite est sensible à *P. vivax* (239). Le fait que la résistance innée à *P. vivax* était bien due à l'absence des déterminants Fy a ou Fy b fut démontrée par l'infestation expérimentale de volontaires humains blancs ou noirs (242).

La substance Fy a est une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 46.000 avec la substance Fy b elle est le récepteur indispensable des globules rouges pour *P. vivax*.

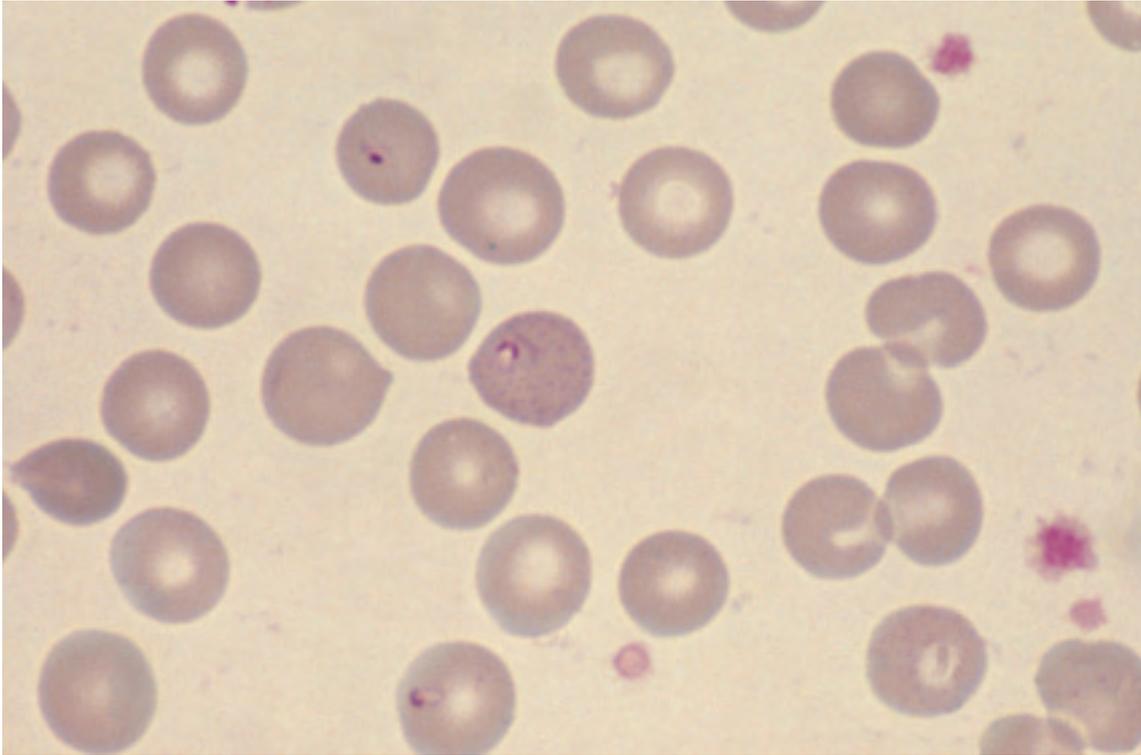


Photo n° 163 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Hématie, avec petites ponctuations basophiles, contenant un trophozoïte jeune chez un malade ayant une anémie régénérative et une anisocytose. Cet aspect isolé ne doit pas être confondu avec des granulations de Schüffner. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

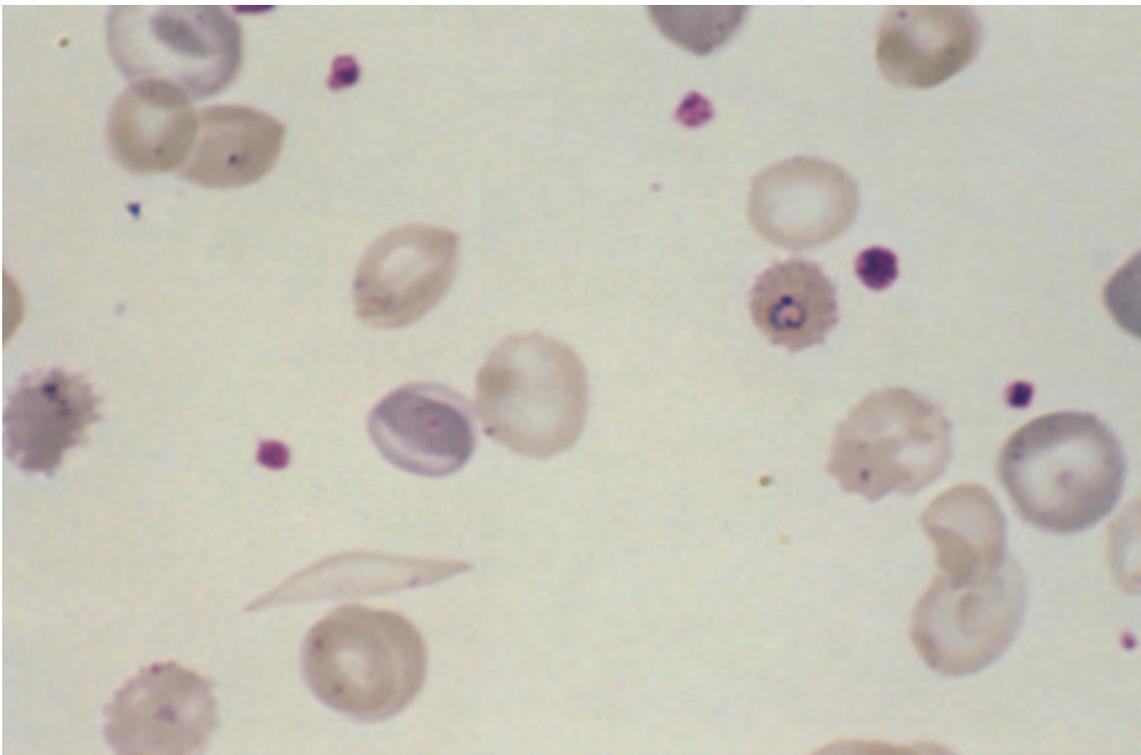


Photo n° 164 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Trophozoïte dans un microcyte chez un malade atteint de drépanocytose. Anisocytose importante. Présence de corps de Jolly et d'un drépanocyte. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

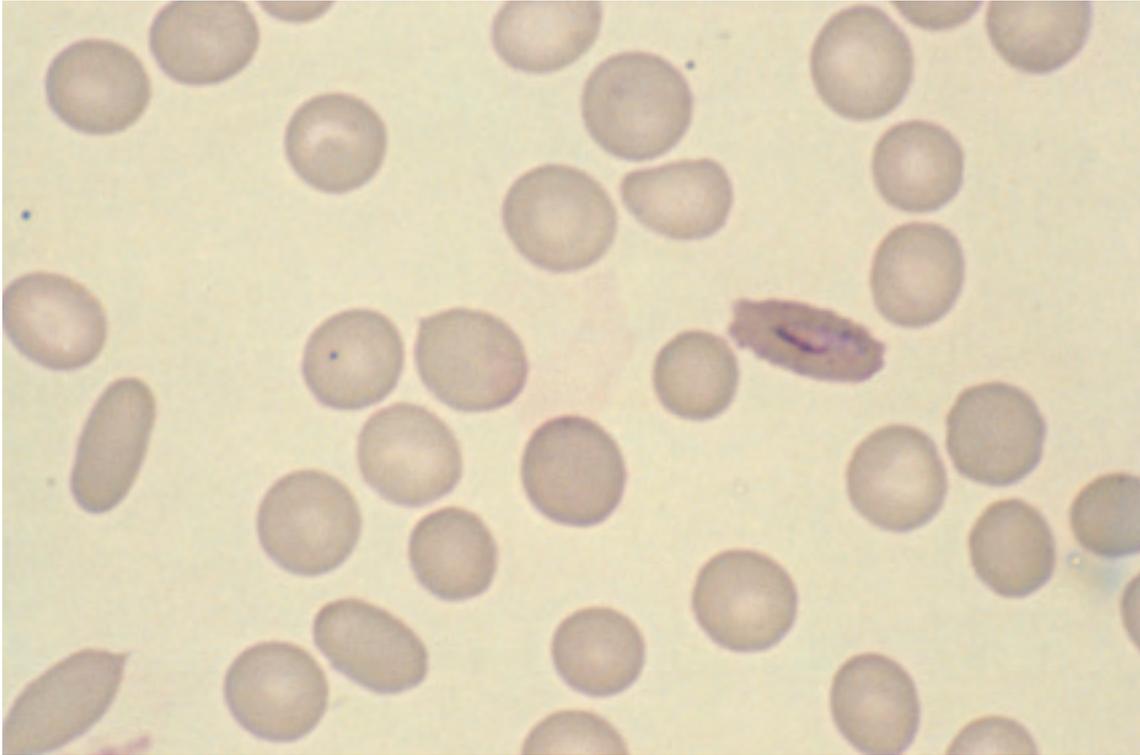


Photo n° 165 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Trophozoïte âgé dans une hématie ovalisée chez un malade atteint d'elliptocytose. Ne pas confondre avec une hématie ovale de *Plasmodium ovale*. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

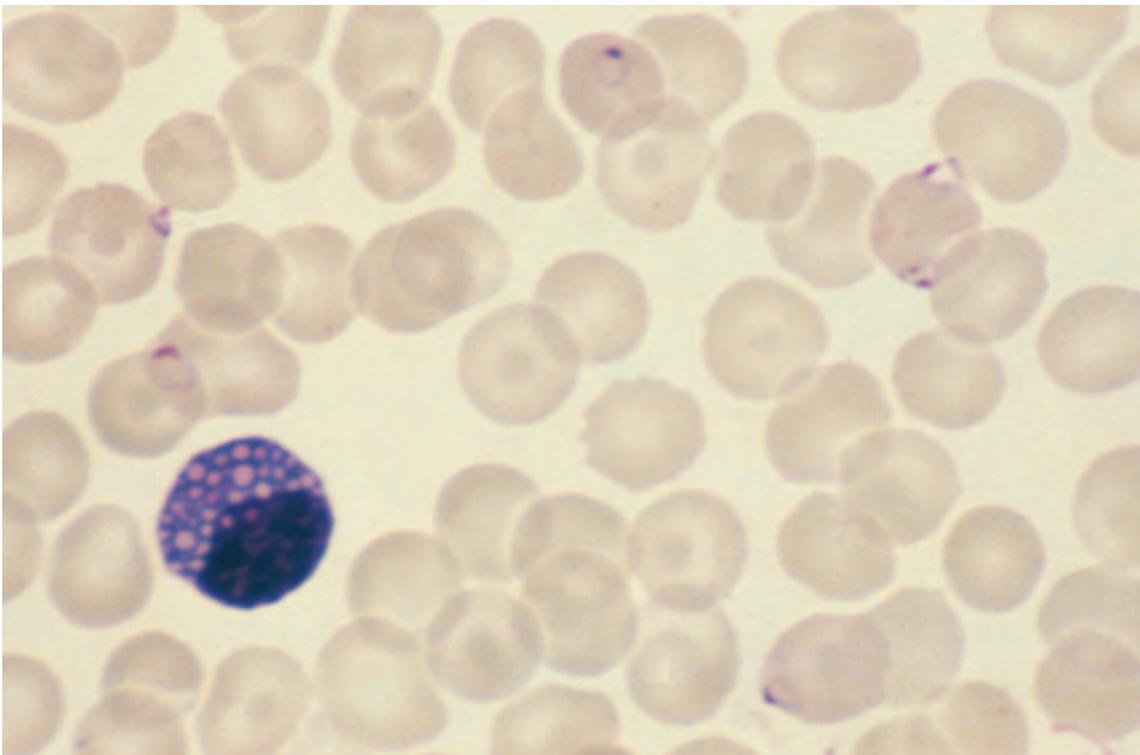


Photo n° 166 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Cinq hématies parasitées par des trophozoïtes. Présence d'un plasmocyte vacuolisé. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

LEUCOCYTES

Les modifications de la numération et de la formule leucocytaire sont assez variables dans le paludisme. Le plus souvent existe une légère polynucléose neutrophile pendant la phase d'invasion et une leucopénie avec neutropénie à la phase des accès palustres. À cette phase on observe fréquemment dans le sang périphérique des cellules mononucléées hyperbasobiles, des lymphocytes plasmocytaires, parfois des plasmocytes (photo n° 166), rarement des cellules de Mött.

Chez l'enfant existe une polynucléose neutrophile particulièrement marquée.

Les polynucléaires éosinophiles sont très diminués dans les poussées fébriles aiguës. Leur chiffre redevient normal au cours du traitement (227 et 234).

LEUCOCYTES MÉLANIFÈRES ET PHAGOCYTOSE

Les leucocytes mélanifères sont des leucocytes qui ont ingéré (macrophagie) des plasmodium et qui présentent dans leur cytoplasme, des produits cristallins non digérés, sous forme d'un ou plusieurs amas de pigment malarique = hémozoïne.

Ces leucocytes mélanifères sont d'abord des polynucléaires neutrophiles (photo n° 167), lorsqu'il existe une polynucléose neutrophile au début de l'infestation paludique. Les jeunes polynucléaires neutrophiles, métamyélocytes, sont les plus mélanifères.

À un stade plus avancé, ce sont surtout les monocytes qui sont mélanifères (photo n° 168). Chez eux, le pigment d'abord en gros amas, est semblable au pigment contenu dans les plasmodium eux-mêmes. On voit quelquefois le Plasmodium entier, surtout sous la forme d'une rosace, en particulier dans les formes graves à *P. falciparum*. Il est ensuite désintégré lentement.

La richesse du sang périphérique en polynucléaires neutrophiles et monocytes contenant du pigment est un élément de pronostic défavorable (244). La cytoconcentration (249) permet une numération des polynucléaires et monocytes mélanifères (photos n° 169 et 170). Les lymphocytes, plasmocytes, polynucléaires éosinophiles exceptionnellement, peuvent être aussi mélanifères (225).

Les premières descriptions de phagocytose de trophozoïtes ou schizontes en particulier rosaces de *Plasmodium falciparum* par des polynucléaires neutrophiles dans le sang périphérique ont été faites par Deane en 1938 (228), puis à la fois par des polynucléaires neutrophiles et des monocytes par Field et Shute en 1958 (21). Depuis plusieurs autres publications les ont également signalées. Les photos n° 172 à 176 montrent des aspects de phagocytose que nous avons observés. *P. vivax* a été signalé dans des plaquettes humaines (230 et 231).

En l'absence de plasmodium dans le sang, à la suite d'un traitement antipaludéen pris récemment par exemple, la présence de leucocytes mélanifères permet de faire un diagnostic rétrospectif de paludisme (à condition bien entendu que le pigment soit bien du pigment palustre et non n'importe quel élément de poussière par exemple).

Les leucocytes mélanifères persistent dans le sang pendant une semaine après le traitement (21), ce qui permet parfois de confirmer un diagnostic rétrospectif tardif.

THROMBOCYTES

Les plaquettes sont de plus grande taille chez les malades présentant un accès à *P. falciparum* ou *P. vivax*, elles peuvent atteindre 7,2 µm de diamètre (230 et 231).

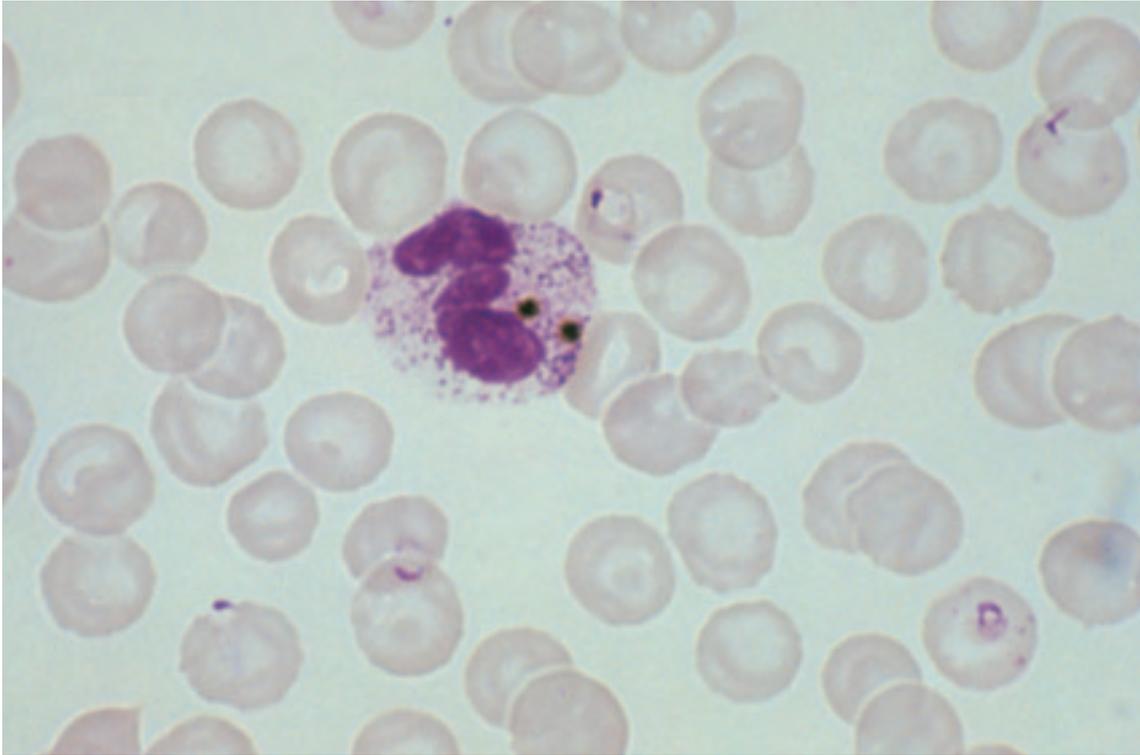


Photo n° 167 : Plasmodium falciparum. Frottis. Accès simple. Polynucléaire mélanifère avec deux amas de pigment. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

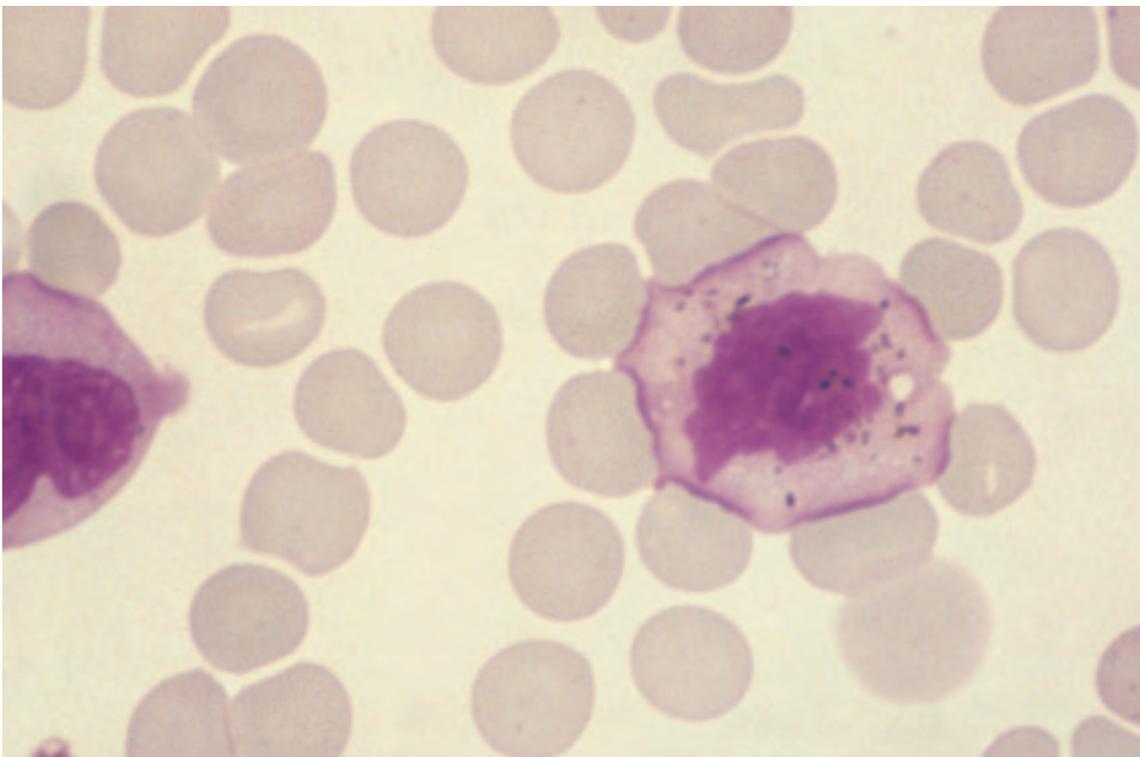


Photo n° 168 : Plasmodium falciparum. Frottis. Accès simple. Monocyte mélanifère avec pigment dispersé. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

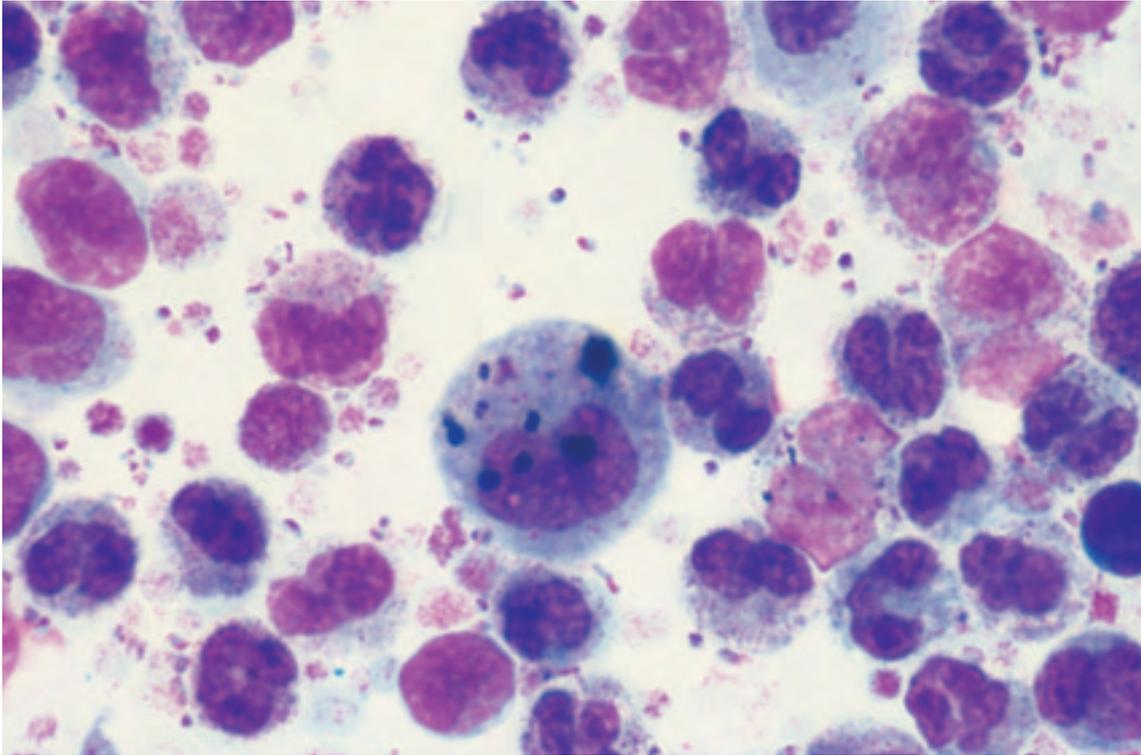


Photo n° 169 : Plasmodium falciparum. Cytoconcentration. Accès simple. Monocyte mélanifère au milieu de nombreux trophozoïtes jeunes. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

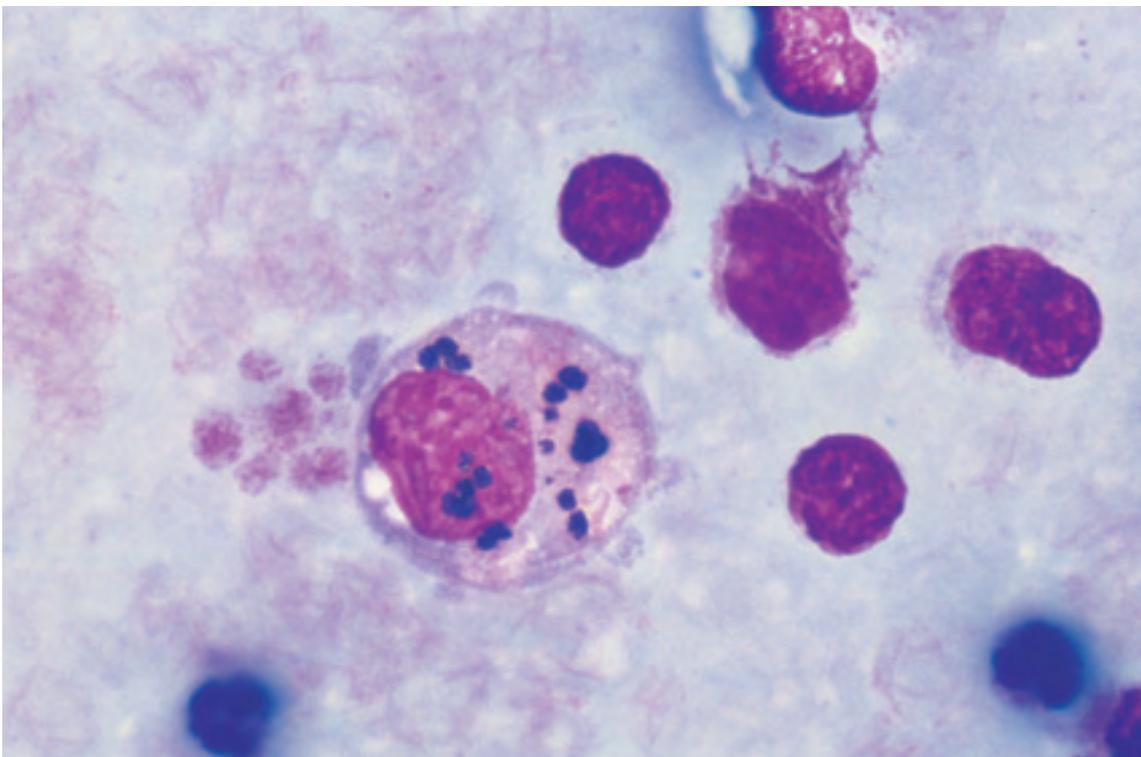


Photo n° 170 : Plasmodium falciparum. Cytoconcentration. Accès simple. Monocyte mélanifère sans éléments parasitaires. Recherche effectuée 5 jours après le traitement.

*NB : la cytoconcentration permet une très bonne recherche et numération des leucocytes mélanifères.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

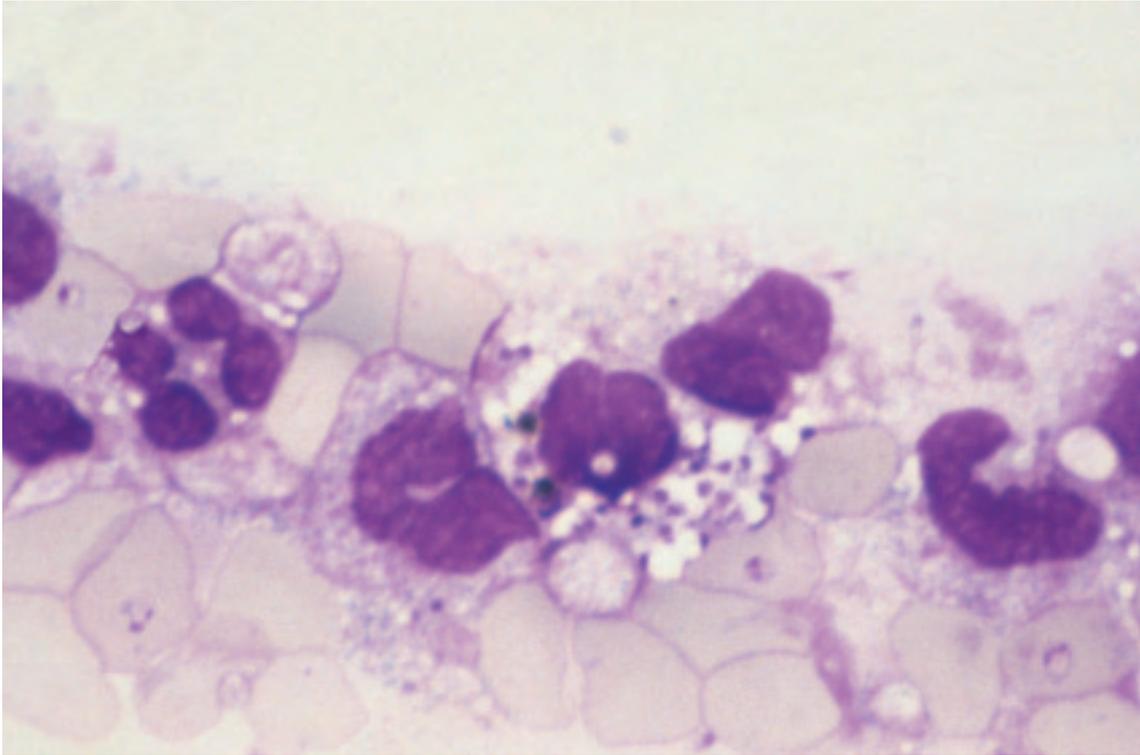


Photo n° 171 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Monocyte ayant phagocyté au moins une rosace dont les mérozoïtes sont en partie digérés. Présence de deux amas de pigment. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

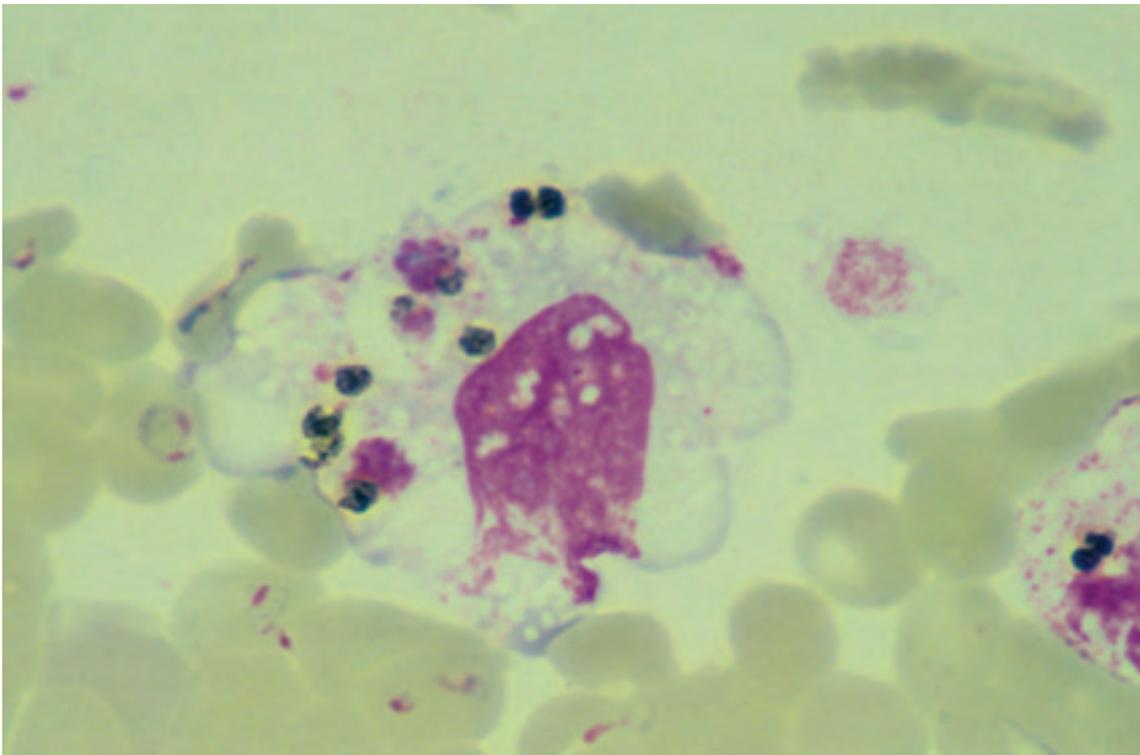


Photo n° 172 : *Plasmodium falciparum*. Frottis. Monocyte géant ayant phagocyté de nombreux parasites dont l'état de digestion ne permet pas de diagnostic précis. Nombreux amas de pigment. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

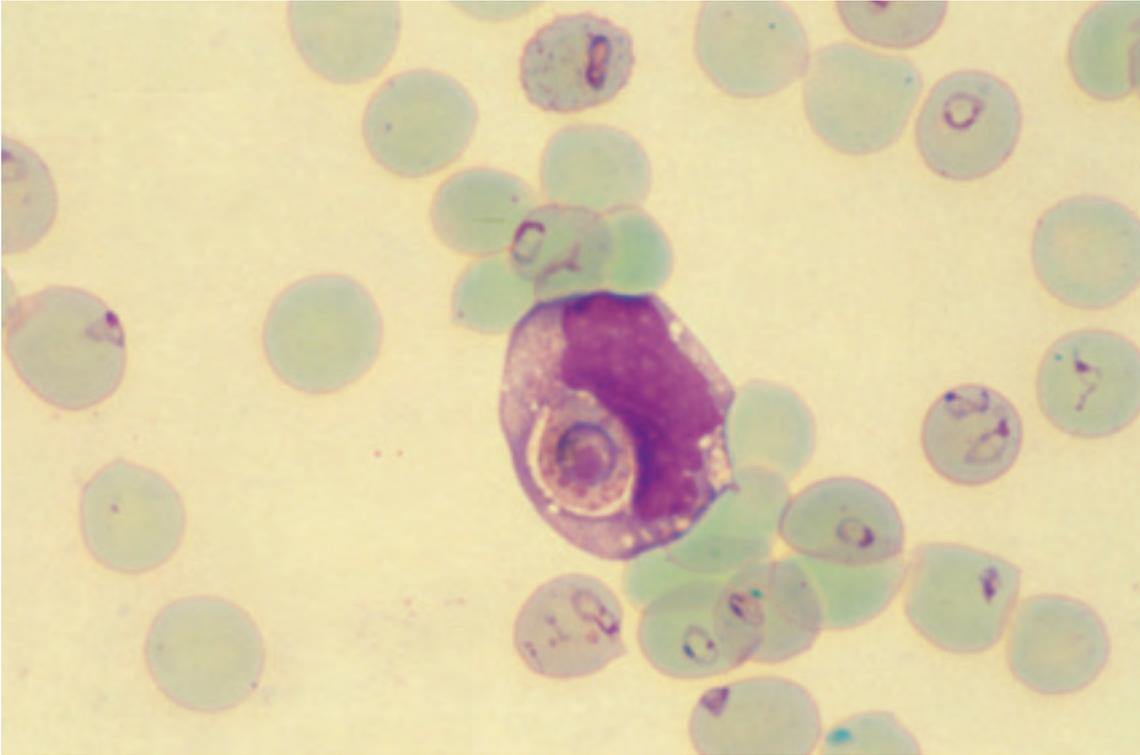


Photo n° 173 : Plasmodium falciparum. Frottis. Accès pernicieux. Présence dans une vacuole phagocytaire d'un monocyte, d'une hématie parasitée par un élément ayant un cytoplasme bleu (trophozoïte âgé ?). Coloration M.G.G. Obj. × 100.

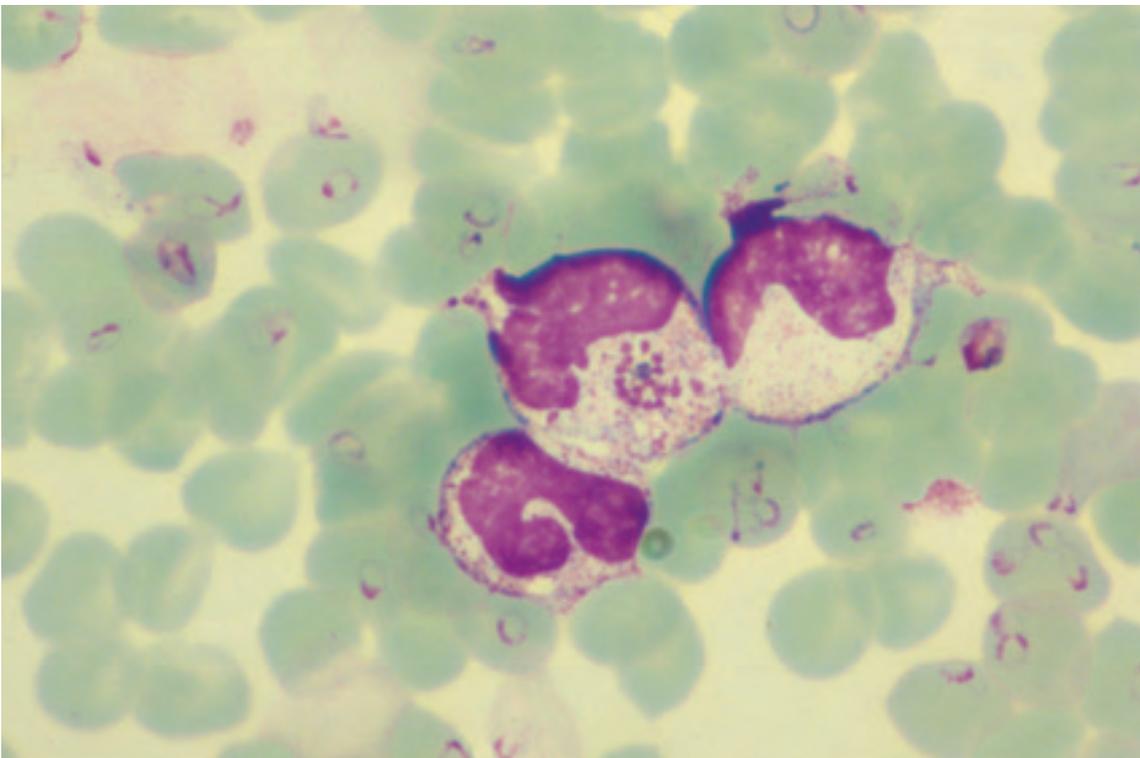


Photo n° 174 : Plasmodium falciparum. Frottis. Accès pernicieux. Monocyte ayant phagocyté une rosace. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

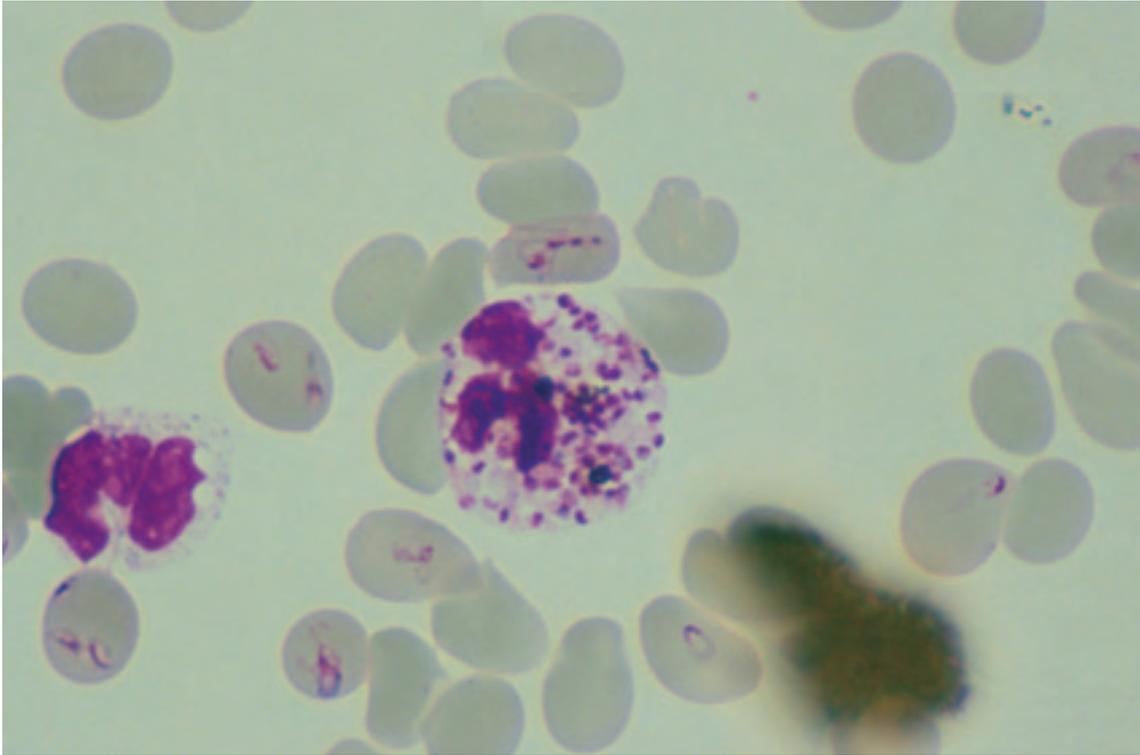


Photo n° 175 : Plasmodium falciparum. Frottis. Accès pernicieux. Polynucléaire ayant phagocyté deux rosaces dont les mérozoïtes sont dispersés dans le cytoplasme. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

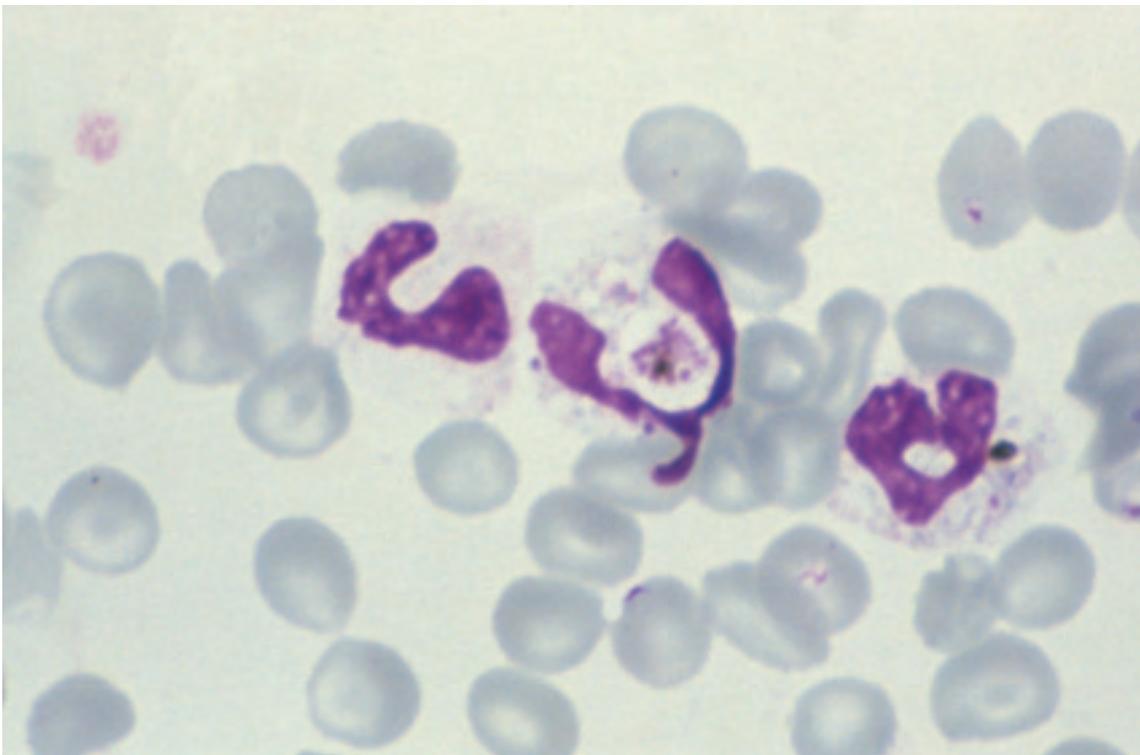


Photo n° 176 : Plasmodium falciparum. Frottis. Accès simple. Au centre un polynucléaire à 2 lobes ayant phagocyté un schizonte partiellement digéré, avec un amas de pigment central. À droite un polynucléaire à 2 lobes avec un amas de pigment. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

Une thrombopénie inférieure à 100 000 par μl est fréquente dans les formes graves de paludisme.

Cette thrombopénie peut faire alors partie d'un tableau de coagulation intra-vasculaire disséminée (C.I.V.D.) et s'associe aux autres troubles de la coagulation : hypofibrinémie, hypoaccélérimie, présence de produits de dégradation du fibrinogène (P.D.F.) (251 et 255).

Cette thrombopénie s'observe fréquemment aussi dans les formes sévères sans C.I.V.D. (247).

Lors des numérations globulaires, la lyse des hématies par la saponine ou autre agent hémolytique, libère les plasmodiums qui peuvent être comptés comme des plaquettes en particulier par certains automates. Ainsi une parasitémie élevée donne alors un chiffre erroné par excès (300 000 plaquettes au lieu de 50 000 par μl par exemple). Il faut donc toujours vérifier le nombre des plaquettes sur le frottis coloré.

AUTOMATES DE FORMULES LEUCOCYTAIRES ET DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DU PALUDISME

Aucun ne décèle actuellement les plasmodiums. Certains peuvent même après lyse des hématies prendre les trophozoïtes libérés pour des plaquettes et les inclure dans cette numération comme nous venons de le voir.

Dans les cas cliniques de paludisme les modifications cytologiques sont en général nombreuses : anémie, leucocytose ou leucopénie, thrombopénie, polynucléose neutrophile, monocytose etc. Ces modifications constituent des alarmes conduisant obligatoirement à faire un frottis sanguin et à l'étudier au microscope. Dans de rares cas, peu évolutifs sur le plan clinique, ces alarmes peuvent faire défaut et le diagnostic qui pourrait être fait au microscope par une laborantine expérimentée n'est alors pas porté.

BIOCHIMIE

Dans les formes graves, on note (235) :

- élévation modérée du taux de bilirubine libre,
- abaissement marqué du taux de cholestérol.

MODIFICATIONS DES PROTÉINES

Outre l'hypergammaglobulinémie correspondant à l'augmentation des IgM et IgG (voir pages 180 et 181), on note une diminution du complément.

C4 est également diminué. L'importance de la diminution est en relation avec la parasitémie. Les taux redeviennent normaux en une semaine après le début du traitement (255 et 260).

Le complément est abaissé dans les accès graves ou pernicieux. C3 est en moyenne de $0,41 \pm 0,25$ g/l pour une valeur normale de $0,73 \pm 0,11$ g/l.

C4 : $0,16 \pm 0,13$ pour une normale de $0,46 \pm 0,12$ (232).

Des immuns complexes sont habituellement retrouvés et sont sans doute à l'origine de la baisse du complément (232).

L'IgE totale a été trouvée augmentée dans le paludisme à *P. vivax* par rapport à une population témoin en Corée du Sud : 587 U.I. contre 197 U.I. (234).

HYPOGLYCÉMIE

Une hypoglycémie inférieure à 2,8 mmol/l (= 0,5 g/l) a été observée dans 10 à 15 % des cas d'accès pernicioseux traités par la quinine en Thaïlande (259), au Zaïre (245) et à Madagascar (252 et 253). Cette hypoglycémie s'accompagne d'une hyperinsulinémie (259). Il s'agit de patients « modérément mal nourris » (245) ce qui peut jouer un rôle favorisant. Cette hypoglycémie survient 2 à 4 heures après le début du traitement par la quinine (245). La quinine en I.V. provoque une augmentation de 9 à 17 mU/l de l'insuline chez les sujets normaux (259). Il convient donc de surveiller la glycémie lors du traitement I.V. des accès pernicioseux et de traiter une éventuelle hypoglycémie, particulièrement chez les enfants (245).

L'HYPOCALCÉMIE (248)

La calcémie totale moyenne de 68 paludéens a été trouvée à 2,17 mmol/l, significativement différente de la moyenne 2,38 de 34 témoins normaux. Une hypocalcémie totale inférieure à 1,95 mmol/l (= 80 mg/l) a été constatée dans 16 % des cas de paludisme. Cette hypocalcémie est plus marquée dans les formes sévères avec parasitémie très élevée.

Elle est en grande partie liée à l'hypoalbuminémie très fréquente dans le paludisme, trouvée à 37,2 g/l contre 43,9 g/l pour les témoins normaux.

Le calcium ionisé est également significativement abaissé à 1,19 mmol/l pour 1,24 chez les témoins normaux, quatre malades avec parasitémie supérieure à 6 % avaient un calcium ionisé inférieur à 1,15 mmol/l, le plus bas étant à 0,84 mmol/l.

CRYOGLOBULINES

Elles sont pratiquement toujours présentes dans les formes graves. Leur taux varie de 0,01 à 0,40 g/litre.

L'haptoglobine est également diminuée (254).

C.R.P. (Protéine C réactive) est présente dans 100 % des cas des formes aiguës de *P. falciparum* (250).

PARAMÈTRES RENAUX ils sont souvent modifiés dans les formes graves de paludisme à *P. falciparum*. Une atteinte rénale chronique est parfois observée dans le paludisme à *P. malariae*.

DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE

Réactions non spécifiques

Les anciennes réactions comme celles de Chorine-Le-Bourdellès, formol-leuco-gélification, réaction de Henry sont maintenant abandonnées. Elles mettaient en évidence le déséquilibre gamma-globulines-albumine, mieux précisé maintenant par le dosage des immunoglobulines (277).

Immunoglobulines

Dans les infections par piqûres de moustiques, l'IgM croît 4 à 7 jours après l'apparition de la parasitémie. En cas de rechute, le maximum est aussi élevé que lors de l'infestation primitive, il est atteint beaucoup plus rapidement.

Le taux d'IgG augmente peu de temps après les IgM. Le maximum est en moyenne de 16 g/l pour une normale de 11,5 g/l. L'augmentation persiste bien au-delà du 40^e jour. Une faible part, moins de 1 %, des IgG ont une spécificité anti-plasmodium.

Réactions spécifiques

La principale difficulté est l'obtention d'antigènes en quantité importante. Un antigène majeur, l'antigène S, est thermolabile, mais variable selon l'origine géographique des souches. Il permet un sérotypage par Ouchterlony (279).

Méthodes

La plus utilisée est l'immunofluorescence qui nécessite peu d'antigènes (263, 267 et 270).

Les réactions immunoenzymatiques dont les résultats sont au moins équivalents et pour lesquels il ne faut pas d'équipements microscopiques sont possibles.

Les réactions d'hémagglutination indirecte utilisant diverses espèces de *Plasmodium*, surtout de singe, sont également utilisées.

En **immunofluorescence sur lame**, sont utilisés soit des plasmodiums animaux tels que *P. cynomolgi bastianelli* de singe *Macacus*, ou des frottis humains conservés congelés à -70°C de *P. falciparum* surtout. Le seuil de spécificité est, en général, de 1/20^e. Les réactions croisées entre espèces de *Plasmodium* sont importantes, par exemple avec 93 sérums de paludisme à *P. falciparum* elles étaient positives à 97,5 % avec l'antigène *P. falciparum*, 45 % avec l'antigène *P. vivax* et 33 % avec l'antigène *P. malariae* (268 et 278).

Résultats

La réaction se positive quelques jours après l'apparition de la parasitémie, 4 à 7 jours pour *P. vivax* (262) mais reste positive longtemps après sa disparition. Les sujets vivants en zone d'endémie soumis à des infections répétées ont en permanence des taux élevés pouvant persister à des titres faibles jusqu'à 10 ans après l'arrêt du stimulus. Il n'y a donc, en règle générale, aucun parallélisme entre la positivité de l'immunofluorescence et les manifestations cliniques. La valeur diagnostique dans ces conditions est très faible. L'intérêt est principalement épidémiologique à la fois dans les régions de faible endémicité permettant de préciser le

pourcentage de la population atteinte, ainsi que dans les pays en voie d'éradication, permettant sa surveillance.

En France, ces réactions sont pratiquées dans 80 laboratoires de biologie médicale et 20 laboratoires d'établissement de transfusion sanguine, qui utilisent (sauf de rares exceptions) l'immunofluorescence indirecte sur frottis de *P. falciparum*. Les délais de transmission et d'exécution de ce test pour une affection dont le diagnostic est urgent suffiraient à leur faire préférer la recherche du parasite.

Ces réactions n'ont d'intérêt pratique que dans quelques cas particuliers, par exemple :

- confirmation rétrospective d'un paludisme traité sans recherche de *Plasmodium*.
- recherche d'un paludisme ancien (devant une grosse rate par exemple ou une suspicion de rechute). Rappelons que la « splénomégalie tropicale idiopathique » ou maladie de Charmot d'origine palustre, est prouvée par la présence d'anticorps anti-hématozoaires en quantité élevée (voir ci-dessous).

Dans le paludisme congénital, on observe une réaction d'immunofluorescence à IgM positive comme dans tous les paludismes au début.

Prévention du paludisme transfusionnel : à l'heure actuelle, l'élimination du don du sang de tous les donneurs potentiels, ayant séjourné en pays d'endémie palustre, en raison des voyages exotiques fréquents, fait perdre de nombreux flacons de sang.

Par contre, un interrogatoire précis sur les régions géographiques fréquentées et la date des séjours, permettent de dépister 4 % de sujets suspects. On trouve parmi eux 11 % de réactions positives à un taux égal ou supérieur à 1/10^e, soit 5,5 % seulement des donneurs éliminés en région parisienne.

LE PALUDISME HYPERIMMUN

Charmot (264 et 265) a isolé le syndrome splénomégalie avec macroglobulinémie, rebaptisé par les auteurs anglo-saxons : « Tropical Splenomegaly Syndrome = T.S.S. ».

Ce syndrome est principalement caractérisé chez des malades vivant en zone d'endémie paludéenne par :

- sur le plan clinique : une splénomégalie, l'absence d'accès palustres aigus, la chronicité,
- sur le plan biologique :
 - la parasitémie absente ou faible de n'importe quelle espèce plasmodiale, surtout de *P. falciparum*. La cytoconcentration (273) peut permettre de trouver de rares trophozoïtes
 - l'augmentation très importante des immunoglobulines : soit des IgM (splénomégalie tropicale de Charmot), soit des IgG, soit des IgG et IgM.
 - un taux très élevé d'anticorps anti-*Plasmodium*.
 - des réactions sérologiques croisées avec d'autres protozooses, leishmaniose mais surtout trypanosomiase à *T. brucei* et toxoplasmose. Il convient de se méfier de ces fausses réactions dans le diagnostic sérologique des affections correspondantes (272).
 - présence possible de cryoglobulines ou de facteur rhumatoïde,
 - un rapport T. auxiliaire/T. suppresseur normal ou modérément augmenté alors qu'il est souvent diminué dans les accès palustres habituels.
- sur le plan étio-pathogénique : un terrain génétique particulier de l'hôte est probable.

IMMUNITÉ

Le nouveau né perd en quelques mois les anticorps IgG anti-paludéens que lui a transmis sa mère. Il est alors très sensible à l'infection plasmodique et c'est à ce moment de la vie que le maximum de mortalité a lieu. Une immunité relative apparaît progressivement un an ou deux après la naissance, elle est fonction du rythme de contaminations successives par les anophèles infectées. L'immunité relative établie, protège le malade contre une forme grave de paludisme, mais permet quand même à de rares *Plasmodium* de se reproduire lentement. Cette immunité relative a reçu le nom de prémunition. Quand un paludéen quitte le pays d'endémie, il perd sa prémunition en quelques années et redevient très sensible à l'infestation palustre et aux formes graves.

L'infestation par *P. falciparum* d'adultes non immunisés est fulgurante, notamment pour les voyageurs européens allant en Afrique tropicale. Cette primo-infestation est fréquemment à l'origine d'accès pernicieux, si aucune chimioprophylaxie n'a été faite.

PALUDISME ET SIDA

Paludisme et SIDA coexistent dans de nombreux pays tropicaux, en particulier en Afrique, différentes études ont été réalisées à ce sujet.

Il n'a pas été observé de fréquence accrue ou de gravité augmentée du paludisme en cas d'infection à V.I.H.1 ni d'accélération de l'évolution chez 271 enfants (271).

Le paludisme n'a pas aggravé l'évolution du SIDA (266 et 271) chez 170 adolescents et adultes atteints par un paludisme à *Plasmodium falciparum*. Les 28 séropositifs n'avaient pas une parasitémie supérieure à ceux séronégatifs (275).

Néanmoins d'autres études ont montré que la parasitémie à *P. falciparum* était plus élevée chez la femme enceinte séropositive V.I.H.1 au début de la grossesse et à la délivrance et que les nouveaux-nés de mères séropositives avaient des taux de parasitémie dans le sang du cordon plus élevés que ceux nés de mères séronégatives (276). À Entebbe les cas de paludisme observés chez les malades H.I.V. positifs étaient de 45 pour mille adultes quand les CD4 étaient $> 500/\mu\text{l}$ et 115 pour mille quand ils étaient $< 200/\mu\text{l}$ (269).

En conclusion le SIDA serait bien un facteur modérément aggravant pour le paludisme : la malnutrition, l'effondrement des défenses immunitaires et la dénutrition de la phase finale joueraient peut être un rôle.

Bibliographie

Introduction et diagnostic biologique

71. GRASSI G.B., FELETTI R. Parassiti malaria negli uccelli. *Archi. Ital. Biol.*, 1890, **13**, 297-300.
72. LANAR D.E., MCLAUGHLIN G.L., WIRTH D.F., BARKER R.J., ZOLG J.W., CHOLAY J.D. Comparison of thick films, in vitro culture and DNA hybridization probes for detecting *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1989, **40**, 3-6.
73. LAVERAN A. Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme. Description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre. Baillière, Paris, 1881, 58.
74. STEPHENS J.W. A new malaria parasite of man. *Ann. Trop. Med. Par.*, 1922, **16**, 383-386.

Épidémiologie

75. BABINET J., GAY F., BUSTOS D., DUBARRY M., JAULMES D., NGUYEN L., GENTILINI M. Transmission of *Plasmodium falciparum* by heart transplant. *B.M.J.*, 1991, **303**, 1515-1516.
76. BARRETT E. et al. *M.M.W.R.*, 1978, **27**, 81-89.
77. BASTIN R., CHARMOT G., BRUMPT I., SANSONETTI PH., SOLAL-CELIGNY PH. Transmission par la seringue de paludisme à *Plasmodium falciparum* chez un héroïnomane. *Nouv. Pres. Méd.*, 1979, **8**, 699-700.
78. BENDING M.R., MAURICE P.D.L. Malaria: a laboratory risk. *Postgrad. Med. J.*, 1980, **56**, 344-345.
79. BIGGAM A.G. Malignant malaria associated with the administration of heroin intravenously. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1929, **23**, 147-153.
80. BOURÉE P., FOUQUET E. Paludisme par inoculation accidentelle. À propos d'un cas. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1978, **71**, 297-301.
81. BOURÉE P. Paludisme congénital à *Plasmodium falciparum*. À propos d'un cas, à Paris. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1983, **76**, 43-48.
82. BOUTEILLE B., DARDÉ M.L., WEINBRECK P., VOULTOURY J.C., GOBEAUX R., PESTRE-ALEXANDRE M. Accès pernicieux à *Plasmodium falciparum* après piqûre accidentelle. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 1990, **8**, 69-72.
83. BROUSSE G. et al. *Gaz. Méd. France*, 1977, **84**, 2685-2708.
84. BROWN J.D., NGUYEN QUOC KHOA. Fatal *falciparum* malaria among narcotic injectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1975, **24**, 729-733.
85. BRUCE-CHWATT L.J. Imported malaria – A growing world problem. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1970, **64**, 201-209.
86. BRUCE-CHWATT L.J. Blood transfusion and tropical disease. *Trop. Dis. Bull.*, 1972, **69**, 825-862.
87. BRUMPT L.C. Paludisme autochtone ou paludisme accidentel. Contribution à la « pathologie par la seringue ». *Bull. Mém. Sté. Méd. Hôp. Paris*, 1949, **9-10**, 1-6.
88. BRUMPT L.C., PETITHORY J.C., GIACOMINI T. Actualités du paludisme en France. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1978, **162**, 395-400.
89. BURNE J.C., DRAPER C.C. Accidental self-inoculation with malaria. *Lancet*, 1970, **2**, 936.

90. CASTELLI F., CALIGARIS S., MATTEELLI A., DHIODERA A., CAROSI G., FAUSTI G. Baggage malaria in Italy: cryptic malaria explained? *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, **87**, 394.
91. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Congenital malaria in children of refugees in Washington, Massachusetts, Kentucky. *M.M.W.R.*, 1981, **30**, 53-56.
92. CHARMOT G. Rappel parasitologique. *Rev. Prat.*, 1977, **27**, 2343-2346.
93. CONLON C.P., BERENDT A.R., DAWSON K., PERO T.E.A. Runway malaria. *Lancet*, 1990, **335**, 472-473.
94. CONNOR M.P., GREEN A.D. Runway malaria in a British serviceman. *J. Roy. Soc. Med.*, 1995, **88**, 415-416.
95. CRUZ I., MODY V., CALLENDER C., HOSTEN A. Malaria infection in transplant recipient. *J. Natl. Med. Ass.*, 1978, **70**, 105-107.
96. DELMONT J., BROUQUI P., POUILLIN P., BOURGEADE A. Harbour-acquired *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*, 1994, **344**, 330-331.
97. DIALLO S., VICTORIUS A., N'DIR O., DIOUF F., BAH I.b. Prévalence et évolution du paludisme congénital en zone urbaine : Cas de la ville de Thiès (Sénégal). *Dakar Méd.*, 1983, **28**, 133-141.
98. DRUILHE P., TRAPE J.F., LEROY J.P., GODARD C., GENTILINI M. Deux cas d'infection humaine accidentelle par *Plasmodium cynomolgi bastianellii*. Étude clinique et sérologique. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1980, **60**, 349-354.
99. EDRISSIAN Gh. Blood transfusion induced malaria in Iran. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1974, **68**, 491-493.
100. EXCLER J.L., RENAUD H., MONNET P. Paludisme congénital à *Plasmodium vivax*. *Nouv. Pres. Méd.*, 1980, **7**, 455-456.
101. EYLES D.E., COATNEY G.R., GETZ M.E., *Vivax*-type malaria parasite of macaques transmissible to man. *Science*, 1960, **131**, 1812-1813.
102. FRIEDMANN C.T.H., DOVER A.S., ROBERTO R.R., KEARNS O.W. A malaria epidemic among heroin users. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1973, **22**, 302-307.
103. GARNHAM P.C.C., BRAY R.S., COOPER W., LAINSON R., AWAD F.I., WILLIAMSON J. The pre-erythrocytic stage of *Plasmodium ovale*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1955, **49**, 158-167.
104. GARNHAM P.C.C. Rechutes dans la malaria : revue des travaux récents. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1985, **65**, 233-242.
105. GIACOMINI T., GOUDAL H., BOUDON P., RENNES C., DUMOUCHEL P., PETITHORY J.C. À propos de deux cas de paludisme à *Plasmodium falciparum*. Responsabilité probable d'anophèles importés par voie aérienne. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1977, **70**, 375-379.
106. GIACOMINI T., MOUCHET J., MATHIEU P., PETITHORY J.C. Étude de six cas de paludisme contractés près de Roissy-Charles-de-Gaulle en 1994. Mesures de prévention nécessaires dans les aéroports. *Bull. Acad. Natle Méd.*, 1995, **179**, 335-353.
107. GUAZZI M., GRAZI S. Considerazioni su un caso di malaria quartana recidivante dopo 53 anni di latenza. *Riv. Malar.*, 1963, **42**, 55-59.
108. HOLZER B.R., GLÜCK Z., ZAMBELLI D., FEY M. Transmission of malaria by renal transplantation. *Transplantation*, 1985, **39**, 315-316.
109. JENSEN J.B., CAPPS T.C., CARLIN J.M. Clinical drug-resistant falciparum malaria acquired from cultured parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1981, **30**, 523-525.

110. KINDE-GAZARD, OKE J., GNAHOUI I., MASSOUGBODJI A. Le risque de paludisme transfusionnel à Cotonou, Bénin. *Cahiers Santé*, 2000, **10**, 389-392.
111. KOCIECKA W., SKORYNA B. *Falciparum* malaria probably acquired from infected skin-cut. *Lancet*, 1987, **ii**, 220.
112. KROTOSKI W.A., KROTOSKI D.M., GARNHAM P.C.C., BRAY R.S., KILLICK-KENDRICK R., DRAPPER C.C., TARGETT G.A.T., GUY M.W. Relapses in primate malaria: discovery of two populations of exoerythrocytic stages. Preliminary note. *Brit. Med. J.*, 1980, **i**, 153-154.
113. LANDAU I., CHABAUD A.G., MORA-SILVERA E., COQUELIN F., BOULARD Y., RÉNIA L., SNOUNOU G. Survival of rodent malaria merozoites in the lymphatic network : potential role in chronicity of the infection. *Parasite*, 1999, **6**, 311-322.
114. LAPIERRE J., HOLLER C., TOURTE-SCHAEFER C., LEBAS-SAISON E., ANCELLE T. Recrudescence du paludisme d'importation. *Nouv. Gaz. Méd.*, 1977, **6**, 3625-3626.
115. LARCAN A., LAPREVOTTE-HEULLY M.-C., VOYDEVILLE G., BASTOS P. Une nouvelle observation de paludisme autochtone avec contamination probable dans un aéroport international de la région parisienne. *Ann. Méd. Interne*, 1978, **129**, 411-412.
116. LARKIN G.L., THUMA P.E. Congenital malaria in a hyperendemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1991, **45**, 587-592.
117. LEGROS F., GAY F., BELKAID M., DANIS M. Situation du paludisme en France métropolitaine en 1996. *Bull. Épid. Hebd*, 1997, **48**, 213-216.
118. LEGROS F., FROMAGE M., ANCELLE T., BURG E., JANOT C., MAISONNEUVE P., DANIS M. Enquête nationale de recensement des cas de paludisme d'importation en France métropolitaine pour l'année 1997. *Bull. Épid. Hebd.*, 1999, **11**, 41-42.
119. LIGNY C., DE GENTILE L., CHABASSE D., PINEAU P., MINCKES O., LARGET-PIET L. Paludisme et grossesse. À propos d'une observation de paludisme congénital à *Plasmodium falciparum*. *Ann. Pédiatr.*, 1989, **36**, 669-674.
120. MANTEL C.F., KLOSE C., SCHEURER S., VOGEL R., WESIROW A.-L., BIENZLE U. *Plasmodium falciparum* malaria acquired in Berlin, Germany. *Lancet*, 1995, **346**, 320.
121. MARCHOUX E. Discussion suivant la communication de M. Blanchard et M. Lin, sur la guérison du paludisme. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1929, **2**.
122. MOLLARET P. Le problème de l'absence de toute période d'incubation dans l'impaludation artificielle par injection directe de sang. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1941, 62-80.
- 122 bis. MORTIMER P.P. Nosocomial malaria. *Lancet*, 1997, **349**, 574.
123. NETTER L. Un cas de paludisme accidentel. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1929, 318.
124. MUNGAI M., ROBERTS J., BARBER A.M., WILLIAMS H.A., RUEBUSH T.K., CHANG M.-H., JAJOSKY R.A., PARISE M.E. Malaria surveillance – United States, 1996. *M.M.W.R.*, 2001, **50**, 1-22.
125. OLIVARES LÓPEZ F., CRUZ CARRANZA G., PÉREZ RODRIGUEZ G.E., CAMACHO GUTIÉRREZ G.R. Paludismo inducido por transfusión de sangre. Análisis de 44 casos. *Rev. Méd. IMSS (Mexico)*, 1985, **23**, 153-157.
126. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. La situation du paludisme dans le monde en 1994. *Relevé Épidém. Hebd. (OMS)*, 1997, **36**, 1-20.
127. OSWALD G., LAWRENCE E.P. Runway malaria. *Lancet*, 1990, **335**, 1537.
128. PASTICIER A., MACHALI D., SAIMOT G., COULAUD J.P., PAGET M. Paludisme autochtone. Problèmes diagnostiques. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1974, **67**, 57-64.

129. PEIGNE B., FERRÉ P., FOURNET J.P., BÉGUÉ P. Paludisme congénital : Une réalité à ne pas méconnaître. *Sem. Hôp. Paris*, 1988, **22**, 1515-1517.
130. PÈNE P., ROUGEMONT A., BOURGEADE A., QUILICI M., DELMONT J. Le paludisme d'importation dans les hôpitaux de Marseille de 1973 à 1976 ; caractères épidémiologiques. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1977, **70**, 596-605.
131. PETITHORY J.C., LEBEAU G. Contamination probable de laboratoire par *Plasmodium falciparum*. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1977, **70**, 371-375.
132. PETITHORY J.C. Paludisme transfusionnel. Dépistage sérologique par I.F.I. *Nouv. Gaz. Transf.*, 1982, **9**, 5-6.
133. PETITHORY J.C., PARIENTE PH., MILGRAM M., RISSONDO J., SEBBAH J-L., SLOVEN P., TARDY M., DE LOYE J. Prévalence de l'infection L.A.V. chez les toxicomanes de la banlieue nord de Paris. *Bull. Acad. Natle. Méd.*, 1986, **6**, 689-696.
134. PETITHORY J.C. Répertoire des sérums de qualité en parasitologie. *Union Nationale des Polios de France*, Ezanville, 2000.
135. RAFFENOT D., ROGEAUX O., DE GOER B., ZERR B. *Plasmodium falciparum* malaria acquired by accidental inoculation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, **18**, 680-681.
136. RATHERY F., DEROT M., BRUMPT L.C., SIGUIER F. Deux cas de fièvre tierce bénigne. Étude épidémiologique d'un foyer de paludisme autochtone à la Croix-de-Berny. *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1940, **41**, 1-6.
137. RIZZO F., MORANDI N., RICCIO G., GHIAZZA G., GARAVELLI P. Unusual transmission of *falciparum* malaria in Italy. *Lancet*, 1989, **1**, 555-556.
138. ROMER N. Paludisme et transfusion sanguine. Lipschutz Librairie, Paris, 1932.
139. SALEUM J.-P., DEROFF P., SIMITZIS A.-M., FADE S., FEREC CL. Paludisme post-transfusionnel. Données statistiques partielles. Approche prophylactique par le dépistage des donneurs de sang à risque. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1987, **62**, 9-16.
140. SAUTET J., QUILICI M. À propos de quelques cas de paludisme autochtone contractés en France pendant l'été. *Pres. Méd.*, 1971, **79**, 524.
141. SHORTT H.E., GARNHAM P.C.C. The pre-erythrocytic development of *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium vivax*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1948, **41**, 785-795.
142. SHUTE P.G. Relapse of quartan fever after 12 and 21 years. *Lancet*, 1944, 146.
143. VANDEMEULEBROUCKE, MATHIEU P., GODINEAU N., GIACOMINI T., DE LOYE J., HAMANE S., PETITHORY J.C. Dix ans de paludisme d'importation dans la banlieue Nord de Paris : Présentation de 1 088 cas (1986-1995). *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 1996, **14**, 159-171.
144. VAUCEL M., ROUBAUD E., GALLIARD H. Terminologie du paludisme. Rapport d'un Comité de Rédaction nommé par l'O.M.S. *O.M.S.*, 1954, **25**, 1-96.
145. VERNES A., DEI CAS E., PROUVOST J.-M., HAGUE B., MARCOLIN M. Paludisme congénital à *Plasmodium vivax*. Un cas. *Nouv. Pres. Méd.*, 1978, **22**, 1960.
146. VINETZ J.M., LI J., MCCUTCHAN T.F., KASLOW D.C. *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. *N. Engl. J. Med.*, 1998, **338**, 367-371.
147. WHITFIELD D., CURTIS C.F., WHITE G.B., TARGETT G.A.T., WARHURST D.C., BRADLEY D.J. Two cases of *falciparum* malaria acquired in Britain. *Brit. Med. J.*, 1984, **289**, 1607-1609.

148. WILLIAMS J.L., INNIS B.T., BURKOT T.R., HAYES D.E., SCHNEIDER I. *Falciparum* malaria: accidental transmission to man by mosquitoes after infection with culture-derived gametocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1983, **32**, 657-659.

Techniques

149. JEFFREY H. C. Morphological changes in *Plasmodium vivax* in patients under treatment with chloroquine. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1968, **62**, 47-50.

150. LACAN A., PEEL E. *Plasmodium ovale* Stephens 1922 en Afrique Équatoriale Française. *Bull. Sté. Fr. Path. Exo.*, 1958, **51**, 67-169.

151. PETITHORY J.C., FROMAGE M. La goutte épaisse, intérêts et limite. *Ann. Contr. Qual. Parasitol.*, 1998, **12**, 120-123.

152. PETITHORY J.C., ARDOIN F.G., ASH L.R. A rapid and easy method of diluting Giemsa stain for use in staining blood smears for the diagnosis of malaria and other blood parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001, **63**, sup. n° 3.

153. PETITHORY J.C., ARDOIN F.G., ASH L.R. Limitations of thick blood smears for the diagnosis of malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001, **63**, sup. n° 3.

154. ROSS R. A improved method for microscopical diagnostic of intermittent fever. *Lancet*, 1903, 86.

155. SHEEHY T.W. Complications of falciparum malaria and their treatment. *Ann. Int. Med.*, 1967, **66**, 807-809.

156. YOUNG M.D., CONTACOS P.G., STITCHER J.E., MILLAR J.W. Drug resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1963, **12**, 305-134.

Plasmodium sp. p.

157. VAUCEL M., ROUBAUD E., GALLIARD H. Terminologie du paludisme. Rapport d'un comité de rédaction nommé par l'O.M.S. *O.M.S.*, 1954, **25**, 1-96.

158. VILLAIN A.G. Guide pratique d'examen microscopique du sang appliqué au diagnostic du paludisme. *Biologie Médicale*, Paris, 1935.

Plasmodium falciparum

159. BRUMPT L.C., VU-CONG-HOE. Contribution à l'étude du cycle sporogonique du *Plasmodium falciparum*. *Extrême Orient Méd. Hanoi*, 1952, **5**, 74-80.

160. CHOPRA R.N., DAS GUPTA B.M., SEN B. A fatal case of severe malignant tertian malaria. *Ind. Med. Gaz.* 1932, **67**, 680-681.

161. FIELD J.W. Blood examination and prognosis in acute falciparum malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1949, **43**, 33-48.

162. GARNHAM P.C.C. On some curious bodies found in erythrocytes containing immature crescents. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1933, **26**, 401.

163. GARNHAM P.C.C., BRAY R.S., COOPER W., LAINSON R., AWAD F.I., WILLIAMSON J. The pre-erythrocytic stage of *Plasmodium ovale*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1955, **49**, 158-167.

164. GIOVANNOLA A. Ceppi tropicali e ceppi europei di *Plasmodium immaculatum*. *Inst. Di Sanita Publica*, 1938, **1**, 791-804.
165. MAURER G. Die malaria perniciosa. *Zbl. Bakt. Abst I*, 1902, **32**, 695-719.
166. O.M.S. Severe *falciparum* malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2000, **94**, 1-90.
167. PETITHORY J.C., ARDOIN F.G., ASH L.R., DUFOUR M. The “extraterrestrial forms” of *Plasmodium falciparum*. Special aspect of trophozoite in blood film. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1997, **57**, 187-188.
168. PETITHORY J.C., ARDOIN F.G., ASH L.R. A rapid and easy method of dilution Giemsa stain for use in staining blood smears for the diagnosis of malaria and other blood parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001, **63**, sup. n° 3.
169. RUSSEL P. F. *Plasmodium tenue* (Stephens). A review of the literature and a case report. *Am. J. Trop. Med.*, 1928, **8**, 449-479.
- 169 bis. SIMPSON J.A., SILAMUT K., CHOTIVANICH K., PUKRITTAYAKAMEE S., WHITE N. Red cell selectivity in malaria: a study of multiple-infected erythrocytes. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1999, **93**, 165-168.
170. SMALLEY M.E., SINDEN R.E. *Plasmodium falciparum* gametocytes : their longevity and infectivity. *Parasitol.*, 1977, **74**, 1-8.
171. STEPHENS J.W.W. A new malarial parasite of man. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1914, **8**, 119-124.
172. YOUNG M.D., CONTACOS P.G., STITCHER J.E., MILLAR J.W. Drug resistance in *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1963, **12**, 305-134.

Plasmodium vivax

173. ARMSTRONG J.C. Evaluation of an indirect haemagglutination test for malaria in an Ethiopian population. *Proc. Helminth. Soc. Washington*, 1972, **39**, 545-553.
174. ARNOT D.E., BARNEWELL J.W., TAM J.P., NUSSENZWEIG V., NUSSENZWEIG R., ENEA V. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* : gene cloning and characterisation the immunodominant epitope. *Science*, 1985, **230**, 815-816.
175. BROOK J.H., GENESE C.A., BLOLAND P.B., ZUCKER J.R., SPITALNY K .C. Brief report : Malaria probably locally acquired in New Jersey. *N. Eng. J. Med.*, 1994, **331**, 22-23.
176. FLOCH H.-A. Archives de l’Institut Pasteur de la Guyane française et de l’Inini. Où en sommes-nous du point de vue paludisme en Guyane française en 1965 ? *Arch. Inst. Pasteur de la Guyane Fr.*, 1965, **495**, 1-15.
177. JUMINER B., ROBIN Y., PAJOT F.X. EUTROPE R. Physionomie du paludisme en Guyane. *Bull. Soc. Path. Ex.*, 1981, **74**, 176-192.
178. KROTOSKI W.A., COLLINS W.E., BRAY R.S., GARHNAM P.C., COGSWELL F.B., GWADZ R.W., KILLOCK-KENDRICK R., WOLF R., SINDEN R., KOOTZ L.C., STANFILL P.S. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Trop. Med. Hyg.*, 1982, **31**, 1291-1293.
179. LEE H.K., LIM J., KIM M., LEE S., OH E.J., LEE J., OH H., KIM Y., HAN K., LEE E.J., KANG S., KIM B.K. Immunological alterations associated with *Plasmodium vivax* malaria in South Korea. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 2001, **95**, 31-39.

180. LIM C.S., KIM Y.K., LEE K.N., KIM S.H., HOFFMAN K.J., SONG K.-J., SONG J.W. The analysis of circumsporozoite-protein gene sequences from South Korean isolates of *Plasmodium vivax*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 2001, **95**, 229-235.
181. M.M.W.R. Mosquito-transmitted malaria – Michigan, 1995. *W.W.W.R.*, 1996, **45**, 398-400.
182. M.M.W.R. Probable locally acquired mosquito-transmitted *Plasmodium vivax* infection – Georgia, 1996. *M.M.W.R.*, 1997, **46**, 264-167.
183. M.M.W.R. Probable locally acquired mosquito-transmitted *Plasmodium vivax* infection – Suffolk County, New York, 1999. *M.M.W.R.*, 2000, **49**, 495-498.
184. MOUCHET J. Le paludisme en Guyane. Rapport de mission, 19 avril-13 mai. *Arch. Inst. Gén. Guyane*, 1988, 21.
185. MOUCHET J., NADIRE-GALLIOT M., GAY F., POMAN J.P., LEPELLETIER L., CLAUSTRE J., BELLONY S. Le paludisme en Guyane. II Les caractéristiques des différents foyers et la lutte antipaludique. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1989, **82**, 393-405.
186. QARI S.H., SHI Y.P., GOLDMAN I.F., UDHAYAKUMAR V., ALPERS M.P., COLLINS W.E., LAL A.A. Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite. *Lancet*, 1993, **341**, 780-783.
187. SHORTT H.E., GARNHAM P.C. The pre-erythrocytic development of *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium vivax*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Méd. Hyg.*, 1948, **41**, 785-795.
188. SHUTE P.G., GARNHAM P.C.C., MARYON M. The Madagascar strain of *Plasmodium vivax*. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar* 1978. 1979, **47**, 173-183.
189. SLEIGH A.C., XI-LI LIU, JACKSON S., PENG LI, LE YVAN SHANG. Resurgence of *vivax* malaria. *Bull. O.M.S.*, 1998, **76**, 265-270.

Plasmodium ovale

190. ADLER S., ZUCKERMAN A. Observations on the morphology of a strain of *Plasmodium ovale*. *Ann. Trop. Med.* 1952, **46**, 289-297.
191. BAUFINE-DUCROCQ H., COUZINEAU P., ROUSSET J.-J. *Plasmodium ovale* Stephens 1922. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1969, **44**, 273-328.
192. BLAIR D.M. Infection with *Plasmodium ovale* in southern Rhodesia. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1938, **32**, 229-236.
193. CHARMOT G., BRICAIRE F., BASTIN R. Paludisme à *Plasmodium ovale* en France. Probabilité d'un contrôle génétique de la durée d'incubation. *Nouv. Pres. Méd.*, 1979, **8**, 35-38.
194. CRAIG C.F. The nomenclature of *Plasmodium ovale* Stephens 1922. *Am. J. Trop. Med.*, 1933, **13**, 539-542.
195. JAMES S.P., NICOL W.D., SHUTE P.G. *Plasmodium ovale* Stephens 1922. *Parasitology*, 1933, **25**, 87-95.
196. JEFFERY G.M., WILCOX A., YOUNG M.D. A comparison of West African and West Pacific strains of *Plasmodium ovale*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1955, **49**, 168-175.
197. LACAN A., PEEL E. *Plasmodium ovale* Stephens 1922 en Afrique Équatoriale Française. *Bull. Sté. Fr. Path. Exo.*, 1958, **51**, 67-169.
198. LANGUILLON J., MOUCHET J., RIVOLA E. Contribution à l'étude du *Plasmodium ovale* Stephens 1922, dans les territoires français d'Afrique. Sa relative fréquence au Cameroun. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1955, **48**, 819-823.

199. MILLER M.J., MARCUS D.M., CAMERON D.G. Latent infections with *Plasmodium ovale* malaria. *Can. Med. Ass. J.*, 1965, **92**, 1241-1247.
200. SHER A., AL-MOTOWWA Y.K., AL-OWAISH R.A. *Ovale* malaria: a case report from Kuwait. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1988, **82**, 670.
201. SFORZA M. Segnalazione del *Plasmodium ovale*, Stephens 1922 in Eritrea (Nota preventiva). *Rivista di Malariologia*, 1948, **27**, 261-264.
202. SINTON J.A. Morphology of the parasitized erythrocyte in infections with *Plasmodium ovale*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1955, **49**, 286-287.
203. STEPHENS J.W.W. A new malaria parasite of man. *Ann. Trop. Med.*, 1922, **16**, 383-386.
204. STEPHENS J.W.W., OWEN D.V. *Plasmodium ovale*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1927, **21**, 293-303.
205. YOUNG M.D., EYLES D.E. Parasites resembling *Plasmodium ovale* in strains of *Plasmodium vivax*. *J. Nat. Malaria Soc.*, 1949, **8**, 219-223.
206. WILCOX A., JEFFERY G.M., YOUNG M.D. The Donaldson strain of malaria. 2. Morphology of the erythrocytic parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1954, **3**, 638-649.
207. WILSON D.B., WILSON M.E. Infections with *Plasmodium ovale* Stephens in Tanganyika territory. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1935, **28**, 469-474.

Polyinfestations

208. MCKENZIE F.E., BOSSERT W.H. Multispecies *Plasmodium* infections of humans. *J. Parasitol.*, 1999, **85**, 12-18.
209. PINTO J., SOUSA C.A., GIL V., GONÇALVES L., LOPES D., DO ROSARIO V.E., CHARLWOOD J.D. Mixed-species malaria infections in the human population of Sao Tomé Island, West Africa. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2000, **94**, 256-257.
210. PURNOMO A.S., GOMEZ-SALADIN E., BANGS M.J. Rare quadruple malaria infection in Irian Jaya Indonesia. *J. Parasitol.*, 1999, **85**, 574-579.
211. SENEVET G., SARROUY C., CHABELARD R., BOULARD C. À propos d'un cas de triple infection palustre chez un enfant nord-africain. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1941, **34**, 168-170.

Manifestation clinique et biologie

212. MAEGRAITH B.G. Interdependence : the pathology of malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1977, **26**, 344-354.
213. MAEGRAITH B.G. Aspects of the pathogenesis of malaria. *South Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.*, 1981, **12**, 251-261.

Culture

214. JENSEN J.B., TRAGER W. *Plasmodium falciparum* in culture : use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J. Parasitol.*, 1977, **63**, 883-886.
215. JENSEN J.B. Some aspects of serum requirements for continuous cultivations of *Plasmodium falciparum*. *Bull. W.H.O.*, 1979, **57**, 27-31.

216. O.M.S. Techniques de culture applicables aux stades érythrocytaires des parasites du paludisme. *Bull. O.M.S.*, 1973, **48**, 355-372.
217. RIECKMANN K.H., MREMA J.E., CAMPBELL G.H. Malaria immunity induced by infection with cultured parasites of *Plasmodium falciparum*. *J. Parasitol.*, 1978, **64**, 750-752.
218. TRAGER W., JENSEN J.B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 1976, **193**, 673-675.
219. TRAGER W. Culture de parasites du paludisme humain. *Méd. Mal. Infect.*, 1981, **11**, 339-341.

Modifications biologiques

220. ALLISON A.C. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Brit. Med. J.*, 1954, **1**, 290-294.
221. BEET E.A. et al. Sickle-cell disease in the Balovale district of Northern Rhodesia. *East African Med. J.*, 1946, 75-86.
222. BIENZLE U., AYENI O., LUCAS A.O., LUZZATO L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria. Greater resistance of females heterozygous for enzyme deficiency and of males with non-deficient variant. *Lancet*, 1972, **1**, 107-110.
223. BOUVET E., LEFRANÇOIS G., LEBRAS J., VROCLANS M., SIMONNEAU M., VACHON F. Anémie hémolytique auto-immune au cours du paludisme immunologique. *Méd. Mal. Infect.*, 1981, **11**, 372-377.
224. BOYD M.F., STRATMAN-THOMAS W.K. Studies on benign tertian malaria. 4. On the refractoriness of negroes to inoculation with *Plasmodium vivax*. *Am. J. Hyg.*, 1933, **18**, 485-489.
225. BRUMPT L., HO THI SANG. Les granulocytes mélanifères du paludisme. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1953, **46**, 506-510.
226. CHASTEL C., THOMAS J. Elliptocytose constitutionnelle et paludisme. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1968, **4**, 605-613.
227. COUTELLIER J. Valeur diagnostique de l'étude des leucocytes dans le paludisme aigu. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1956, 265-269.
228. DEANE L., GUIMARÃES F.N. Aspectos interessantes de fagocytose observados na leishmaniose visceral e na malaria. *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz*, 1938.
229. DLUZEWSKI A.R., NASH G.B., WILSON R.J.M., REARDON D.M., GRATZER W.B. Invasion of hereditary ovalocytes by *Plasmodium falciparum* in vitro and its relation to intracellular ATP concentration. *Molec. Bioch. Parasitol.*, 1992, **55**, 1-8.
230. FAJARDO L.F., SARALA RAO. Platelet enlargement in malaria. *Milit. Med.*, 1971, **136**, 463-464.
231. FAJARDO L.F., TALLENT C. Malaria within human platelets. *JAMA*, 1974, **229**, 1205-1207.
232. GIBERT C., LEMERCIER Y., ADAM C., GENITEAU M., GOUGEROT-POCIDALO M., VERROUST P., LE BRAS J., MOREL-MAROGER L. Aspects immuno-pathologiques du paludisme grave aigu. *Méd. Mal. Infect.*, 1981, **11**, 378-381.
233. LE CŒUR. Thèse Méd. Paris. 1980.
234. LEE H.K., LIM J., KIM M., LEE S., OH E.J., LEE J., OH H., KIM Y., HAN K., LEE E.J., KANG S., KIM B.K. Immunological alterations associated with *Plasmodium vivax* malaria in South Korea. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 2001, **95**, 31-39.
235. LIMBOS P. Erreurs de diagnostic en matière de paludisme observées en Belgique. Les pseudo-paludismes. *Acta Clin. Belg.*, 1971, **26**, 27-35.

236. LOO L.C., REKHRAJ V., CHIANG G.L., MAK J.W. Ovalocytosis protects against severe malaria parasitemia in the malayan aborigines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1992, **47**, 271-275.
237. LUZZATTO L. Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood*, 1979, **54**, 961-976.
238. MARTIN S.K., MILLER L.H., ALLING D. Severe malaria and glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency: a reappraisal of the malaria/G-6.P.D. hypothesis. *Lancet*, 1979, **1**, 524-526.
239. MATHEWS H.M., ARMSTRONG J.C. Duffy blood types and *vivax* malaria in Ethiopia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1981, **30**, 299-303.
240. MILLER L.H., DVORAK J.A., SHIROISHI T., DUROCHER J.R. Influence of erythrocyte membrane components on malaria merozoite invasion. *J. Exp. Med.*, 1973, **138**, 1597.
241. MILLER L.H., MASON S.J., DVORAK J.A., MCGINNISS M.H., ROTHMAN I.K. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science*, 1975, **189**, 561-563.
242. MILLER L.H., MASON S.J., CLYDE D.F., MCGINNISS M.H. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype FyFy. *N. Engl. J. Med.*, 1976, **295**, 302-304.
243. NETTER L. Résistance globulaire et paludisme. *Pres. Méd.*, 1917, **67**, 687-688.
244. NGUYEN HOAN PHU, DAY N., PHAM THI DIEP, FERGUSON D.J.P., WHITE N.J. Intraleucocytic malaria pigment and prognosis in severe malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1995, **89**, 200-204.
245. OKITOLONDA W., DELACOLLETTE C., MALENGREAU M., HENQUIN J.C. High incidence of hypoglycaemia in African patients treated with intravenous quinine for severe malaria. *Brit. Med. J.*, 1987, **295**, 716-718.
246. PATTANAPANYASAT K., YONGVANITCHIT K., TONGTAWA P., TACHAVANICH K., WANACHIWANAWIN W., FUCHAROEN S., WALSH D.S. Impairment of *Plasmodium falciparum* growth in Thalassemic red blood cells : Further evidence by using Biotin labeling and flow cytometry. *Blood*, 1999, **93**, 3116-3119.
247. PETCHELAI B., PRASONGSOM S., BENJAPONGS W. Intravascular coagulation and malaria. *Lancet*, 1975, **1**, 36.
248. PETITHORY J.C., LEBEAU G., GALEAZZI G., CHANTRY A. L'hypocalcémie palustre. Études des corrélations avec d'autres paramètres. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1983, **76**, 455-462.
249. PETITHORY J.C., ARDOIN F., ASH L.R., VANDEMEULEBROUCKE E., GALEAZZI G., DUFOUR M., PAUGAM A. Microscopic diagnosis of blood parasites following a cytoconcentration technique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1997, **57**, 78-83.
250. REE G.H. C-Reactive protein in Gambian Africans with special reference to *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1971, **65**, 574-580.
251. REID H.A. Adjuvant treatment of severe *falciparum* malaria, intravascular coagulation, and heparin. *Lancet*, 1975, **1**, 167-168.
252. ROBLIN W., BÉCOT F., MONNET D., CAUCHOIX B. Le traitement par quinine en I.V. est-il responsable d'hypoglycémies sévères lors des accès pernicieux palustres ? *Méd. Mal. Infect.*, 1989, **19**, 472-473.
253. ROBLIN W., LE BRAS J., COULANGES P. Hypoglycémies sévères au cours d'accès pernicieux à *Plasmodium falciparum* traités par la quinine (Étude de 110 cas). *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1989, **82**, 476-481.

254. ROUGEMONT A., QUILICI M., RANQUE PH., PÈNE P. Taux d'haptoglobine, paludisme et anémie chez l'adulte africain. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1974, **67**, 52-57.
255. SRICHAIKUL T., PUWASATIEN P., KARNJANAJETANEE J., BOKISCH V.A. Complement changes and disseminated intravascular coagulation in *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*, 1975, **1**, 770-772.
256. TRAGER W. Culture de parasites du paludisme humain. *Méd. Mal. Infect.*, 1981, **11**, 339-341.
257. WEATHERALL D.J. Thalassaemia and malaria, revisited. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1997, **91**, 885-890.
258. WELCH S.G., MCGREGOR I.A., WILLIAMS K. The Duffy blood group and malaria prevalence in Gambian West africans. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1977, **71**, 295-296.
259. WHITE N.J., WARREL D.A., CHANTHAVANICH P., LOOAREESUWAN S., WARREL M.J., PATH M.R., KRISHNA S., WILLIAMSON D.H., TURNER R.C. Severe hypoglycemia and hyperinsulinemia in *falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.*, 1983, **309**, 61-66.
260. WILLIAMSON W.A., DAMISAH M., GREWOOD B.M. Hypocomplementaemia in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1978, **72**, 676-677.
261. WOODRUFF A.W., ANSDELL V.E., PETTITT L.E. Cause of anemia in malaria. *Lancet*, 1979, **i**, 1055-1057.

Immunologie

262. ABÈLE D.C., TOBIE J.E., HILL G.J., CONTACOS P.G., EVANS C.B. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1965, **14**, 191.
263. AMBROISE-THOMAS P. La réaction d'immunofluorescence dans l'étude séro-immunologique du paludisme. *Bull. Org. Mond. Santé*, 1974, **50**, 267-276.
264. CHARMOT G., BASCOULERGUE R., BERGOT G., REYNAUD R. Un cas de macroglobulinémie. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1957, **50**, 838-843.
265. CHARMOT G., DEMARCHI J. Un nouvel aspect des splénomégalies en Afrique Noire. *Pres. Méd.*, 1959, **67**, 11-12.
266. CHARMOT G., SIMON F. Infection à VIH et paludisme. *Rev. Prat.*, 1990, **40**, 2141-2143.
267. COLLINS W.E., JEFFERY G.M., SKINNER J.C. Fluorescent antibody studies in human malaria. II. Development and persistence of antibodies to *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1964, **13**, 256-260.
268. DIGGS C.L., SADUN E.H. Serological cross reactivity between *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* as determined by a modified fluorescent antibody test. *Exp. Parasitol.*, 1965, **16**, 217-223.
269. FRENCH N., FILKS C.F. Fresh from the fiels: some controversies in tropical medicine and hygiene. HIV and malaria, do they interact? *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2000, **94**, 233-237.
270. GARIN J.-P., AMBROISE-THOMAS P., SALIOU P. Diagnostic sérologique du paludisme par la méthode des anticorps fluorescents. *Pres. Méd.*, 1965, **73**, 1847-1852.
271. GREENBERG A.E., NSA W., RYDER R.W., MEDI M., NZEZA M., KITADI N., BAANGI M., MALANDA N., DAVACHI F., HASSIG S.E. *Plasmodium falciparum* malaria and perinatally acquired human immunodeficiency virus type 1 infection in Kinshasa, Zaire. *N. Engl. J. Med.*, 1991, **325**, 105-109.
272. PETITHORY J.C., WEINSBERG M., ZATLA F. Immunologie cellulaire et humorale dans le paludisme hyperimmun. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1985, **78**, 836-843.

273. PETITHORY J.C., ARDOIN F., ASH L.R., VANDEMEULEBROUCKE E., GALEAZZI G., DUFOUR M., PAUGAM A. Microscopic diagnosis of blood parasites following a cytoconcentration technique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1997, **57**, 78-83.
274. PHANUPHAK P., HANVANICH M., SAKULRAMRUNG R., MOOLLAOR P., SITPRIJA V., PHANTHUMKOSOL D. Complement changes in falciparum malaria infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 1985, **59**, 571-576.
275. SIMOOYA O.O., MWENDAPOLE R.M., SIZIYA S., FLEMING A.F. Relation between *falciparum* malaria and HIV seropositivity in Ndola, Zambia. *B.M.J.*, 1988, **297**, 30-31.
276. STEKETEE R.W., WIRIMA J.J., BLOLAND P.B., CHILIMA B., MERMIN J.H., CHITSULO L., BREMAN J.G. Impairment of a pregnant woman's acquired ability to limit *Plasmodium falciparum* by infection with human immunodeficiency virus type-1. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1996, **55**, 42-49.
277. TOBIE J.E., ABÈLE D.C., WOLFF J.M., CONTACOS P.G., EVANS C.B. Serum immunoglobulin levels in human malaria and their relationship to antibody production. *J. Immunol.*, 1966, **97**, 498-505.
278. VIJAYAMMA T., YAP PAK LENG. Agreement between indirect fluorescent-antibody tests and microscopical diagnosis in *Plasmodium falciparum* infections. *J. Com. Dis.*, 1976, **8**, 255-260.
279. WILSON R.J.M. Serotyping *Plasmodium falciparum* malaria with S-antigens. *Nature*, 1980, **284**, 451-453.

IV

BABÉSIOSES

L'atteinte de l'Homme par *Babesia* (= *Piroplasma*), protozoaire, parasite des hématies de nombreuses espèces animales (mammifères), a été décrite en 1957 (323). Il s'agit d'une affection peu fréquente, souvent méconnue mais en expansion : une meilleure connaissance des données épidémiologiques, cliniques et surtout de son aspect microscopique permettra d'en améliorer le diagnostic. Maladie souvent grave elle est fréquemment confondue avec des accès sévères, voire perniciose, de *P. falciparum*, les manifestations cliniques sont semblables, la morphologie microscopique voisine. L'absence de séjours tropicaux des malades est aussi une difficulté diagnostique, qui peut conduire au diagnostic de paludisme des aéroports (314). La babésiose atteint surtout les personnes âgées, de sexe masculin, cela sans doute en rapport avec les activités professionnelles agricoles, exposant ces personnes aux vecteurs que sont les tiques du genre *Ixodes*. Différentes espèces de *Babesia* sont en cause. *Babesia divergens* parasite des bovidés en Europe et en France en particulier (une trentaine de cas pour l'Europe), est à l'origine d'une maladie très grave chez les splénectomisés. Mortelle dans environ la moitié des cas quand le diagnostic n'est pas fait précocement, d'où l'importance du rôle du biologiste qui fait alors un frottis quand l'automate lui signale une thrombopénie inattendue et découvre parfois un accès palustre à *P. falciparum* ou une babésiose grave dont la recherche n'était pas prescrite. A côté de *B. divergens* d'autres espèces (*B. canis*, *B. caballi*, *B. bovis*) sont mises en cause. Récemment une espèce voisine de *B. divergens* mais non identifiée, provisoirement désignée WA1, a été mise en évidence aux U.S.A., elle est à l'origine d'une trentaine de cas. Une autre forme, moins grave, due à *Babesia microti* survenant chez des personnes non splénectomisées, est à l'origine de plus de 300 cas, uniquement aux U.S.A.

■ ÉPIDÉMIOLOGIE, RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE, CLINIQUE

La transmission se fait en général par piqûres de tiques du genre *Ixodes*, mais peut également être transmise par voie transfusionnelle, à partir d'un donneur porteur chronique (282).

Il existe deux types épidémiologiques principaux :

1) chez des malades splénectomisés en Europe (284, 285, 294, 297, 298, 303, 323, 328).

La survenue de l'affection est liée à la diminution du potentiel immunitaire consécutive à la splénectomie. Ont été incriminés *Babesia bovis* et surtout *Babesia divergens* (318), parasites d'ongulés, mais aussi *Babesia canis*. Cette parasitose a été souvent observée chez les bovidés d'Europe occidentale et centrale, (34) jusqu'à 80 % du cheptel bovin est parasité dans l'Ouest de la France (313) mais aussi dans le centre et le Sud-Ouest. *Ixodes ricinus* est l'agent vecteur principal (292) et la notion de piqûre de tiques peut souvent être retrouvée à l'interrogatoire.

Le temps d'incubation est de 7 à 10 jours (319). Un contact professionnel avec des bovidés (288 et 291) ou avec des chiens (293 et 311) est souvent constaté. Il s'agit en général de personnes âgées de plus de 50 ans (319).

Elle a été observée aux U.S.A., en Yougoslavie, Irlande, Ecosse, France (Pornic, Marseille), Russie (Georgie) (299), Pays de Galles (314).

Deux cas survenus chez un éleveur de chiens l'un dans l'état de New York (324 et 325), l'autre dans l'Ile de Shelter, semblent être dus à *Babesia canis*.

En France une douzaine de cas ont été observés dont deux mortels (284, 285, 288, 291, 293, 300, 302, 310, 311 et 326).

Chez des malades splénectomisés aux U.S.A.

Une autre espèce de *Babesia* provisoirement désignée WA1 est à l'origine de cas de babésiose, voisins de ceux dus à *B. divergens*. Le premier cas a été observé dans l'état de Washington.

Quatre malades de sexe masculin ont été atteints aux U.S.A. dans l'état de Californie, d'une babésiose après splénectomie. L'un des malades est décédé. L'étude génétique a montré qu'il ne s'agissait pas de *B. microti*, sans pouvoir cependant préciser l'espèce en cause (317).

D'autres cas avec un problème d'identification de l'espèce en cause ont été observés dans le Missouri (308). La transmission transfusionnelle à partir d'un donneur de 37 ans a été décrite (309). Dans le Wisconsin, 10 cas, dont 3 mortels ont été observés (307).

Cliniquement, il s'agit d'une affection fébrile, avec anémie, ictère, hémoglobinurie, insuffisance rénale aiguë, mortelle dans plus de la moitié des cas en l'absence de traitement avec parfois atteinte pulmonaire grave (O.A.P.). Elle peut être aussi asymptomatique (304 et 305).

2) chez des malades non splénectomisés

Elle a été décrite dans des Iles de la côte Est des U.S.A. : Ile de Nantucket (320), Ile de Martha's Vineyard (315 et 321).

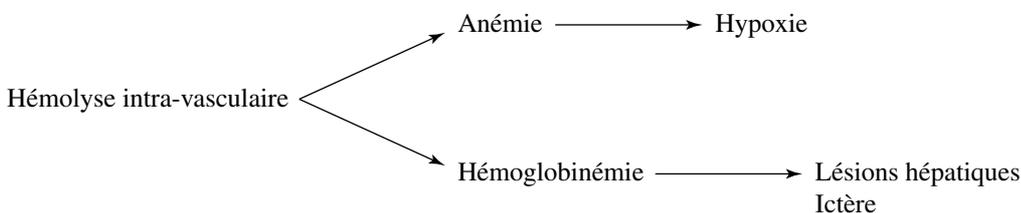
21 cas ont été sérologiquement diagnostiqués dans l'Ile de Nantucket (306). Dans l'Ile de Shelter (303) 7 % de la population est sérologiquement positive (296).

13 cas, dont 2 mortels, ont été observés dans le Connecticut (283).

Elle est due à *Babesia microti*, parasite de petits rongeurs sauvages, principalement de la « souris à pattes blanches », *Peromyscus leucopus* (304, 305 et 319). La transmission se fait par piqûre d'*Ixodes dammini* (306).

■ PATHOGÉNIE DES BABÉSIOSES (289)

Elle est principalement due à : 1) l'hémolyse intra-vasculaire, hémolyse liée surtout à la lyse des hématies parasitées



2) Adhérence des hématies à l'endothélium vasculaire. Les hématies parasitées par *B. bovis* s'agglutinent et adhèrent à l'endothélium vasculaire en particulier de l'encéphale. Ces hématies parasitées présentent à leur surface des protubérances étoilées, proches des protubérances en bouton de *P. falciparum* (280 et 281).

3) production de complexes immuns à auto-antigènes qui se déposent sur les hématies.

■ MODIFICATIONS BIOLOGIQUES

Hémogramme :

Hématies : L'anémie est en général constante, et se situe entre 2 000 000 et 3 500 000, pouvant atteindre 1 000 000 d'hématies/ μ l (323). Il existe une réticulocytose modérée de 5 à 10 %, exceptionnellement 25 % (297). Chez les malades splénectomisés, les corps de Jolly sont nombreux.

Leucocytes : Dans les formes dues à *B. microti*, on observe une leuconéutropénie : 4 400 (327) ; 2 500 dont 49 % de polynucléaires (303) ; 4 000/ μ l dont 40 % de polynucléaires (321), 3 600 à 6 700 (319) ; 3 700 dont 35 % de polynucléaires (282) chez des malades splénectomisés.

Chez les malades splénectomisés et infectés par *B. divergens*, il y a en général une hyperleucocytose avec polynucléose, de l'ordre de 20 000 globules blancs par μ l dont 70 % de polynucléaires neutrophiles, pouvant atteindre 46 500 par μ l dont 88 % de polynucléaires neutrophiles à un stade terminal (297). Des lymphocytes atypiques, lymphocytes plasmocytaires, sont souvent observés.

Plaquettes : Dans certaines formes graves, elles ont été trouvées abaissées : 45 000 juste avant le décès (284).

Biochimie

La bilirubine totale est modérément augmentée, 10 à 60 mg/litre.

Les L.D.H. constamment élevés jusqu'à 1 000 U.I. en relation avec l'hémolyse.

L'urée peut être aussi élevée en relation avec l'atteinte rénale.

Une hypocalcémie à 78 mg/litre a été décrite (303).

■ DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE

1) Prélèvement : sang prélevé au bout du doigt, ou sur anticoagulant (E.D.T.A.)

2) Morphologie : (290, 298, 299 et 301).

Un élément important pour le diagnostic différentiel avec les *Plasmodium* : il n'y a pas de pigment chez *Babesia*. Cela permet de différencier les deux genres au stade trophozoïte âgé ou schizonte. Le fait peut être confirmé par culture de douze heures par la méthode de Traeger.

Babesia divergens (M'Fadyean and Stockman 1911) = *Piroplasma divergens* (290, 298 et 299).

La parasitémie est en règle importante (photos n° 177 et 178), elle peut s'élever à 70 % (328) et même 75 % (284) d'hématies parasitées.

Les trophozoïtes ont une forme en anneau allongé, de 2,5 microns sur 1 micron, avec une extrémité plus large, donnant un aspect général en forme de poire (= *Piroplasma*) (photo n° 179) ou de point d'exclamation. Les anneaux peuvent aussi être de forme arrondie ou en « raquette » (photo n° 180) ce qui peut être en relation avec les modalités de confection du frottis.

Le polyparasitisme est fréquent, les trophozoïtes étant alors accolés par paires ou par tétrades ou au nombre de 8 (photos n° 181 et 182). Par paires, ils sont appariés par leur petite extrémité en formant un angle variable souvent voisin de 90 °, en paire de lunettes (photos n° 183 et 184). Les hématies renferment un ou deux de ces corps bigémisés. Par quatre, il peuvent se disposer en

croix avec des extrémités élargies, comme dans la croix de Malte. Des trophozoïtes peuvent « diverger » par rapport à l'hématie, et paraissent alors accolés au globule rouge.

Dans le sang périphérique il n'y a ni schizontes ni gamétocytes.

Babesia divergens est différent morphologiquement de *Babesia bovis*, et l'atteinte de l'Homme par cette dernière espèce est discutée. Le diagnostic différentiel se pose surtout avec *P. falciparum*.

Babesia microti : le nombre d'hématies parasitées varie de 1 à 10 % (319 et 327). On trouve aussi l'aspect piriforme, les formes en croix de Malte. Il existe aussi des formes rondes avec vacuole centrale claire.

3) Inoculation à l'animal : Elle est utilisée pour confirmer le diagnostic. *Babesia divergens* est inoculable au chimpanzé qui fait une infection grave, aux gerbilles, *Meriones unguiculatus* (328) et aux hamsters.

Babesia microti est inoculable au singe et au hamster par inoculation intra-péritonéale de sang de malade prélevé sur E.D.T.A (290, 304 et 319).

■ DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE

La réaction habituellement utilisée est celle d'immunofluorescence indirecte sur frottis de *Babesia sp. p.* (303, 304, 305, 306, 322 et 324). Les réactions sont en général négatives vis-à-vis des antigènes de *Plasmodium sp. p.* (304, 305 et 322).

– Pour les babésioses à *B. microti*

La réaction est toujours positive à un taux égal ou supérieur à 1/64, pouvant atteindre 1/4096 (303). Les témoins normaux réagissent à un taux égal ou inférieur au 1/16° (306).

Une étude a été faite en 1994 par Krause (312) pour 25 malades présentant, une babésiose (bénigne) à *B. microti*, 4 laboratoires travaillant en parallèle en immunofluorescence, antigène *B. microti* ont obtenu comme résultat :

Le seuil de 1/32 a été atteint ou dépassé pour 21 sérums de babésiose sur 25 = sensibilité 84 %. La spécificité a été de 94 % pour 130 témoins.

– **Pour les babésioses observées en France** un malade a présenté des taux élevés pour *B. canis* et un taux moyen pour *B. divergens* (288) un autre a été positif à 1/160 pour *B. divergens* (311), un autre a été négatif pour *Babesia caballi*, *B. canis* et *B. divergens* et positif au 1/40 pour *P. malariae*, (311).

un autre positif pour *B. canis* au 1/2560 (311).

un autre positif pour *B. divergens* au 1/256 a augmenté en une semaine pour atteindre 1/2048.

Au total dans ces cas, la sérologie n'a pas d'intérêt diagnostique mais a une valeur d'orientation pour l'espèce de *Babesia* en cause, qui semble variable.

La réaction d'hémagglutination conditionnée peut être également utilisée. Le résultat est considéré significatif si le taux est égal ou supérieur à 1/258 (319).

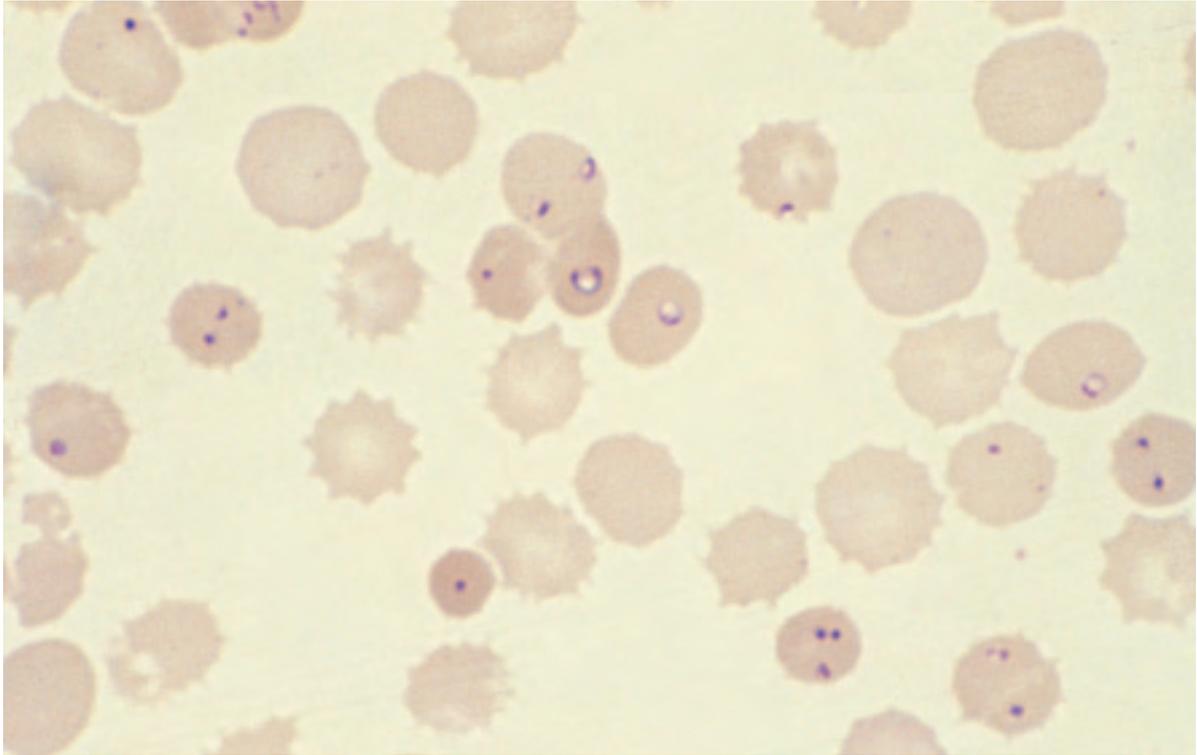


Photo n° 177 : Babesia divergens. Frottis. Nombreux trophozoïtes d'aspect varié, ayant parfois un noyau en haltère rappelant celui de Plasmodium falciparum. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

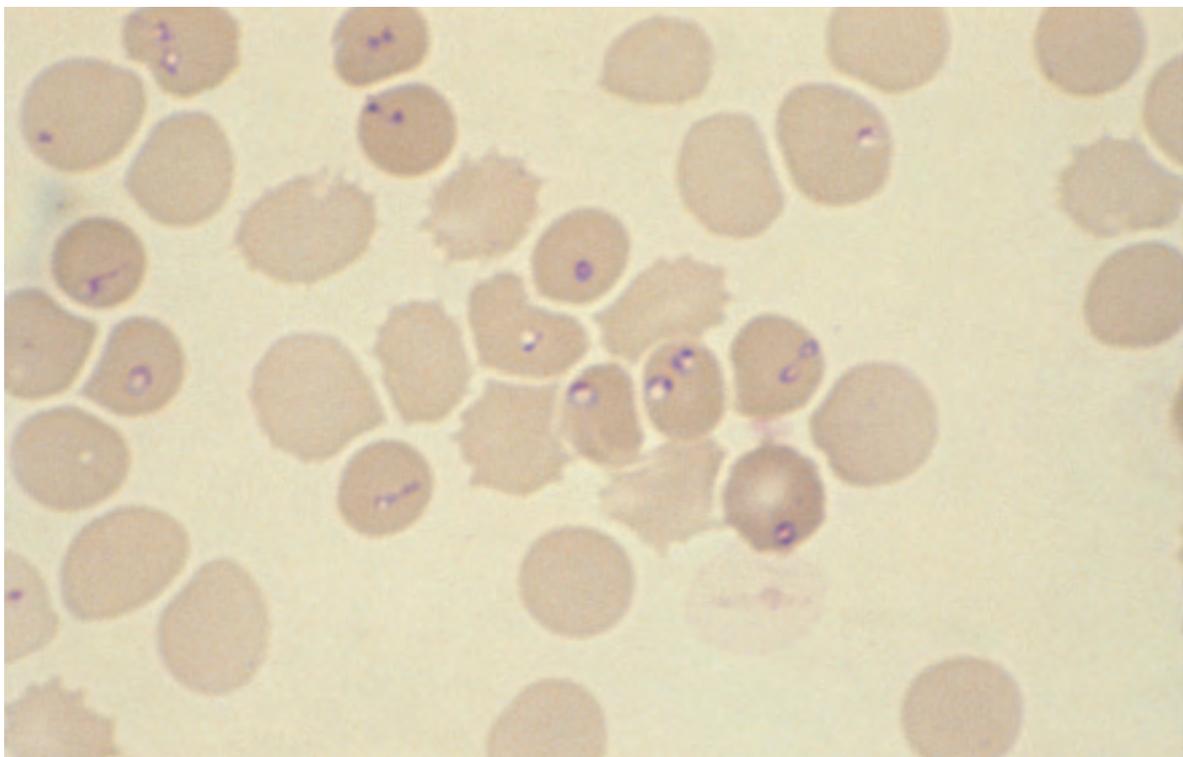


Photo n° 178 : Babesia divergens. Frottis. Nombreux trophozoïtes et hématies biparasitées. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

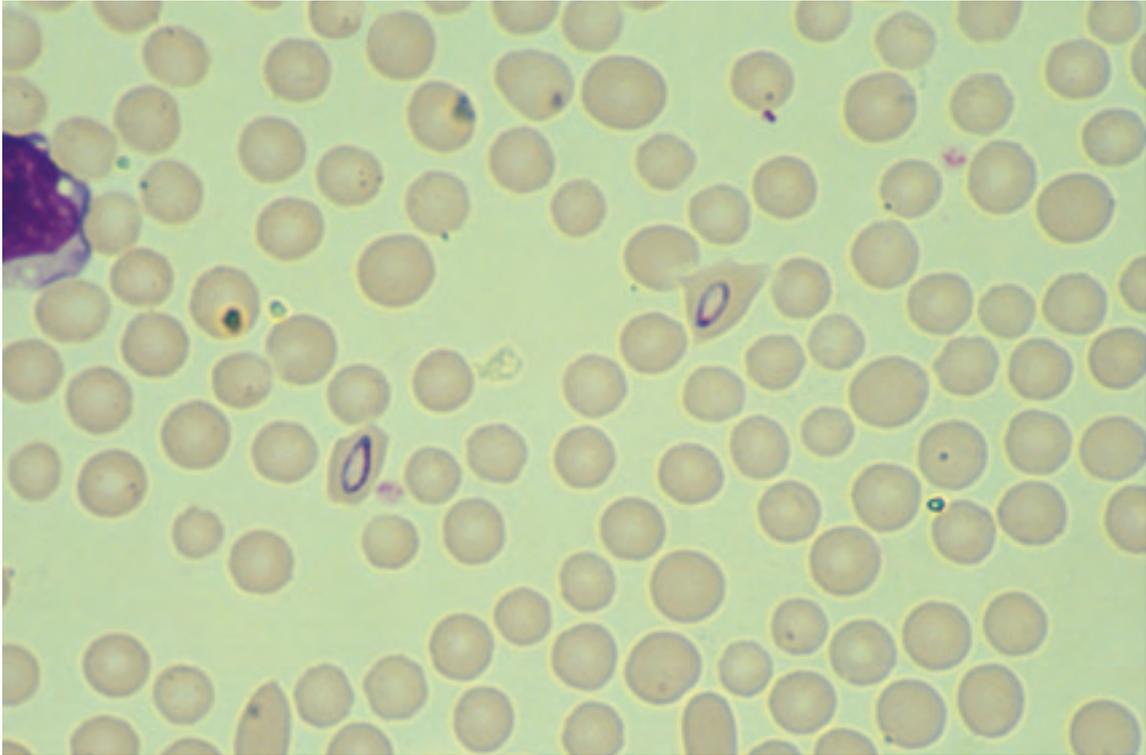


Photo n° 179 : Babesia sp. Frottis. Deux trophozoïtes ayant une forme en anneau allongé avec une extrémité plus large en forme de poire (Piroplasma). Coloration M.G.G. Obj. × 100.

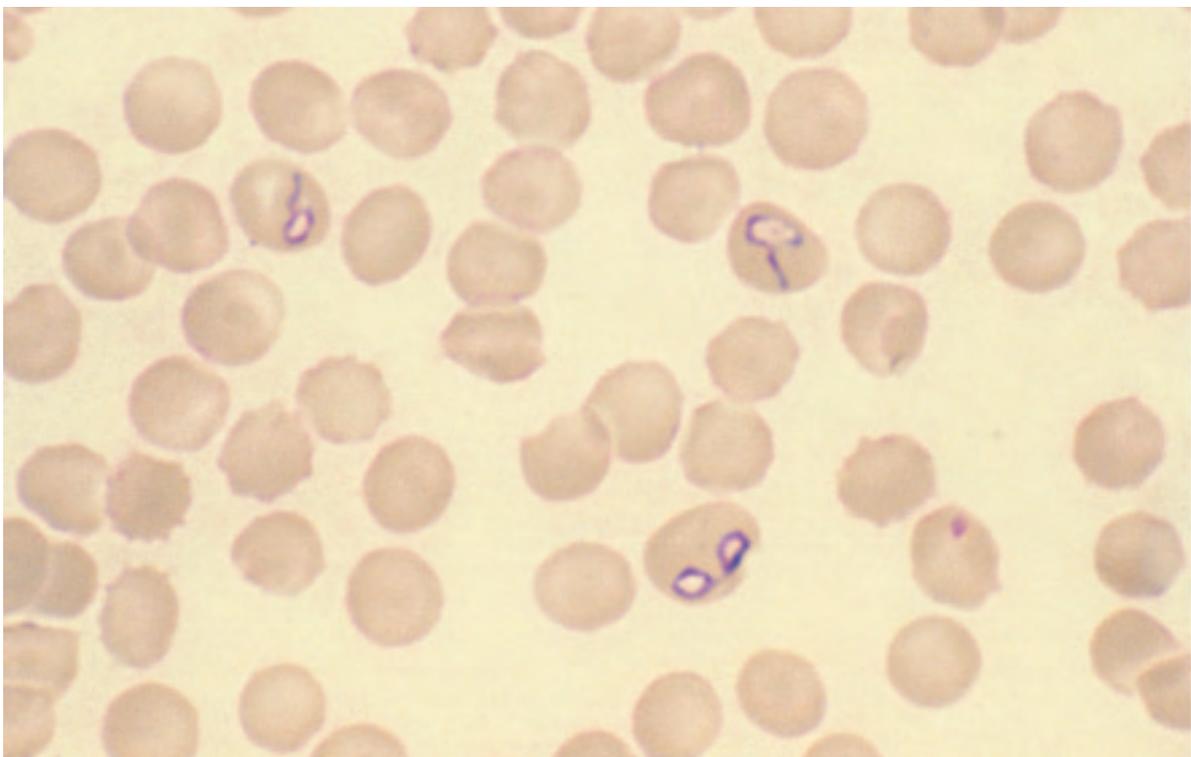


Photo n° 180 : Babesia canis. Frottis. Deux trophozoïtes en forme de raquette. Une hématie biparasitée. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

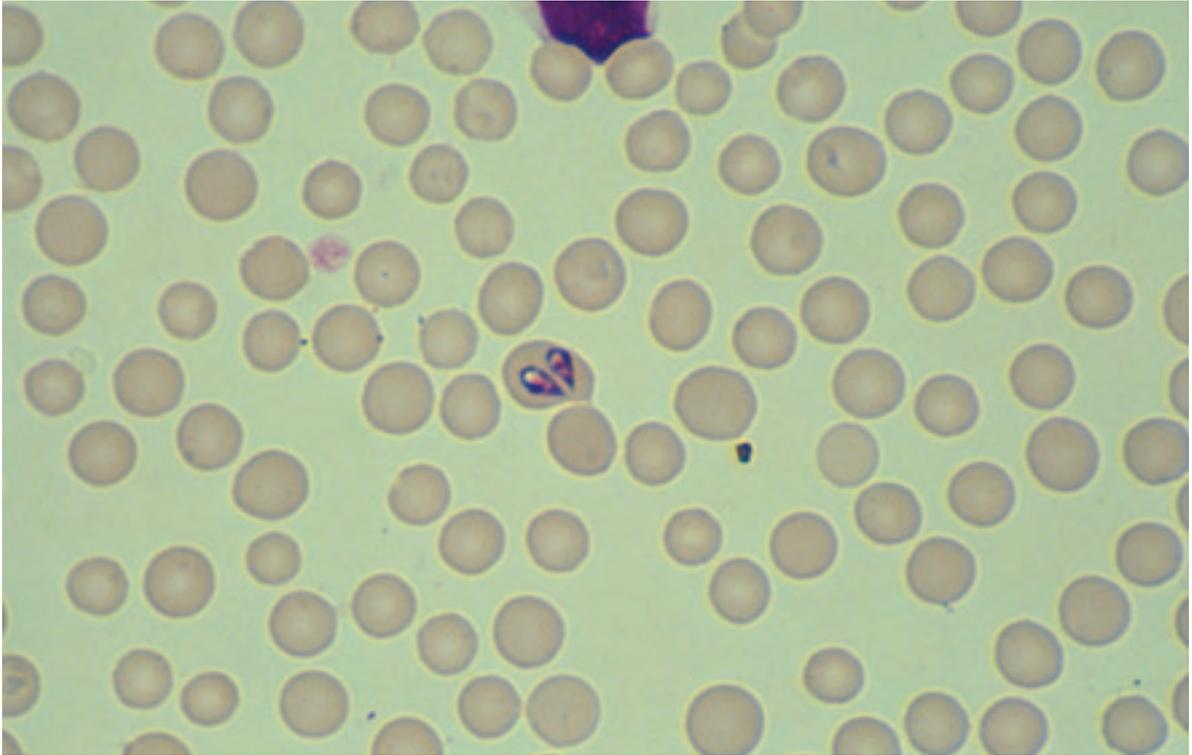


Photo n° 181 : Babesia sp. Frottis. Hématie parasitée par une paire de trophozoïtes en forme de poire. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

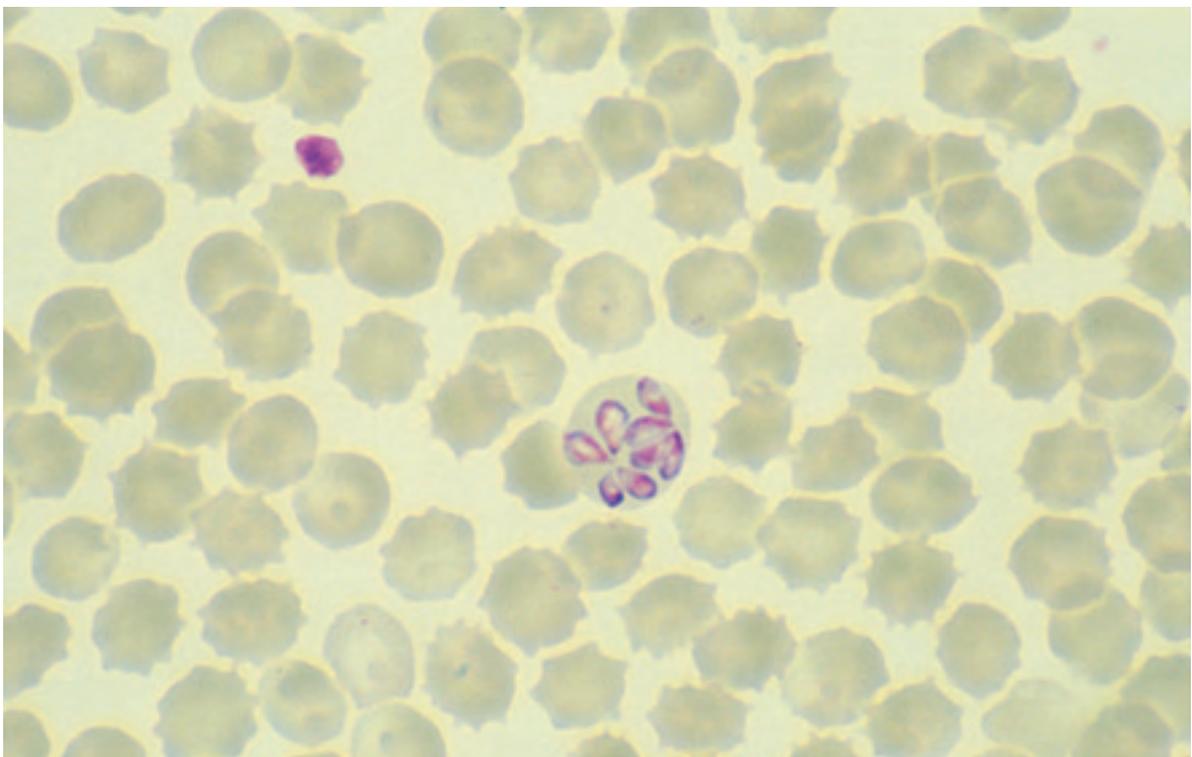


Photo n° 182 : Babesia canis. Frottis. Hématie de grande taille parasitée par huit trophozoïtes en forme de poire correspondant à deux tétrades. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

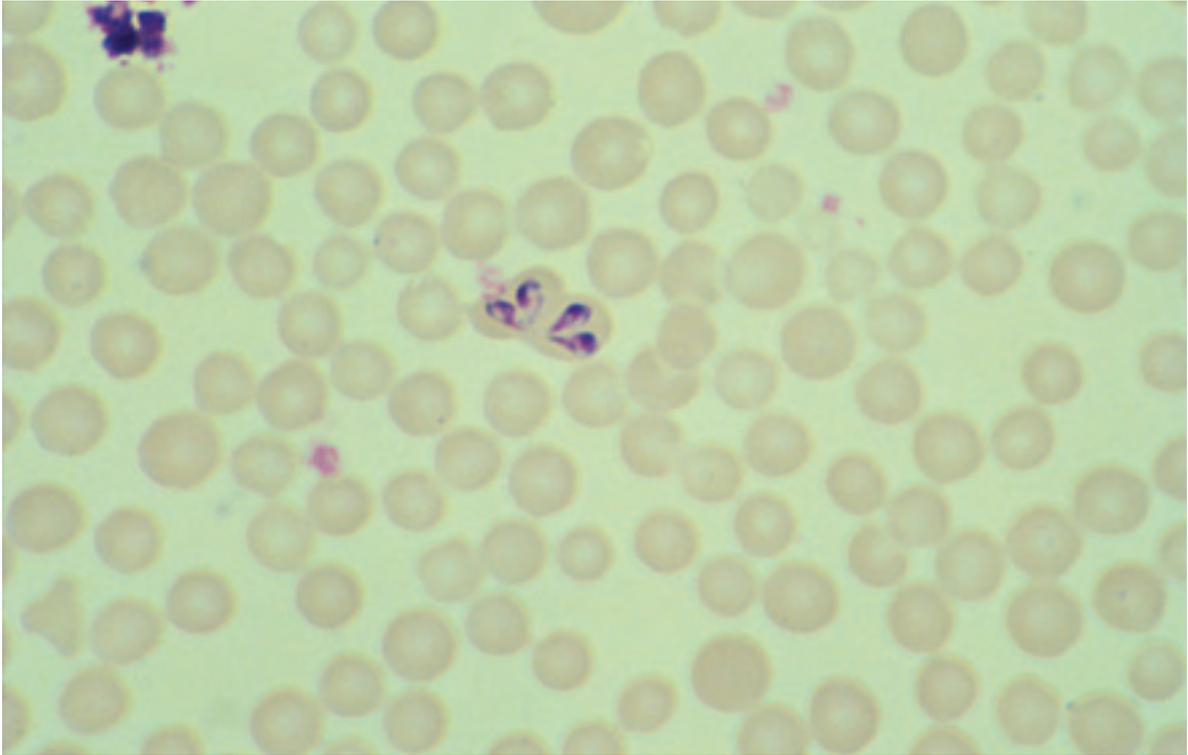


Photo n° 183 : Babesia sp. Frottis. Deux hématies parasitées par deux trophozoïtes formant un angle un peu inférieur à 90 °. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

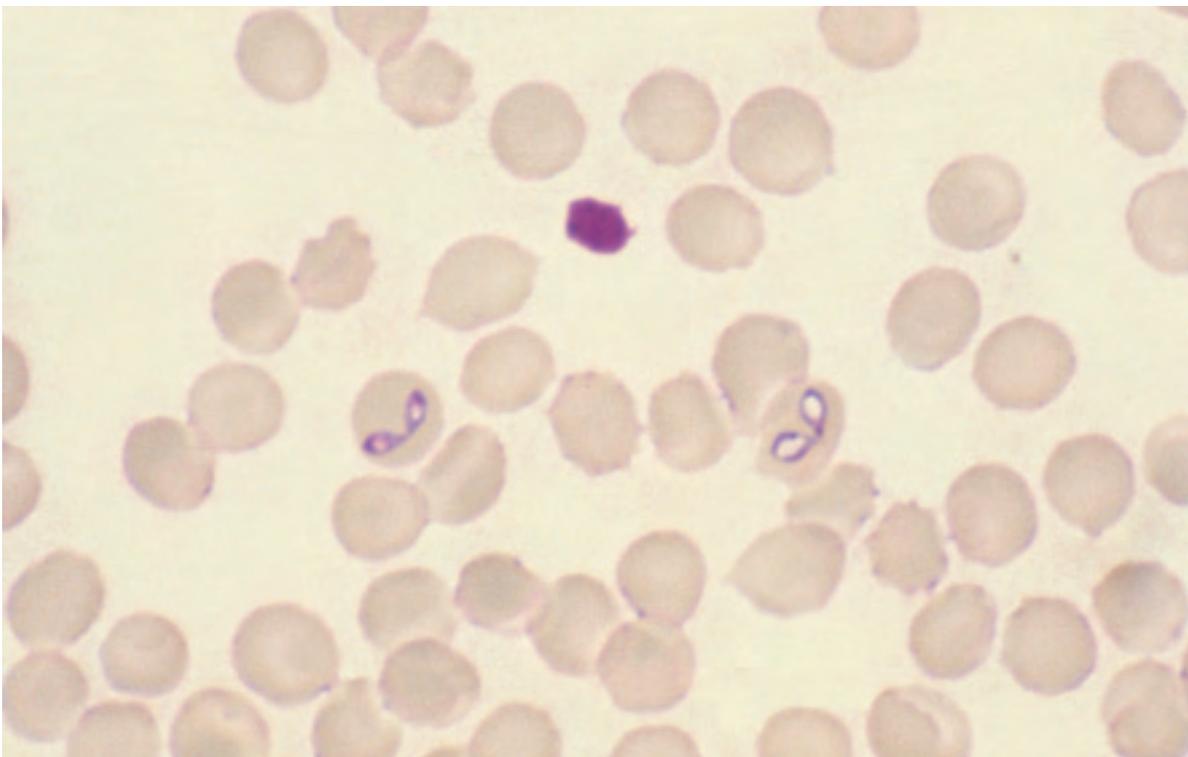


Photo n° 183 : Babesia canis. Frottis. Deux hématies parasitées par deux trophozoïtes faisant un angle supérieur à 90 °, en forme de « paire de lunettes ». Coloration M.G.G. Obj. × 100.

■ BABÉSIOSE ET SIDA

Plusieurs cas ont été observés aux U.S.A.

Il fut trouvé chez un américain de 40 ans atteint de SIDA des *Babesia* dans le sang après trois semaines de fièvre. Les parasites disparurent après traitement à la clindamycine. La sérologie faite avec *B. microti* fut trouvée négative et une récurrence se produisit 8 mois plus tard (287).

Un autre patient américain de 40 ans, homosexuel de New-York, atteint du SIDA, polytransfusé, ne se souvenait pas avoir été piqué par des tiques. Il a été trouvé, 30 % d'hématies parasitées par *Babesia microti* 4 jours après qu'il ait été splénectomisé, alors que les parasites étaient rares avant splénectomie. La température ne redevint normale qu'après 6 mois et différents traitements (316).

Un autre malade atteint du SIDA, non splénectomisé, présenta une fièvre prolongée d'origine inconnue avec hépatosplénomégalie. L'examen du sang montra des *Babesia* qui furent retrouvées aussi sur des frottis antérieurs. Il faisait des séjours fréquents dans l'île de Nantucket et ne se souvenait pas d'avoir été piqué par des tiques. Pendant un an la babésiose fut contrôlée mais non guérie (295).

Au total ces formes de babésiose à *B. microti* dans le SIDA présentent une persistance malgré le traitement mais sans être directement mortelles.

Ces cas, où la maladie est contrôlée mais non éradiquée, suggèrent que le SIDA prédispose à une persistance de *B. microti*.

■ BABÉSIOSE ET BORRÉLIOSE (Maladie de Lyme)

Ce sont deux maladies transmises par les tiques, ce qui explique qu'aux Etats-Unis une coïncidence ait été trouvée entre-elles deux chez des malades.

– 54 % des malades atteints de babésiose avaient des anticorps IgG ou IgM pour *Borrelia burgdorferi*, agent de la maladie de Lyme.

– 66 % des patients atteints de la maladie de Lyme habitant dans les régions endémiques de babésiose avaient des anticorps IgG ou IgM pour *B. microti* (286).

– 5 malades sur 8 atteints de babésiose avaient un taux d'IgG ou IgM élevé : 1/640 à 1/5 120 (282).

Expérimentalement il n'a pas été trouvé de réactions croisées entre ces 2 agents infectieux (286) qui sont très différents.

■ CONCLUSION

Un certain nombre de données concernant les babésioses sont établies, d'autres sont à confirmer, beaucoup sont encore à découvrir.

C'est une parasitose émergente parce que :

- son diagnostic est mieux fait,
- elle est transmise par des tiques, ectoparasites, qui persistent ou sont même en expansion,
- elle a un nombre très important de réservoirs de parasites, animaux domestiques ou sauvages.

Son diagnostic biologique microscopique est capital, puisque c'est lui seul, qui permet un traitement spécifique.

Bibliographie

280. AIKAWA M., RABBEGE J.R. Electron microscopy of knobs in *Plasmodium falciparum*, infected erythrocytes. *J. Parasitol.*, 1983, **69**, 435-437.
281. AIKAWA M., RABBEGE J., UNI S., RISTIC M., MILLER L.H. Structural alteration of the membrane of erythrocytes infected with *Babesia bovis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1985, **34**, 45-49.
282. ANDERSON A.E., CASSADAY P.B., HEALY G.R. Babesiosis in man. Sixth documented case. *A.J.C.P.*, 1974, **62**, 612-618.
283. ANDERSON J.F., MINTZ E.D., DADBAW J.J., MAGNARELLI L.A. *Babesia microti*, human babesiosis, and *Borrelia burgdorferi* in Connecticut. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 2779-2783.
284. BAYLE J., DUMON H., VERDOT J.J., MURATORE R. Piroplasmose humaine. Une observation. *Nouv. Pres. Med.*, 1979, **8**, 3674.
285. BAZIN C., LAMY C., PIETTE M., GORENFLOT A., DUHAMEL C., VALLA A. Un nouveau cas de babesiose humaine. *Nouv. Pres. Med.*, 1976, **5**, 799-800.
286. BENACH J.L., COLEMAN J.L., HABICHT G.S., MACDONALD A., GRUNWALDT E., GIRON J.A. Serological evidence for simultaneous occurrences of Lyme disease and babesiosis. *J. Infect. Dis.*, 1985, **152**, 473-477.
287. BENEZRA D., BROWN A.E., POLSKY B., GOLD J.W.M., ARMSTRONG D. Babesiosis and infection with human immunodeficiency virus (HIV). *Ann. Intern. Med.*, 1987, **107**, 944.
288. BOURÉE P., MARSAUDON E., CAHIEZ M., TESTOU D., MAUBRI K., GORENFLOT A. Babesiose grave, d'évolution favorable, dans l'Indre. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 1996, **14**, 172-178.
289. BUSSIÈRES J. Pathogénie des babésioses. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 1990, **8**, 223-238.
290. CANNING E.U., KILLICK-KENDRICK R., MONK J.B. Morphology of piroplasms in abnormal hosts and the identification of piroplasms of man. *J. Trop. Med. Hyg.*, 1976, **79**, 5-8.
291. DENES E., ROGEZ J.P., DARDÉ M.L., WEINBRECK P. Management of *Babesia divergens* babesiosis without a complete course of quinine treatment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, **18**, 672-673.
292. DONNELLY J. Human babesiosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1980, **74**, 158.
293. DUMON H., RAOULT D., QUILICI M., CASANOVA P. Un nouveau cas de babésiose humaine dans la région marseillaise. Congrès de la Société de Française de Parasitologie, 1987.
294. ENTRICAN J.H., WILLIAMS H., COOK I.A., LANCASTER W.M., CLARK J.C. Babesiosis in man: a case from Scotland. *Brit. Med. J.*, 1979, **2**, 474.
295. FALAGAS M.E., KLEMPNER M.S. Babesiosis in patients with AIDS: A chronic infection presenting as fever of unknown origin. *Clin. Infect. Dis.*, 1996, **22**, 809-812.
296. FILSTEIN M.R., BENACH J.L., WHITE D.J., BRODY B.A., GOLDMAN W.D., BAKAL C.W., SCHWARTZ R.S. Serosurvey for human babesiosis in New York. *J. Infect. Dis.*, 1980, **141**, 518-521.
297. FITZPATRICK J.E.P., KENNEDY C.C., MCGEOWN M.G., OREOPOULOS D.G., ROBERTSON J.H., SOYANWO M.A. Further details of third recorded case of redwater (Babesiosis) in man. *Brit. Med. J.*, 1969, **4**, 770-772.
298. GARNHAM P.C.C., DONNELLY J., HOOGSTRAAL H., KENNEDY C.C., WALTON G.A. Human babesiosis in Ireland: further observations and the medical significance of this infection. *Brit. Med. J.*, 1969, **4**, 768-770.
299. GARNHAM P.C.C. Human babesiosis: European aspects. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1980, **74**, 153-155.

300. GORENFLOT A., PIETTE M., MARCHAND A. Babésioses animales et santé humaine. Premier cas observé en France. *Rec. Méd. Vét.*, 1976, **152**, 289-297.
301. GORENFLOT A., PIETTE M. Aspects microscopiques observés au cours des deux premiers cas français de babesiose humaine. *Med. Mal. Infect.*, 1981, **11**, 334-338.
302. GORENFLOT A., BRASSEUR P., BONMARCHAND G., LANELEE D., SIMONIN D. Deux cas de babesiose humaine grave traités avec succès. *Pres. Méd.*, 1990, **19**, 335.
303. GRUNWALDT E. Babesiosis on Shelter Island. *New York State J. Med.*, 1977, **77**, 1320-1321.
304. HEALY G.R., SPIELMAN A., GLEASON N. Human babesiosis: reservoir of infection on Nantucket Island. *Science*, 1976, **192**, 479-480.
305. HEALY G.R. WALTER P.D., SULZER A.J. A case of asymptomatic babesiosis in Georgia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1976, **25**, 376-378.
306. HEALY G.R. Babesia infections in man. *Hospital Practice*, 1979, **14**, 107-116.
307. HERWALD B.L., SPRINGS F.E., ROBERTS P.P., EBERHARD M.L., CASE K., PERSING D.H., AGGER W.A. Babesiosis in Wisconsin: A Potentially fatal disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1995, **53**, 146-151.
308. HERWALD B.L., PERSING D.H. PRÉCIGOUT E.A., GOFF W.L., MATHIESEN D.A., TAYLOR P.W. et al. A fatal case of babesiosis in Missouri : identification of another piroplasm that infects humans. *Ann. Intern. Med.*, 1996, **124**, 643-650.
309. HERWALD B.L., KJEMTRUP A.M., BARNES R.C., CONRAC P.A., WILSON M., MCCARTHY M.G., SAYERS M.H., EBERHARD M.L. Transfusion-Transmitted babesiosis: first-reported case caused by a WA1-type parasite. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1996, **55**, n° 332, 209.
310. JACQUEMIN J.L., TANZER J. Infection humaine à piroplasmes dans les suites immédiates de splénectomie efficacité clinique de la chloroquine. Congrès de la Soc. Fr. Parasitol., Nancy, 1978.
311. JACQUEMIN J.L., BAZIN C., LAMI C., CHUBILLEAU C., BARALE TH., DAUDAL P., DUHAMEL C. Babésiose (ou piroplasmose) humaine à propos de trois observations récentes en France. *Maghreb Inform. Med.*, 1980, **2**, 31-38.
312. KRAUSE P.J., TELFORD S.R., RYAN R., CONRAD P.A., WILSON M., THOMFORD J.W., SPIELMAN A. Diagnosis of babesiosis : Evaluation of a serologic test for the detection of *Babesia microti* antibody. *J. Infect. Dis.*, 1994, **169**, 923-926.
313. L'HOSTIS M. Aspects vétérinaires des maladies transmises par les tiques: exemple de la babesiose bovine à *Babesia divergens*. *Méd. Mal. Infect.*, 1998, **28**, 359-362.
314. LOUTAN L., ROSSIER J., ZUFFEREY G., CUENOD D., HATZ C., MARTI H.P., GERN L. Imported babesiosis diagnosed as malaria. *Lancet*, 1993, **342**, 749.
315. MILLER L.H., NEVA F.A., GILL F. Failure of chloroquine in human babesiosis (*Babesia microti*). Case report and chemotherapeutic Trials in hamsters. *Annal. Intern. Med.*, 1978, **88**, 200-202.
316. ONG K.R., STAVROPOULOS C., INADA Y. Babesiosis, asplenia, and AIDS. *Lancet*, 1990, **8707**, 112.
317. PERSING D.H., HERWALDT B.L., GLASER C., LANE R.S., THOMFORD J.W., MATHIESEN D., KRAUSE P.J., PHILLIP D.G., CONRAD P.A. Infection with a babesia-like organism in Northern California. *N. Engl. J. Med.*, 1995, **332**, 298-303.
318. PURNELL R.E., LEWIS D. Babesiosis in man. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1980, **74**, 283.
319. RUEBUSH T.K., CASSADAY P.B., MARSH H.J., LISKER S.A., VOORHEES D.B., MAHONEY E.B., HEALY G.R. Human babesiosis on Nantucket Island. *Ann. Intern. Med.*, 1977, **86**, 6-9.

320. RUEBUSH T.K., SPIELMAN A. Human babesiosis in the United States. *Intern. Med.*, 1978, **88**, 263.
321. SCHARFMAN W.B., TAFT E.G. Nantucket fever an additional case of babesiosis. *J.A.M.A.*, 1977, **238**, 1281-1282.
322. SCHOLTENS R.G., BRAFF E.H., HEALY G.R., GLEASON N. A case of babesiosis in man in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1968, **17**, 810-813.
323. SKRABALO Z., DEANOVIC Z. Piroplasmosis in man. Report on a case. *Doc. Med. Geogr. Trop.*, 1957, **9**, 11-16.
324. STAHL W., JACKSON R., TUREK G., GAAFAR H.A. Babesiosis : Malaria mimic. *A. J. Med. Technology.*, 1978, **44**, 572-574.
325. STAHL W., JACKSON R., ZAKI M.H., TUREK G., GAAFAR H.A. Babesiosis. First case in New York State. *New York State J. Med.*, 1978, **78**, 642-644.
326. VARACHE C., DELILLE F., GORENFLOT A., MARMONIER A., HAAS C. Un nouveau cas de babésiose humaine au Mans. *Méd. Mal. Infect.*, 1986, **2**, 93-94.
327. WESTERN K.A., BENSON G.D., GLEASON N.N., HEALY G.R., SCHULTZ M.G. Babesiosis in a Massachusetts resident. *New Eng. J. Med.*, 1970, **283**, 854-856.
328. WILLIAMS H. Human babesiosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1980, **74**, 157.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES FILARIOSES SANGUICOLES

Les filarioses sont des affections parasitaires sévissant dans les pays chauds, elles sont dues à des nématodes, vers cylindriques appelés filaires en raison de la ressemblance des adultes avec un fil et vivent soit dans le tissu sous-cutané, soit dans le mésentère, ou dans les vaisseaux lymphatiques. Ces affections sont accompagnées habituellement d'une éosinophilie sanguine plus ou moins élevée.

Les adultes femelles sont ovovivipares et pondent des embryons. La mise en évidence de ces embryons appelés **microfilaires** permet le diagnostic de certitude de la maladie.

Les microfilaires restent dans le tissu sous-cutané pour *Onchocerca volvulus* et *Dipetalonema streptocerca* tandis qu'elles gagnent le sang pour les autres espèces rencontrées chez l'homme, ce sont les microfilaires sanguicoles de : *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Loa loa*, *Mansonella perstans*, *Mansonella ozzardi* et autres espèces plus rares. À titre exceptionnel, on peut trouver des microfilaires *Onchocerca volvulus* dans le sang.

Le diagnostic biologique de certitude des filarioses à microfilaires sanguicoles se fait en deux temps :

- Recherche des microfilaires dans le sang,
- Identification de l'espèce en cause par l'étude morphologique après coloration.

Dans certains cas particuliers que nous préciserons plus loin, il sera nécessaire de pratiquer une numération de microfilaires. Quant au diagnostic sérologique ce ne peut être qu'un élément d'appoint.

PRÉLÈVEMENTS

Horaire : en principe, on effectue un prélèvement à midi et un autre à minuit afin de pouvoir rechercher les microfilaires de périodicités différentes (voir périodicité page 217). L'emploi d'une technique de concentration permet de ne faire qu'un prélèvement diurne en début de matinée dans la plupart des cas.

Prélèvement : a) au doigt

Faire plusieurs préparations pour l'examen direct à frais. Les premières gouttes de sang sont considérées comme les plus riches, surtout pour les filarioses lymphatiques. Faire plusieurs gouttes épaisses (par exemple, trois lames avec goutte épaisse sur chaque lame).

b) sur anticoagulant

Il est recommandé de faire systématiquement un prélèvement sur anticoagulant :

- soit sur complexon = EDTA,
- soit sur citrate de soude liquide (citrate de soude à 0,106 mol/l, soit 3,13 % : 1 ml, sang qsp 10 ml dans un tube à prélèvement pour étude de la coagulation).

Ces proportions précises permettent, au cas où l'on doit faire une numération de microfilaires, de tenir compte de la dilution qui ici est au 1/10^e.

Sur complexon et sur citrate, les microfilaires de *Loa loa*, *W. bancrofti*, *M. perstans* restent vivantes au moins trois semaines à + 4 °C, ce qui permet, en cas de nécessité, de différer les examens.

Les autres anticoagulants sont à déconseiller car :

- l'héparine provoque souvent une agglutination des microfilaires, principalement de *Wuchereria bancrofti* mais aussi de *Loa loa*.
- le fluorure de sodium les tue immédiatement.
- l'oxalate de sodium les tue aussi, mais en 24 à 48 heures.

Autres prélèvements

Les microfilaires *W. bancrofti* et *B. malayi* sont également recherchées dans l'urine, les liquides d'hydrocèle et l'ascite. On trouve assez fréquemment aussi les microfilaires *O. volvulus* dans les urines.

TECHNIQUES DE RECHERCHE DES MICROFILAIRES

a) à frais

La recherche des microfilaires à frais se fait par l'examen microscopique direct entre lame et lamelle du sang total.

On utilise :

- soit une goutte de sang prélevée au bout du doigt et examinée immédiatement,
- soit le sang prélevé sur anticoagulant, dont l'examen peut éventuellement être différé.

Déposer une goutte de sang de taille moyenne sur une lame. La recouvrir d'une lamelle. Attendre un moment pour que les « courants » cessent.

Examiner au microscope avec un objectif de faible grossissement × 25 ou × 10 pour les personnes entraînées.

Il faut parcourir systématiquement toute la préparation. Les microfilaires sont de grande taille 100 à 300 µm, elles sont mobiles provoquant par leur mouvement d'ondulation une agitation des globules rouges qui facilite leur repérage.

b) sur frottis mince

Les microfilaires peuvent être rencontrées fortuitement sur les frottis sanguins habituellement destinés à établir la formule leucocytaire examinés systématiquement, parce que le malade possède un nom de pays d'endémie et présente une éosinophilie sanguine.

Après coloration au May-Grünwald-Giemsa, on recherche les microfilaires par priorité dans les franges, surtout pour *Loa loa*, puis sur les bords du frottis, et enfin à l'intérieur du frottis où elles sont plus rares. Pour *M. perstans*, la répartition sur l'ensemble du frottis est plus régulière.

En pratique, on recouvre le frottis d'une mince couche d'huile à immersion et on le parcourt avec un objectif à faible grossissement.

On identifie ensuite les éléments trouvés en passant à l'objectif à immersion.

c) culture de microfilaires

Les essais de culture de microfilaires ont abouti à une survie ou à un début d'évolution des embryons sans jamais atteindre le stade adulte (330, 355 et 357). Les cultures n'aboutissent toujours qu'à un développement partiel des différents stades (353). Il n'y a pas multiplication, si bien que ces procédés de culture n'ont aucun intérêt pour le diagnostic biologique pratique.

d) après concentration

Les microfilaires sont dans certains cas si rares que l'examen direct d'une goutte de sang, ou à plus forte raison, l'examen d'un frottis mince ne permet pas toujours de mettre en évidence le parasite. Une concentration est alors indiquée.

Les méthodes de concentration de microfilaires sont nombreuses et de valeurs inégales. Une bonne technique (342) doit viser à :

- permettre de traiter une quantité appréciable de sang (plusieurs millilitres),
- concentrer dans le plus petit volume possible le plus grand nombre de microfilaires et, si possible, toutes les microfilaires,
- ne pas altérer leur morphologie afin de permettre leur coloration et la détermination des espèces,
- préserver leur vitalité pour faciliter leur recherche à l'examen direct entre lame et lamelle grâce à leur mobilité intacte. Les modalités de leur mobilité peut être un élément de diagnostic d'appoint pour quelqu'un d'entraîné.
- ne faire appel qu'à des réactifs simples et être de réalisation facile et rapide.

TECHNIQUES DE CONCENTRATION

Techniques utilisant le sang non hémolysé

La technique de triple centrifugation de Martin, Lebœuf et Roubaud est irrégulière et d'un rendement très minime.

L'étude de la couche leucocytaire entre lame et lamelle après sédimentation pendant 24 heures de 1 ml de sang (352) met à profit la faible différence de densité entre microfilaires et globules blancs. Elle est simple mais d'un rendement modéré.

Lors de la recherche de cellules de Hargraves, on peut, en raison de ces densités voisines, trouver quelques microfilaires chez les malades qui auraient été suspectés de péri-artérite noueuse en raison d'une éosinophilie sanguine élevée.

Techniques par hémolyse

Les techniques usuelles appartiennent à cette catégorie et ont pour principe commun, l'élimination des globules rouges par hémolyse et la concentration des microfilaires dans le sédiment ou le culot leucocytaire. Les unes provoquent la mort des microfilaires et sont ainsi moins favorables que les autres qui conservent la vitalité des embryons.

a) Techniques qui tuent les microfilaires

La plus ancienne de ces méthodes est celle de la goutte épaisse, toujours employée, très simple, mais qui a l'inconvénient de n'étudier qu'une faible quantité de sang, c'est-à-dire 10 à 20 microlitres (voir page 32).

Technique de Knott (344)

1 millilitre de sang prélevé à la veine est immédiatement mélangé à 9 ml de formol à 2 p. 100. Laisser sédimenter 24 heures. Cette méthode est à retenir parce que le formol fixe les microfilaires en extension, ce qui en permet la mensuration. Cette solution à 2 % permet également la numération des microfilaires (voir page 270).



Photo n° 185 : Microfilaires Loa loa. Cytoconcentration. Coloration M.G.G. Obj. × 25.

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

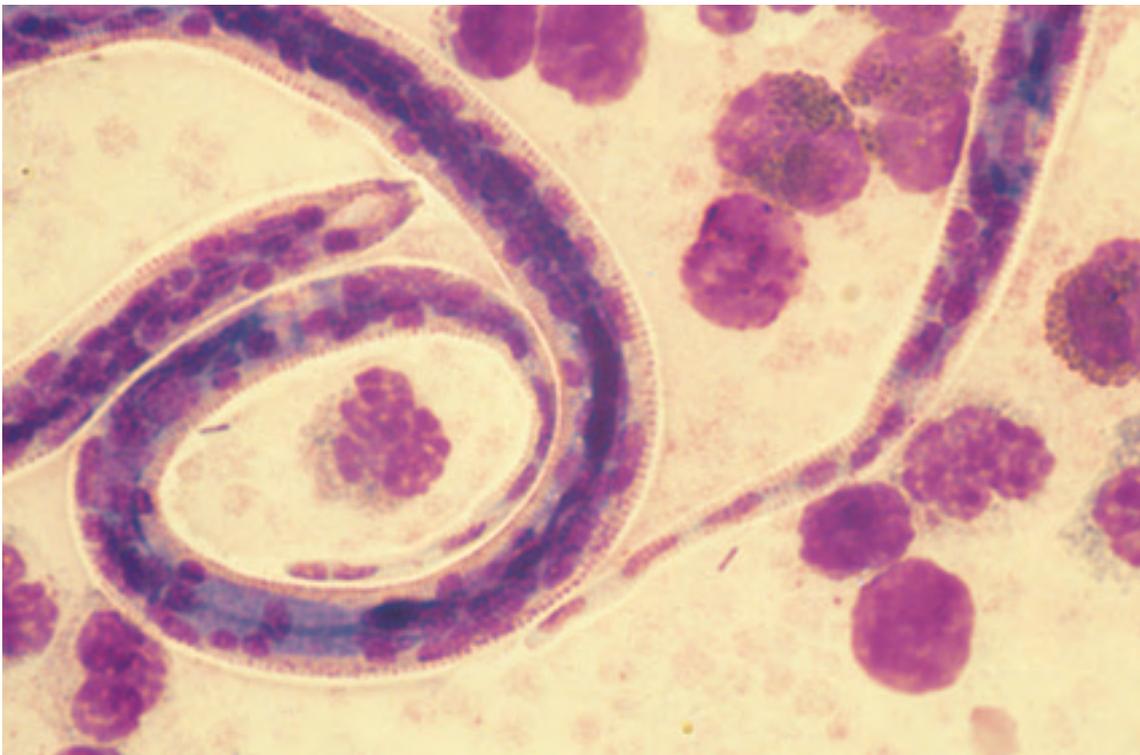


Photo n° 186 : Microfilaires Loa loa. Cytoconcentration. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

Il est courant de trouver grâce à cette méthode quelques microfilaries de *Wuchereria bancrofti* ou de *Mansonella perstans* dans le culot de centrifugation de 5 ml de sang, ce qui est impossible avec une goutte épaisse dont le volume est d'une dizaine de microlitres. Un tel résultat est parfois aussi obtenu pour les microfilaries *Loa loa*. Mais il est possible aussi, chez les malades présentant une symptomatologie clinique caractéristique de loase, que des concentrations répétées restent négatives. Ceci semble correspondre à une immunité élective vis-à-vis des microfilaries de cette espèce (342). Il faut alors recourir à la sérologie.

Si les microfilaries n'ont été observées qu'après concentration, faire plusieurs étalements avec le culot puis les colorer au May-Grünwald-Giemsa. Les étalements trop épais se colorent très mal et la détermination risque d'être difficile.

■ ÉOSINOPHILIE

Les filaires sont des helminthes, et comme l'ensemble des helminthes parasites de l'Homme, provoquent une éosinophilie sanguine qui suit la courbe de Lavier (345, 346 et 351) (Figure 4).

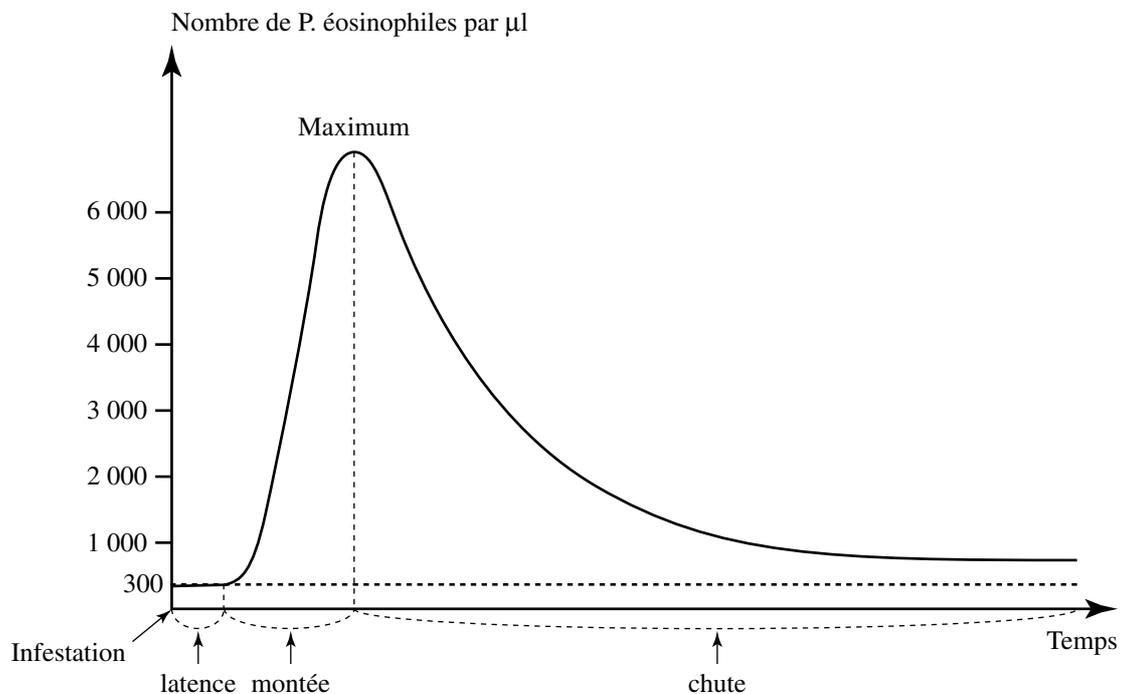


Figure 4 : Courbe de l'évolution de l'éosinophilie des helminthiases en fonction du temps (345).

Il est à souligner que l'éosinophilie parasitaire revient à la normale un certain temps après l'infestation alors que les parasites, ici les microfilaries dans le sang, sont encore présents dans l'organisme humain. Cela explique que la présence de microfilaries s'accompagne souvent d'une hyperéosinophilie mais pas toujours, surtout dans les cas d'infestation ancienne. Dans les filarioses lymphatiques au stade d'éléphantiasis, l'éosinophilie a souvent disparu, d'autant plus qu'une surinfection bactérienne s'ajoute souvent à ce stade. Les filarioses à *M. perstans* sont peu (ou pas) éosinophilogènes.

Le traitement de la filariose entraîne dans les heures qui suivent son début, une éosinopénie puis une augmentation de l'éosinophilie une dizaine d'heures après (337).

■ IDENTIFICATION DES MICROFILAIRES

Nous étudions successivement :

- les techniques de coloration des microfilaires,
- la mensuration des microfilaires,
- la morphologie générale des microfilaires,
- les critères d'identification des microfilaires,
- la morphologie des différentes espèces de microfilaires.

TECHNIQUES DE COLORATION

a) Goutte épaisse : pour leur confection (voir page 32).

– coloration au Giemsa : laisser sécher la goutte épaisse à plat et à l'air pendant 24 heures à la température du laboratoire, ou en cas d'urgence, pendant 2 heures à l'étuve à 37 °C. Si on laisse sécher à l'air, recouvrir la lame avec un couvercle de boîte de Pétri, par exemple, pour la préserver des mouches et autres insectes.

Déshémoglobiner pendant 5 minutes à l'eau distillée ou à l'eau du robinet en mettant la lame soit verticale dans un petit verre à pied, ou un tube de Borrel, soit horizontale, sur un portoir.

Sécher à la température du laboratoire

Fixer à l'alcool méthylique 2 à 5 minutes **Indispensable** (photos n° 187 et 188)

Sécher de nouveau.

Colorer avec la solution de Giemsa à 3 p. 100 dans l'eau tamponnée à pH 7-7,3 pendant 15-20 minutes. On peut comme pour les *Plasmodium* utiliser une eau minérale à pH 7,2 l'eau d'Evian® source Cachat par exemple.

Laver avec précaution car les gouttes épaisses se décolent très facilement. Sécher.

Variante : si l'on ne dispose pas d'alcool méthylique, faire un May-Grünwald-Giemsa sur goutte épaisse préalablement déshémoglobinisée et séchée.

Coloration par l'hémalun-éosine ou par la méthode Harris Shorr (349).

Déshémoglobiner → Sécher → Fixer à l'alcool méthylique → Colorer.

L'intérêt de ces deux méthodes est de colorer constamment la gaine des microfilaires. Ce sont des méthodes couramment employées par les anatomo-pathologistes, à qui l'on peut demander de colorer un frottis en cas de doute sur la présence d'une gaine.

b) Frottis mince : coloration au May-Grünwald-Giemsa voir page 28.

c) Colorations vitales : utilisées depuis longtemps pour l'étude des microfilaires, les colorations vitales sont peu employées en pratique courante. Nous les indiquerons brièvement car elles peuvent être utilisées combinées avec une méthode de concentration préservant la vitalité des microfilaires.

– Principes généraux : (335) Utiliser les colorants à très faible concentration en solution dans l'eau salée à 9 p. 1000, légèrement alcalinisée par un cristal de carbonate de sodium ou de lithium ou encore neutralisée par un tampon de phosphate de Sorënsen.

Sur lame, mélanger une goutte de la solution et une goutte de sang ou de culot de concentration contenant des microfilaires vivantes.



Photo n° 187 : Microfilaires Loa loa. Goutte épaisse non fixée. Mauvaise coloration au Giemsa direct. Obj. × 40.

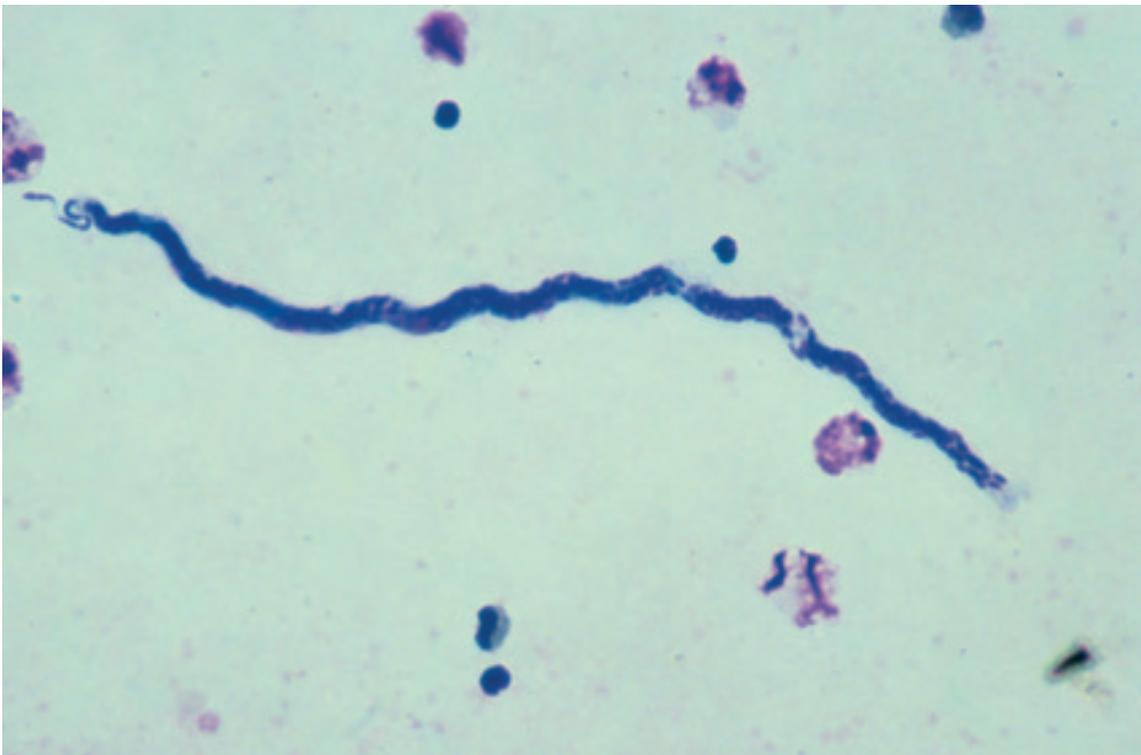


Photo n° 188 : Microfilaires Loa loa. Goutte épaisse. Bonne coloration M.G.G. Obj. × 40.

- Colorants usuels
 - rouge neutre à 1 p. 2000 (31 et 335)
 - bleu de méthylène à 1 p. 5000 (356) (photo n° 203)
 - azur II à 1 p. 3000 (335 et 354).

– Résultats – Lecture au microscope. Le rouge neutre colore les vacuoles et le corps interne (qui est une vacuole de réserves protidiques). Le bleu de méthylène et l'azur II colorent les cellules excrétrices et génitales puis les cellules sous-cuticulaires.

MENSURATION DES MICROFILAIRES

On peut employer la méthode de concentration de Knott, 1939 (344) (voir les méthodes de concentration page 209) puis les mesurer au micromètre oculaire étalonné.

En pratique courante, on peut simplement chercher dans les franges des frottis ou, en goutte épaisse, les microfilaries en extension et les mesurer directement au micromètre oculaire. Les résultats obtenus alors, sont toujours inférieurs à ceux après fixation humide par le formol.

MORPHOLOGIE GÉNÉRALE DES MICROFILAIRES (figure 5)

Taille : variable, les espèces à gaine sont plus grandes (220 à 320 µm sur 5 à 8 µm de large) que les espèces sans gaine (100 à 200 µm de long sur 4 à 6 µm de large).

Pour une espèce, les microfilaries les plus grandes seraient les plus âgées (347).

Gaine : présente dans certaines espèces comme *Loa loa*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, elle est absente dans d'autres notamment *Mansonella perstans*, *Mansonella ozzardi*. La gaine est une membrane ovulaire visible surtout aux extrémités antérieure et postérieure où elle dépasse largement le corps de l'embryon.

La microfilarie peut se déplacer longitudinalement dans la gaine « comme dans une sorte de fourreau » (331) si bien que la longueur de la partie de la gaine dépassant l'extrémité antérieure ou postérieure du corps de la microfilarie est variable, donc sans valeur diagnostique. Les microfilaries sans gaine, *Mansonella perstans* et *Mansonella ozzardi* l'ont perdue.

Cuticule elle constitue la paroi externe du corps de la microfilarie. Elle est striée transversalement dans toutes les espèces, ces stries peuvent être parfois vues après coloration au May-Grünwald-Giemsa, surtout pour *Mansonella ozzardi*, mais il est habituellement nécessaire de recourir à l'imprégnation argentique pour les mettre en évidence (332).

Espace céphalique c'est la partie libre de noyau située entre l'extrémité antérieure arrondie de la cuticule et le premier noyau somatique.

Noyaux somatiques non séparés par une paroi cellulaire, constituent une colonne de plusieurs rangées (2 ou 3) se chevauchant plus ou moins selon l'espèce, tout le long du corps de la microfilarie. Leur forme et leur espacement sont importants à étudier.

Noyaux sous-cuticulaires sont allongés, espacés, au nombre de 10 à 20 et disposés juste au contact de la cuticule. Ils n'existent pas chez toutes les espèces.

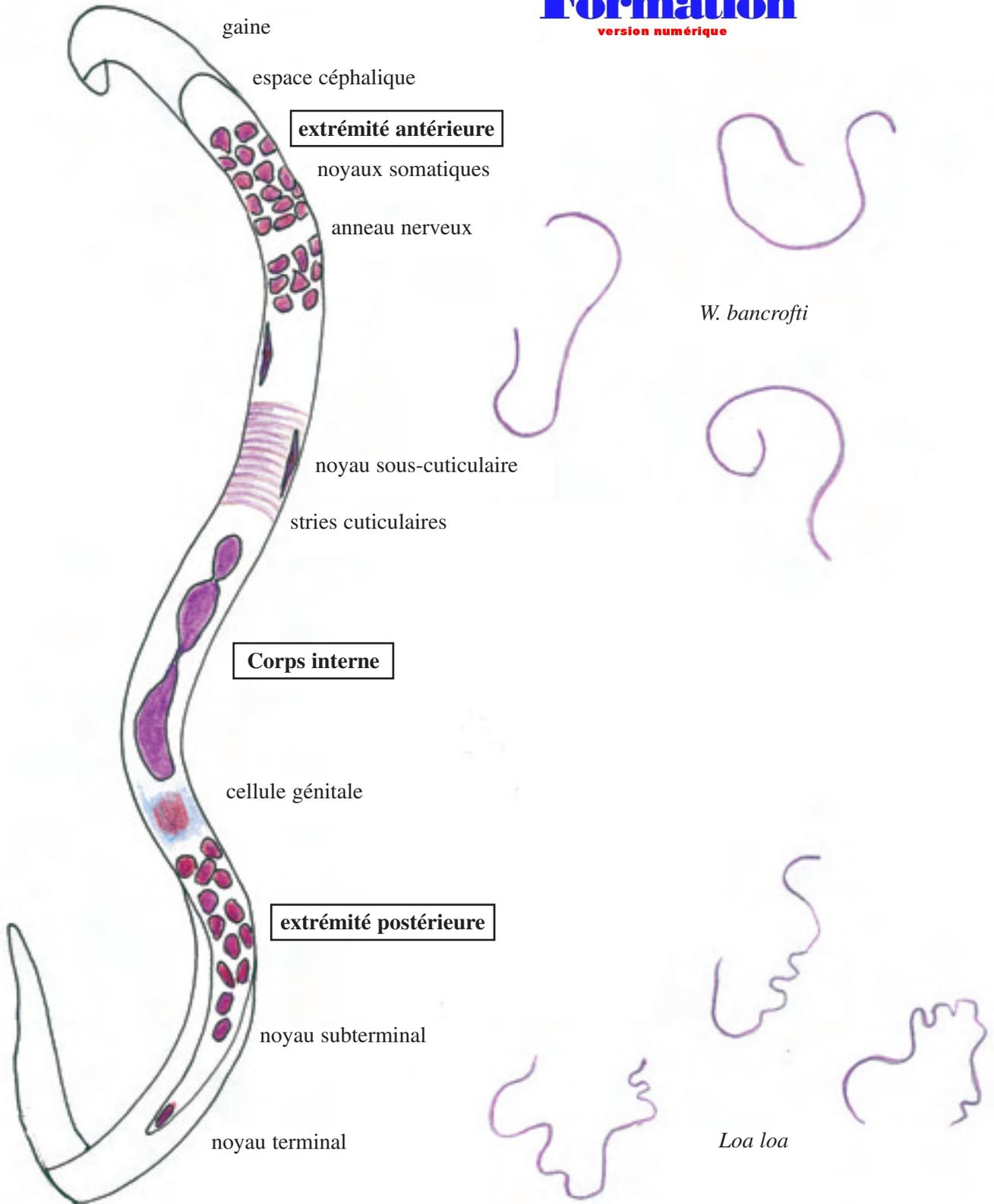


Figure 5 : Schéma des organes d'une microfilaire (Fülleborn).

Schéma de l'attitude des microfilaries en goutte épaisse.

Corps interne ou corps central de Manson, de 30 à 35 µm de long à frais chez *Wuchereria bancrofti* (330). C'est un élément allongé, coloré en rouge vif par le May-Grünwald-Giemsa, non coloré par l'hémalun-éosine et le Harris-Shorr et situé au début de la deuxième moitié du corps. Il serait constitué par les restes des vacuoles alimentaires protidiques ovulaires. Il n'est visible que dans certaines espèces.

Dernier noyau et extrémité postérieure : le dernier noyau somatique peut être situé à la terminaison de la cuticule = noyau terminal ou à une certaine distance = noyau subterminal. Sa forme est variable. L'extrémité postérieure finale de la cuticule peut être arrondie ou effilée. **Ces deux éléments sont caractéristiques de l'espèce.**

Autres structures : L'anneau nerveux, le pore excréteur et la cellule sécrétrice, les cellules anales et le pore anal sont les ébauches de différentes formations de l'adulte, surtout étudiées par les auteurs allemands (333).

Ce sont des éléments plus difficiles à voir présentant des différences minimales selon les espèces. Sur le plan du diagnostic biologique courant leur intérêt est faible.

CRITÈRES D'IDENTIFICATION DES MICROFILAIRES

a) La périodicité c'est le phénomène par lequel les microfilaires sont retrouvées dans le sang périphérique seulement la nuit, il s'agit alors de périodicité nocturne, ou seulement le jour on parle de périodicité diurne.

Les espèces ne la présentant pas, c'est-à-dire pour lesquelles la microfilarémie est constante tout le long du nyctémère sont dites apériodiques.

La périodicité des espèces périodiques n'est pas toujours stricte et n'a pratiquement pas de valeur diagnostique tant les variations sont grandes. Par exemple, les microfilaires de *Wuchereria bancrofti* ont, en principe, une périodicité nocturne, mais plusieurs réserves sont à faire sur ce point :

Il existe, en Polynésie, une variété de *W. bancrofti* apériodique transmise par les *Aedes* (343).

Les microfilaires d'Afrique et des Antilles n'ont pas une périodicité nocturne nette, tout au moins chez les sujets examinés en France.

Chez un malade couché, cette périodicité peut disparaître et même s'inverser (359).

Lorsque les microfilaires nocturnes sont nombreuses, il est bien évident qu'il en persiste dans le sang le jour en quantité d'autant plus grande que la microfilarémie nocturne est plus importante c'est le cas de *Loa loa* en particulier.

Les deux premières remarques sont valables pour les autres espèces périodiques. Néanmoins, malgré ces restrictions, l'origine géographique ou les lieux de séjour du malade et les caractères cliniques peuvent orienter vers une espèce de filaire déterminée et justifier un prélèvement supplémentaire conforme à la périodicité de l'espèce suspectée, prélèvement qui a une chance de plus d'être positif.

b) la répartition géographique est par contre un bon critère de contrôle, ainsi *Loa loa* n'existe que dans une zone bien définie de l'Afrique. Son identification, par exemple chez un américain n'ayant jamais été en Afrique, constituerait une découverte scientifique surprenante. Cette répartition a été étudiée par Hawking F. et Denham (338, 339 et 340).

c) La morphologie

La gaine c'est un élément morphologique important, mais qui n'est pas toujours facile à mettre en évidence à frais et surtout après coloration au May-Grünwald-Giemsa. Elle est en effet souvent non colorée dans les gouttes épaisses.

Sa présence est donc un bon critère diagnostique, son absence n'a de valeur que si l'on a employé une coloration spécifique c'est à dire l'hémalun-éosine, ou l'Harris Shorr.

La taille est un élément utile, surtout si elle est mesurée aussi exactement que possible. Elle permet de distinguer :

- les petites microfilaires qui sont aussi, minces et sans gaine.
- les grandes microfilaires qui sont aussi, larges et avec gaine.

L'attitude : le corps de la microfilarie décrit des courbures principales qui, pour certaines espèces, sont compliquées d'ondulations secondaires dues à la rétraction de la cuticule (334). Cette attitude a une bonne valeur diagnostique à condition qu'elle soit observée dans les gouttes épaisses. Elle est sans valeur dans les frottis minces et dans les étalements de culot de centrifugation urinaire (336).

Les noyaux somatiques c'est essentiellement sur leur étude que doit reposer l'identification des microfilaires : forme, taille, rapports des noyaux de la colonne nucléaire et surtout forme et disposition des noyaux terminaux.

■ MORPHOLOGIE DES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE MICROFILAIRES

Nous allons étudier :

- les espèces de grande taille possédant une gaine :

Wuchereria bancrofti,
Brugia malayi,
W. bancrofti variété *vauceli*,
Loa loa.

- les espèces de petite taille, sans gaine :

Mansonella perstans,
Mansonella ozzardi.

- quelques autres espèces plus rares :

Brugia timori,
Brugia pahangi,
Meningonema peruzzii,
Dipetalonema semiclanum.

■ DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE DES MICROFILAIRES *LOA LOA*

**Tableau XIV : *Loa loa* – résultats des 12 tests du Contrôle National de Qualité français.
Le diagnostic différentiel se pose d'abord avec *Mansonella perstans*
(qui est souvent associé) ensuite avec *W. bancrofti*.**

DATE D'ENVOI	NOMBRE DE RÉPONSES	RICHESSSE*	RÉSULTATS CONFORMES	DEUXIÈME RÉPONSE	TROISIÈME RÉPONSE
11/1979	1 594	10 à 20	70,2 %	<i>Wuchereria bancrofti</i> 7,3 %	<i>Plasmodium</i> divers 5,9 %
06/1981	732	8 à 20	71,7 %	<i>Mansonella perstans</i> 4,3 %	Microfilaires divers 6,5 %
02/1984	1 078	2 à 50	80,5 %	<i>Mansonella perstans</i> 7,5 %	<i>Wuchereria bancrofti</i> 2,7 %
06/1984 **	1 134	1 à 20	78,6 %	<i>Mansonella perstans</i> 14,8 %	Microfilaires divers 3,8 %
03/1987	1 078	2 à 5	75 %	<i>Mansonella perstans</i> 8,5 %	Parasites divers 6,4 %
03/1991	1 088	1 à 10	70,6 %	<i>Mansonella perstans</i> 8,8 %	<i>Wuchereria bancrofti</i> 5,3 %
04/1994	1 196	1 à 5	81,8 %	<i>Mansonella perstans</i> 6,4 %	<i>Wuchereria bancrofti</i> 3,7 %
11/1996	1 307	10 à 50	78,5 %	<i>Mansonella perstans</i> 9 %	<i>Wuchereria bancrofti</i> 3,7 %
06/1998	1 297	10 à 30	80,2 %	<i>Mansonella perstans</i> 6,8 %	<i>Wuchereria bancrofti</i> 5,6 %
10/1998 (Bioforma)	3 788	5 à 20	79,9 %	<i>Mansonella perstans</i> 7,7 %	<i>Mansonella ozzardi</i> 3,2 %
10/1999	1 332	5 à 30	77,5 %	<i>Mansonella perstans</i> 11,3 %	<i>Wuchereria bancrofti</i> 3,8 %
05/2000 **	1 283	1 à 20	78,6 %	<i>Mansonella perstans</i> 19,9 %	<i>Wuchereria bancrofti</i> 2,6 %

* Richesse moyenne de microfilaires par frottis.

** Présence de quelques microfilaires de *Mansonella perstans* dans une partie des frottis envoyés.

Épidémiologie : c'est un taon, aux ailes tachetées de brun, aux volumineux yeux verts, à l'abdomen rouge, le Chrysops, qui transmet cette filariose. Seule la femelle est hématophage, elle pique le jour et prélève alors chez un porteur des embryons = microfilaires présentes dans le sang périphérique le jour, qui ne deviendront infestantes qu'après une dizaine de jours d'évolution sans multiplication.

A l'occasion de la piqûre d'un homme sain, piqûre peu douloureuse, les microfilaires infectieuses quittent la trompe de l'insecte pour venir s'installer sous la peau, où elles deviennent progressivement adultes.

Cycle : il n'y a pas de réservoir d'origine animal dans les conditions habituelles, bien que *Loa papionis* du singe (mandrill et cercopithèque) soit identique à *Loa loa*, il s'agit en fait d'espèces jumelles (369).

Répartition géographique : c'est une espèce uniquement africaine qui ne s'observe que dans la partie occidentale de l'Afrique tropicale : Cameroun, Gabon, Congo, Zaïre, Nord-Ouest de l'Angola, Nigeria, Sud du Soudan de la République Centrafricaine, du Tchad, rares cas au Bénin et en Ouganda.

Manifestations cliniques : elles sont désagréables, mais sans gravité en général.

L'ŒDÈME DE CALABAR (photo n° 189)

- son apparition est précédée de fourmillements.
- il siège volontiers aux mains, mais aussi en n'importe quel autre endroit du corps.
- il est prurigineux et entraîne une gêne des mouvements quand il siège au niveau d'une articulation.
- sa durée est de quelques heures à quelques jours, puis il disparaît sans séquelles, pour réapparaître quelques jours, quelques mois ou quelques années plus tard à une autre place, ce qui lui vaut le nom d'œdème ambulante.

MIGRATIONS VISIBLES DES FILAIRES ADULTES sous la peau (photo n° 190).

- le tracé est serpentineux, progresse rapidement.
- disparaît brusquement, après quelques heures.

La migration sous conjonctival permet de voir directement le ver et donc de faire un diagnostic de certitude.

COMPLICATIONS

- complications rénales, consistant en une albuminurie isolée, très rarement sévères.
- complications cardiaques, à type d'endocardite fibroblastique de Loeffler, également rares.
- pratiquement, une seule complication grave est à redouter, l'encéphalite thérapeutique (voir page 221).

Aspect à frais : la microfilare est animée de mouvements d'ondulation comme un serpent et quitte rapidement le champ microscopique, ses mouvements sont efficaces. La gaine est en général non visible, plaquée contre le corps, parfois elle apparaît à l'extrémité antérieure comme un dard, les deux faces accolées l'une à l'autre.

Périodicité : diurne avec maximum vers midi.

Association : dans environ 1 cas sur 5 de microfilarémie à *Loa loa*, on constate une association avec *M. perstans*.

Attitude en goutte épaisse : sinueuse, les courbures primaires sont compliquées d'ondulations secondaires (différence avec *W. bancrofti*) (photos n° 191 et 192).

Taille : du corps des microfilaires sans la gaine : humide après fixation au formol (371).

Longueur moyenne : 301,5 µm (de 280 à 330)

Largeur moyenne : 7 µm

Gaine : bien colorée par l'hémalun ou le Harris Shorr, elle ne l'est jamais en goutte épaisse et parfois seulement en frottis par le Giemsa. Cette difficulté de mise en évidence de la gaine explique sans doute les erreurs de diagnostic avec *Mansonella perstans* (voir tableau XIV page 219) (photos n° 193 et 194).

Espace céphalique : court, de l'ordre de 4-6 µm, inférieur à la largeur du corps (photo n° 195)

Corps interne : le corps interne est visible chez 80 % des microfilaires *Loa Loa* en frottis colorés à pH 7,2 mais pas en goutte épaisse. Il se présente rarement sous forme d'une masse unique allongée, le plus souvent il est moniliforme avec 2 à 5 renflements, et parfois réduit à des granulations plus ou moins nombreuses. Sa longueur est en moyenne de 34 µm. Il s'étend du milieu de l'embryon jusqu'à la cellule G 1. Comme chez *W. bancrofti*, il semble avoir un rôle de réserve nutritive. Sa coloration violet foncé est assez proche de celle des noyaux et il est beaucoup moins facile à voir que celui rouge vif des microfilaires de *W. bancrofti* (362) (photos n° 196 à 200).

Noyaux somatiques : ils sont gros, de forme irrégulière, ovalaires ou quadrangulaires, se chevauchant et difficiles à compter. Ils remplissent toute la largeur de la microfilarie et leur aspect permet de faire facilement la différence avec les noyaux des microfilaires de *W. bancrofti*. Ils sont colorés en violet par le Giemsa (photo n° 201).

En outre, il existe sur les bords des noyaux sous-cuticulaires au nombre d'une vingtaine, allongés, plus rouges, qui n'existent que dans cette espèce humaine et sont donc très caractéristiques (photos n° 202 et 203).

Dernier noyau et extrémité postérieure : le dernier noyau de forme allongée est situé à la partie tout à fait terminale de la microfilarie (bon caractère différentiel avec *W. bancrofti*). L'extrémité postérieure est souvent recourbée et se termine par une pointe émoussée, distincte seulement à l'immersion (photo n° 204).

L'encéphalite thérapeutique de la loase est connue depuis les années 1950 (360 et 377). Elle est due au traitement par la diéthylcarbamazine (notézine®), comme l'a montré Brumpt et coll. en 1966 (364). De très faibles doses de ce médicament sous corticothérapie n'évitent pas l'apparition de cette grave complication ; il en est de même de l'ivermectine (mectizan®) (363 et 368). Ces médicaments tuent les microfilaires et permettent ainsi leur lyse rapide, ce qui libère une neurotoxine (373 et 374). Cinq cas dont 2 mortels au Congo ont été publiés en 1991 (366). Cette grave complication est liée à la quantité de microfilaires présentes dans le sang, elle peut être évitée. Quand le nombre de microfilaires est supérieur à 500/20 µl soit 25/1 µl (365), il faut traiter prudemment le malade hospitalisé. Si le nombre de microfilaires est supérieur à 1 000/20 µl soit 50/1 µl, on procède à une exsanguino-transfusion (361) ou à une cytophérèse (367).

Pour le biologiste il est indispensable de faire la numération des microfilaires dès que leur nombre est important à l'examen direct du sang ou sur le frottis.



Photo n° 189 : Loase. Œdème de Calabar oculaire.



Photo n° 190 : Loase, filaire adulte (macrofilaire) sous la peau.

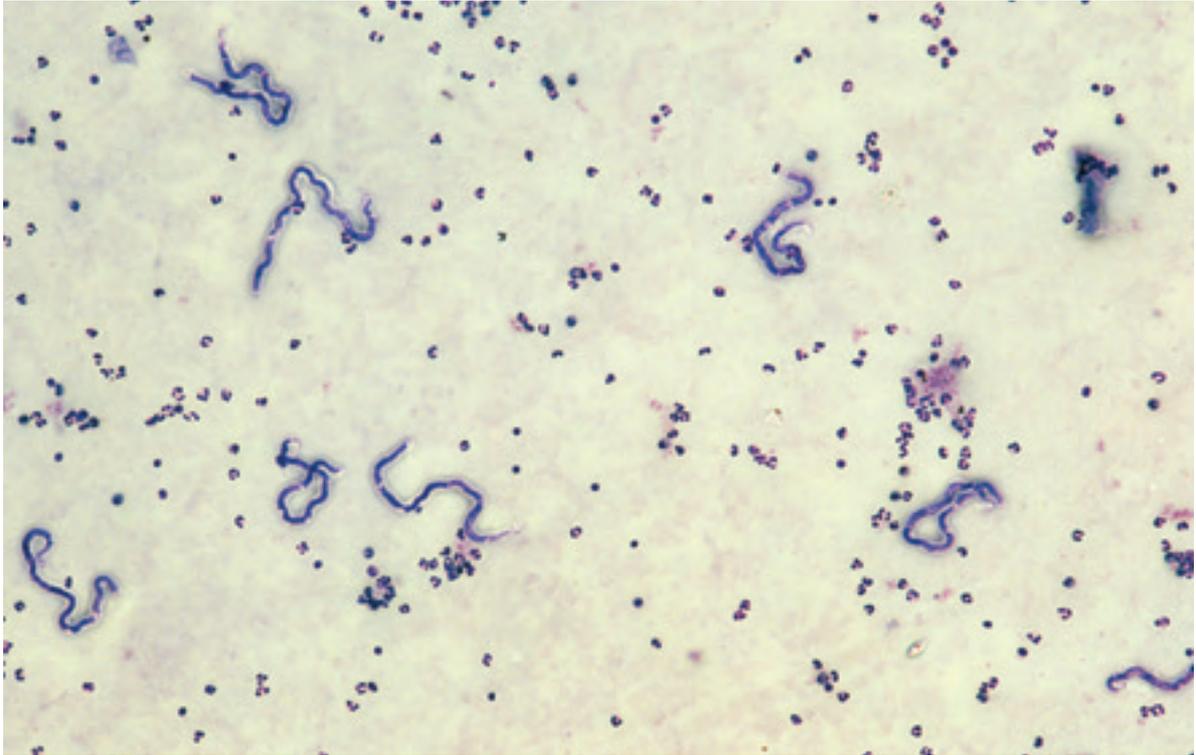


Photo n° 191 : Microfilaires Loa loa. Goutte épaisse. Attitude sinueuse. Coloration M.G.G. Obj. × 10.

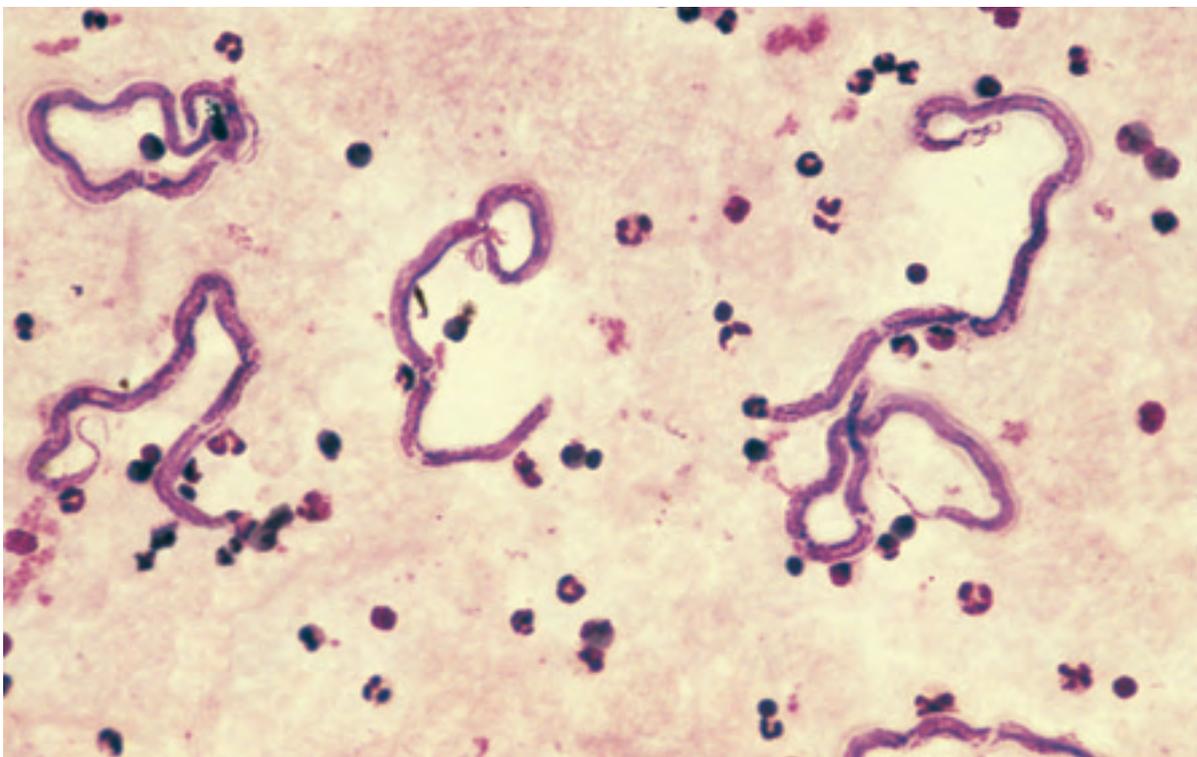
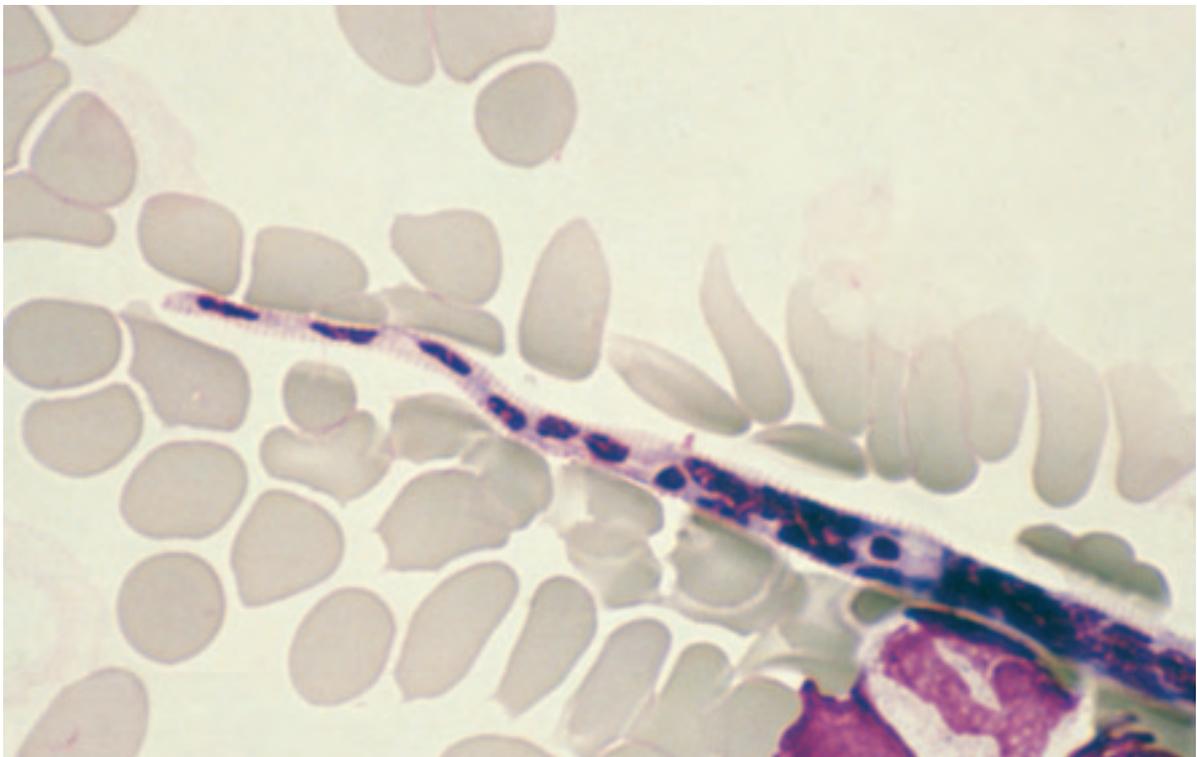


Photo n° 192 : Microfilaires Loa loa. Goutte épaisse. Attitude sinueuse. Noter l'hyperparasitémie. Coloration M.G.G. Obj. × 25.



*Photo n° 193 : Microfilaire Loa loa. Goutte épaisse. Gaine bien visible.
Coloration hématoxyline-éosine. Obj. × 100.*



*Photo n° 194 : Microfilaire Loa loa. Frottis. Gaine non colorée
mais dont on devine la présence par l'éloignement des hématies
du corps de la microfilaire. Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

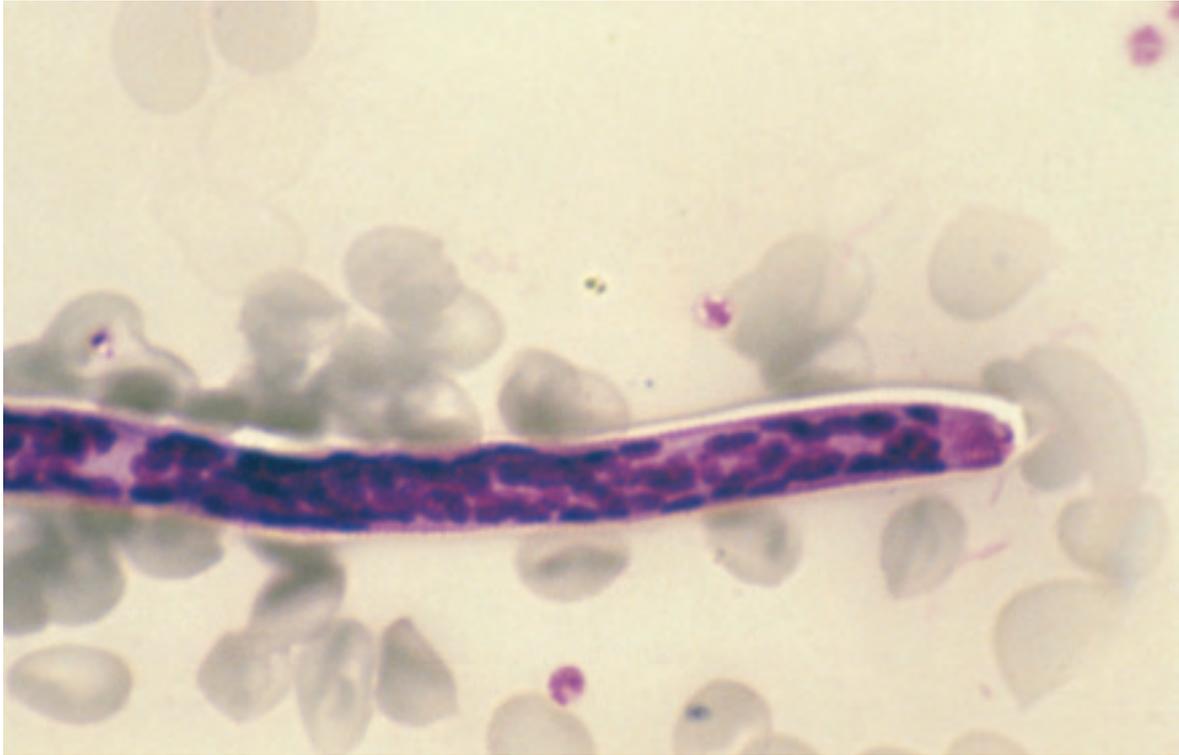


Photo n° 195 : *Microfilaire Loa loa*. Frottis. Extrémité antérieure.
Espace céphalique sans noyau, court, inférieur à la largeur du corps de la microfilaire.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.

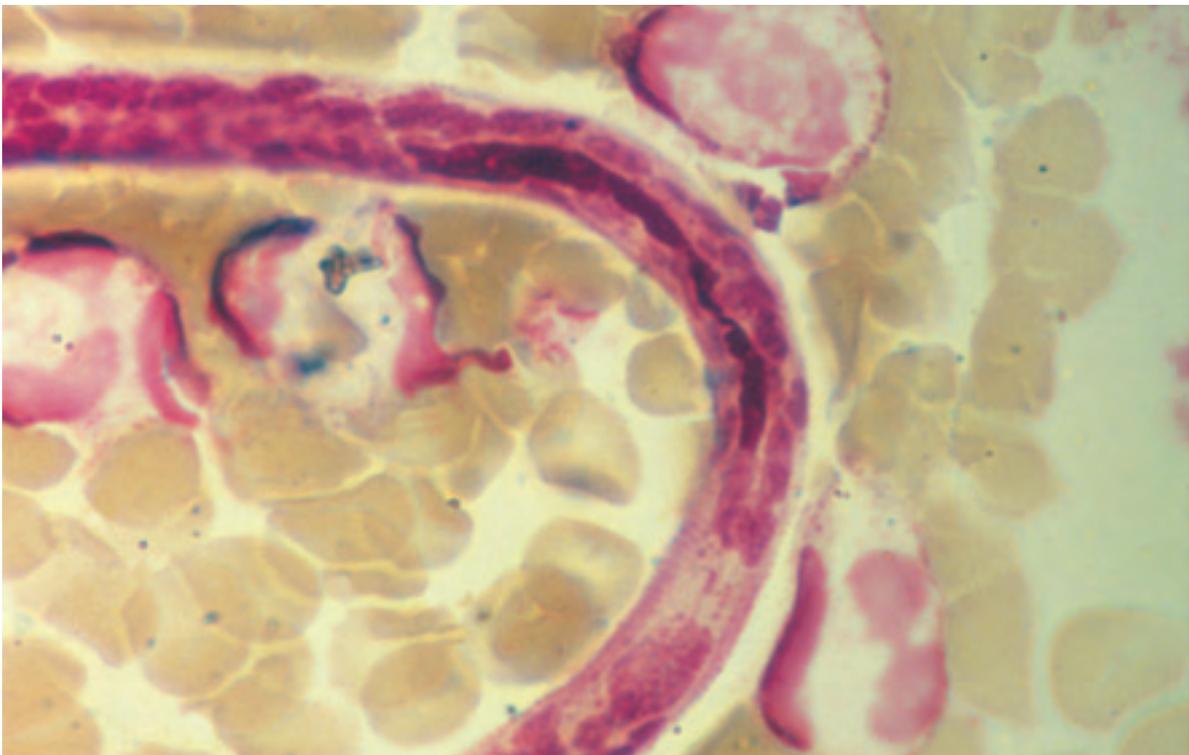
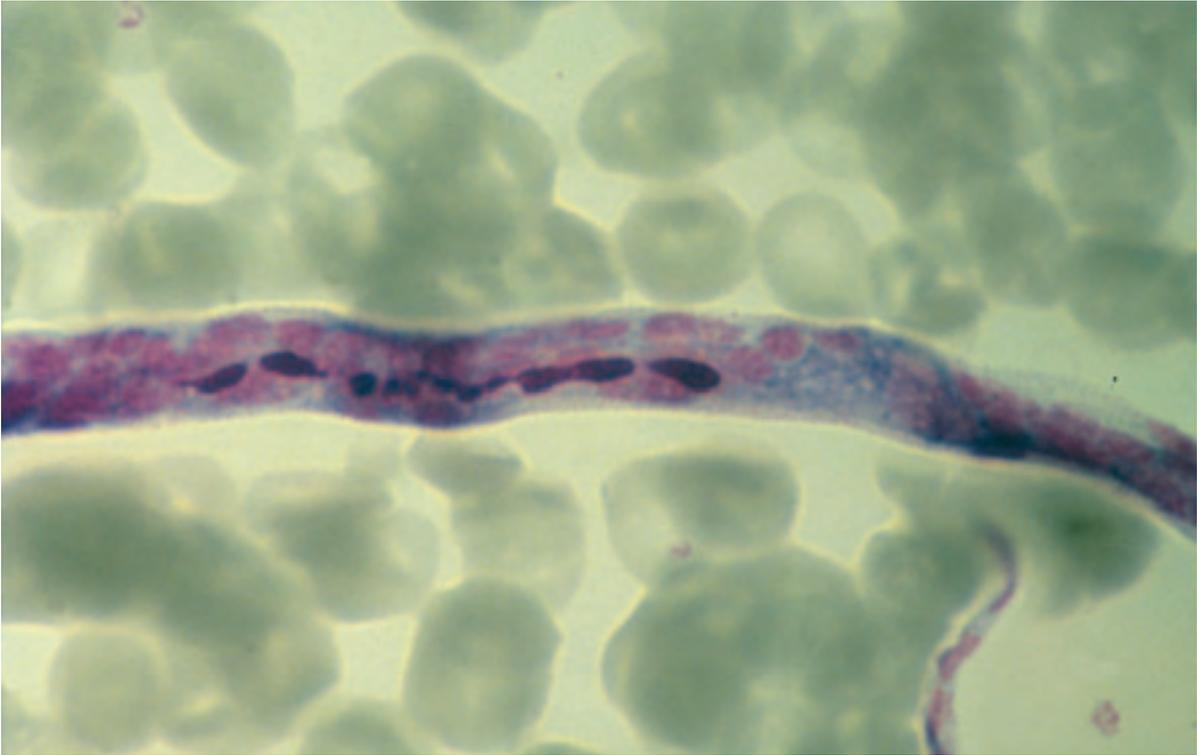
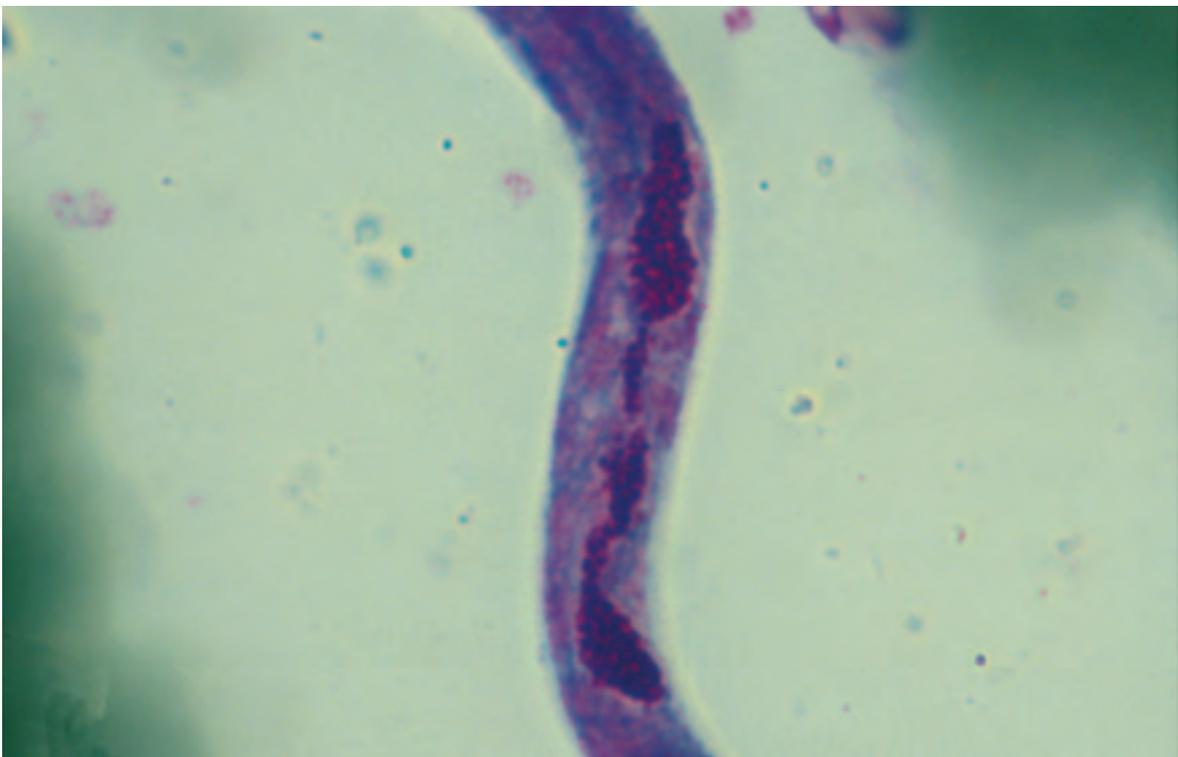


Photo n° 196 : *Microfilaire Loa loa*. Frottis. Corps interne en masse allongée bien visible.
Coloration May-Grünwald-Giemsa. Obj. × 100.



*Photo n° 197 : Microfilaire Loa loa. Frottis. Corps interne à 8 lobes séparés.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



*Photo n° 198 : Microfilaire Loa loa. Frottis. Corps interne constitué de granulations en amas.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

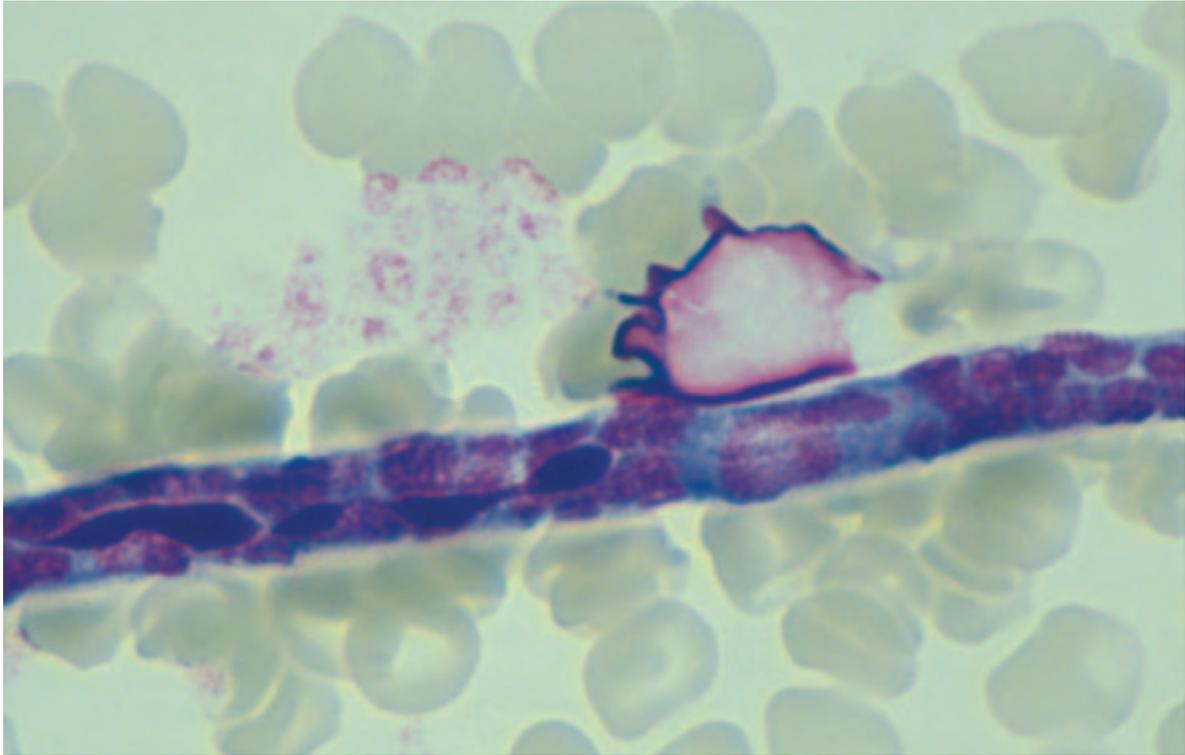


Photo n° 199 : *Microfilaire Loa loa*. Frottis. Corps interne à gauche.
Cellule génitale sous la cellule sanguine mononucléée. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

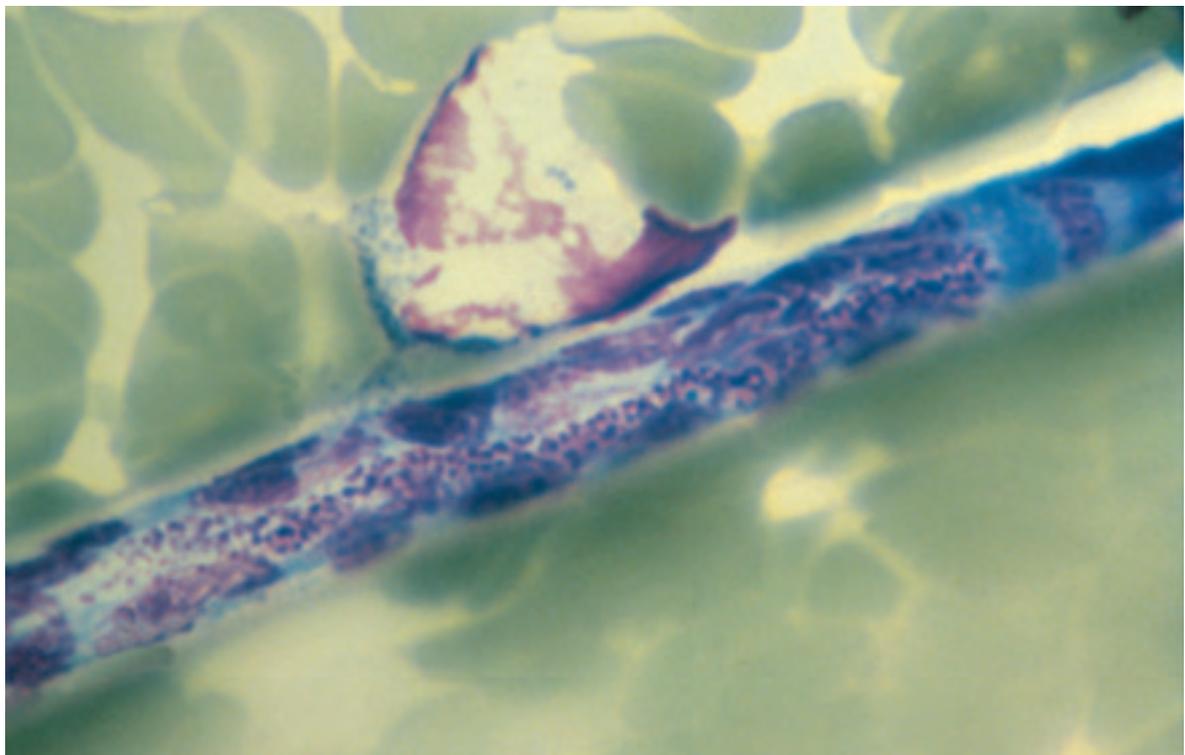


Photo n° 200 : *Microfilaire Loa loa*. Frottis. Corps interne allongé
constitué de petites granulations. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

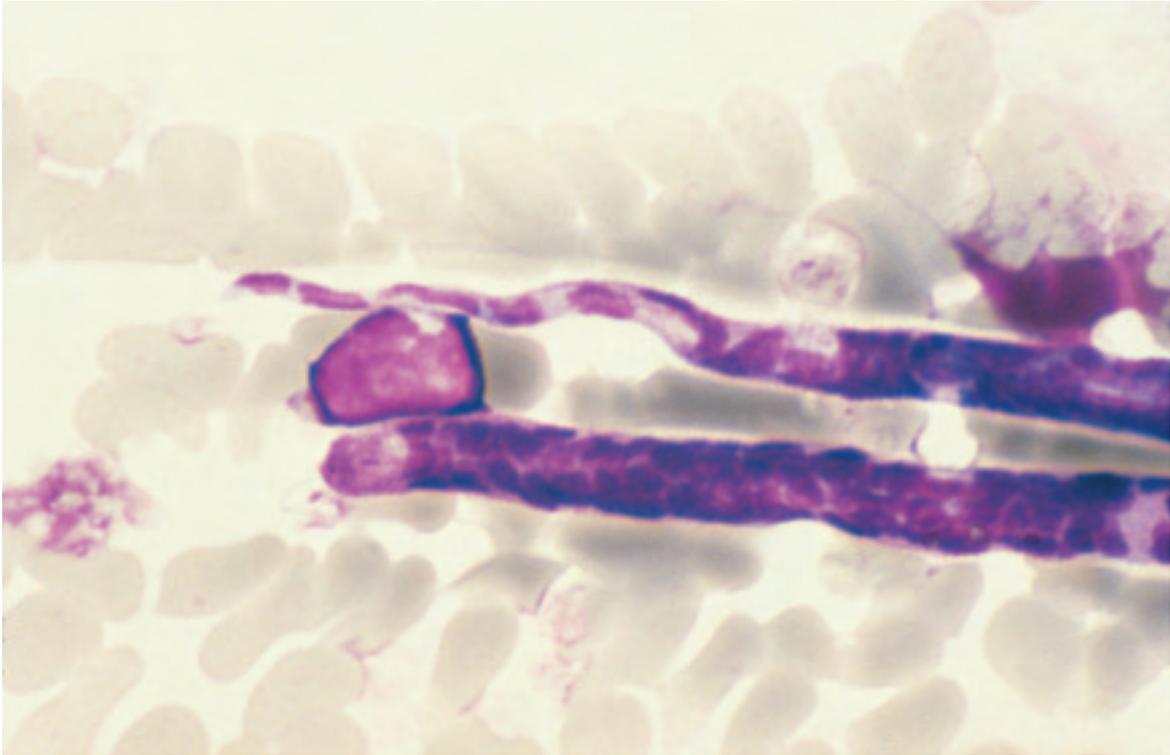


Photo n° 201 : Microfilaire Loa loa. Frottis. Noyaux somatiques gros, de forme irrégulière se chevauchant. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

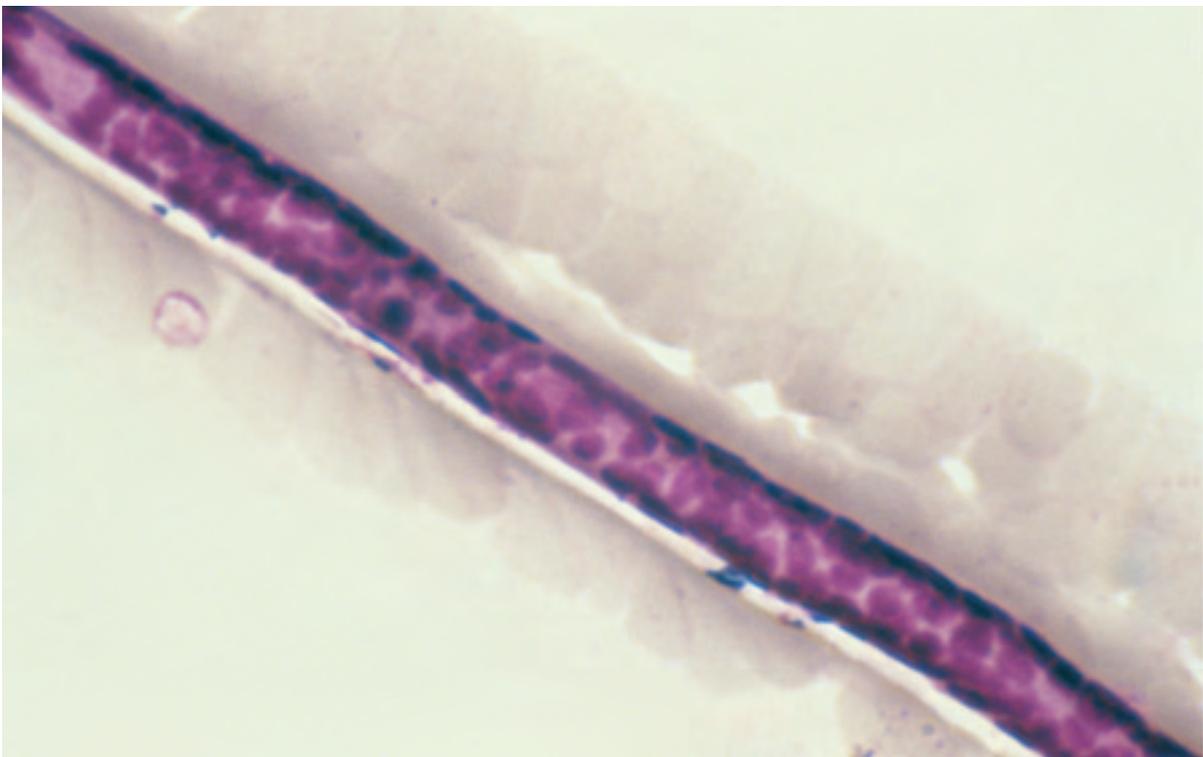
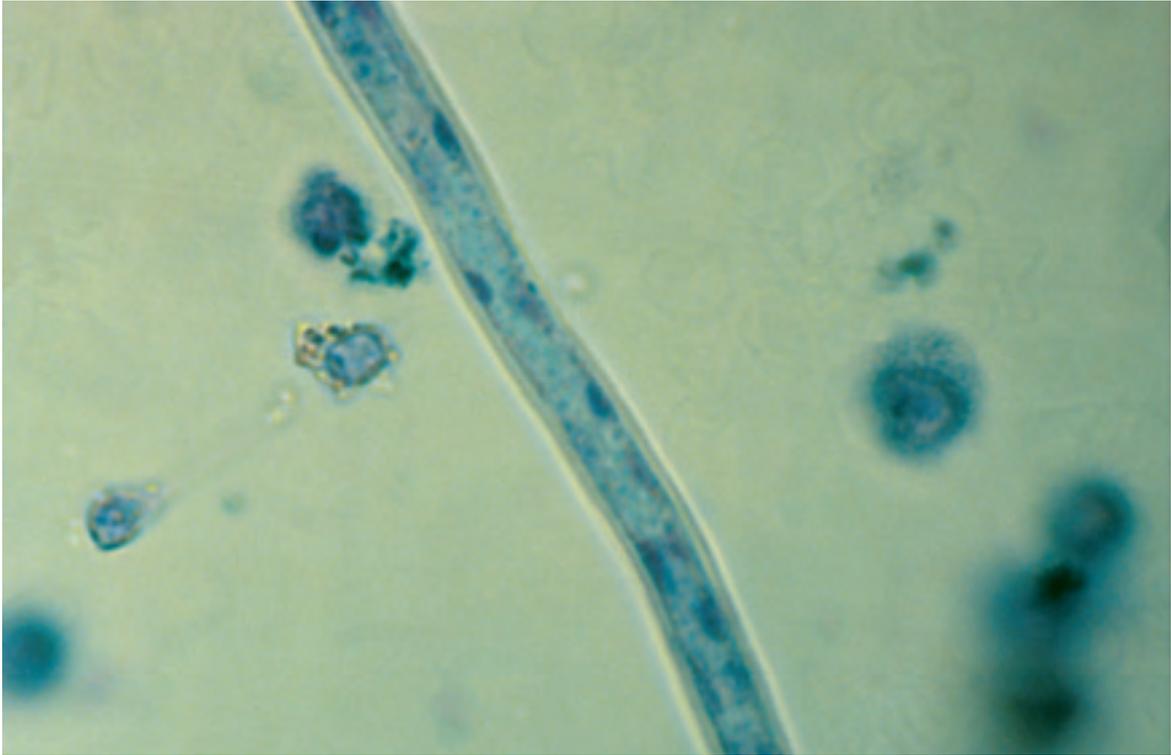
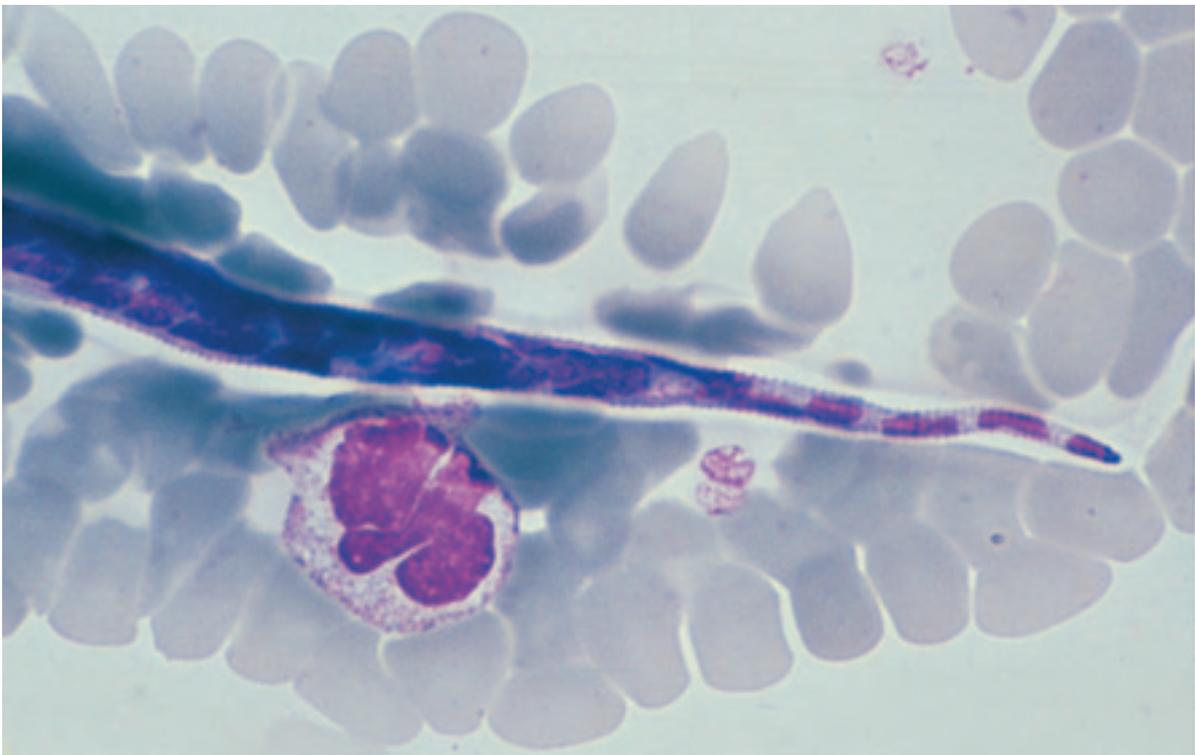


Photo n° 202 : Microfilaire Loa loa. Frottis. Noyaux sous-cuticulaires allongés très colorés. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



*Photo n° 203 : Microfilaire Loa loa. Noyaux sous-cuticulaires.
Coloration vitale bleu de méthylène. Obj. × 100.*



*Photo n° 204 : Microfilaire Loa loa. Dernier noyau allongé terminal.
Coloration M.G.G. Obj × 100.*

SÉROLOGIE DE LA LOASE

La sérologie de cette maladie est importante. En effet plusieurs études (369 et 375) ont montré que sur des données épidémiologiques et cliniques caractéristiques une forte proportion de malades (au moins un quart) n'avaient pas de microfilaires dans le sang. Cette sérologie est difficile à réaliser.

Les réactions croisées entre des antigènes hétérologues d'autres nématodes comme *Dipetalonema vitae* ne donne des résultats conformes pour un sérum positif de référence que dans la moitié des laboratoires, l'antigène *A. suum* adulte donne des résultats encore moindres (370).

L'antigène microfilaire *Loa loa* homologue nécessite pour être préparé, une grande quantité de sang fortement parasité suivi d'une purification des microfilaires (372) (photo n° 205).

Cet antigène homologue a donné 74 % de résultats positifs en Ouchterlony et immuno-électrophorèse (375) (photos n° 206 et 207).

La P.C.R. a été trouvée positive dans 68 % des malades amicrofilarémiques (376). La recherche des antigènes circulants par des sérums hyperimmuns en co-électrosynérèse a donné un résultat positif chez 11/13 patients amicrofilarémiques (378).

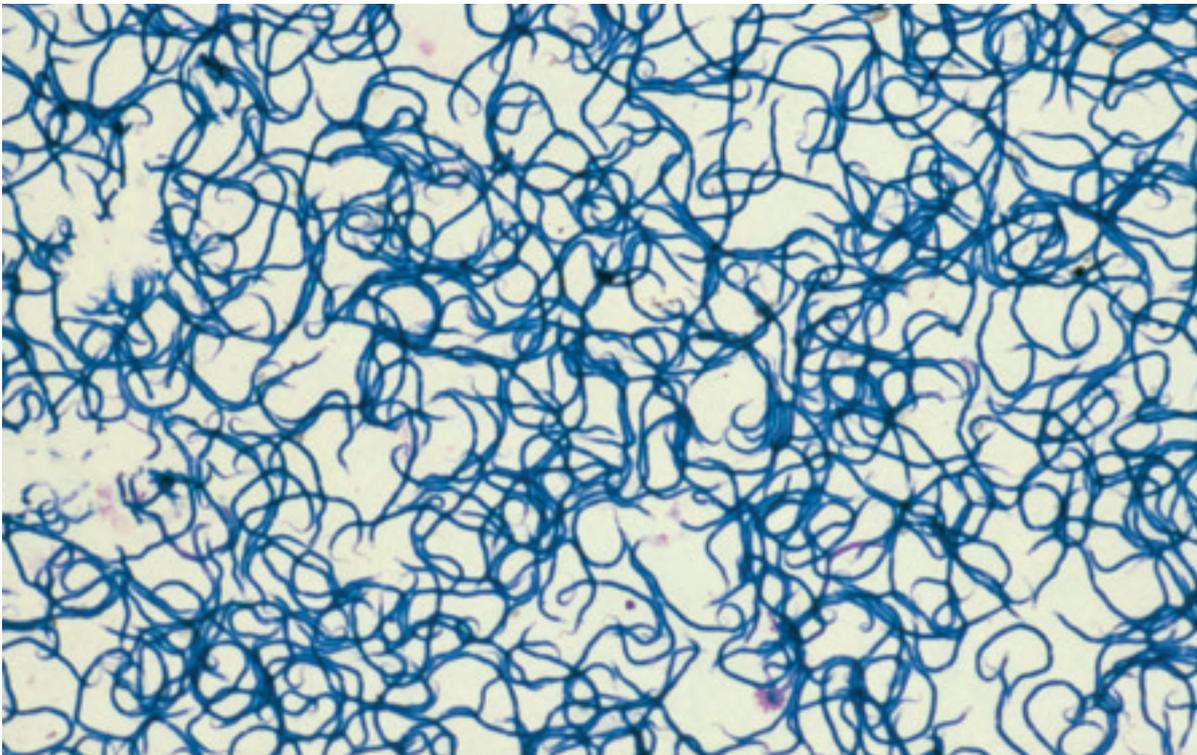
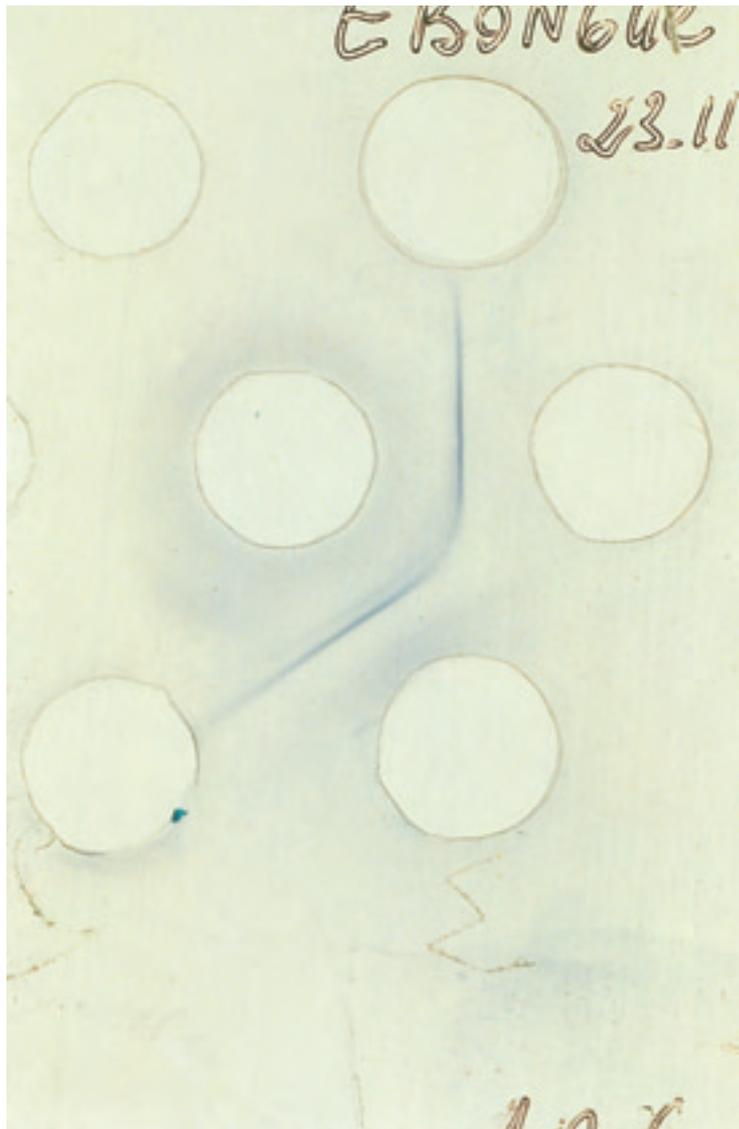
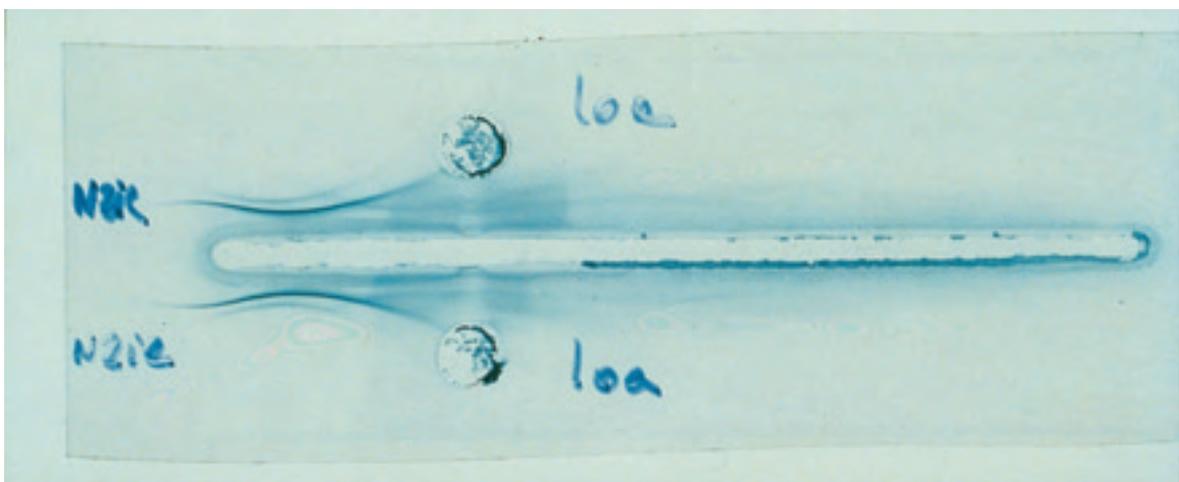


Photo n° 205 : Microfilaires *Loa loa* purifiées pour antigène. Coloration M.G.G. Obj. $\times 10$.



*Photo n° 206 : Ouchterlony. Antigène microfilaire *Loa loa* dans le puits central. Dans les 6 puits périphériques sérum de 6 malades. Deux présentent des anticorps.*



*Photo n° 207 : Gouttière centrale antigène microfilaire *Loa loa*. Puits supérieur et inférieur, sérums concentrés trois fois, de deux malades différents. Présence de 4 arcs de précipité.*

■ FILARIOSES LYMPHATIQUES

Morbidité actuelle et éradication

En 1997, l'OMS et ses États Membres se sont engagés à éliminer la filariose lymphatique, qui atteint un nombre de personnes estimé à 120 millions, en tant que problème de santé publique. La filariose lymphatique a déjà été éliminée dans plusieurs pays, à la suite de programmes ciblés, par exemple au Japon et dans une partie de la Chine, et d'un effort d'assainissement, par exemple en Australie et aux États-Unis d'Amérique. La filariose lymphatique est l'une des seules 6 maladies « éradicables ou potentiellement éradicables ». Cette éradication devrait être effective en 2020.

Les données ci-dessus proviennent de « Filariose lymphatique. » Relevé épidémiologique hebdomadaire de l'Organisation Mondiale de la Santé, 2001, **76** n° 20, p. 149-156, de même que le tableau : « pays ou territoires signalant la présence de filarioses lymphatiques » de la page suivante.

Manifestations cliniques

Les filarioses lymphatiques sont provoquées par *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* et *B. timori*. L'infestation par ces vers entraîne différentes manifestations cliniques, notamment un lymphœdème et un éléphantiasis d'un membre, plus spécialement une hydrocèle, un chylocèle et un éléphantiasis du scrotum et du pénis (photos n° 208 et 209) et des surinfections bactériennes aiguës récurrentes donnant lieu à des « crises violentes ». La plupart des personnes infestées sont asymptomatiques, mais presque toutes présentent des lésions lymphatiques infracliniques et près de 40 % présentent également une atteinte rénale accompagnée de protéinurie et d'hématurie.

Cycle

Les microfilaires sont absorbées avec le sang par les moustiques femelles des genres *Culex*, *Aedes*, *Anophèle* et *Mansonia*. La périodicité des microfilaires correspond à celle de l'activité des moustiques. Les larves évoluent, muent et atteignent le troisième stade infectant en 12 à 15 jours. Lors d'un nouveau repas elles pénètrent au niveau de la piqûre dans l'organisme humain, migrent dans les lymphatiques et y deviennent adultes. La durée de vie des adultes peut atteindre vingt ans, elle est couramment de 10 à 15 ans et une personne ayant séjourné en zone d'endémie peut donc être porteur de microfilaires pendant cette durée après avoir quitté la zone d'endémie.

ÉPIDÉMIOLOGIE

Plus de 1,1 milliard de personnes, soit près de 18 % de la population mondiale, vivent dans des régions où existe un risque d'infestation par les filaires. Dans les régions tropicales et subtropicales du monde, près de 120 millions de personnes sont infestées. En Asie et dans certaines parties du Pacifique 90 % des infestations sont dues à *W. bancrofti* et 10 % à *B. malayi*. Près de 25 millions d'hommes souffrent d'atteintes génitales et l'on estime à 15 millions le nombre de personnes, en majorité des femmes, qui sont atteintes de lymphœdème ou d'éléphantiasis de la jambe. Ces chiffres sont actuellement en régression.

Tableau XV : Pays ou territoires signalant la présence de filarioses lymphatiques.

Afrique	
Angola	Haïti
Bénin	République-Dominicaine
Burkina Faso	Suriname
Burundi	Trinité-et-Tobago
Cameroun	Méditerranée orientale
Cap-Vert	Egypte
Comores	Soudan
Congo	Yémen
Côte d'Ivoire	Asie du Sud-Est
Ethiopie	Bangladesh
Gabon	Inde
Gambie	Indonésie
Ghana	Maldives
Guinée	Myanmar
Guinée-Bissau	Népal
Guinée équatoriale	Sri Lanka
Kenya	Thaïlande
Libéria	Pacifique occidental
Madagascar	Brunéi Darussalam
Malawi	Cambodge
Mali	Chine
Maurice	Fidji
Mozambique	Iles Cook
Niger	Iles Salomon
Nigéria	Kiribati
Ouganda	Malaisie
République centrafricaine	Micronésie (Etats fédérés de)
République démocratique du Congo	Nouvelle-Calédonie
République-Unie de Tanzanie	Niue
Réunion	Papouasie-Nouvelle-Guinée
Rwanda	Philippines
Sénégal	Polynésie française
Seychelles	République de Corée
Sierra Leone	République démocratique populaire lao
Tchad	Samoa américaines
Togo	Samoa
Zambie	São Tomé-et-Principe
Zimbabwe	Tonga
Amériques	Tuvalu
Brésil	Vanuatu
Costa Rica	Viet Nam
Guyana	Wallis et Futuna



*Photo n° 208 : Eléphantiasis du scrotum
chez un indigène du Congo.
Photographie de 1902.
Collection E. Brumpt*

*Photo n° 209 : Filariose lymphatique
Brugia malayi. Eléphantiasis
des membres inférieurs.*



■ DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE DES MICROFILAIRES *WUCHERERIA BANCROFTI*

**Tableau XVI : *Wuchereria bancrofti* : résultats de 8 tests
du Contrôle National de Qualité français.**

DATE D'ENVOI	NOMBRE DE RÉPONSES	RICHESSSE *	RÉSULTATS CONFORMES	DEUXIÈME RÉPONSE	TROISIÈME RÉPONSE	ABSENCE DE PARASITE
07/1980	1 503	1 à 5	37,3 %	<i>Loa loa</i> 36,3 %	<i>Mansonella ozzardi</i> 2,1 %	7,6 %
03/1983	1 026	1 à 10	48,8 %	<i>Loa loa</i> 22,9 %	<i>Mansonella ozzardi</i> 1,95 %	17,6 %
07/1988	995	1 à 10	35,35 %	<i>Loa loa</i> 32,2 %	<i>Plasmodium</i> divers 3,95 %	21,5 %
10/1989	1 097	1 à 6	69,5 %	<i>Loa loa</i> 8,7 %	<i>Mansonella ozzardi</i> 2,9 %	11,3 %
07/1990	1 072	2 à 10	70 %	<i>Loa loa</i> 8,7 %	<i>Mansonella ozzardi</i> 4,6 %	12,7 %
11/1992	1 178	1 à 30	80,3 %	<i>Loa loa</i> 10,5 %	<i>Brugia malayi</i> 0,8 %	0 %
04/1996	1 218	10 à 40	89 %	<i>Loa loa</i> 5,5 %	<i>Brugia malayi</i> 1,1 %	0,5 %
10/1998 (Bioforma)	3 788	5 à 20	85,9 %	<i>Mansonella ozzardi</i> 4,2 %	<i>Loa loa</i> 2,1 %	0,7 %

* Richesse moyenne de microfilaires par frottis.

Les résultats du tableau ci-dessus montrent les progrès, dans le diagnostic de cette espèce, des laboratoires d'analyses médicales français participant au Contrôle National de Qualité. Ils montrent aussi que le diagnostic différentiel se pose d'abord avec des microfilaires *Loa loa*, ensuite avec les microfilaires *Mansonella ozzardi*.

Filariose qui n'atteint que l'homme.

Répartition géographique : c'est l'espèce la plus répandue. Elle est présente dans presque tous les pays tropicaux.

En Europe : le dernier foyer était en Turquie.

En Asie : elle est fréquente en Chine, Inde, Bangladesh, Vietnam, Formose, Thaïlande, Malaisie, Philippines, Indonésie, Sri Lanka.

En Océanie : dans de nombreuses îles, en particulier Nouvelle-Guinée, Nouvelles-Hébrides, Wallis, Nouvelle-Calédonie. Elle est maintenant rare en Polynésie française (Tahiti) et absente en Australie.

En Afrique : elle est fréquente en Afrique tropicale de l'Est et de l'Ouest : delta du Nil, Ethiopie, Soudan, Sénégal, Gambie, Mali, Haute-Volta, à Madagascar, aux Iles Comores, Maurice, Réunion, Seychelles, rare en Afrique du Nord, Niger, Guinée, Sierra Léone, Libéria, Côte d'Ivoire, Ghana, Togo, Dahomey, Nigeria où elle est très répandue, Cameroun, Tchad, Empire Centrafricain, Congo, Zaïre, Ouganda, Kenya, Tanzanie, Rhodésie, Mozambique.

En Amérique : elle est assez commune dans le Nord de l'Amérique du Sud, Brésil, Guyanes, République Dominicaine et rare aussi aux Antilles, notamment Martinique et Guadeloupe, Haïti (385).

Aspect à frais : agitée continuellement de mouvements inefficaces, si bien qu'elle ne quitte généralement pas le champ du microscope, elle se tord sur place comme un ver coupé et se recourbe en anneaux plus ou moins ouverts.

Périodicité : les microfilaires sont retrouvées essentiellement la nuit dans le sang périphérique avec un maximum entre 22 h et 2 h.

L'administration par voie orale, de 2 mg/Kg de poids corporel, de Notézine, soit un comprimé à 0,10 g pour un adulte, provoque la sortie diurne dans le sang périphérique des microfilaires à périodicité nocturne (386). Effectuer le prélèvement une heure après la prise du médicament. Ne pas pratiquer ce test en zone d'endémie de *Loa loa* sans avoir examiné, au préalable, du sang à la recherche d'une forte microfilarémie : cela pourrait être à l'origine d'une méningo-encéphalite mortelle (373 et 380).

Dans certaines îles du Pacifique et notamment en Polynésie française, aux Iles Wallis et Futuna et aux Philippines, il n'existe aucune périodicité : *Wuchereria bancrofti* var. *pacifica* apériodique (386). *W. bancrofti* est subpériodique en Thaïlande (20 % des microfilaires retrouvées dans le sang périphérique par rapport à la nuit). Cette périodicité est également irrégulière chez l'Africain (388).

Attitude en goutte épaisse : Elle est assez caractéristique : le corps des microfilaires de *Wuchereria bancrofti* a des courbures régulières, simples, à grand rayon, alors que chez les microfilaires de *Loa loa* et *Brugia malayi*, de petites ondulations secondaires viennent s'ajouter à ces courbures primaires. Cette disposition n'est typique qu'en goutte épaisse et sans valeur sur frottis mince (photo n° 210).

Taille du corps des microfilaires sans la gaine (384) en goutte épaisse séchée et colorée :

Longueur moyenne : 290 µm (de 255 à 322)

Largeur moyenne : 7 µm (de 6,3 à 8,4)

Gaine : Toujours bien colorée par les techniques à l'hématoxyline-éosine et de Harris-Shorr. Le May-Grünwald Giemsa la colore généralement sur frottis et d'une façon inconstante en goutte épaisse (photos n° 211, 212 et 214).

Les microfilaires de *Wuchereria bancrofti* sortent parfois de leur gaine et l'on retrouve alors, côte à côte, la microfilaire nue et la gaine vide, cela peut se produire lorsque le sang a été conservé assez longtemps.

Le rapport, longueur de la gaine/longueur du corps de la microfilaire, est égal à 1,23 (383).

Espace céphalique : court, de 4 à 6 µm en moyenne, la longueur est inférieure à la largeur de la microfilaire (photo n° 217).

Corps interne ou corps central : il n'est pas mis en évidence par les colorations à l'hémalum et à l'hématoxyline. Par le Giemsa, il est coloré en rouge vif. C'est un élément allongé, d'une trentaine de microns de long sur une largeur de deux ou trois microns environ, renflé aux deux extrémités, présentant parfois des rétrécissements. Il commence à la moitié du corps de l'embryon. Il est parfois remplacé par un semis de ponctuations rouges (photos n° 213, 215 et 216).

Noyaux somatiques : Ils sont au nombre total de 260 et il n'y a pas de noyaux sous-cuticulaires (387). Il existe un espace libre marqué entre la cuticule et la colonne nucléaire. Les noyaux sont arrondis, petits, bien séparés les uns des autres et ne se chevauchent pas ce qui est caractéristique de cette espèce. Ils sont disposés sur 2 ou 3 rangées, sauf les 5 ou 6 derniers noyaux qui sont alignés (photos n° 213, 214, 215 et 216).

Extrémité postérieure : Le dernier noyau est subterminal et il existe une partie vide de noyaux de 15 microns de long environ. A l'immersion, l'extrémité postérieure est effilée et se termine par une pointe fine (photos n° 212, 214 et 215).

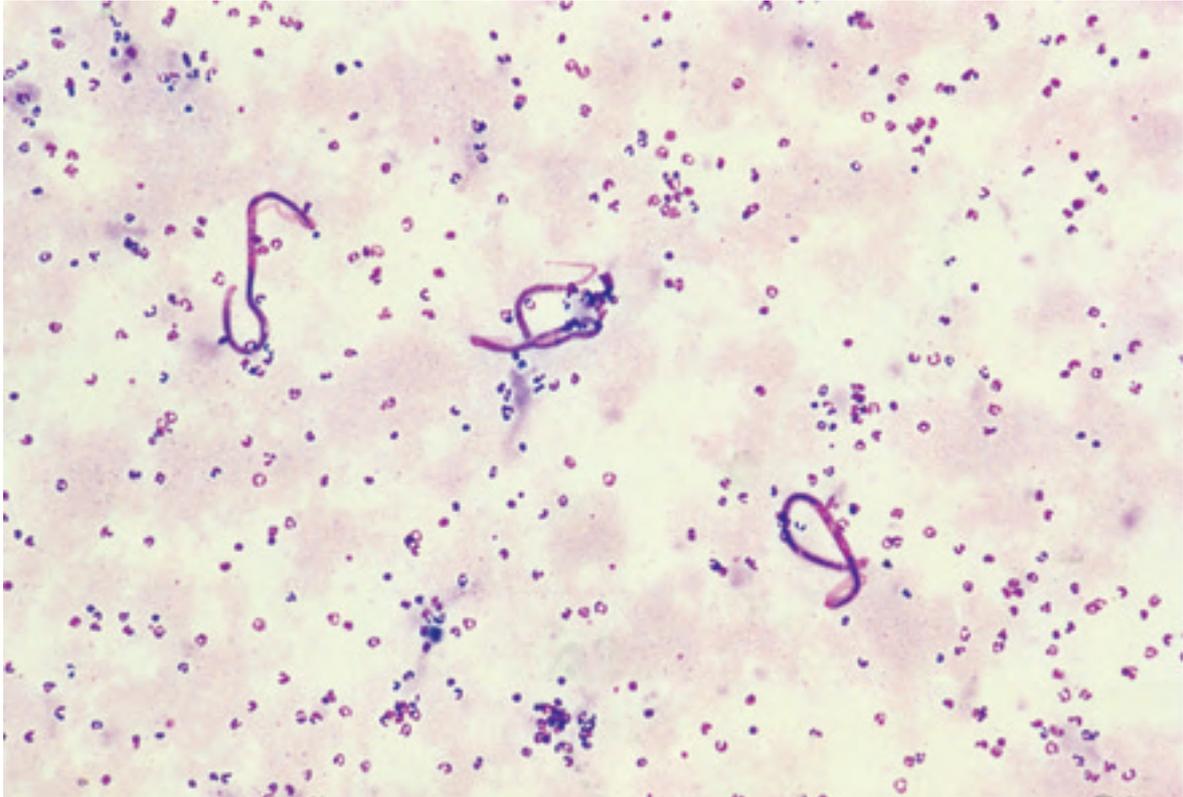


Photo n° 210 : Microfilaires de Wuchereria bancrofti en goutte épaisse, attitude avec courbures régulières, gaines visibles. Coloration M.G.G. Obj. X 10.

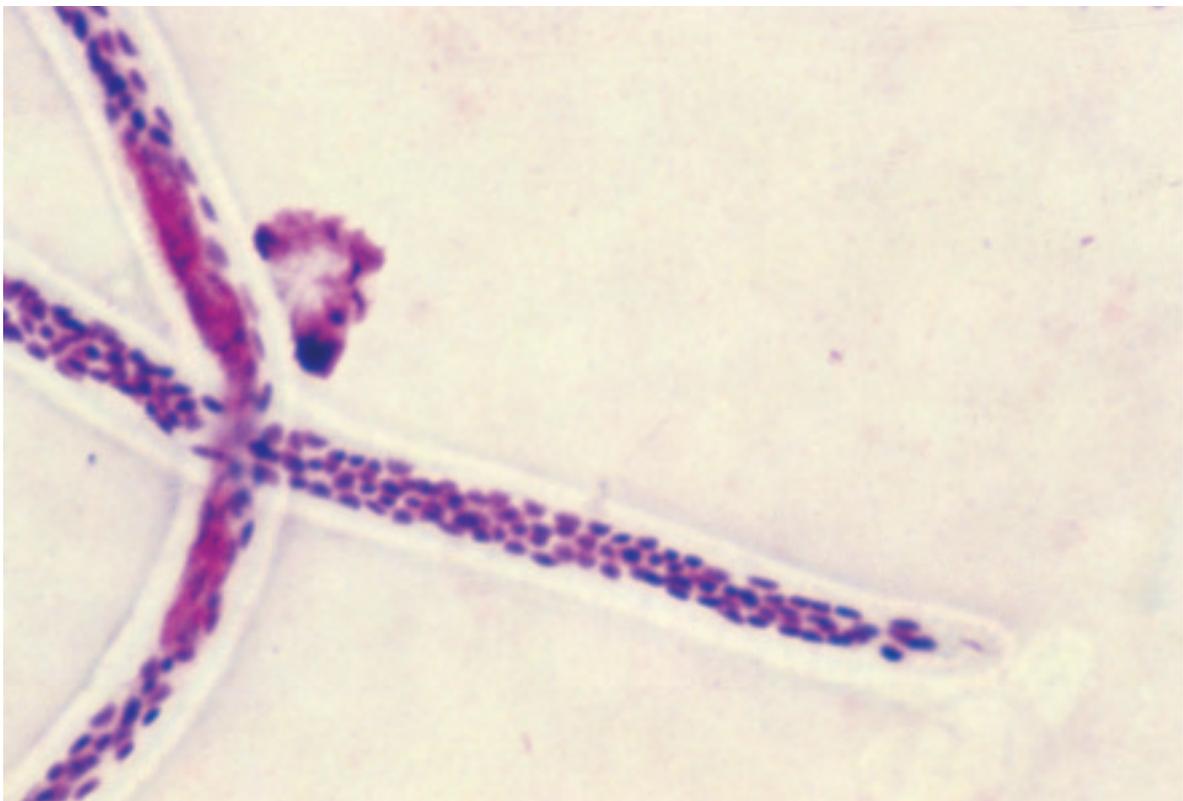


Photo n° 211 : Microfilaire de Wuchereria bancrofti en goutte épaisse, gaine non colorée, corps interne coloré en rouge bien visible. Coloration M.G.G. Obj. X 100.



Photo n° 212 : Microfilaire de Wuchereria bancrofti. Goutte épaisse, gaine bien visible, dernier noyau non terminal. Coloration hématoxyline-éosine. Obj. X 100.

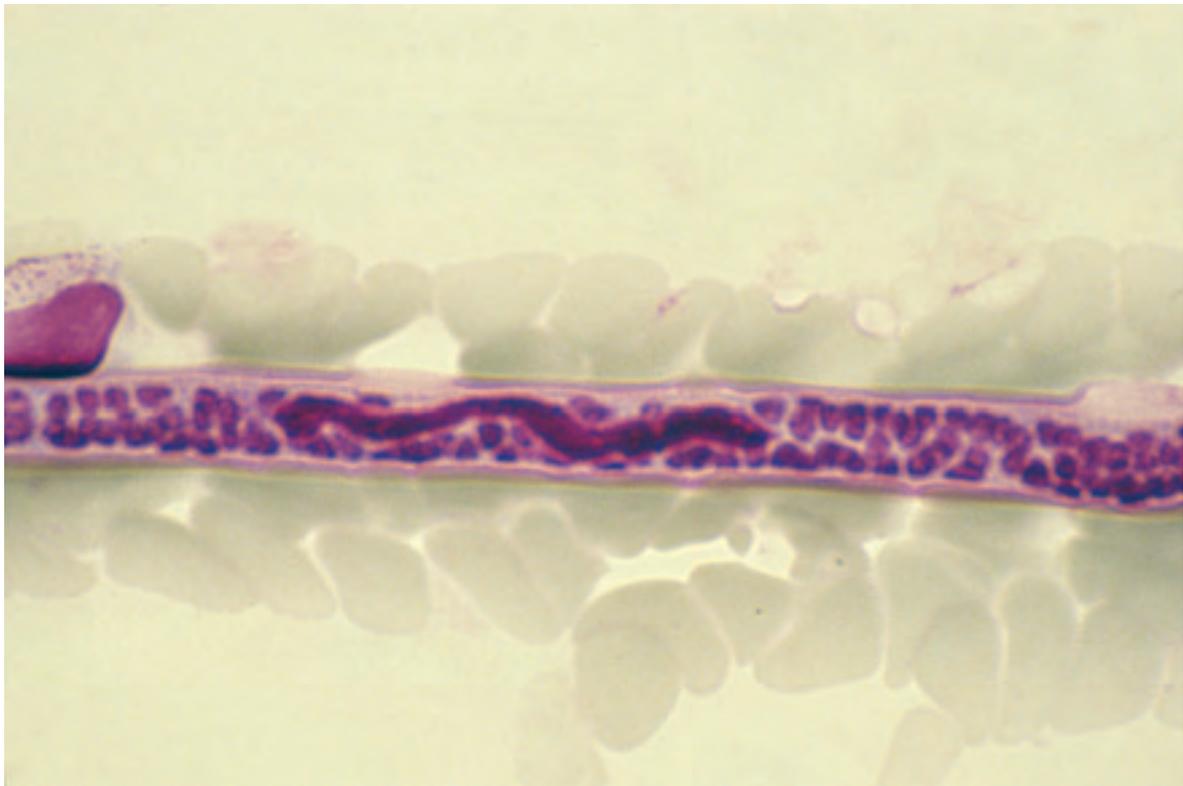


Photo n° 213 : Microfilaire de Wuchereria bancrofti. Frottis. Corps interne bien visible, noyaux ronds bien séparés. Coloration M.G.G. Obj. X 100.



Photo n° 214 : Microfilaire de *Wuchereria bancrofti*. Frottis. Extrémité postérieure avec noyau subterminal, cuticule avec striations. Gaine bien colorée. Coloration M.G.G. Obj. X 100.



Photo n° 215 : Microfilaire de *Wuchereria bancrofti*. Goutte épaisse. Gaine non colorée. Noyaux somatiques arrondis, disposés sur 2 ou 3 colonnes, à distance de la cuticule. Corps interne rouge vif en masses distinctes. Coloration M.G.G. Obj. X 100.



Photo n° 216 : Microfilaire de Wuchereria bancrofti. Frottis. Noyaux arrondis bien séparés. Corps interne bien visible. Coloration M.G.G. Obj. X 100.

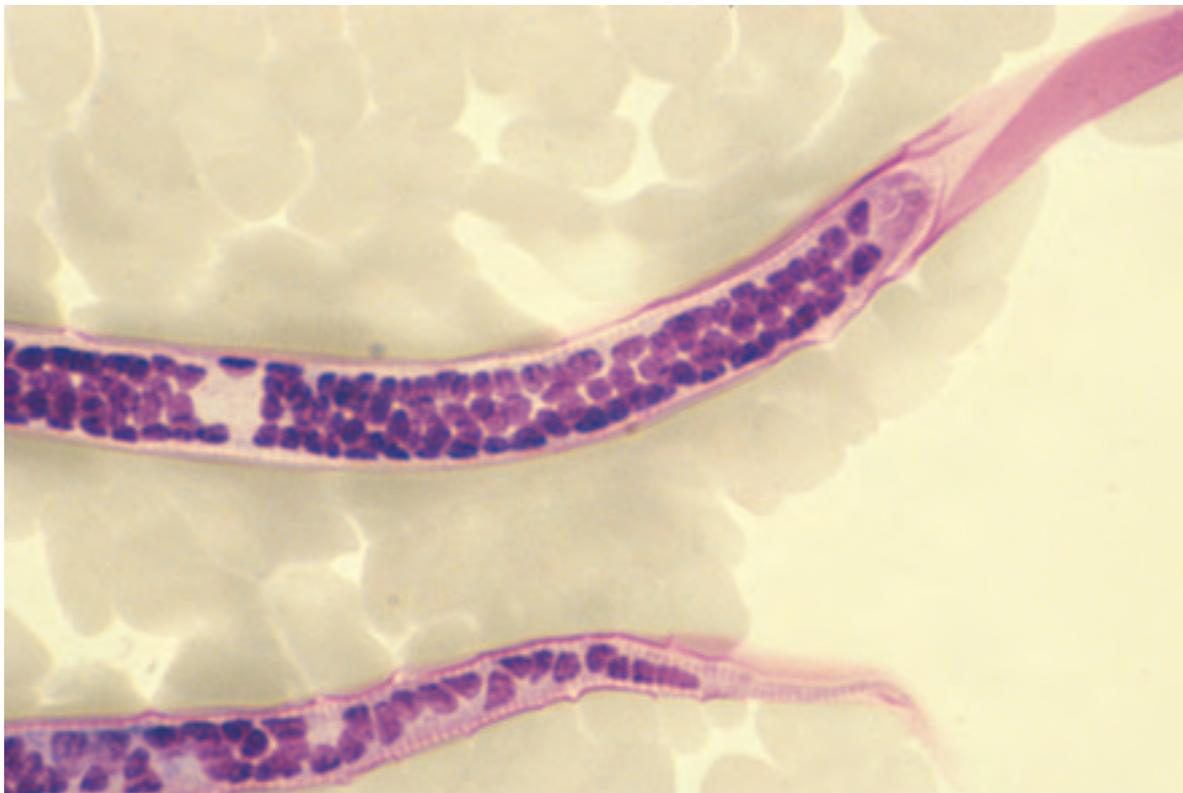


Photo n° 217 : Microfilaire de Wuchereria bancrofti. Frottis. Extrémité céphalique sans noyau, courte, moins longue que la largeur du corps de la microfilaire. Coloration M.G.G. Obj. X 100.

■ MICROFILAIRES DE *WUCHERERIA BANCROFTI* SUB. SP *VAUCELLI*

Cette filaire est peu répandue. Elle n'a été observée jusqu'ici qu'à Madagascar où elle a été décrite pour la première fois par H. Galliard (381 et 382) et P. Brygoo et en Rhodésie du Sud (379). Les microfilaires présentent des caractères intermédiaires entre *W. bancrofti* et *B. malayi* (382) mais plus proche de la première dont c'est peut être une sous espèce, ou une espèce indépendante : le problème ne sera résolu que par l'étude des adultes. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour la situer par rapport à *W. bancrofti*.

Attitude en goutte épaisse : aspect tortillé avec des courbures principales compliquées d'ondulations secondaires, semblables à *B. malayi*.

Taille : microfilaires fixées et colorées par le Giemsa en goutte épaisse :

Longueur moyenne : 250 μm (de 180 à 275)

Largeur moyenne : 5 μm

Gaine : elle n'est pas colorée par le Giemsa en goutte épaisse, alors que nous avons pu constater sur des lames communiquées par le Pr Galliard et étudiées par Ho Thi Sang, qu'elle était bien colorée par l'hémalun-éosine (photos n° 218 et 219).

Espace céphalique : court comme chez *W. bancrofti* (photos n° 219, 220 et 221).

Corps interne : débute à 40 p. 100 de la longueur du corps, se colore en rouge vif et a un aspect granuleux, poussiéreux. Il n'est pas toujours présent.

Noyaux somatiques : ils se chevauchent parfois comme pour *B. malayi*. D'autres fois ils sont séparés comme pour *W. bancrofti*. Ils sont tantôt arrondis, tantôt de forme irrégulière (photos n° 219, 220 et 221).

Cellules génitales et excrétrices, pore anal, différents de ceux de *W. bancrofti*.

Extrémité postérieure : le dernier noyau est situé à distance de l'extrémité postérieure comme chez *W. bancrofti*. Il n'y a pas de noyau situé dans deux renflements successifs comme chez *B. malayi* (photos n° 219, 220 et 221).

Au total, la microfilaire *Wuchereria bancrofti vauceli*

- taille de 250 μm
- possède une gaine
- à une extrémité céphalique courte
- corps interne irrégulièrement visible
- noyaux somatiques se chevauchant parfois, de forme arrondie ou irrégulière.
- dernier noyau allongé à distance de l'extrémité postérieure.

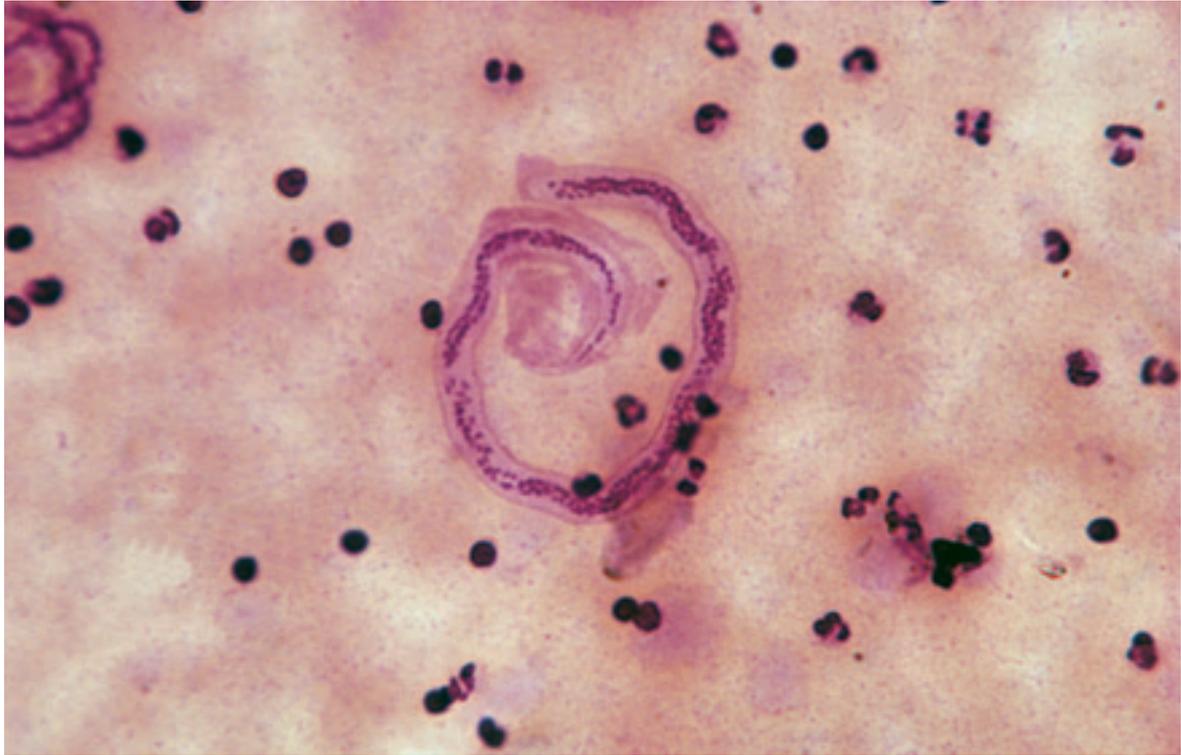


Photo n° 218 : *Microfilaire Wuchereria bancrofti vauceli*. Goutte épaisse. Noter la présence de la gaine dépassant l'extrémité antérieure et postérieure. Court espace céphalique. Coloration hémateïne-éosine. Obj. X 40.



Photo n° 219 : *Microfilaire Wuchereria bancrofti vauceli*. Goutte épaisse. Gaine présente à l'extrémité postérieure et antérieure. Court espace céphalique. Coloration hémateïne-éosine. Obj. X 100

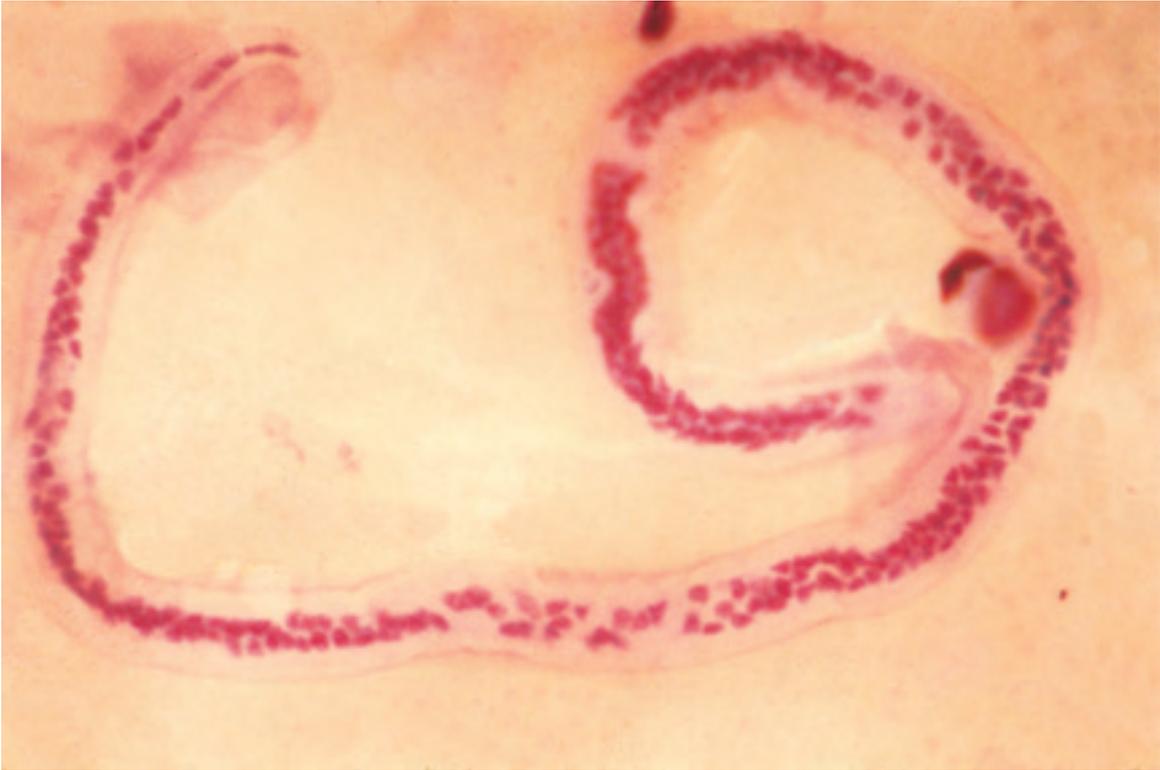


Photo n° 220 : *Microfilare Wuchereria bancrofti vauceli*. Goutte épaisse. Espace céphalique court. Amas rosé aux extrémités antérieure et postérieure devant correspondre à la gaine. Disposition irrégulière des noyaux somatiques qui sont parfois arrondis. Corps interne non visible. Dernier noyau allongé à distance de l'extrémité postérieure. Coloration M.G.G. Obj. X 100.

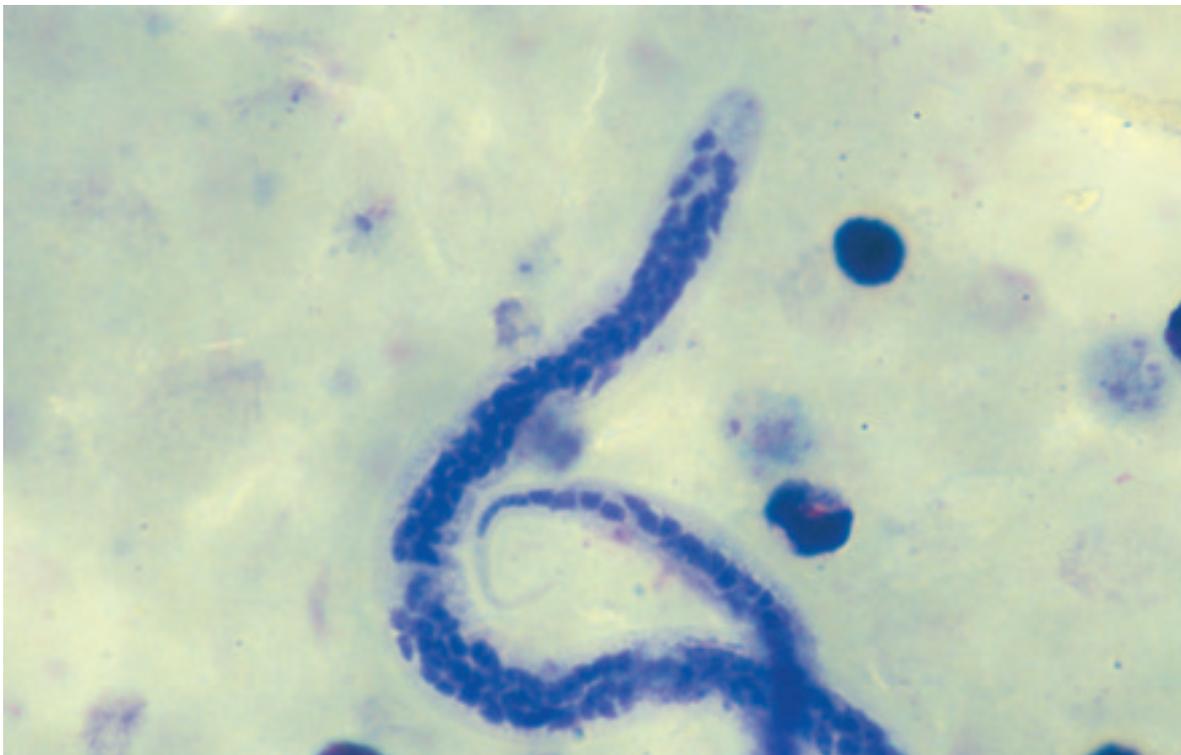


Photo n° 221 : *Microfilare Wuchereria bancrofti vauceli*. Goutte épaisse. Noyaux somatiques de forme irrégulière se chevauchant. Espace céphalique court. Dernier noyau allongé à distance de l'extrémité postérieure. Coloration M.G.G. Obj. X 100.

■ DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE DES MICROFILAIRES *BRUGIA MALAYI*

Tableau XVII : *Brugia malayi* : résultats des 4 tests du Contrôle National de Qualité français.
Il montre les progrès réalisés dans ce diagnostic et que le diagnostic différentiel se pose avec 1) *W. bancrofti* 2) *Loa loa*.

DATE D'ENVOI	NOMBRE DE RÉPONSES	RICHESSÉ*	RÉSULTATS CONFORMES	DEUXIÈME RÉPONSE	TROISIÈME RÉPONSE
11/1983	1 070	20 à 100	37,2 %	<i>Wuchereria bancrofti</i> 36,2 %	<i>Loa loa</i> 16,45 %
06/1985	1 082	1 à 40	35,65 %	<i>Wuchereria bancrofti</i> 46,4 %	<i>Loa loa</i> 10,55 %
11/1987	1 080	3 à 15	34,2 %	<i>Wuchereria bancrofti</i> 39,5 %	<i>Loa loa</i> 8,5 %
10/1998 (Bioforma)	3 788	5 à 15	84,3 %	<i>Wuchereria bancrofti</i> 7,8 %	<i>Loa loa</i> 2,2 %

* Richesse moyenne de microfilaires par frottis.

Répartition géographique : c'est une espèce uniquement confinée à la zone biogéographique orientale. Elle existe en Inde, en Indonésie, à Ceylan, en Malaisie, Thaïlande, Philippines, Nord-Vietnam, Chine, Corée du Sud, et Japon (Ile de Hachigo seulement). Des cas sporadiques ont été décrits aux U.S.A. dans les états du New-England, New-jersey, New-York et Ohio sans que l'espèce de *Brugia* en cause soit précisée (397).

Périodicité : nocturne. Il existe une variété subpériodique, c'est-à-dire à périodicité également nocturne mais beaucoup moins marquée en Malaisie Ouest (dans l'Est Pahang), au Sud-Vietnam et aux Philippines (393).

Attitude en goutte épaisse : aspect sinueux avec des courbures principales, compliquées d'ondulations secondaires. C'est un bon critère de différenciation avec les microfilaires de *Wuchereria bancrofti* (photo n° 222).

Taille du corps des microfilaires sans la gaine (395) en frottis colorés par l'Azur II :

Longueur moyenne : 215 µm (de 192 à 241)

Largeur moyenne : 5,6 µm (de 5,4 à 6,22)

La longueur est donc intermédiaire entre les deux grandes microfilaires sanguicoles, *Loa loa* et *W. bancrofti* d'une part, et les deux petites, *M. perstans* et *M. ozzardi* d'autre part.

Gaine : elle est colorée en rose brillant par le Giemsa mais elle n'est pas toujours mise en évidence par ce colorant (photos n° 226 et 227).

Le rapport, longueur de la gaine/longueur du corps de la microfilarie, est égal à 1,09 et est plus petit que pour *W. bancrofti* (398).

Espace céphalique : long de 10 à 15 µm, soit 1,5 à 2,5 fois la largeur de la microfilarie (395), c'est un bon élément diagnostique (photo n° 223).

Corps interne : bien visible après coloration par le Giemsa, il n'est pas coloré par les colorations à l'hémalun ou à l'hématoxyline. Il commence à 40 p. 100 de la longueur de la microfilarie, souvent massif, sans retrécissement (photos n° 223 et 224).

Noyaux somatiques : ils sont petits, de forme irrégulière, se chevauchant les uns les autres. Ils sont colorés en violet par le Giemsa (photo n° 224).

Dernier noyau et extrémité postérieure : l'extrémité caudale est souvent repliée sur elle-même, ce qui en gêne l'étude, mais il faut toujours rechercher une microfilaire à la queue en extension pour voir les deux derniers noyaux dont la disposition est caractéristique. Après la fin de la colonne nucléaire, le corps de la microfilaire s'élargit puis s'atténue brusquement pour s'élargir à nouveau graduellement, en une extrémité renflée, il y a ainsi deux renflements successifs, un subterminal renfermant un petit noyau difficile à voir et un terminal contenant le dernier noyau, plus gros, plus visible quoique de taille inférieure aux noyaux somatiques (photos n° 225, 226 et 227.)

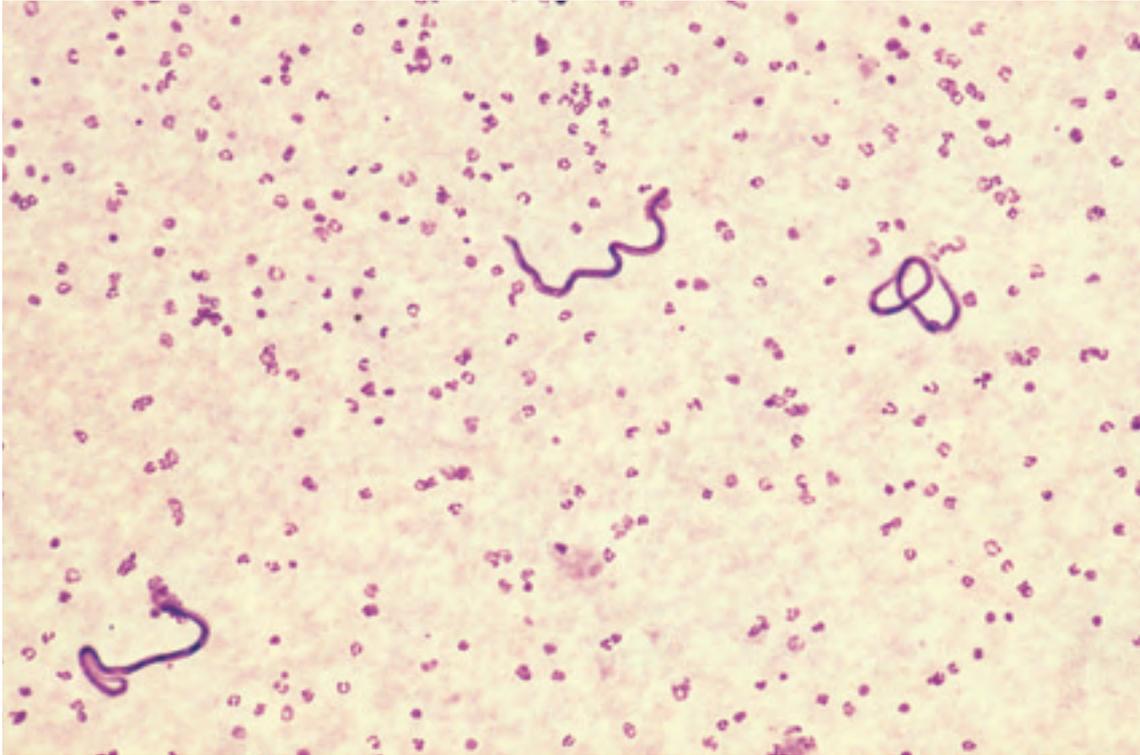
Diagnostic différentiel entre *B. malayi* périodique et subpériodique (394). Les frottis colorés au Giemsa montrent des différences entre les microfilaires de formes périodiques et subpériodiques de *B. malayi*. Les microfilaires périodiques ont habituellement perdu leur gaine et des gaines vides peuvent être vues dans le frottis. Les microfilaires sub-périodiques restent habituellement dans leur gaine et les gaines vides sont rarement vues.

BRUGIA TIMORI : C'est une filaire qui n'a été trouvée (392) jusqu'ici que dans l'Ile de Timor (Asie) et dont sont seulement connues les microfilaires. Celles-ci ressemblent beaucoup à celles de *B. malayi*. Elles ont la même périodicité nocturne, la même attitude en goutte épaisse, les mêmes noyaux divisés se chevauchant et la présence de deux noyaux terminaux.

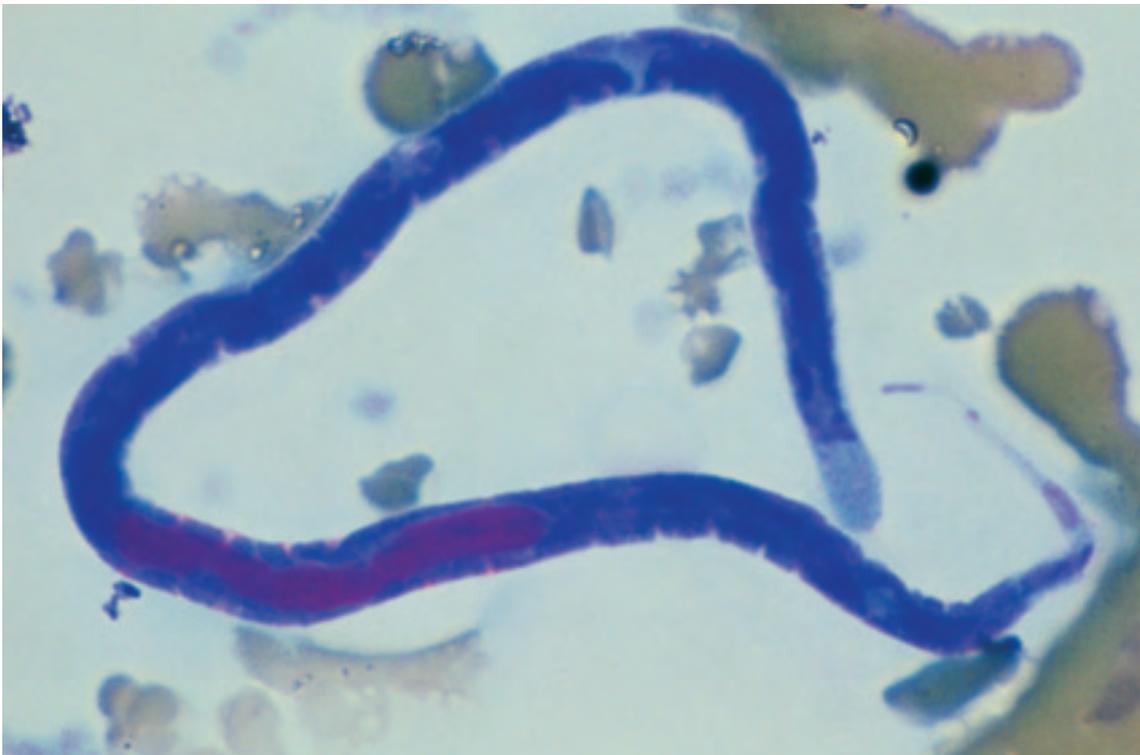
Elles en diffèrent par :

- la gaine qui se colore à l'hémalum et non au May-Grünwald-Giemsa.
- un espace céphalique plus long (3 fois la largeur de la microfilaire au lieu de 2 fois)
- une longueur totale plus grande : $290 \mu\text{m} \times 4,5 \mu\text{m}$ (extrêmes : 265 – 323).

BRUGIA PAHANGI : est une filaire du groupe *malayi*, principalement trouvée chez des carnivores, mais aussi chez l'homme et qui peut y émettre des microfilaires. Elle peut être à l'origine du poumon éosinophile tropical. Les microfilaires ont une longueur de 215 à 230 μm , plus grandes que celles de *B. malayi*, l'espace céphalique à une longueur moyenne de 22 μm (402).



*Photo n° 222 : Microfilaires Brugia malayi. Goutte épaisse. Attitude régulière.
Coloration M.G.G. Obj. × 10.*



*Photo n° 223 : Microfilaires Brugia malayi. Frottis. Espace céphalique long. Deux noyaux
terminaux bien séparés de la colonne nucléaire. Corps interne massif coloré en rouge vif.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



Photo n° 224 : Microfilaires Brugia malayi. Frottis. Noyaux somatiques se chevauchant, noyaux terminaux non visibles. Corps interne massif coloré en rouge carmin. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



Photo n° 225 : Microfilaires Brugia malayi. Goutte épaisse. Noyaux terminal et subterminal à distance de la colonne de noyaux somatiques. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

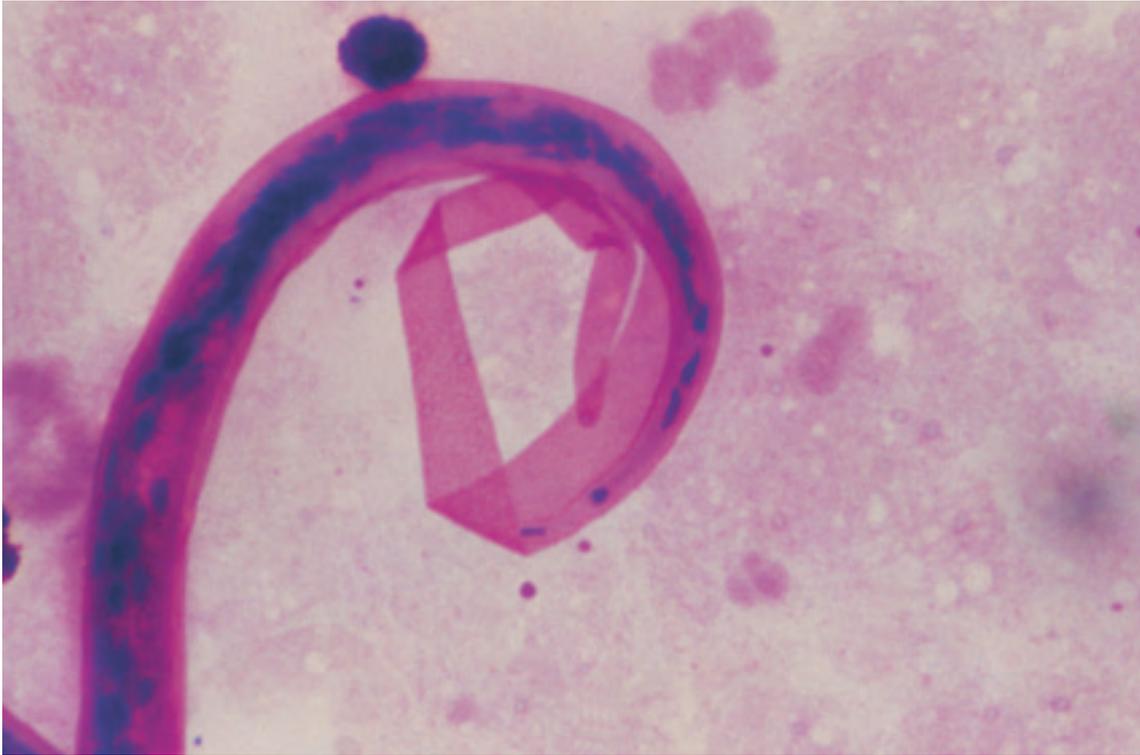


Photo n° 226 : *Microfilaires Brugia malayi*. Goutte épaisse. Gaine visible colorée en rouge carmin. Deux noyaux terminaux bien visibles. L'avant dernier est situé dans un élargissement de la cuticule. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

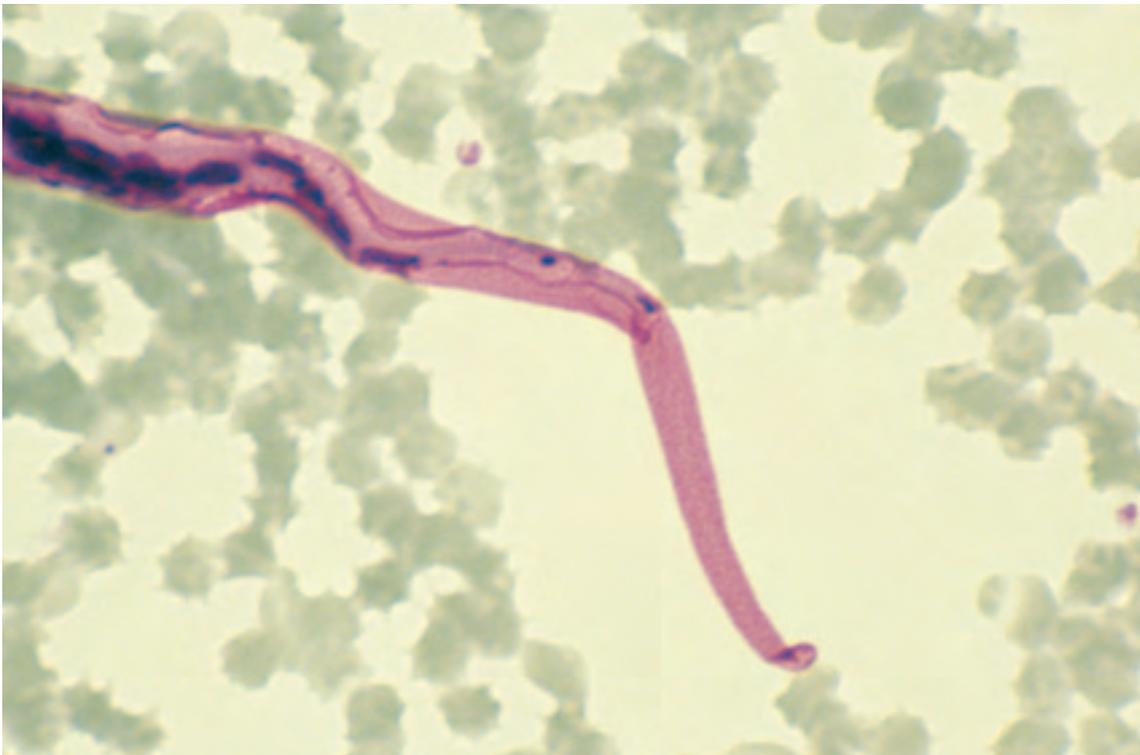


Photo n° 227 : *Microfilaires Brugia malayi*. Frottis. Gaine visible colorée en rouge. Deux noyaux terminaux bien visibles. L'avant dernier est situé dans un élargissement de la cuticule. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

■ *BRUGIA SP. P.*

Diverses espèces du genre *Brugia*, cause de zoonoses, ont été observées comme pouvant aussi atteindre l'homme sans que l'espèce ne puisse être bien déterminée. Souvent leur développement chez l'Homme est incomplet (impasse parasitaire), celui de la femelle ne va pas jusqu'à la ponte : la preuve parasitologique dépend alors de la découverte d'une filaire adulte plus ou moins développée dans un organe lymphatique biopsié. Elles sont à l'origine de troubles qui peuvent être importants, comme le poumon éosinophile tropical. Dans de tels syndromes la mise en évidence des microfilaries dans le sang est souvent difficile, voir totalement impossible.

BRUGIOSE LYMPHATIQUE : Neuf cas ont été étudiés en Rhode Island, à New-York, en Pensylvanie, en Floride et en Californie.

Cliniquement il s'agissait d'un ganglion unique de siège variable, ayant grossi en 2 à 8 semaines. Histo-pathologie : granulome avec cellules épithélioïdes en palissade, cellules géantes et nombreux éosinophiles.

Présence de vers de 30 à 75 µm de diamètre, mâles ou femelles ne contenant pas de microfilaries (389).

BRUGIA GUYANENSIS : a été trouvé chez l'homme au Pérou, émettant des microfilaries (390).

BRUGIA SP : un cas humain avec microfilaries semblables à celles de *B. malayi*, a été observé en Ethiopie (400).

Le diagnostic est alors sérologique ou/et histopathologique :

- la sérologie des filarioses lymphatiques fait appel à des antigènes homologues ou hétérologues comme *A. suum* (photo n° 228).
- le diagnostic histopathologique concerne en particulier les ganglions lymphatiques (396), avec parfois mise en évidence du ver, et sinon une infiltration éosinophile (photo n° 229).

Ces filarioses sont à l'origine du Poumon Eosinophile Tropical.

SÉROLOGIE DES FILARIOSES LYMPHATIQUES

Les antigènes utilisés sont variables :

hétérologues : microfilaries *Dirofilaria immitis*, *Dipetalonema viteae*, *Ascaris suum* adulte, *Ascaris lumbricoides* adultes, *Parascaris equorum* ...

homologues : microfilaries de *W. bancrofti*, *B. malayi*, *B. pahangi*.

Les techniques utilisées sont principalement l'immunofluorescence, la recherche de précipitines en milieux gélifiés, l'ELISA ...

Test ELISA pour la recherche d'anticorps anti-microfilaire *W. bancrofti* (391 et 399).

Test ELISA, ou immunochromatographie avec anticorps monoclonal pour recherche d'antigène dans la filariose à *W. bancrofti* (401).

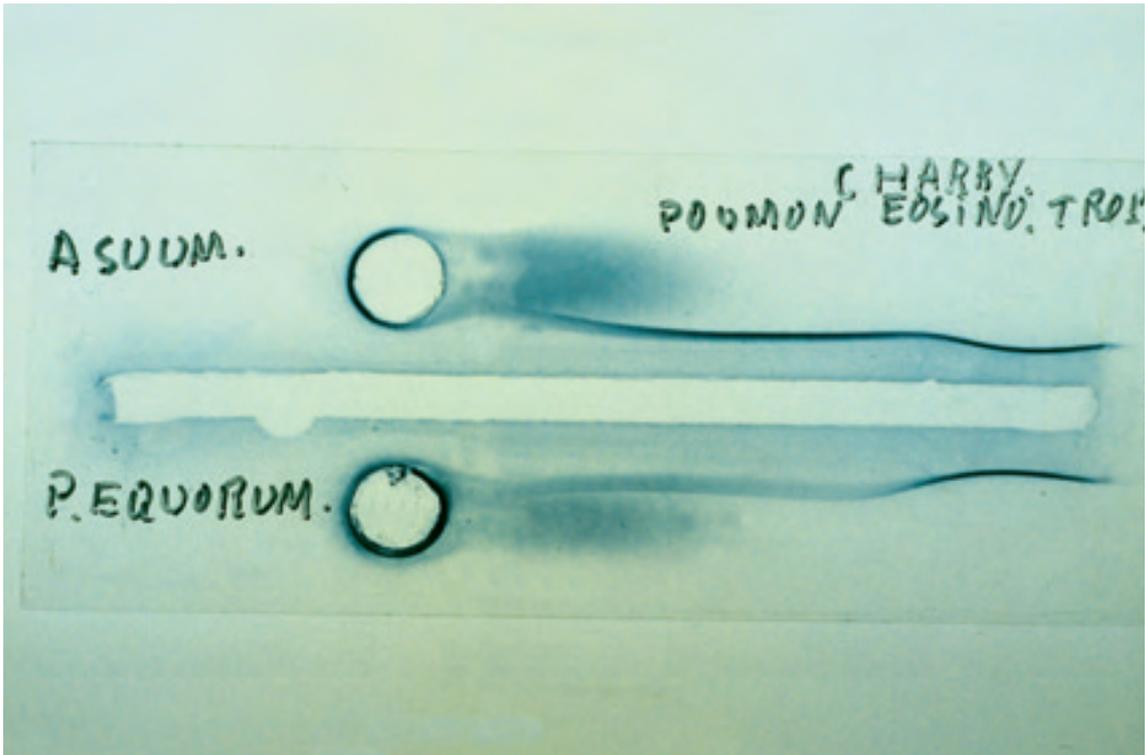


Photo n° 228 : Brugia sp. Poumon éosinophile tropical. Sérologie immunoélectrophorèse avec Ascaris suum et P. equorum.

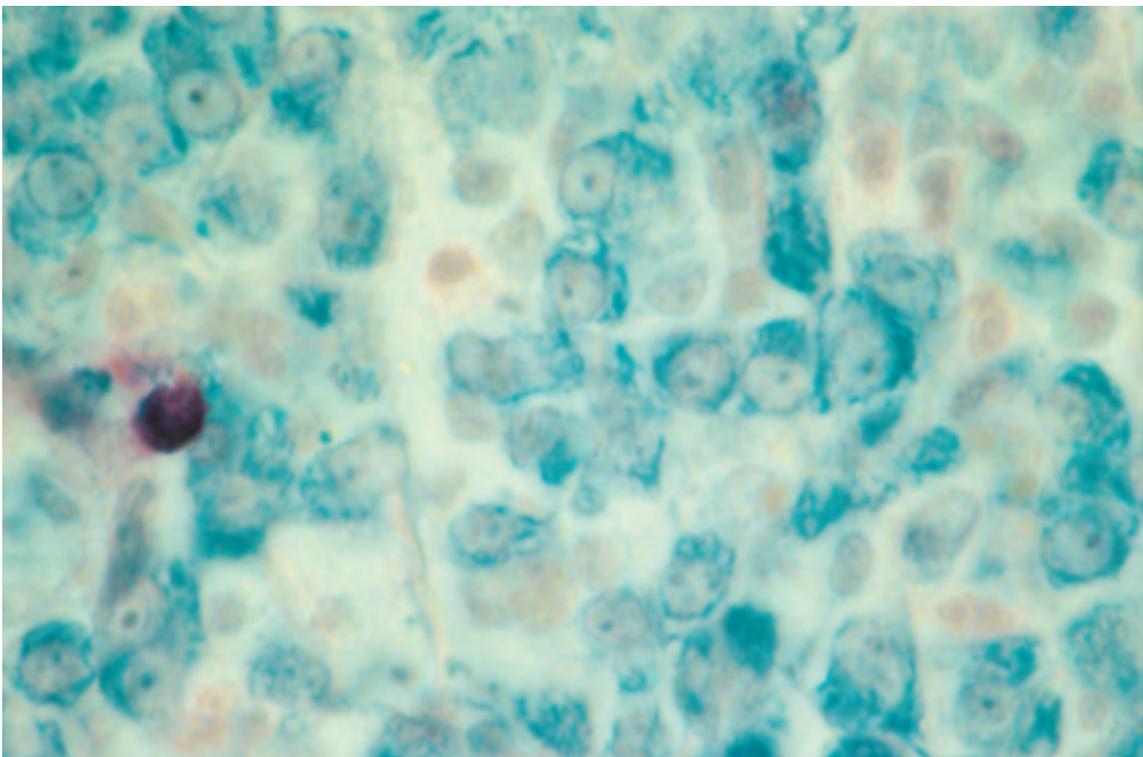


Photo n° 229 : Brugia sp. Cliché H. Galliard. Coupe de ganglion avec infiltration massive de polynucléaires éosinophiles. Coloration hémateïne-éosine. Obj. × 100.

■ MICROFILAIRES DE *MENINGONEMA PERUZZII*

Cette espèce a été récemment isolée et différenciée de *M. perstans* (403) avec laquelle elle a été longtemps confondue. C'est une filaire des singes atteignant le système nerveux où elle provoque des troubles graves. Elle est présente dans différentes régions d'Afrique centrale. Les deux premiers cas ont été rapportés au Zimbabwe.

Les microfilaries s'observent dans le sang et surtout dans le liquide céphalo-rachidien (photo n° 230).

Taille : 170 μm \times 5 μm

Gaine : présente, mais très courte et difficile à voir surtout en goutte épaisse colorée au May-Grünwald-Giemsa.

Extrémité postérieure : semblable à *Loa loa*, dernier noyau allongé.

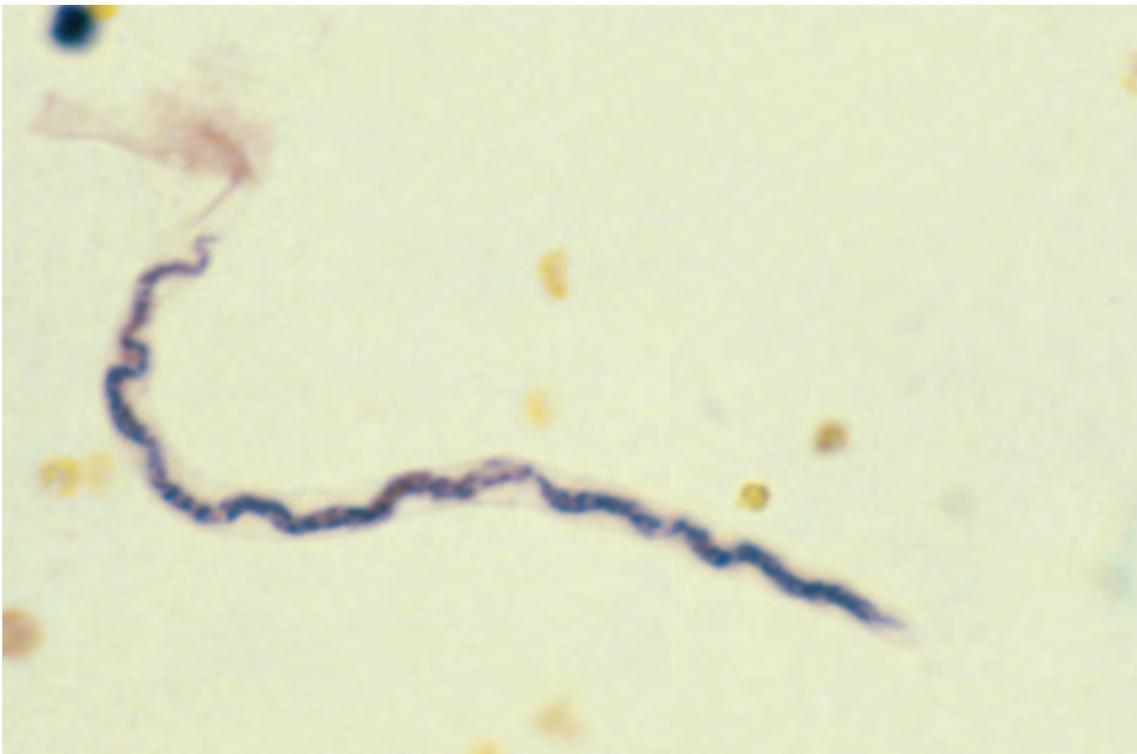


Photo n° 230 : Microfilarie *Meningonema peruzzii* (Orihel). Goutte épaisse. Gaine présente. Dernier noyau allongé, petite taille. Coloration hémateïne-éosine. Obj. \times 100.

■ DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE DES MICROFILAIRES *MANSONELLA PERSTANS* (= *Dipetalonema perstans*)

**Tableau XVIII : *Mansonella perstans* : résultats de 8 tests du Contrôle National de Qualité français.
Le diagnostic différentiel se pose avec *Loa loa*.**

DATE D'ENVOI	NOMBRE DE RÉPONSES	RICHESSSE*	RÉSULTATS CONFORMES	DEUXIÈME RÉPONSE	TROISIÈME RÉPONSE	ABSENCE DE PARASITE
11/1982	1 078	1 à 5	33,65 %	<i>Loa loa</i> 29,25 %	Autres filaires 3,25 %	19,7 %
06/1984 **	1 134	1 à 5	14,85 %	<i>Loa loa</i> 78,65 %	Autres filaires 3,8 %	2,7 %
03/1989	1 154	1 à 6	43,4 %	<i>Loa loa</i> 18,6 %	<i>Plasmodium</i> divers 3,2 %	21,2 %
10/93	1 200	1 à 10	47 %	<i>Loa loa</i> 25 %	<i>Wuchereria</i> <i>bancrofti</i> 1,8 %	18,1 %
11/95	1 256	1 à 10	62,2 %	<i>Loa loa</i> 22,3 %	<i>Wuchereria</i> <i>bancrofti</i> 1,7 %	8,2 %
10/1998 (Bioforma)	3 158		79 %	<i>Loa loa</i> 5,7 %	<i>Onchocerca</i> <i>volvulus</i> 1,4 %	4,7 %
10/1998 (Bioforma)	630	1 à 6	54 %	<i>Loa loa</i> 35,7 %	<i>Mansonella</i> <i>ozzardi</i> 3,8 %	0,3 %
05/2000 **	1 283	1 à 20	19,9 %	<i>Loa loa</i> 78,6 %	<i>Wuchereria</i> <i>bancrofti</i> 2,6 %	1,1 %

* Richesse moyenne de microfilaires par frottis.

** Présence de quelques microfilaires *Loa loa* dans une grande partie des frottis envoyés.

Manifestations cliniques : *Mansonella perstans* n'est pratiquement pas pathogène. Elle semble pouvoir provoquer un prurit modéré, peut être des céphalées minimales et être peu éosinophilogène. Son rôle dans l'éléphantiasis et l'œdème de Calabar est certainement nul (407).

Répartition géographique : elle a été trouvée en Afrique et en Amérique.

En Afrique : elle existe au Mali, Dahomey, Sénégal, Ghana, Nigeria, Congo, Cameroun, Gabon, Rhodésie, Soudan, Gambie, Haute-Volta, Guinée, Libéria, Tchad, Empire centrafricain, Zaïre, Ouganda, Kenya, Tanzanie, Angola, Mozambique.

En Amérique : elle est localisée dans la région côtière d'Amérique du sud et centrale : Panama, Vénézuéla région de l'Amazone (404), Argentine, Colombie (406).

Aspect à frais : mouvements saccadés avec extension brusque d'une partie du corps.

Périodicité : apériodique.

Attitude en goutte épaisse : assez régulière, il n'y a pas d'ondulations secondaires (photos n° 231 et 232).

Taille : microfilaires humides fixées par le formol (408)

Longueur moyenne : 197 µm (de 165 à 216)

Largeur moyenne : 4,5 µm

Microfilaires séchées sur frottis colorées au May-Grünwald-Giemsa. Pour 30 microfilaires observées chez 3 malades différents, nous avons obtenu :

Longueur moyenne : 178 µm (de 155 à 212)

Largeur moyenne : 4,3 µm

On distingue parfois (405) une grande variété, constatée une fois sur 10 par E. Brumpt (8).

Gaine : absente

Espace céphalique : 3 à 4 μm de long (inférieur à la largeur) (photo n° 233).

Corps interne : non visible

Noyaux somatiques : de taille moyenne, de forme irrégulière, ovulaire, losangique, se touchant, sans espace libre entre eux, de couleur violette au Giemsa. En goutte épaisse avec sang prélevé au bout du doigt, les noyaux ont un aspect en carrelage très caractéristique (photos n° 233 à 237).

Dernier noyau et extrémité postérieure : le dernier noyau est situé tout à fait à l'extrémité de la microfilaire. Il a la forme d'un demi-cercle dont l'arrondi est postérieur et est recouvert par la cuticule, ce qui fait que l'extrémité terminale est arrondie. Cet aspect terminal en « doigt de gant » est caractéristique de *M. perstans* (photos n° 234 à 237).

Une autre espèce, *Dipetalonema semiclanum*, a été décrite au Zaïre. C'est une microfilaire sans gaine et subpériodiques avec un léger pic diurne.

Elle mesure 200 μm \times 5 μm en goutte épaisse. L'aspect général est celui de *M. perstans* mais elle est plus large et dans la moitié postérieure, il y a une longue bande claire contenant des noyaux peu nombreux et espacés.



Photo n° 231 : Microfilaire Mansonella perstans. Goutte épaisse. Attitude régulière. Absence de gaine. Coloration hématéine-éosine. Obj. \times 25.

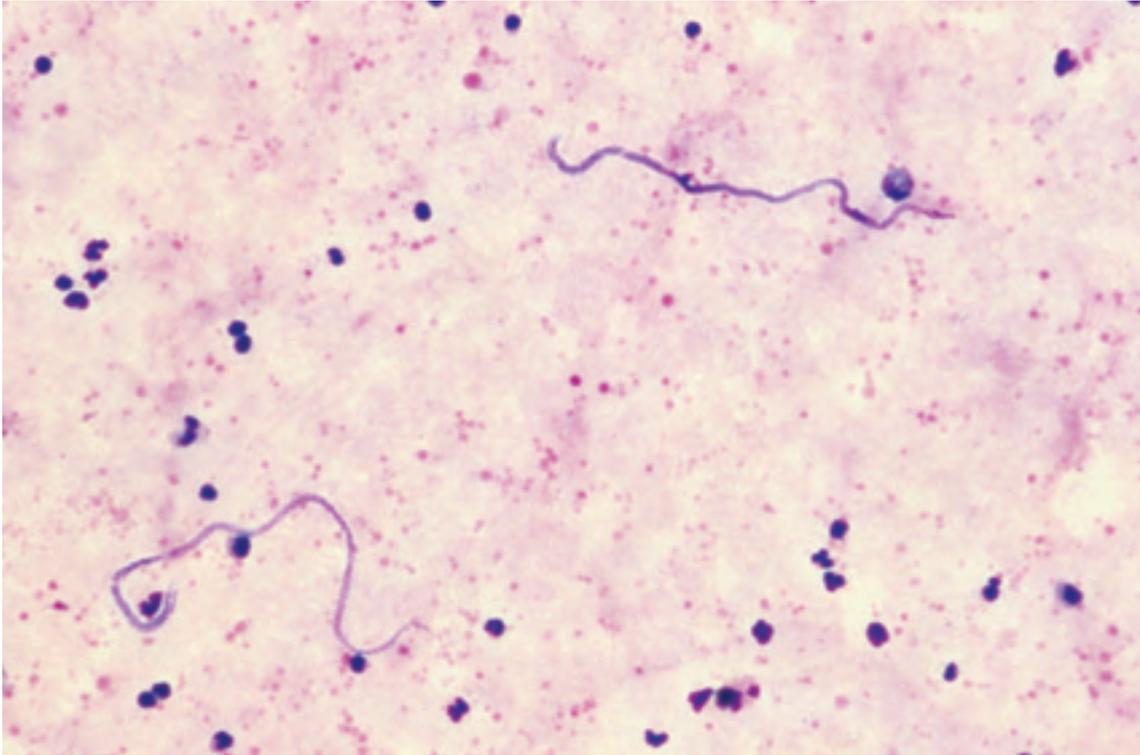


Photo n° 232 : Microfilaire Mansonella perstans. Goutte épaisse. Attitude assez régulière. Coloration M.G.G. Obj. × 25.



Photo n° 233 : Microfilaire Mansonella perstans. Frottis. Extrémité antérieure, sans noyau, courte. Noter l'absence d'espace entre la cuticule et les hématies en raison de l'absence de gaine. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



Photo n° 234 : Microfilaire Mansonella perstans. Frottis. Noyaux somatiques de forme irrégulière se chevauchant. Pas de corps interne. Noyau terminal de forme arrondie en doigt en gant. Hématies touchant la cuticule en faveur de l'absence de gaine. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

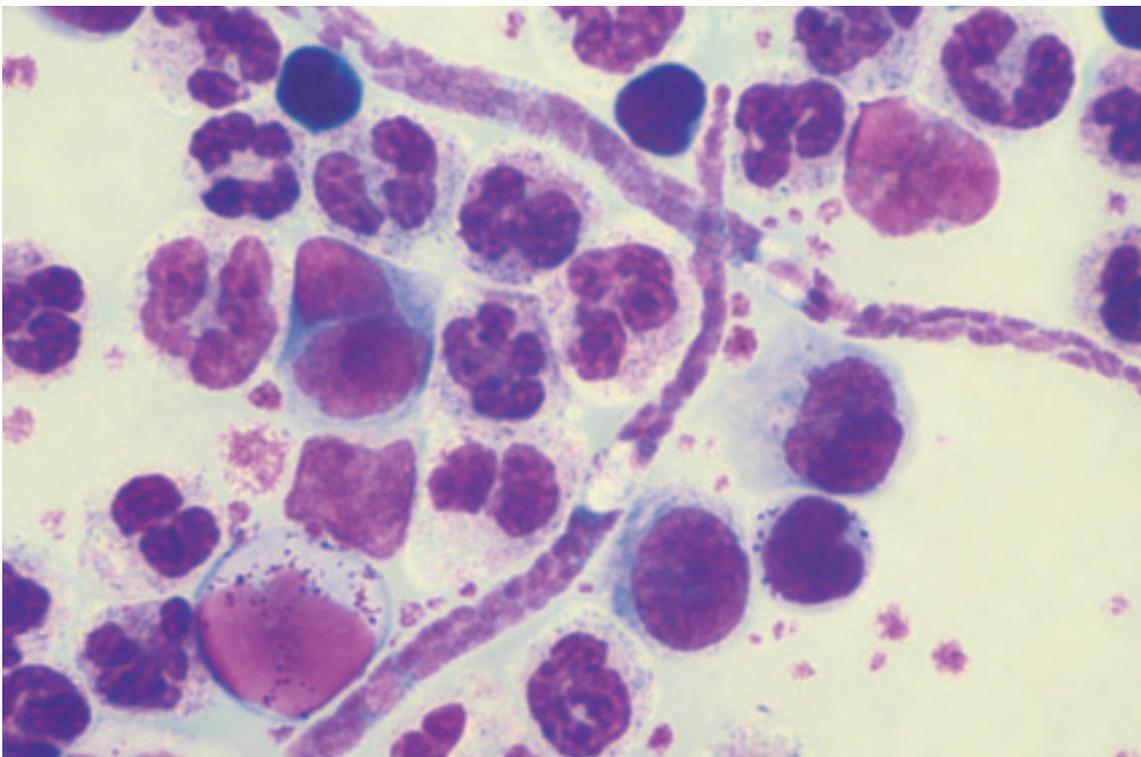


Photo n° 235 : Deux microfilaries Mansonella perstans avec extrémité terminale caractéristique. Cyto-concentration. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



Photo n° 236 : *Microfilare Mansonella perstans*. Goutte épaisse. Noyaux somatiques de forme irrégulière, se touchant. Noyau terminal circulaire. Absence de corps interne. Coloration M.G.G. Obj. $\times 100$.



Photo n° 237 : *Microfilare Mansonella perstans*. Goutte épaisse. Noyaux somatiques de forme irrégulière, se touchant. Noyau terminal semi-circulaire recouvert par la cuticule, en doigt de gant. M.G.G. Obj. $\times 100$.

■ DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE DES MICROFILAIRES

MANSONELLA OZZARDI

Répartition géographique : espèce uniquement américaine, Guyane, Argentine, Vénézuéla, Colombie, Panama, Bolivie (409), Guatemala, Haïti (385) et Antilles ou elle a été observée en Guadeloupe par L. Brumpt (410).

Aspect à frais : elle traverse rapidement le champ microscopique.

Périodicité : apériodique.

Attitude en goutte épaisse : courbures régulières, sans ondulations secondaires.

Taille : microfilaires en goutte épaisse colorées par le Giemsa :

Longueur moyenne : 185 (43) à 200 μm (311)

Largeur moyenne : 4 à 5 μm

Gaine : n'existe pas.

Espace céphalique : 4 μm . 2 ou 3 noyaux les plus antérieurs sont en file unique, les suivants sont par paire.

Corps interne : inconstant après coloration au Giemsa, de petite taille, situé entre 60 et 70 p. 100 de la longueur du corps (photo n° 238).

Dernier noyau et extrémité postérieure : dernier petit noyau allongé, subterminal. L'extrémité postérieure est longuement effilée. La dernière portion de la queue, libre de noyaux, est difficile à voir (photos n° 238 et 239).

Manifestations cliniques

Il n'a pas été observé d'association entre les signes comme fièvre, éruption cutanée, prurit, céphalée, œdème lymphatique, éléphantiasis, douleur articulaire et la présence de microfilaires *M. ozzardi* dans le sang (409) : comme *M. pertans* cette espèce paraît peu ou non pathogène.

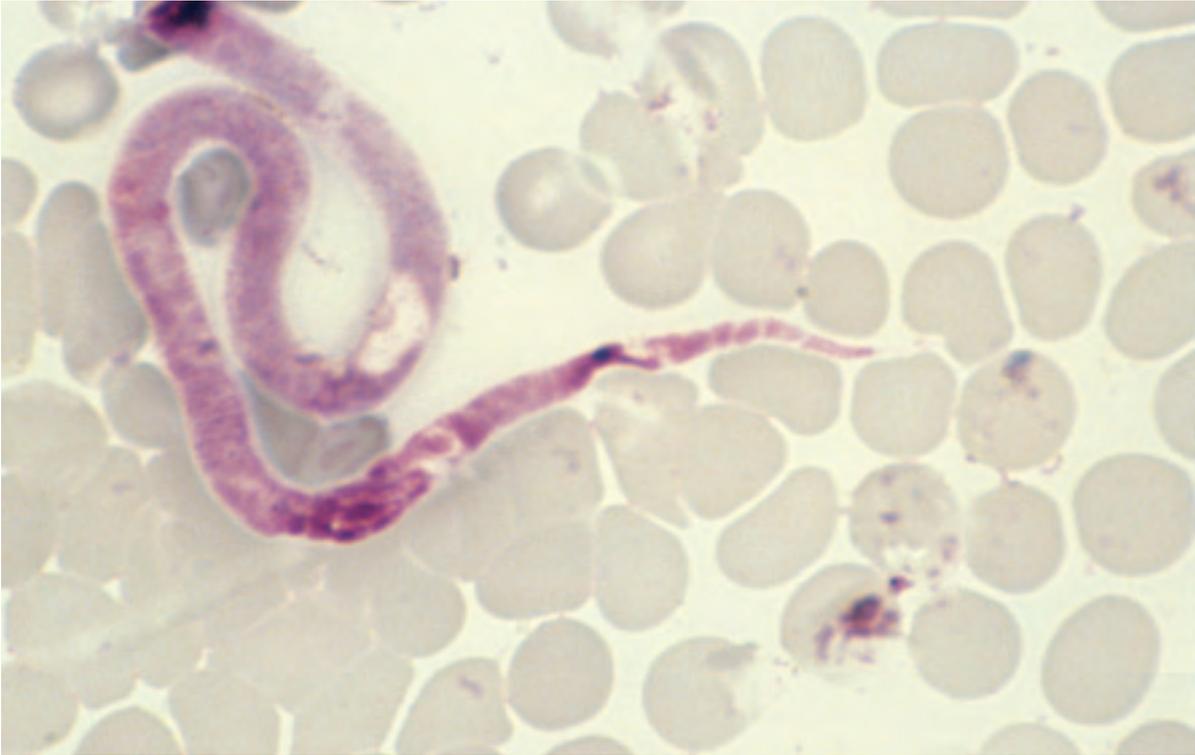


Photo n° 238 : Microfilaire Mansonella ozzardi. Frottis. Noyaux se chevauchant. On aperçoit une ébauche de corps interne à 70 % du corps de la microfilaire. Extrémité postérieure longuement effilée. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

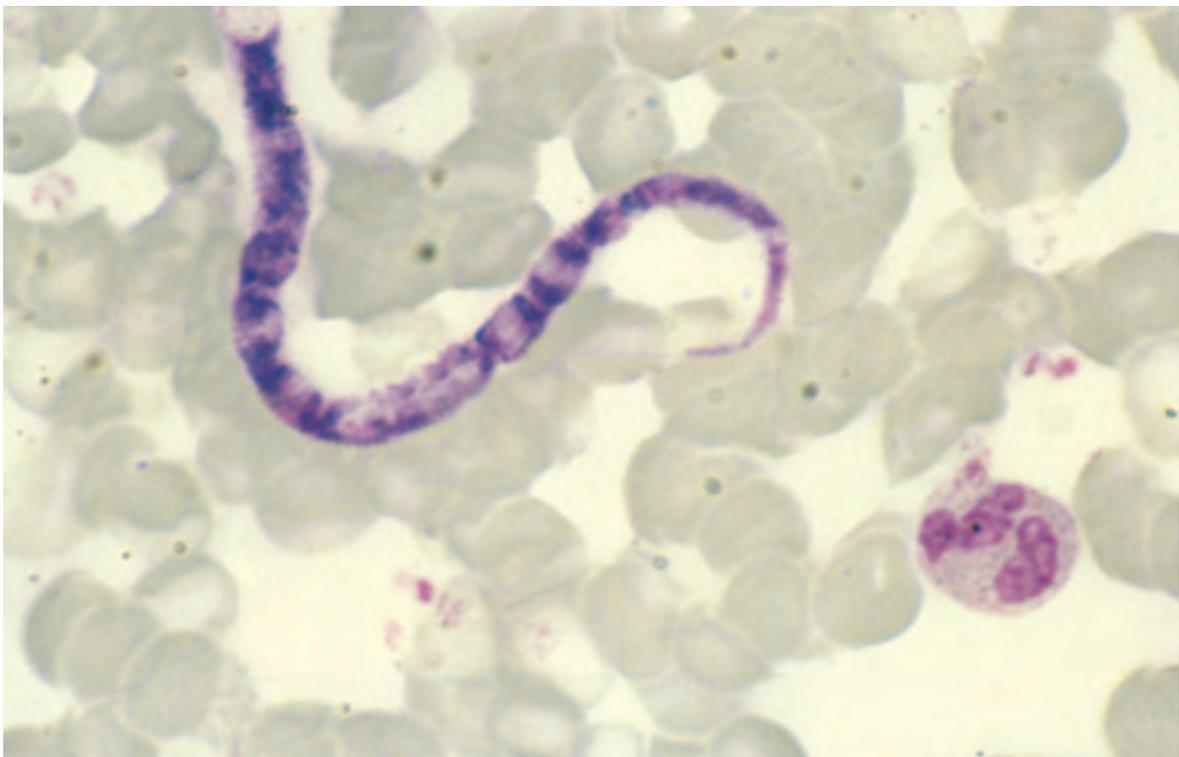


Photo n° 239 : Microfilaire Mansonella ozzardi. Frottis. Noyaux irréguliers dernier petit noyau allongé sub-terminal. Coloration M.G.G. Obj. × 100

■ DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DES PRINCIPALES MICROFILAIRES

MICROFILAIRES *LOA LOA* ET *M. PERSTANS* (photos n° 240 et 241)

La confusion entre microfilaires *Loa loa* et *M. perstans* est fréquente. Sur 10 envois faits au Contrôle de Qualité contenant des microfilaires *Loa loa* seules, 9 fois la deuxième réponse était *M. perstans*, une seule fois ce fut *Wuchereria bancrofti*. La moyenne des réponses *Loa loa* a été 77,3 % et celle des réponses *M. perstans* de 7,8 %. Inversement sur 4 envois comportant des microfilaires *M. perstans* seules, les quatre fois la première réponse était bien *M. perstans* pour les 4 tests avec une moyenne de réponse conforme de 52,5 % et la deuxième réponse était *Loa loa* avec une moyenne de réponses de 22,3 % (en outre 4 envois ont été faits contenant *Loa loa* et *M. perstans*, association fréquente).

Les raisons de cette confusion

² La répartition géographique des deux espèces est en grande partie la même, ce qui explique aussi la fréquence de leur association bien que l'agent vecteur soit très différent.

² **Problème de la gaine** : *M. perstans* est une espèce sans gaine alors que *Loa loa* en possède une, mais cette gaine est inconstamment colorée au May-Grünwald-Giemsa en frottis : c'est cette absence apparente de gaine qui explique de nombreuses confusions diagnostiques.

Les critères de différenciation

² La taille : les microfilaires *Loa loa* ont une longueur de 250 à 300 µm et celles de *M. perstans* de 150 à 180 µm en moyenne : la microfilarie *Loa loa* a une taille presque double de celle de *M. perstans* : c'est l'élément majeur qui permet la différenciation quand on a eu l'occasion d'observer quelque-fois ces microfilaires au microscope.

On ne peut pratiquement pas mesurer la taille des microfilaires en frottis mince en raison de leurs sinuosités. On doit par contre pouvoir comparer leur taille avec celle des lames du contrôle de qualité en parasitologie qui doivent être conservées comme échantillons de référence.

² La forme du noyau terminal, allongé pour *Loa loa*, semi-circulaire pour *M. perstans* est différente.

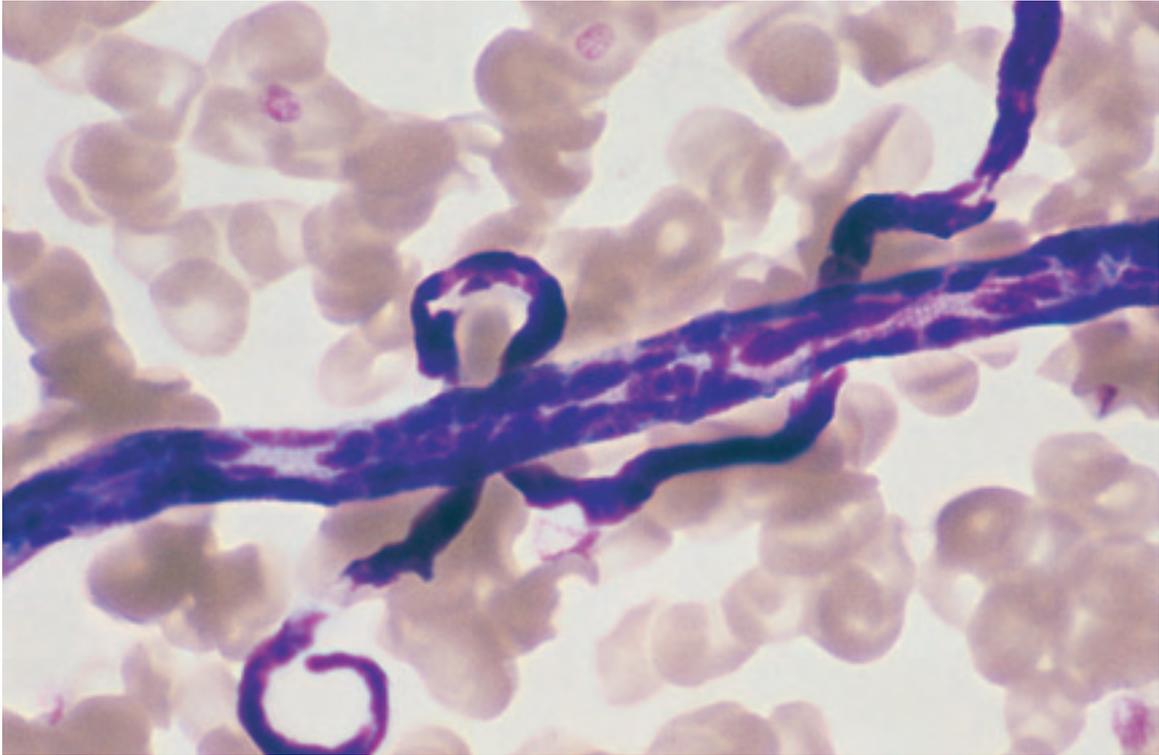
² Noyaux somatiques : ils sont de forme irrégulière, se chevauchant pour ces deux espèces.

² Nous rappelons que la non coloration de la gaine ne veut pas dire son absence.

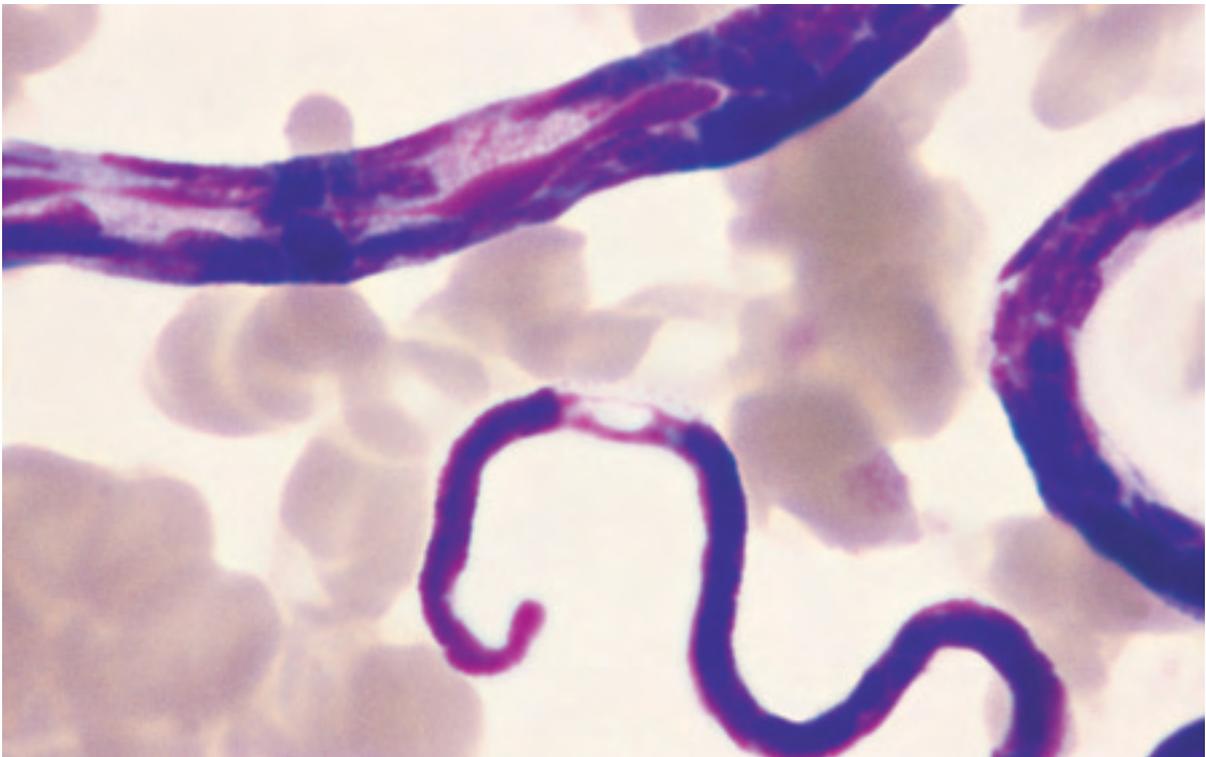
² La présence de noyaux sous cuticulaires allongés chez *Loa loa* est caractéristique.

Goutte épaisse : L'attitude est différente : « tortillée » pour *Loa loa*, régulière pour *M. perstans*.

Traitement : Le traitement de la loase est efficace, mais comporte le risque d'encéphalite thérapeutique (voir page 221). *M. perstans* est difficile à traiter mais cette filaire est pratiquement non pathogène.

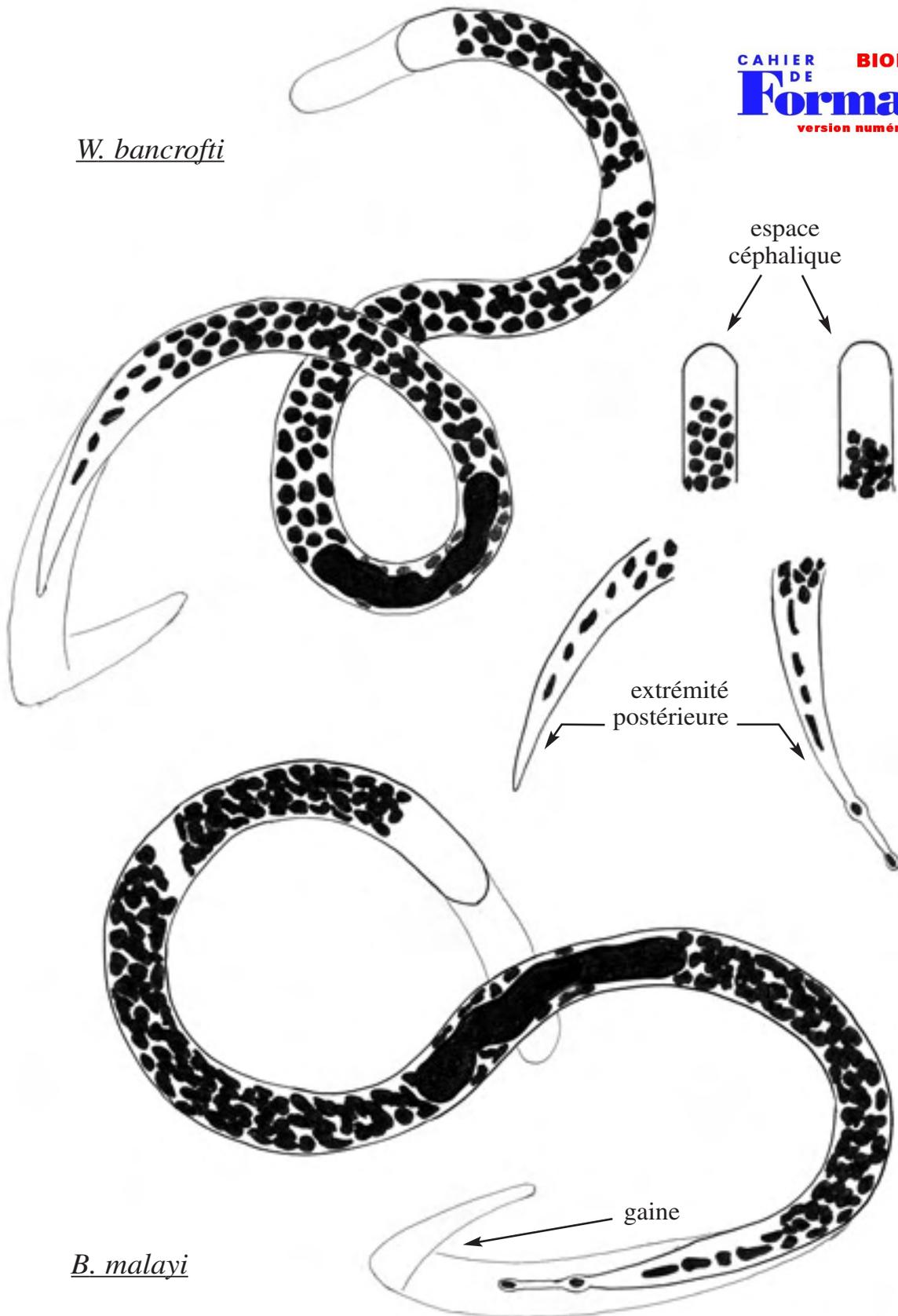


*Photo n° 240 : Une microfilaire Loa loa entourée d'une microfilaire M. perstans de beaucoup plus petite taille avec son extrémité terminale en doigt de gant.
Frottis. Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



*Photo n° 241 : Microfilaire Loa loa et M. perstans comparer en particulier la taille.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

W. bancrofti



B. malayi

Figure 6 : Diagnostic différentiel de *W. bancrofti* et *B. malayi*.



Photo n° 242 : Microfilarie W. bancrofti. Frottis. Le dernier noyau situé à distance de l'extrémité terminale, noyaux somatiques arrondis, séparés, bien différents de B. malayi ci-dessous. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

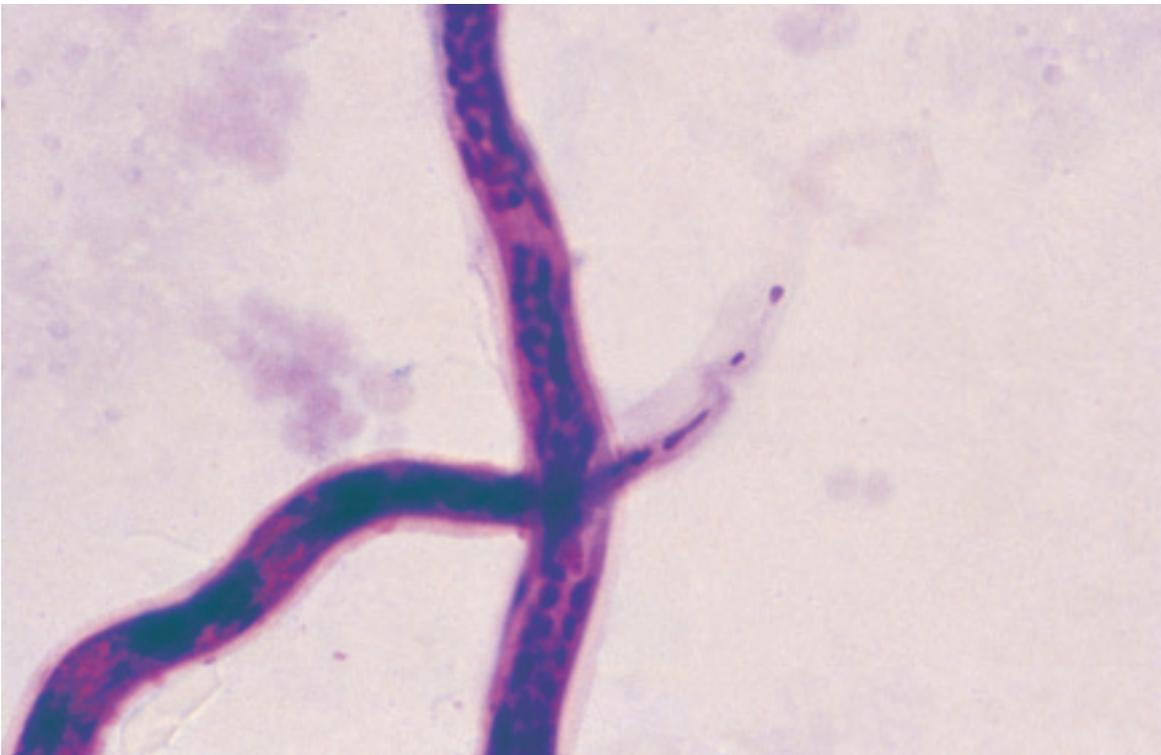


Photo n° 243 : Microfilarie B. malayi. Goutte épaisse. Les deux derniers noyaux sont à distance de l'extrémité terminale. Noyaux somatiques se chevauchant, bien différents de W. bancrofti ci-dessus. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

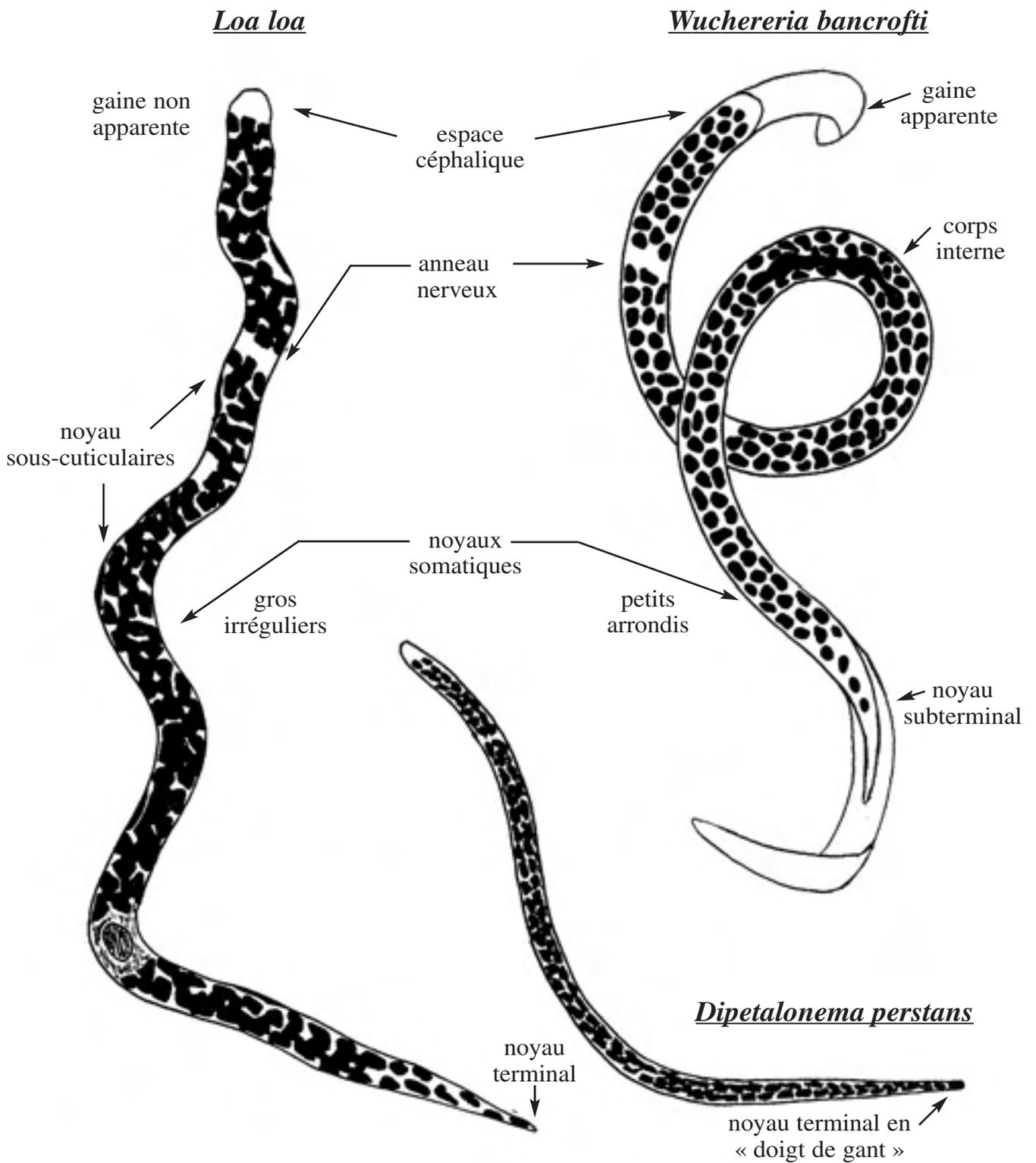


Figure 7 : Diagnostic différentiel de *Loa loa*, *W. bancrofti* et *M. perstans*



Photo n° 244 :
 Microfilaire *Loa loa* :
 noyau terminal allongé,
 noyaux somatiques
 se chevauchant, gaine
 non colorée.
 Coloration M.G.G.
 Obj. × 100.



Photo n° 245 :
 Microfilaire
W. bancrofti :
 noyau subterminal
 situé à 10-12 µm
 de l'extrémité,
 noyaux somatiques
 arrondis séparés,
 gaine colorée.
 Corps interne visible.
 Coloration M.G.G.
 Obj. × 100.



Photo n° 246 :
 Microfilaire
M. perstans :
 petite taille, noyau
 terminal arrondi,
 noyaux somatiques
 se chevauchant.
 Coloration M.G.G.
 Obj. × 100.

	<i>Wuchereria bancrofti</i>	<i>Loa loa</i>	<i>Brugia malayi</i>	<i>Mansonella ozzardi</i>	<i>Mansonella persians</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>	<i>Dipetalonema streptocerca</i>
Localisation	Sang	Sang	Sang	Sang	Sang	Derme	Derme
Périodicité	Nocturne (var. apériodique)	Diurne	Nocturne non stricte	Apériodique	Apériodique	Apériodique	Apériodique
Attitude en G.E. (Goutte épaisse)	Courbures régulières « Gracieuses »	Courbures irrégulières « Tortillées »	Courbures irrégulières « Tortillées »	Courbures régulières	Courbures régulières	Courbures régulières, assez rigide	Rigide, peu ondulé, souvent rectiligne
Taille : Longueur	250-300 µm	250-300 µm	135-240 µm	200 µm envir.	100-200 µm 150-180 en général	200-300 µm	180-240 µm
Largeur	8 µm	7-8 µm	6-7 µm	5 µm envir.	4-5 µm	8 µm	4-5 µm
Gaine Col. M.G. Giemsa	Avec gaine	Avec gaine	Avec gaine	Sans gaine	Sans gaine	Sans gaine	Sans gaine
FROTTS	généralement colorée en rose brillant	inconstamment colorée	inconstamment colorée				
G.E.	Inconstamment colorée	jamais colorée	inconstamment colorée				
Col. hématéine	Gaine constamment visible						
Espace céphalique sans noyau	5-6 µm	4 µm	10-15 µm	4 µm	3-4 µm	8-15 µm, extrémité ant., légèrement dilatée	3-4 µm
Corps interne	Bien visible unique, rouge vif	Souvent visible	Bien visible en 3 petites masses	Ébauché	Non visible	Non visible	Non visible
Noyaux somatiques	Petits, arrondis, très espacés	Gros, irréguliers, se chevauchant Présence de noyaux sous-cuticulaires	Nombreux, petits, peu distincts se chevauchant	Moyens, irréguliers, se chevauchant	Moyens, irréguliers, se chevauchant	Gros, allongés, se chevauchant	Premiers noyaux sur une seule file
Noyaux terminaux	Situé à 8-10 µm de l'extrémité	Situé à l'extrémité	Renvoi ①	Petit noyau allongé presque terminal	Assez gros noyau, semi arrondi terminal	à 10-15 µm de l'extrémité	Derniers noyaux sur une seule file
Extrémité postérieure	Longueusement effilée	Effilée et légèrement émoussée	Renflements terminaux Renvoi ①	Longueusement effilée	Mousse, en doigt de gant	Brusquement effilée	Amincie graduellement, non effilée, en croûte d'évêque

① *Brugia malayi* : au-delà de la colonne nucléaire, deux renflements terminaux : – petit renflement subterminal renfermant un noyau difficile à voir,

– renflement terminal renfermant un noyau un peu plus grand.

Tableau XIX : Diagnostic différentiel des microfilaries (photos n° 240 à 246)

Le diagnostic différentiel de microfilaires se pose avec différents éléments de nature variée, en général mycéliens, qui sont des artéfacts provenant soit :

– d'une multiplication mycosique qui s'est produite quand le frottis ou la goutte épaisse est conservé à l'humidité avant d'être coloré

– soit d'éléments d'origine végétale qui se sont déposés sur le frottis ou la goutte épaisse avant coloration.

– Filaments mycéliens (photos n° 247, 248 et 249)

• *Helicosporium sp* (photo n° 250)

• Fibre végétale (photo n° 251)

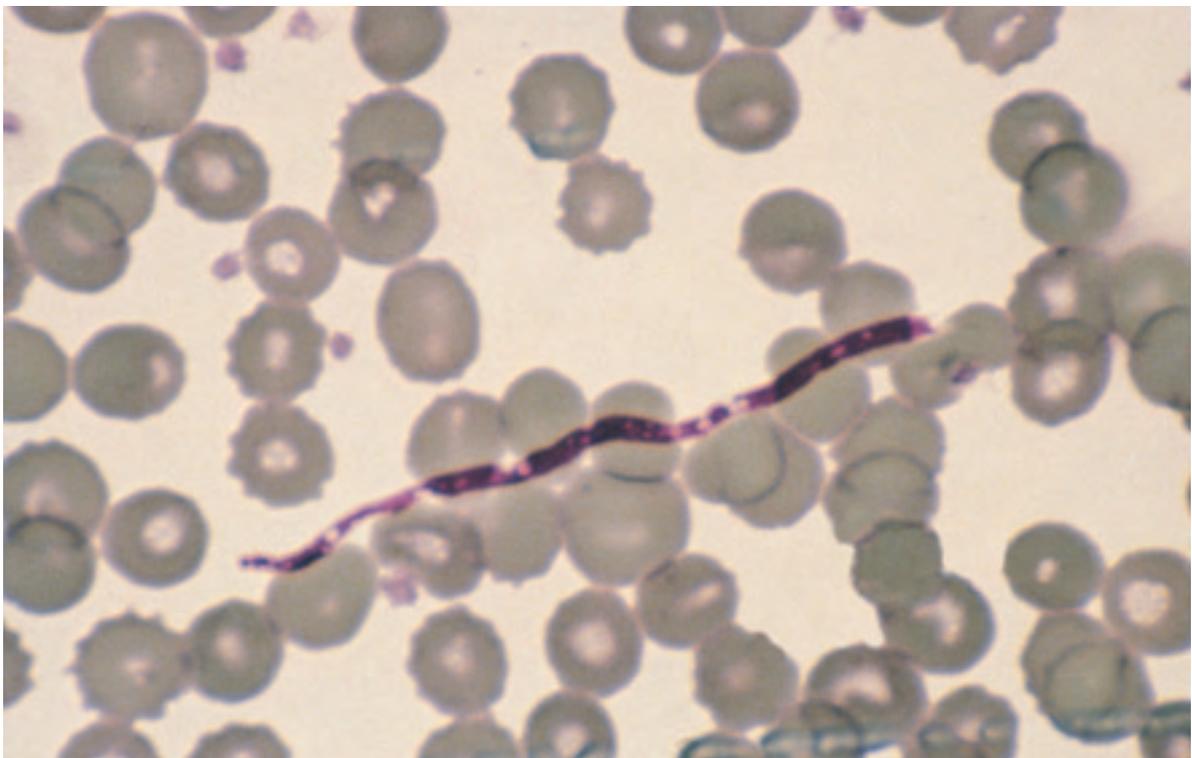


Photo n° 247 : Petite partie d'un filament mycélien, l'extrémité postérieure pourrait faire penser à une microfilaire avec noyau terminal, mais les noyaux somatiques ne sont pas présents. Frottis. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

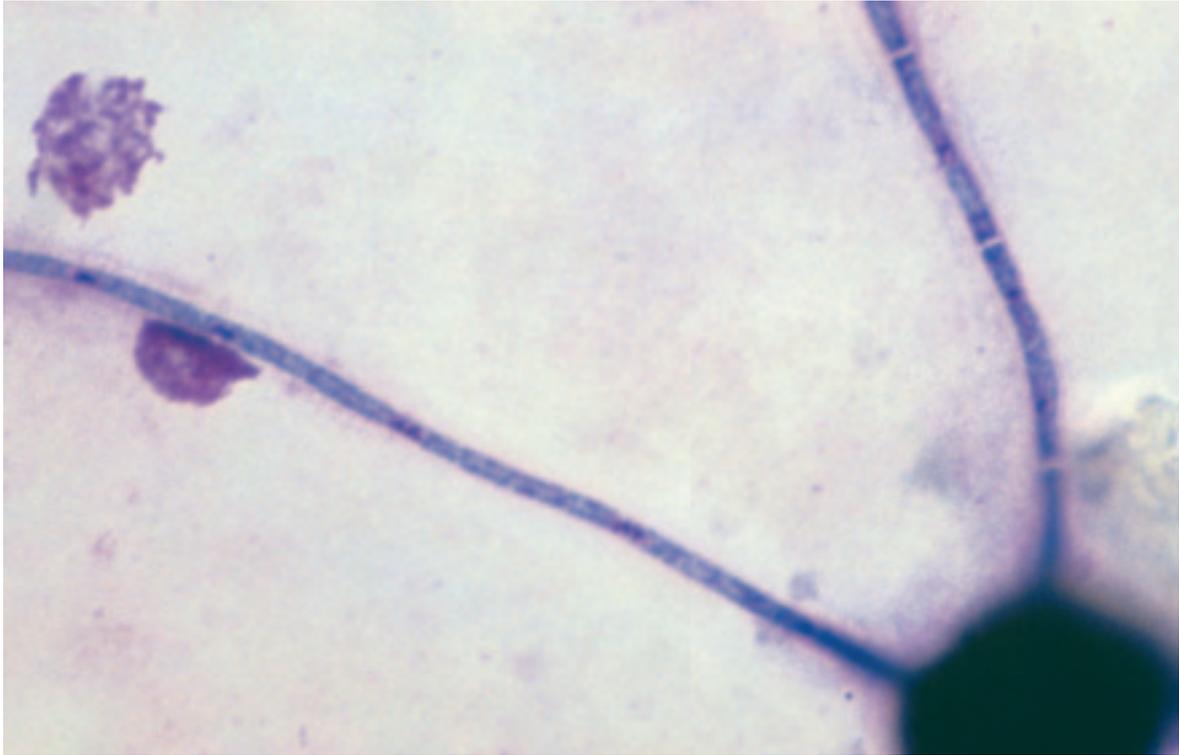


Photo n° 248 : Deux filaments mycéliens naissant d'un élément de base, facile à différencier d'une microfilaire. Goutte épaisse. Coloration M.G.G. obj. × 100.

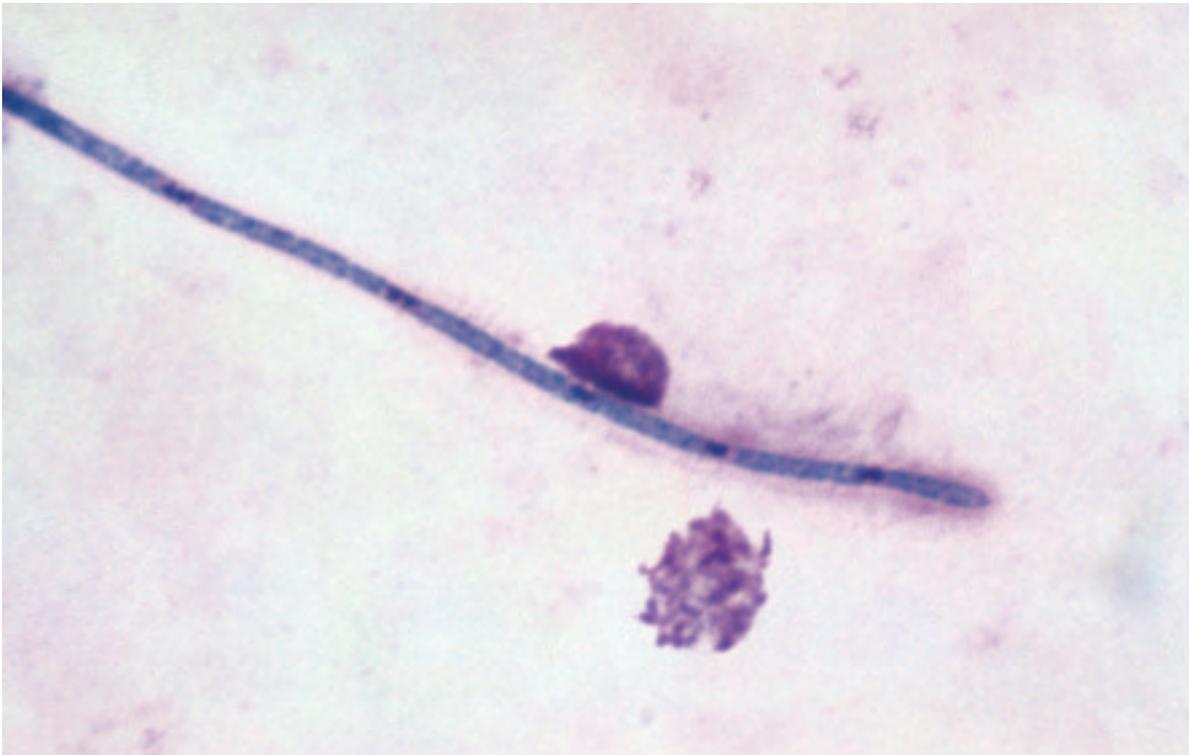


Photo n° 249 : Filament mycélien sur la même préparation que la photo précédente, plus difficile à différencier d'une microfilaire quand il est isolé. Goutte épaisse. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



Photo n° 250 : *Helicosporium* sp. dans son enveloppe ressemblant à un œuf, à ne pas confondre avec une microfilaire. Frottis. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



Photo n° 251 : Élément rencontré sur un frottis sanguin. Aucun noyau n'est présent, il ne peut donc pas s'agir d'une microfilaire, c'est une fibre végétale. Coloration M.G.G. Obj. × 40.

■ NUMÉRATION DES MICROFILAIRES

La numération des microfilaires est importante dans la loase et doit précéder toute thérapeutique si la microfilarémie paraît élevée. En effet, la lyse thérapeutique brutale de plus de 1 000 microfilaires par 20 µl soit 50 par µl de sang peut provoquer un coma mortel (364).

En outre, elle permet de suivre l'évolution de la microfilarémie des espèces périodiques.

TECHNIQUES

a) **Numération directe** : goutte épaisse calibrée (412 et 413).

Prélever 20 µl de sang au moyen d'une micropipette.

Confectionner une goutte épaisse en faisant écouler doucement ce sang suivant des bandes longitudinales successives en évitant de faire des bulles de manière à obtenir un étalement épais, rectangulaire, de 3 cm de long sur 1,5 cm de large environ. On peut rincer la pipette avec un peu d'eau qu'on dépose à côté de la goutte épaisse pour plus de précision.

Sécher. Colorer comme une goutte épaisse habituelle.

Compter les microfilaires au microscope à l'objectif $\times 10$ (ou $\times 25$) après avoir recouvert la goutte épaisse d'huile à immersion : on a le nombre de microfilaires contenus dans 20 µl de sang (faire la correction nécessaire si le prélèvement a été fait sur citrate liquide).

b) **Numération après dilution** (412)

Faire une dilution au 1/10 dans une pipette à globules blancs, avec le bleu acétique (comme pour une numération manuelle de leucocytes).

On peut remplacer le bleu acétique par une dilution du sang dans du formol à 2 % dans de l'eau distillée, du robinet ou minérale comme pour la concentration de Knott. Diluer 0,1 ml de sang dans 0,9 ml de formol 2 %. Cette dilution permet aussi une mensuration des microfilaires présentes (page 209).

Remplir une cellule de Nageotte. (La cellule de Lemaure est moins adaptée à cette numération.)

Compter les microfilaires contenues dans toute la cellule (40 bandes = 50 µl) et on obtient le nombre de microfilaires pour 5 µl ; multiplier par 4 pour avoir le nombre de microfilaires pour 20 µl ou diviser par 5 pour avoir le résultat par µl.

INTÉRÊT DE CHACUNE DE CES TECHNIQUES

La numération à la cellule de Nageotte est plus précise si la microfilarémie est assez élevée c'est à dire supérieure à plus de 100 microfilaires pour 20 µl.

La goutte épaisse calibrée est préférable si la microfilarémie est faible.

RÉSULTATS

Les résultats sont exprimés en nombre de microfilaires pour 20 μ l de sang ou par μ l. Ils doivent rendre compte du nombre de microfilaires maximal, il faut donc effectuer le prélèvement à l'acmé de la microfilarémie, c'est-à-dire vers midi pour la loase et vers minuit pour les filarioses lymphatiques.

Habituellement, on trouve pour 20 μ l de sang :

- *W. bancrofti* : quelques-unes à quelques dizaines de microfilaires.
- *B. malayi* : quelques-unes à quelques centaines de microfilaires.
- *Loa loa* : quelques-unes à quelques milliers de microfilaires.

Les numérations faites sur sang capillaire donnent des chiffres un peu plus élevés que celles faites sur sang veineux (412).

BIBLIOGRAPHIE

Recherche des microfilaires sanguicoles

329. BELL D. Membrane filters and microfilariae: a new diagnostic technique. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1967, **61**, 220-223.
330. COUTELEN F. G. Contribution aux essais de culture *in vitro* d'embryons de filaires. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1928, **21**, 316-322.
331. FOLEY H. Études morphologiques sur les microfilaires à gaine (*Mf. Bancrofti* et *Mf. Diurna*) *Ann. Inst. Pasteur*, 1913, **27**, 50-68.
332. FOSHAY L. The cuticular morphology of some common microfilariae. *Ann. J. Trop. Med.*, 1947, **27**, 233-239.
333. FÜLLEBORN F. Beiträge zur morphologie und differential diagnose der mikrofilarien. *Arch. Schiffs Trop. Hyg.*, 1913, **17**, 7-72.
334. GOLVAN Y.J. La rétractilité des microfilaires sanguicoles dans les gouttes épaisses, ses modalités et sa valeur diagnostique. *Ann. Paras. Hum. Comp.*, 1956, **31**, 139-146.
335. GOLVAN Y.J. Les principales techniques de coloration des microfilaires sanguicoles. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1957, **50**, 143-157.
336. GOLVAN Y.J., LARIVIÈRE M. Aspects des microfilaires de *Wuchereria bancrofti* dans les étalements de culots de centrifugation urinaires. *Ann. Paras. Hum. Comp.*, 1957, **32**, 286-289.
337. GUSTAVSON-MORINGLANE I-L., BENGTSON E. Eosinophil leucocytic reactions from diethylcarbamazine in filariasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1981, **75**, 615-621.
338. HAWKING F., DENHAM D.A. The distribution of human filariasis throughout the world. Part I. The Pacific region, including New Guinea. *Trop. Dis. Bull.*, 1976, **73**, 347-373.
339. HAWKING F., DENHAM D.A. The distribution of human filariasis throughout the world. Part II. Asia. *Trop. Dis. Bull.*, 1976, **73**, 967-1016.
340. HAWKING F., DENHAM A. *Trop. Dis. Bull.*, 1976, **74**, 649-679.
341. HERBEUVAL R., HEURBEVAL H., CUNY G., DUHEILLE J. Recherche des cellules cancéreuses dans le sang et les liquides et exsudats par leuco-concentration. *Presse Méd.*, 1961, **69**, 149-152.
342. HO THI SANG, PETITHORY J.C. Techniques de concentration des microfilaires sanguicoles. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1963, **56**, 197-206.
343. Hunter G.W., Warren V.G. Studies on filariasis. VI Observations of the reversal of microfilarial periodicity in a case of *Filariasis bancrofti*. *J. Paras.*, 1950, 36, 164-168.
344. KNOTT J. A method for making microfilariae survey on day blood. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1939, **33**, 191-196.
345. LAVIER G. L'éosinophilie sanguine dans les helminthiases. *Le Sang*, 1944, **16**, 510-528.
346. LAVIER G., BRUMPT L.C. L'évolution de l'éosinophilie au cours de l'ankylostome. *Le Sang*, 1944, **16**, 97-102.
347. MANSON-BAHR PH. The story of filaria bancrofti. *J. Trop. Med. Hyg.*, 1959, **62**, 160-173.
348. PARTONO F., CROSS J.H., DEMIJATI P., CEMMIJATI S. Evaluation of thick smear, Knott and membrane filtration methods for demonstrating microfilariae in blood. *Ital. Trop. Geo. Med. Hyg.*, 1973, **25**, 286-289.

349. PETITHORY J.C. Coloration des microfilaires par la méthode Harris Shorr. *J. Path. Biol.*, 1965, **13**, 316.
350. PETITHORY J.C., ARDOIN F., ASH L.R., VANDEMEULEBROUCKE E., GALEAZZI G., DUFOUR M, PAUGAM A. Microscopic diagnosis of blood parasites following a cytoconcentration technique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1997, **57**, 78-83.
351. PETITHORY J.C. Les éosinophilies familiales : apports de la parasitologie à leur diagnostic. *Bull. Acad. Natle. Méd.*, 1998, **182**, 1823-1838.
352. RANQUE J., CABASSU H. Les limites Nord-Est et Sud-Est du foyer camarguais de filariose canine. *Rev. Path. Comp. Hyg. Gén.*, 1947, **47**, 442-447.
353. RIBERU W.A., ATMOSGEDJONO S., TIRTOKUSUMO P.S., BANGS M.J., BAIRD J.K. Cultivation of sexually mature *Brugia malayi* in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1990, **43**, 3-5.
354. RODENWALDT E. Zur morphologic von *Microfilaria malayi*. *Med. Dienst. Volks. in Ned. Ind.*, 1933, **20**, 44-54.
355. SAWYER T.K., WEINSTEIN P.P. Development *in vitro* to the sauvage stage of microfilariae of the dog heartworm *Dirofilaria immitis*. *J. Parasit.*, 1962, **48**, sup. 35.
356. SHARP N.A.D. *Filaria bancrofti* and *Loa loa*. A note on some methods of differentiation of their embryos. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1923, **17**, 177-191.
357. TAYLOR A. Maintenance of filarial worms *in vitro*. *Exp. Parasit.*, 1960, **9**, 113-120.
358. THIROUX A. Les filaires embryonnaires du sang des indigènes de l'Afrique Occidentale française. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1912, **5**, 438-450.
359. YORKE W., BLACKLOCK D. Observations on the periodicity of microfilaria nocturna. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1917, **11**, 127-148.

Bibliographie *Loa loa*

360. ALAJOUANINE TH., CASTAIGNE P., LHERMITTE F., CAMBIER J. Encéphalite puis endocardite fibroblastique d'origine filarienne. *Rev. Neuro.*, 1959, **101**, 656-660.
361. ANDRÉ R., BRUMPT L.C., OBRIOT T., PETITHORY J.C. Loase avec microfilarémie exceptionnellement élevée. Intérêt thérapeutique de l'exsanguino-transfusion. *Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1966, **117**, 1059.
362. ARDOIN-GUIDON F., PETITHORY J.C. Le corps interne des microfilaires *Loa loa*. Données morphologiques et physiopathologiques. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1989, **82**, 13-20.
363. BOUSSINESQ M., GARDON J., GARDON-WENDEL N., KAMGNO J., NGOUMOU P., CHIPPAUX J-P. Three probable cases of *Loa loa* encephalopathy following ivermectin treatment for onchocerciasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1998, **58**, 461-469.
364. BRUMPT L.C., PÉQUINOT H., LHERMITTE F., PETITHORY J.C., REMY H. Loase avec microfilarémie élevée, encéphalite thérapeutique, traitement par exsanguino-transfusion. *Bull. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1966, **117**, 1049-1058.
365. BRUMPT L.C., PETITHORY J.C. Indications de l'exsanguino-transfusion dans les loases à forte microfilarémie. *Thérapeutique*, 1969, **45**, 77-78.
366. CARME B., BOULESTEIX J., BOUTES H., PURUEHNCE M.F. Five cases of encephalitis during treatment of loiasis with diethylcarbamazine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1991, **44**, 684-690.
367. CHANDENIER J., PILLIER-LORIETTE C., DATRY A., ROSENHEIM M., DANIS M., FÉLIX H., NOZAIS J.P., GENTILINI M. Intérêt de la cytophèrese dans le traitement des loases à fortes microfilarémies. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1987, **80**, 624-633.

368. CHIPPAUX J-P., BOUSSINESQ M., GARDON J., GARDON-WENDEL N., ERNOULD J-C. Severe adverse reaction risks during mass treatment with ivermectin in loiasis-endemic areas. *Paras. Today*, 1996, **12**, 448-450.
369. FAIN A. Les problèmes actuels de la loase. *Bull. Org. Mond. Santé*, 1978, **56**, 155-167.
370. FROMAGE M., PETITHORY J.C. Sérologie de la loase. *Ann. Contr. Natl. Qual.*, 2000, **19**, 55-57.
371. FÜLLEBORN F. Untersuchungen an menschlichen filarien und deren übertragung auf stechmücken. *Arch. f. Schiff. Trop. Hyg.*, 1908, **12**, 5-43.
372. HO THI SANG ET PETITHORY J.C. Techniques de concentration des microfilaries sanguicoles. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1963, **56**, 197-206.
373. PETITHORY J.C., HO THI SANG, BRUMPT L.C. Pouvoir toxique expérimental des microfilaries *Loa loa* chez la souris. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1964, **57**, 1262-1269.
374. PETITHORY J.C. La filariose à *Loa loa*. *Rev. Méd.*, 1967, **12**, 611-615.
375. PETITHORY J.C., BRUMPT L.C., JAEGER G., SOILLEUX M., FEILLET M., RICOUR A., FANQUET B., DAMBRIN A. Étude sérologique de la loase en Ouchterlony au moyen d'un antigène homologue. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1972, **65**, 859-866.
376. TOURÉ F.S., MAVOUNGOU E., DELORON P., EGWANG T.G. Analyse comparative de deux méthodes diagnostique de la loase humaine : sérologie IgG4 et PCR nichée. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1999, **92**, 167-170.
377. VAN BOGAERT L., DUBOIS A., JANSSENS P.G., RADERMECKER J., TVERDY G., WANSON M. Encephalitis in *Loa loa* filariasis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1955, **18**, 103-119.
378. WALKER-DEEMIN A., KOMBILA M., MORAY H., RONDI M.L., NGUIRI C., RICHARD-LENOBLE D. Detection of circulating antigens in Gabonese patients with *Loa loa* filariasis. *Trop. Med. Intern. Health*, 1996, **1**, 772-778.

Bibliographie *W. bancrofti*

379. ALVES R.D., VAN WYK A. A brief note on a new focus of filariasis in Southern Rhodesia Central. *Af. J. Med.*, 1960, **6**, 431-432.
380. BRUMPT L.C., PÉQUINOT H., LHERMITTE F., PETITHORY J.C., RÉMY H. Loase avec microfilarémie élevée, encéphalite thérapeutique, traitement par exsanguino-transfusion. *Bull. Soc. Méd. Hôp. Paris.*, 1966, **117**, 1049-1058.
381. GALLIARD H., BRYGOO P. *Microfilaria bancrofti* var. *vauceli* ; variété nouvelle de la Côte Sud-Est de Madagascar. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1955, **48**, 473-475.
382. GALLIARD H., BRYGOO P., GOLVAN Y. Description de la microfilaries de *Wuchereria bancrofti*, var. *vauceli*. *Ann. Paras. Hum. Comp.*, 1955, **30**, 481-487.
383. IYENGAR M.T.O. Differentiation of microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Filaria malayi*. *Ind. J. Med. Res.*, 1939, **27**, 563-571.
384. IYENGAR M.T.O. *Trop. Dis. Bull.*, 1966, **63**, 1360.
385. RACCURT C.P. Filarioses en Haïti : un siècle d'histoire. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1999, **92**, 355-359.
386. SASA M. et al. *Jap. J. Exp. Med.*, 1965, **35**, 125-132.
387. SHARP N.A.D. *Filaria bancrofti* and *Loa loa*. A note on some methods of differentiation of their embryos. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1923, **17**, 177-191.

388. THIROUX A. Les filaires embryonnaires du sang des indigènes de l'Afrique Occidentale française. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1912, **5**, 438-450.

Bibliographie *Brugia*

389. BAIRD J.K., ALPERT L.I., FRIEDMAN R., SCHRAFT W.C., CONNOR D.H. North American *Brugia* filariasis : report of nine infections of humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1986, **35**, 1205-1209.

390. BAIRD J.K., NEAFIE R.C. South American *Brugia* filariasis : Report of a human infection acquired in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1989, **39**, 185-188.

391. DAS M.K., SUBRAMANYAM V.R., RAVINDRAN B., PATTNAIK N.M. A study of the antigen, antibody and immunocomplex levels in *Wuchereria bancrofti* filariasis with reference to clinical status. *J. Trop. Med. Hyg.*, 1987, **90**, 135-141.

392. DAVID H.L., EDESON J.F.B. Filariasis in Portuguese Timor, with observations on a new microfilaria found in man. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1965, **59**, 193-204.

393. EDESON J.F.B. The microfilariae of the periodic and semi-periodic forms of *Brugia malayi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1960, **54**, 6.

394. EDESON J.F.B., WHARTON R.H. The experimental transmission of *Wuchereria malayi* from man to various animals in Malaya. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1958, **52**, 25-38.

395. FENG L.C. A comparative study of the anatomy of *Microfilaria malayi* Brug 1927 and *Microfilaria bancrofti* Cobbold 1877. *Chin. Med. J.*, 1933, **47**, 1214-1246.

396. FRIESS J., PIERROC M., SEGALÉN J. De certaines formes cliniques. De la filariose lymphatique (*W. malayi*); relations avec les éosinophilie tropicales.. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1953, **6**, 1037-1066.

397. GUTTIEREZ Y., PETRAS R.E. *Brugia* infection in Northern Ohio. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1982, **31**, 1128-1130.

398. IYENGAR M.T.O. Differentiation of microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Filaria malayi*. *Ind. J. Med. Res.*, 1939, **27**, 563-571.

399. KALIRAJ P., GHIRNIKAR S.N., HARINATH B.C. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for bancroftian filariasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1981, **75**, 119-125.

400. MENÉNDEZ M.C., BOUZA M. *Brugia* species in a man from Western Ethiopia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1988, **39**, 189-190.

401. NGUYEN N.L., PLICHART C., ESTERRE P. Assessment of immunochromatographic test for rapid lymphatic filariasis diagnosis. *Parasite*, 1999, **6**, 355-358.

402. SCHACHER J.F. Morphology of the microfilaria of *Brugia pahangi* and of the larval stages in the mosquito. *J. Parasit.*, 1962, **48**, 679-692.

Bibliographie *M. peruzzii*

403. ORIHEL T.C. Cerebral filariasis in Rhodesia – A zoonotic infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1973, **22**, 596-599.

Bibliographie *M. perstans*

404. FORMICA S., BOTTO C. Filariasis focus due to *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* in the Amazon Federal Territory of Venezuela. *J. Trop. Med. Hyg.*, 1990, **93**, 160-165.
405. JOHNSTON J.E.L. Observations on variations in form of microfilariae found in man. *Ann. Trop. Med. Paras.*, 1914, **8**, 73-80.
406. KOZEK W.J., D'ALESSANDRO A., HOYOS M. Filariasis in Colombia: Presence of *Dipetalonema perstans* in the comisaria del guainia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1982, **31**, 486-489.
407. PETITHORY J.C., HO THI SANG. Symptomatology of filariasis due to *Dipetalonema perstans*. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1965, **58**, 496-501.
408. VOGEL H. Zur anatomie der *Microfilaria perstans*. *Arch. fur Schiff's Trop. Hyg.*, 1928, **32**, 291-306.

Bibliographie *M. ozzardi*

409. BARTOLONI A., CANCRINI G., BARTALESI F., MARCOLIN D., ROSELLI M., ARCE C.C., HALL A.J. *Mansonella ozzardi* infection in Bolivia: Prevalence and clinical associations in the chaco region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1999, **61**, 830-833.
410. BRUMPT L.C. Présence de *Mansonella ozzardi* chez une femme de la Guadeloupe. *C.R. Soc. Biol.*, 1949, **CXLIII**, 468-469.
411. ORIHEL T.C., EBERHARD M.L. *Mansonella ozzardi*: A redescription with comments on its taxonomic relationships. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1982, **31**, 1142-1147.

Bibliographie (numération des microfilaires)

412. GALLIARD H., NGU D.V. Recherches sur la filariose. Choix d'une technique de numération des microfilaires du sang. *Ann. Parasit.*, 1947, **22**, 158-163.
413. LOW G. *Filaria loa* cases. Continuation reports. *J. Trop. Med. Hyg.*, 1913, **16**, 118-120.

VI

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA TRYPANOSOMIASE AFRICAINNE OU MALADIE DU SOMMEIL

La trypanosomiase (synonyme de trypanosomose) humaine africaine, plus communément désignée sous le terme de maladie du sommeil, est une parasitose due à un protozoaire flagellésanguicole extracellulaire : *Trypanosoma brucei* Plimmer and Bradford, 1899. Il est transmis lors de la piqûre diurne d'un insecte hématophage du genre *Glossina* encore appelé mouche tsé-tsé.

NOMENCLATURE : espèce, sous-espèces

L'espèce *T. brucei* est divisée en 3 sous-espèces morphologiquement identiques : *Trypanosoma brucei brucei* Plimmer and Bradford, 1899, *Trypanosoma brucei gambiense* Dutton, 1902, *Trypanosoma brucei rhodesiense* Stephens and Fantham, 1910 (431). *T. b. brucei*, un des agents de la forme animale de la trypanosomiase africaine, n'est généralement pas pathogène pour l'homme, seules *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* le sont. Les différences entre ces 2 sous-espèces concernent leur répartition géographique, l'espèce de glossine vecteur, l'évolution de la maladie, le réservoir (tableau XX). Une des principales différences entre ces 2 sous-espèces est que l'infection par *T. b. rhodesiense* est aiguë, capable de se déclarer quelques jours après l'inoculation alors que pour *T. b. gambiense*, l'infection est chronique et n'est, le plus souvent, diagnostiquée qu'après plusieurs mois voire plusieurs années d'évolution. En pratique, étant donné l'impossibilité de distinguer microscopiquement ces 2 sous-espèces, les compte-rendus de laboratoire ne doivent comporter que le nom de l'espèce : *Trypanosoma brucei*.

Tableau XX : Principales différences entre les 2 sous-espèces de *T. brucei* pathogènes pour l'homme.

	<i>T. b. gambiense</i>	<i>T. b. rhodesiense</i>
Répartition géographique	Afrique centrale et de l'ouest	Afrique australe et orientale
Réservoir	Homme Animaux domestiques	Homme Animaux sauvages
Biotope	Forêt	Savane boisée
Vecteur	<i>Glossina palpalis</i>	<i>Glossina morsitans</i>
Évolution clinique	Chronique (mois, années)	Aiguë (semaines, mois)

ÉPIDÉMIOLOGIE

Transmissions

Par piqûre d'une mouche tsé-tsé

Une seule piqûre suffit. La piqûre, douloureuse, est souvent retrouvée à l'interrogatoire.

Par transmission de la mère à l'enfant

Le trypanosome peut traverser la barrière placentaire et être responsable d'avortements et de décès périnataux. L'allaitement a également été cité comme mode de contamination (430).

Par inoculation accidentelle

Lors de la manipulation de sang contaminé.

En cas de contact avec du sang contaminé ou avec un éluat riche en trypanosomes : se laver les mains et les parties du corps touchées avec l'eau du robinet (qui lyse les trypanosomes) et du savon. L'alcool est moins efficace que l'eau savonneuse dans ce cas.

Répartition géographique

La maladie n'existe qu'en Afrique subsaharienne (entre les latitudes 20 ° Nord et 20 ° Sud), principalement dans les zones rurales reculées, là où les systèmes de santé sont les plus déficients. L'instabilité politique, la guerre favorisent son expansion. Elle menace plus de 60 millions de personnes réparties en 36 pays. Dans chaque pays, la distribution géographique de la maladie se répartit en foyers et micro-foyers. En 1999, l'OMS estimait que la maladie atteignait de 300 à 500 000 malades. Selon la prévalence de la trypanosomiase, les principaux pays d'endémie ont pu être classés en différentes catégories :

Zones épidémiques : Angola, République Démocratique du Congo, Soudan.

Zones de fortes endémies : Cameroun, Centrafrique, Congo (422), Côte d'Ivoire, Gabon, Guinée, Ouganda, République Unie de Tanzanie, Tchad.

Zones de faibles endémies : Bénin, Burkina-Faso, Guinée Equatoriale, Kenya, Mali, Mozambique, Togo, Zambie.

Zones dont le statut actuel n'est pas défini : Botswana, Burundi, Ethiopie, Ghana, Liberia, Nigeria, Rwanda, Sénégal, Sierra-Léone.

Il faut signaler qu'en mai 2001, 8 cas de trypanosomiase ont été diagnostiqués chez des touristes (dont 6 européens) ayant séjourné en Afrique de l'Est dans les grands parcs animaliers, avec comme point commun, la visite du parc de Serengeti en Tanzanie. La survenue de ces cas groupés a justifié une alerte épidémiologique.

CLINIQUE

La maladie est une affection fébrile déterminée par la présence de trypanosomes dans les systèmes lymphatico-sanguin et nerveux. La présence des trypanosomes provoque une réaction majeure du système réticulo-histiocytaire avec hyperplasie du tissu lymphoïde (adénopathies, hépatomégalie, splénomégalie). La maladie évolue schématiquement en 2 périodes, qui se chevauchent, et qu'il est important de différencier par la clinique et les études biologiques en raison du pronostic et du traitement qui ne sont pas identiques.

Chancre d'inoculation ou trypanome. La piqûre, douloureuse, provoque fréquemment une lésion cutanée : le trypanome ou chancre d'inoculation. D'aspect furonculoïde (furoncle sans tête), le trypanome est douloureux ou seulement prurigineux. Il s'accompagne parfois d'adénopathies satellites et persiste plusieurs jours. C'est le premier lieu de multiplication des trypanosomes avant qu'ils gagnent les ganglions et le sang.

Incubation. Silencieuse, elle est variable ; estimée habituellement à 8-15 jours suivant la piqûre infectante, elle peut durer plusieurs années.

Première période dite lymphatico-sanguine ou de généralisation. Elle se caractérise par des poussées de fièvre accompagnées de malaises, de céphalées, d'arthralgies. A ce stade, l'apparition de ganglions cervicaux, de 1 à 2 cm, mobiles, indolores, élastiques, est un des signes les plus évocateurs de la maladie. Le parasite peut être isolé dans le

sang et les ganglions. Le pronostic est favorable, le traitement, relativement efficace, amène habituellement la guérison.

Deuxième période dite de polarisation cérébrale ou méningo-encéphalitique. Le parasite a traversé la barrière héméo-méningée et envahit le système nerveux central. Le malade présente des troubles de la conscience, de la sensibilité, de la motricité (coordination). C'est à ce stade qu'apparaît l'altération du cycle du sommeil qui donne son nom à la maladie : le malade présente une somnolence diurne et une agitation nocturne. Si le parasite peut être alors isolé du LCR il peut, parfois, être également isolé du sang, d'où la nécessité, dans ce cas, de rechercher systématiquement le trypanosome dans le système nerveux (PL).

MODIFICATIONS BIOLOGIQUES

Éléments de présomption

- *Vitesse de sédimentation*

Très accélérée, dépassant 100 mm à la première heure (augmentation des IgM).

- *Hémogramme*

- Hématies : anémie normochrome modérée pour les cas anciens (elle progresse avec l'évolution de la maladie). Fréquente auto-agglutination des globules rouges comme pour la maladie de Waldenström.

- Leucocytes : leucopénie modérée avec neutropénie, mais banale chez l'Africain ou hyperleucocytose modérée avec lymphocytose (petits lymphocytes surtout) monocytose et surtout plasmocytose (cellule de Mott).

- *Protidogramme*

Augmentation des IgM sériques supérieure à 4 fois la normale chez plus de 95 % des trypanosomés.

- *Lipidogramme*

Hypolipidémie portant surtout sur le cholestérol total (moyenne 1,20 g) comme dans la maladie de Waldenström.

Ganglions et moelle osseuse

- *Augmentation des plasmocytes*

On recherchera surtout les plasmocytes à cytoplasme bourré de vésicules hyalines sphériques : les cellules de Mott ou cellules mûriformes (photo n° 263). Les cellules de Mott sont à différencier des monocytes vacuolisés par les caractères du noyau (chromatine en motte du plasmocytes) et la forme de la cellule et du noyau (ovale dans le plasmocyte). De plus, les vésicules de la cellule de Mott sont constituées par des glucoprotéines (correspondant à des corps de Russel très nombreux) qui sont colorables en rouge par la fuschine, alors que les vacuoles des monocytes ne le sont pas. La présence de ces cellules s'observe également dans d'autres pathologies telles que la leishmaniose viscérale et le paludisme.

- *Augmentation des lymphocytes*

Dans la moelle une forte proportion d'entre eux sont P. A. S. positif.

Liquide Céphalo Rachidien

- *Numération leucocytaire*

À effectuer avant toute centrifugation, sur un liquide non dilué, en cellule de Nageotte ou de Fuchs-Rosenthal.

Hypercytose : de 5 à plus de 1 000 éléments par μl composés essentiellement de lymphocytes mais aussi de plasmocytes et de cellules de Mott dont la présence est fortement évocatrice de trypanosomiase.

• *Détermination de la protéinorachie*

Valeur normale chez l'adulte : de 0,15 à 0,30 g/l. Dans la trypanosomiase, l'augmentation, modérée, excède rarement 1 g/l. L'hyperprotéinorachie varie de 0,25 à 1,50 g pouvant atteindre 3 g/l. Elle est composée en partie d'IgM (normalement absentes du L.C.R.). Lorsque la proportion d'IgM est supérieure à 10 %, la trypanosomiase est quasiment certaine.

■ **PRÉLÈVEMENTS ET TECHNIQUES DE RECHERCHE DE *T. BRUCEI* : examens directs et concentrations**
(Réf. 425, 426, 427 et 428)

Les examens directs doivent être réalisés immédiatement car le parasite perd rapidement sa mobilité, élément essentiel du diagnostic. Pour le sang, 25 minutes est le délai à éviter de dépasser alors que pour le LCR, milieu moins bien adapté à sa survie, ce délai est réduit à 10 minutes. La répétition des examens augmente les chances d'isoler le parasite. Chez un groupe de 12 malades infectés par *T. b. gambiense* dont seule la sérologie était positive, une recherche parasitologique quotidienne pendant 14 jours a été nécessaire avant de détecter une parasitémie positive (Manson's).

Tableau XXI : Choix du prélèvement pour isoler le parasite en fonction de la période concernée

1 ^{re} Période : Phase lymphatico-sanguine	2 ^e Période : Phase de polarisation cérébrale
Ganglions+++ Sang++ (Moelle, Rate)* LCR**	LCR++ Liquide céphalique+++ (Sang, Moelle, Rate)*

*À effectuer lorsque les autres prélèvements, précédemment cités, sont négatifs.

** Il faut toujours étudier le LCR afin de dépister précocement une atteinte nerveuse.

Mise en évidence des trypanosomes dans le suc dermique

Possible uniquement pendant les 3-4 semaines qui suivent la contamination. À l'endroit du point de piqûre, une lésion cutanée (trypanome) correspond au site initial de multiplication des trypanosomes avant passage hémolymphatique.

GANGLIONS

Recherche des trypanosomes dans le suc ganglionnaire

Matériel : aiguille (pour injection sous-cutanée) : 25 G, 0,5 × 16 mm ; seringue 5 ou 10 ml ; éthanol 70 %.

Méthode : choisir un ganglion hypertrophié (cervical en général), demander au patient de s'asseoir. Désinfecter à l'éthanol à 70 %. Le faire ressortir sous la peau et le maintenir entre le pouce et l'index gauche. De la main droite y introduire l'aiguille à angle droit au centre du ganglion. De la main gauche, masser légèrement le ganglion. De la main droite faire pivoter l'aiguille dans différentes directions pour dilacérer un peu le ganglion. Le suc ganglionnaire va pénétrer dans l'aiguille par capillarité. L'opération doit durer environ une minute. Retirer l'aiguille d'un mouvement rapide, l'index droit bouchant le pavillon de l'aiguille. Appliquer un tampon imbibé de désinfectant au point d'injection. Ne jamais appliquer de désinfectant avant d'avoir retiré l'aiguille, car il pourrait venir au contact de l'extrémité de l'aiguille et immobiliser les trypanosomes. Fixer l'aiguille à la seringue, le piston de celle-ci ayant préalablement été réglé en position arrière. Pousser le piston doucement à mi-hauteur de la seringue pour faire couler le suc ganglionnaire sur une lame. Recouvrir d'une lamelle et examiner immédiatement à frais l'ensemble de la préparation au microscope en grossissant environ 400 fois, avec l'objectif $\times 40$. Commencer l'examen par les bords de la lamelle, les trypanosomes ayant tendance à se diriger vers la périphérie.

Résultat : Le suc ganglionnaire est un liquide blanchâtre, suspension de lymphocytes. Les trypanosomes bien que trois fois plus grands que les hématies sont masqués par les amas de lymphocytes voire de globules rouges. Attendre quelques minutes que les courants de convection cessent, sinon il est impossible de repérer les mouvements des trypanosomes. Tout mouvement dans la préparation est suspect, les trypanosomes sont découverts grâce à leur mobilité. Observer très attentivement et très systématiquement l'ensemble de la préparation.

En raison de la forte densité cellulaire du suc ganglionnaire l'observation de frottis colorés au M.G.G. est peu performante pour détecter les trypanosomes ; ceux ci peuvent être éventuellement réalisés pour l'identification de cellules de Mott.

SANG

En dehors de la mise en œuvre de technique de concentration, le parasite est difficile à mettre en évidence en raison de sa faible circulation. Ceci justifie la multiplication des prélèvements et des examens. L'anticoagulant utilisé sera le citrate de sodium ou l'héparine, voire les anticoagulants conseillés pour certaines techniques de culture. Ne pas employer fluorure et oxalate qui tuent les parasites rapidement.

- *Prélèvement veineux*

Prélever un volume suffisant (5 à 10 ml selon les techniques de concentration utilisées) pour : direct, frottis, gouttes épaisses, techniques de concentration voire inoculation à l'animal, culture cellulaire.

- *Prélèvement au bout du doigt*

Recueillir la première goutte, riche en lymphes, supposée riche en trypanosomes.

- *Examen à frais*

Entre lame et lamelle, le sang, immédiatement examiné, permet de repérer les trypanosomes grâce à leur mobilité. L'association à une recherche sur frottis, gouttes épaisses est indispensable en raison de l'importance de l'identification formelle du parasite.

- *Examen à frais de sang clarifié*

La lyse partielle des hématies, obtenue en mélangeant une goutte de sang hépariné avec une goutte de solution à 1 % de sodium dodécylsulfate (SDS), facilite la détection des trypanosomes qui ont gardé leur mobilité.

- *Frottis et gouttes épaisses multiples*

Ils seront réalisés immédiatement après le prélèvement. Les frottis seront épais. Coloration au May-Grünwald-Giemsa classique. Examen à l'objectif à immersion. Dans les gouttes épaisses les trypanosomes, plus déformés, sont plus difficiles à identifier que dans les frottis.

Techniques de concentration

Triple centrifugation

Prendre un tube conique (tube 1) à centrifuger avec un trait de jauge pour 10 ml. Mettre dans le tube 1 ml de citrate de sodium (solution aqueuse de citrate trisodique à 3,8 %). Prélever 9 ml de sang pour atteindre le trait de jauge 10 ml.

1^{re} centrifugation :

Mélanger et centrifuger 3 minutes à vitesse moyenne.

2^e centrifugation

Prélever tout le plasma surnageant et la couche de leucocytes au-dessus des hématies, mettre ce surnageant dans un autre tube (tube 2) ; le centrifuger 5 minutes à vitesse moyenne.

3^e centrifugation

Prélever tout le surnageant (conserver le culot), le placer dans un autre tube (tube 3). Centrifuger 10 minutes à grande vitesse.

Examen microscopique des culots des tubes 2 et 3 entre lame et lamelle. Les trypanosomes apparaissent dans le culot du tube 3 et quelque fois du tube 2 où l'on trouve préférentiellement les microfilaires.

Méthode au microhématocrite

Principe : la densité des trypanosomes, proche de celle des leucocytes, permet après centrifugation en tube capillaire, de les concentrer à l'interphase globules blancs-plasma.

Réalisation : Piquer le doigt de façon à obtenir 2 gouttes de sang sur une lame. Ajouter 1 goutte de solution de citrate de sodium à 2 % et mélanger. Remplir le tube capillaire au 3/4. Si l'on a recueilli du sang veineux remplir également au 3/4 avec le tube capillaire avec le sang prélevé. Sceller l'extrémité ouverte du tube (flamme, pâte à obturer). Centrifuger dans une centrifugeuse pour microhématocrite pendant 4 minutes. Poser le tube capillaire sur une lame, le fixer aux extrémités avec du ruban adhésif. Examiner l'interface hématies-plasma à l'objectif $\times 10$ pour repérer les trypanosomes mobiles. Passer à un grossissement plus fort pour une meilleure observation.

Technique du « quantitative buffy coat » (QBC Malaria®, Becton Dickinson).

Ce système, commercialisé pour le diagnostic du paludisme, a démontré son excellente sensibilité pour le diagnostic de la trypanosomiase africaine (414 et 429). Son principe repose sur une concentration des parasites par centrifugation sur tube capillaire comme pour la méthode au microhématocrite. Les capillaires QBC, prêts à l'emploi, contiennent de l'acridine orange, un flotteur et un anticoagulant. Le flotteur favorise l'étalement des différents éléments sanguins pendant la centrifugation. L'acridine orange, agent intercalant spécifique des acides nucléiques, se fixe sur les noyaux. Après 5 minutes de centrifugation avec une centrifugeuse (Parafuge, Becton Dickinson), spécialement adaptée aux tubes (qui ne peuvent rentrer dans une centrifugeuse à microhématocrite). Le tube est examiné au microscope, en lumière ultraviolette, au grossissement 50 à immersion. Les trypanosomes sont recherchés à l'interface couche leucocytaire-plaquettaire (« buffy-coat »). Leur mobilité et la fluorescence de leur noyau et de

leur kinétoplaste facilitent grandement leur détection. D'après nos données expérimentales, cette sensibilité est proche de celle obtenue par résine échangeuse d'ions.

Filtration sélective des trypanosomes du sang sur D.E.A.E. cellulose

Principe : les éléments figurés du sang ont une charge électrique différente de celle des trypanosomes. Les résines échangeuses d'ions, réseau cellulosique en suspension dans une solution tamponnée, ont pour propriété de retenir les cellules en fonction de leur charge électrique. Selon le pH et la force ionique du tampon d'équilibrage utilisé, différents types cellulaires seront retenus.

– Prélèvement

1 à 5 ml de sang prélevé sur héparine.

– Réactif et matériels :

D.E.A.E. cellulose DE 52 Whatman ou D.E.A.E. Sephadex Pharmacia.

Tampon Phosphate Saline Glucose = T.P.S.G.

pH = 8, Force ionique = 0,181

Phosphate disodique anhydre Na_2HPO_4 (RP 28.026.292)	6,74 g
Phosphate monosodique $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ (RP 28.015.294)	0,39 g
NaCl	2,12 g
Glucose	10 g
Eau distillée Q.S.P.	1 000 ml

Vérifier le pH et ajuster si besoin avec de l'acide phosphorique à 10 % ou de la soude à 20 %.

– Méthode : pour 5 à 6 ml de sang, mettre en suspension 50 g de D.E.A.E. cellulose dans 200 ml de T.P.S.G. Laisser sédimenter, rejeter le surnageant.

Rajouter 200 ml de T.P.S.G. Laisser sédimenter, rejeter le surnageant. Recommencer encore au moins deux fois l'opération.

Contrôler le pH qui doit être de 8, ajuster si besoin.

Conservation : La suspension se conserve une semaine à + 4°C et beaucoup plus longtemps à -30 °C.

– Mettre la colonne sur un pied ou un portoir, y adapter une tubulure de caoutchouc avec pince de Mohr. S'il s'agit d'une seringue, placer un peu de gaze au fond pour empêcher la cellulose de s'écouler lors du remplissage.

– Remplir la colonne au 3/4 avec la D.E.A.E. cellulose. Laisser sédimenter 15 minutes puis ouvrir la tubulure pour laisser s'écouler le surnageant.

– Diluer le sang au 1/2 en T.P.S.G. Le déposer à la surface du gel : le volume doit être inférieur à 20% du volume de D.E.A.E. cellulose contenu dans la colonne.

Lorsque l'échantillon de sang a pénétré dans la cellulose, ajouter T.P.S.G. à plusieurs reprises, 4 à 5 fois, et récupérer l'éluat dans un tube à centrifuger cylindrico-conique. Centrifuger 10 minutes à 2000 g. Jeter le surnageant en laissant égoutter le tube sans le secouer. Prélever le culot et l'examiner à frais entre lame et lamelle et éventuellement après coloration. La méthode peut être complétée par filtration sur membrane d'acétate de cellulose de 0,45 micron de porosité (Millipore) (432).

Attention cette méthode ne convient pas pour la filtration de *T. cruzi* (maladie de Chagas).

Depuis plusieurs années, un nécessaire prêt à l'emploi contenant la colonne et le mélange tampon, désigné par l'appellation m-AECT pour « Mini Anion Exchange Centrifugation Technique » n'est plus commercialisé.

Liquide céphalo-rachidien (416)

10 ml si possible recueilli par ponction lombaire. Les altérations du L.C.R. ne s'observent que lors de la phase nerveuse. Elles sont moins précoces que celles du liquide céphalique (ponction sous-occipitale). Le liquide est clair, hypertendu. En cas d'isolement de trypanosome (sang, ganglion), l'examen du L.C.R. est indispensable pour définir le stade de la maladie.

Attention

1. Le liquide doit être clair, non-hémorragique, afin de ne pas fausser la protéinorachie et la cellulorachie
2. l'examen doit se faire sur du liquide (céphalique ou céphalo-rachidien) fraîchement prélevé, c'est à dire dans les 10 minutes qui suivent le recueil (les trypanosomes sont plus fragiles dans le L.C.R. que dans le sang).

Liquide céphalique

Faire une ponction sous-occipitale ou faire une ponction lombaire : recueillir 20 ml de liquide rachidien, insuffler 40 ml d'air, récolter de nouveau 20 ml de liquide qui est alors d'origine céphalique. Une très grande quantité est indispensable si l'on veut inoculer les animaux ou cultiver (voir plus loin).

• *Centrifugation simple*

Après avoir procédé à la numération leucocytaires, centrifuger le LCR pendant 10 minutes à 900 g. Transvaser le surnageant et le conserver pour d'autres examens.

Remettre en suspension le culot en tapotant le tube avec le doigt.

Examiner immédiatement, au microscope ($\times 10$ puis $\times 40$), entre lame et lamelle, une goutte de cette suspension. Attendre quelques minutes que la convection cesse et bien balayer l'ensemble de la préparation, en commençant par les bords où les trypanosomes sont souvent retrouvés.

• *Centrifugation double (434 et 435)*

Le culot de la centrifugation simple est repris dans un tube capillaire à microhématocrite dont une extrémité aura été préalablement scellée (à la flamme par exemple). Ce tube est centrifugé à grande vitesse pendant une minute. L'extrémité inférieure (bouchée) du tube est examinée au faible grossissement à la recherche des trypanosomes qui ont sédimenté à l'interface leucocytes-plasma.

Moelle osseuse

Parfois, lorsque tous les prélèvements sont négatifs, les trypanosomes ne sont détectés que sur frottis médullaire coloré au Giemsa.

À FRAIS

C'est la mobilité des trypanosomes qui permet de les repérer dans le sang et le suc ganglionnaire. En effet, en dehors du LCR où ils sont plus facilement repérables, les trypanosomes sont, en général, cachés par les éléments figurés, du sang ou du suc ganglionnaire. C'est donc l'agitation des cellules qui entourent les trypanosomes qui permet de les localiser. Le trypanosome est un grand protozoaire flagellé mesurant de 15 à 40 μm , visible dès le faible grossissement ($\times 25$). Sa forme : allongée, fusiforme, bordée par une membrane ondulante et suffisamment caractéristique pour ne pas le confondre avec un artéfact. Le flagelle, qui fait en moyenne 1/3 de la longueur du parasite, situé à son extrémité antérieure, tracte le trypanosome. Le trypanosome se meut rapidement. On distingue surtout les mouvements du flagelle. Il a des mouvements vifs. Il avance en se contractant et serpente en zigzagant entre les cellules (« poisson allongé et ondulant »). Il faut savoir qu'après 20 à 25 minutes d'examen, les mouvements sont très ralentis et les parasites deviennent très difficiles à repérer.

APRÈS COLORATION (Giemsa, May-Grünwald-Giemsa voir page 28)

(photos n° 252 à 255)

Le cytoplasme

Coloré en bleu, contient des corpuscules chromatiques bleu foncé (grains de volutine).

Le noyau

Ovale ou sphérique, en position centrale, est coloré en rouge-violet. Après coloration à l'hématoxyline, on peut distinguer un caryosome (nucléole) central et la membrane nucléaire.

Le kinétoplaste

Coloré fortement en violet foncé, localisé à l'extrémité postérieure, apparaît comme une grosse granulation. Il contient de l'ADN extra-nucléaire et constitue le système mitochondrial du parasite. Il est couramment appelé blépharoplaste bien que ce terme désigne la partie du kinétoplaste d'où part le fouet ou flagelle.

Le flagelle

Coloré en rouge, part du blépharoplaste, longe un bord du trypanosome auquel il est rattaché par la « membrane ondulante ». Des études faites en microscopie électronique ont démontré que cette membrane n'est qu'un artéfact de microscopie optique (415 et 418). Il est accolé au corps du protiste, auquel il est assujéti par endroits au moyen de rivets lipoprotéiques.

Formes longues et formes courtes

Les trypanosomes peuvent apparaître sous 2 formes (avec les stades intermédiaires).

Les formes longues : de 25-35 μm sur 2-3 μm , au flagelle bien développé.

Les formes courtes : de 14-25 μm sur 4-5 μm , sans flagelle.

L'aspect des frottis sanguins est en général monomorphe, avec prédominance des formes longues (les formes courtes, peu nombreuses, ne se divisent pas ; ce sont les formes infectantes pour la glossine). Il faut rappeler que si *T. b. gambiense*, agent de la forme chronique de l'Ouest Africain est microscopiquement identique à *T. b. rhodesiense*, agent de la forme aiguë de l'Est Africain, par contre *T. b. rhodesiense*, à la différence de *T. b. gambiense* peut être à l'origine de parasitémies élevées, détectables fortuitement sur frottis sanguins minces.

CULTURE

La mise en culture des prélèvements (sang, LCR) n'est pas une méthode diagnostique de routine, en effet, celle-ci se heurte à différentes difficultés :

- La plupart des milieux de culture, à base de sang frais, ne sont pas commercialisés et se conservent assez mal.
- La culture nécessite une dizaine voire une trentaine de jours.
- Elle peut être négative alors même que les trypanosomes ont été détectés (20 % des cas).

Pour réaliser les hémocultures le sang sera prélevé de préférence sur un anticoagulant anti-complémentaire. L'héparine ne convient pas. La culture du LCR améliore la sensibilité de la recherche. Elle a donné de meilleurs résultats que la double centrifugation.

I) La trousse KIVI (« Kit for In Vitro Isolation »)

Il s'agit d'un milieu prêt à l'emploi, fabriqué par le Laboratoire de Protozoologie de l'Institut de Médecine tropicale, Nationales-straat 155, B-2000 Antwerpen, Belgique. La trousse contient le matériel de prélèvement sanguin (aiguilles, seringues) et 2 types de flacons à pénicilline scellés contenant, les uns, le milieu de culture prêt à l'ensemencement et les autres l'anticoagulant. L'ensemencement nécessite 9,5 ml de sang recueilli sur anticoagulant (0,5 ml) à injecter à travers le bouchon du flacon contenant le milieu de culture. La conservation s'effectue à température ambiante (de préférence entre 15 et 20 °C). La culture nécessite, en moyenne 1 à 2 semaines mais ce n'est qu'après un minimum de 40 jours que la culture peut être déclarée négative. La durée pendant laquelle un KIVI positif conserve les trypanosomes, variable selon les souches, dépasse 50 jours. D'après une étude camerounaise (420), le KIVI apparaît comme un outil très utile pour l'isolement de trypanosomes sur le terrain à condition que les missions n'excèdent pas 3 semaines.

II) Les milieux de culture

Technique de Brutsaert et Henrard (417)

Prélèvement : par ponction veineuse 10 ml de sang sur 2 ml d'une solution stérile à 1 % de polyanéthol sulfonate de sodium ou liquoïde (Prolabo).

Milieu de culture : préparer des tubes à essais contenant 2 ml de solution dite de Ringer d'après Hartmann 1934 (419) :

NaCl	6 g
KCl	0,40 g
CaCl ₂	0,20 g
MgCl (cristallisé 6 H ₂ O)	0,20 g
Lactate de sodium	3,05 g
Eau distillée Q.S.P.	1 000 ml

On peut employer également de la solution de Tyrode ou de l'eau physiologique gélosée à 3 pour mille selon Neujean 1950 (423), ou du liquide de Hanks voire du milieu de Parker (420).

Autoclaver.

À chaque tube, on ajoute 2 ml de sang sain citraté à 1 %. Il est préférable, à chaque essai, d'utiliser du sang humain de diverses origines. On peut ajouter 200 unités de pénicilline et 200 µg de streptomycine par ml (420). Tester la stérilité du milieu par une incubation de 24 h à l'étuve à 37 °C.

L'ensemencement se fait immédiatement après le prélèvement. On ensemence une dizaine de tubes avec 0.5 ml de sang par tube. La culture s'effectue à 25 °C, à l'abri de la lumière.

La lecture est possible à partir du 10^e jour. On prélève à la pipette Pasteur une goutte dans chaque tube que l'on examine entre lame et lamelle. Cet examen est répété tous les 2 jours pendant 20 jours.

Technique de Weinman (433)

Prélever 5 ml de sang sur 0.5 ml d'anticoagulant. L'anticoagulant : P.V.S.A. (PolyVinyl Sulphurique Acid, Kodak) sous forme de sel de potassium en solution à 0,5 % dans l'eau physiologique. Cet anticoagulant a l'avantage d'être anticomplémentaire.

Milieu de base :

Gélose nutritive (DIFCO ou autre)	31 g
Gélose	5 g
Eau distillée	1 000 ml

Autoclaver

Décomplémentation du sérum pour le milieu de culture.

- Prélever stérilement du sérum humain sain sur citrate de sodium à 2,5 % dans la proportion de 7, 5 ml d'anticoagulant pour 50 ml de sang.
- Centrifuger
- Prélever le plasma surnageant puis l'inactiver par 30 minutes de chauffage à 56 °C.
- Les hématies sont lavées 3 fois stérilement dans le triple de leur volume de NaCl à 0,9 %.
- Reconstituer le sang en mélangeant à volumes égaux, plasma et globules rouges lavés.

Préparation du milieu pour l'emploi.

Faire fondre le milieu de base, laisser refroidir à 45 °C et ajouter une part de sang reconstitué porté à la même température pour 3 parts de base.

Répartir 5 ml par tube à essai.

Incliner et laisser solidifier.

Vérifier la stérilité après 24 h d'incubation à 37 °C.

Le milieu se conserve 6 mois à + 4 °C. Ensemencement

2 ml de sang par tube. Ajouter 0,5 µg de déhydrostreptomycine par ml de sang (moins toxique pour les trypanosomes que la streptomycine). Ensemencer au moins 2 tubes.

Mettre à incuber à l'obscurité à 25 °C.

Lecture (voir technique précédente).

INOCULATION A L'ANIMAL

L'isolement des trypanosomes par inoculation de sang, suc ganglionnaire ou LCR à des rongeurs n'est pas de pratique courante car les résultats en sont tardifs et inconstants.

Comme pour l'examen direct et la mise en culture le sang doit être impérativement prélevé sur un anticoagulant non toxique (citrate de sodium, héparine...). L'inoculation, intra-péritonéale doit suivre immédiatement le prélèvement. Pour les cobayes, hamsters 2 ml de sang sont inoculés, pour souris et rats nouveaux-nés 0.5 ml suffit. Les animaux sont surveillés 2 fois par semaine, par examen microscopique entre lame et lamelle de sang prélevé à la queue ou à l'oreille, pendant au moins 1 mois.

L'isolement est plus souvent obtenu avec *T. b. rhodesiense* qu'avec *T. b. gambiense*. Pour ce dernier, il est recommandé d'utiliser des rats nouveaux-nés non sevrés.



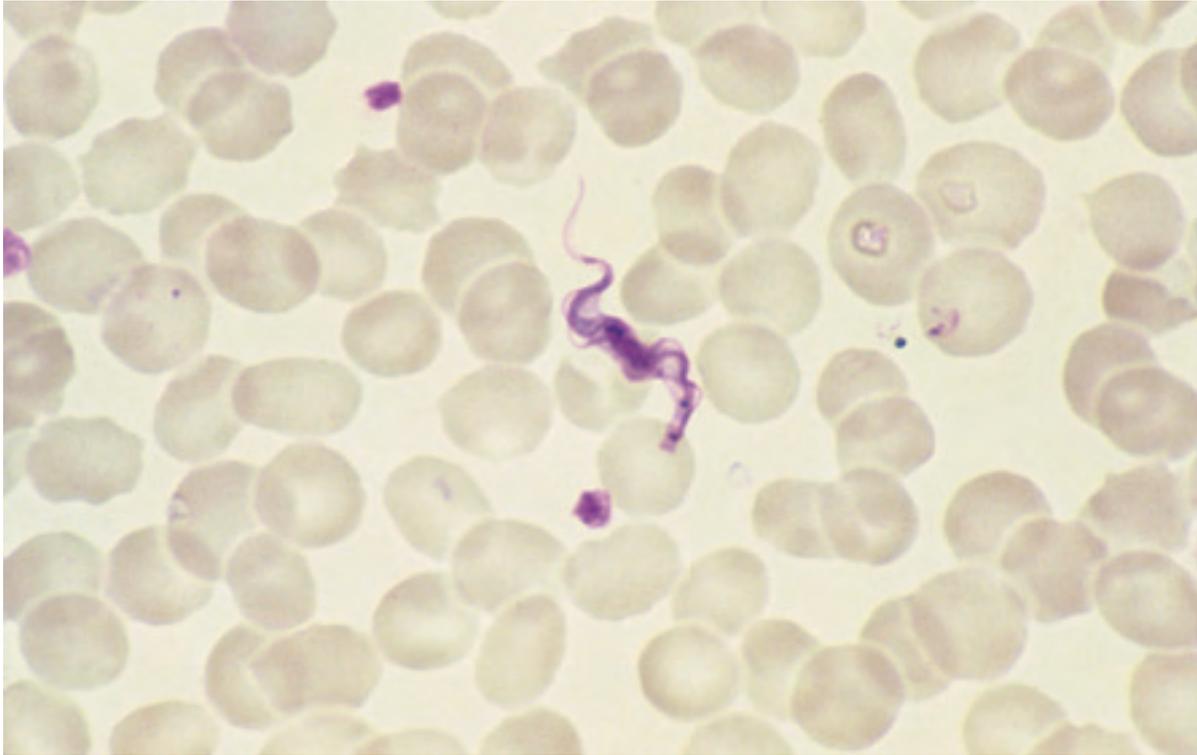


Photo n° 252 : Trypanosoma brucei gambiense. Frottis. Trypanosome en voie de division avec deux blépharoplastes, distincts. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

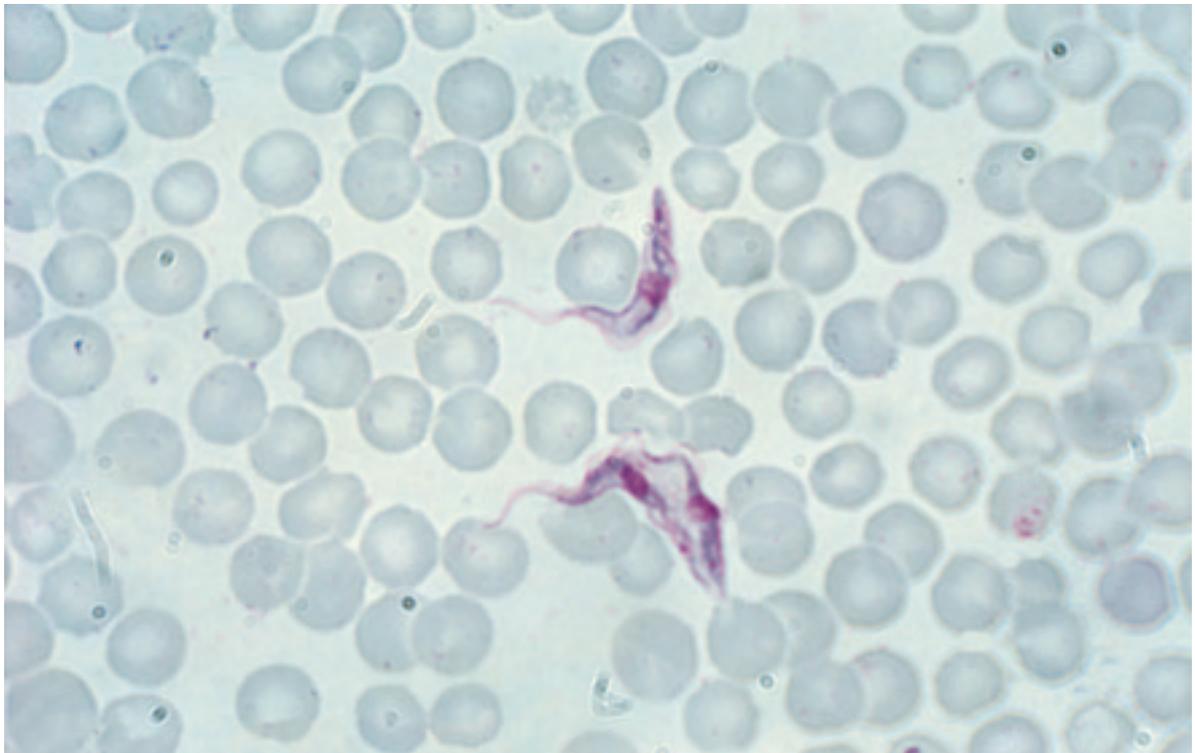
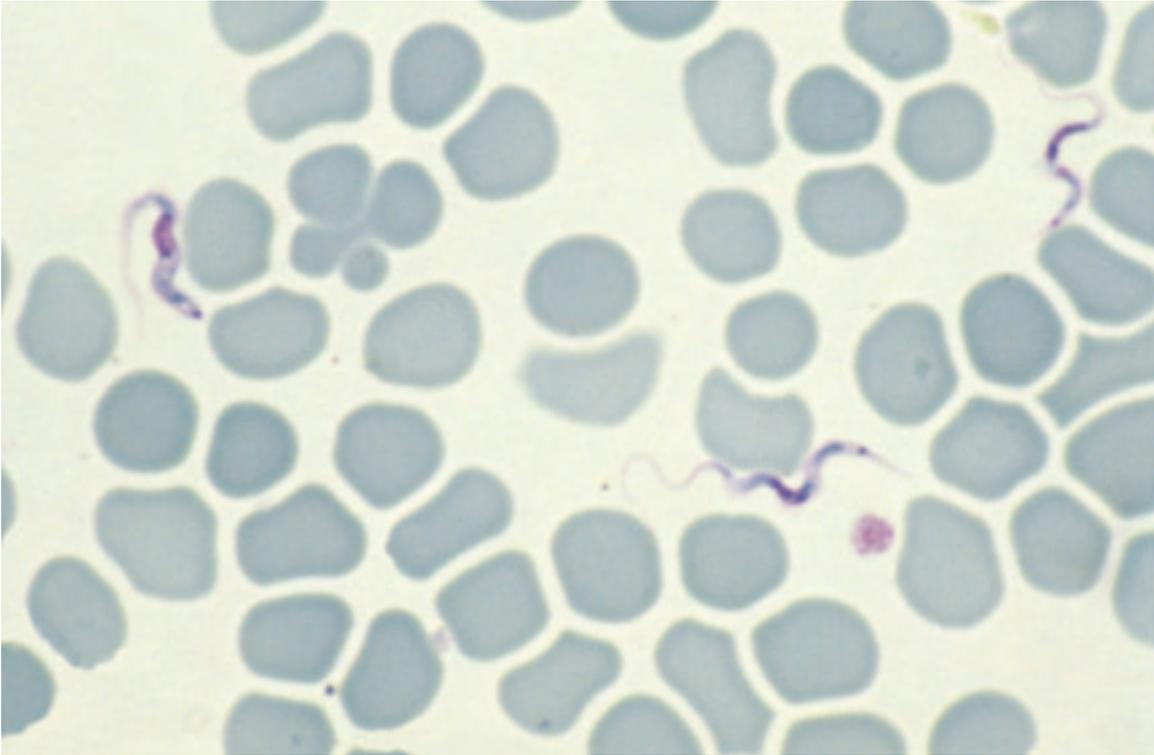
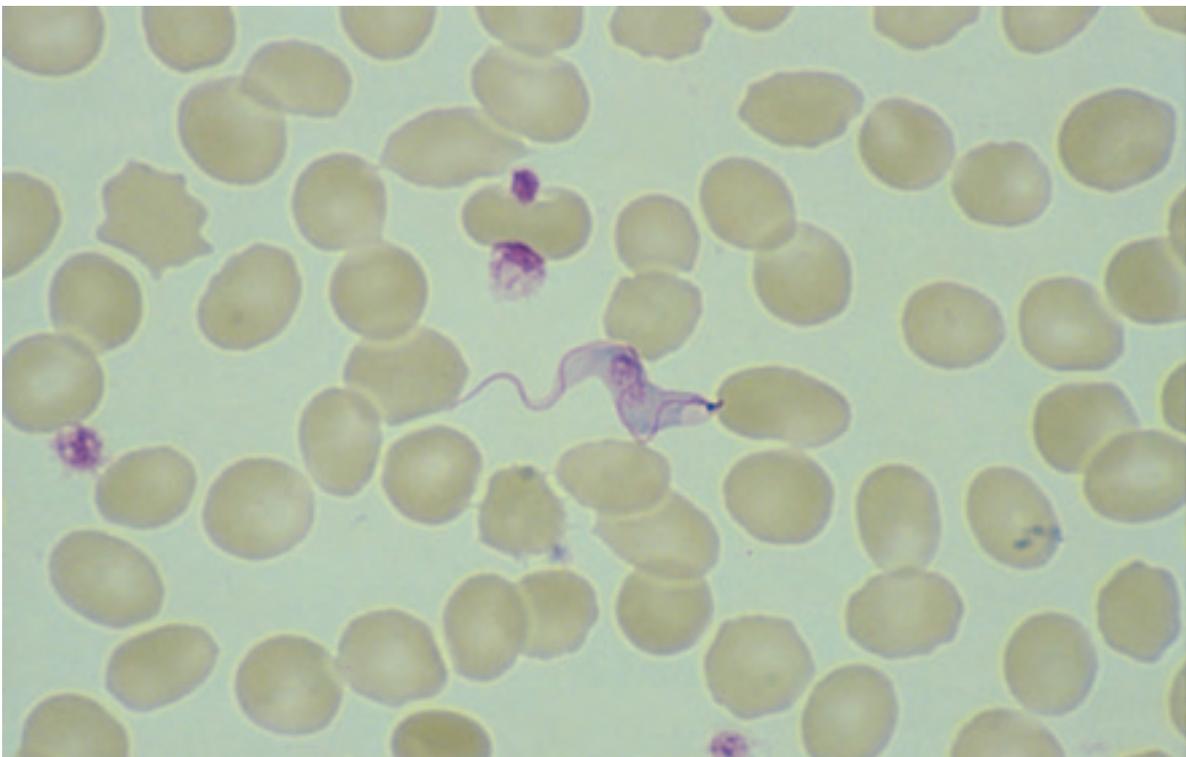


Photo n° 253 : Trypanosoma brucei gambiense. Frottis. Deux trypanosomes dont un en voie de division en phase terminale avec deux noyaux séparés. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



*Photo n° 254 : Trypanosoma brucei rhodesiense. Frottis. Formes très longues.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



*Photo n° 255 : Trypanosoma brucei gambiense. Frottis. Gros noyau ovalaire,
petit blépharoplaste et membrane ondulante nette. Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

IMMUNOLOGIE

Les méthodes immunologiques spécifiques, mettant en évidence les anticorps antitrypanosomes, permettent un diagnostic précoce pour le sérum et plus tardif pour le LCR. Il faut souligner que la rapidité d'évolution de l'infection à *T. b. rhodesiense*, fait, qu'à la différence de ce que l'on observe avec *T. b. gambiense*, la sérologie peut être négative en phase lymphatico-sanguine débutante. Pour le sérum, seuls les titres élevés doivent être considérés comme significatifs en raison de la possibilité de réactions croisées avec la trypanosomiase sud-américaine (maladie de Chagas), la leishmaniose viscérale, le paludisme voire d'autres maladies bactériennes avec dysglobulinémie. Par contre pour le LCR, la mise en évidence des anticorps est spécifique, même aux très faibles dilutions. Si la sérologie est indispensable à associer aux examens de recherche directe du parasite, sa seule positivité (suspect sérologique), doit inciter à s'acharner à mettre en évidence le parasite avant la mise sous traitement en raison de la toxicité de celui-ci.

Agglutination

Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT)

La présence d'anticorps antitrypanosomes est révélée par l'agglutination de trypanosomes fixés au formol et colorés au bleu de Coomassie. Après 5 minutes de réaction avec du sang total hépariné ou du sérum, des grumeaux bleus visibles à l'œil nu témoignent de la positivité de la réaction. Cette technique de dépistage est largement utilisée en zone d'endémie (424).

Latex Agglutination Test (LAT)

La présence d'anticorps antitrypanosomes est révélée par l'agglutination de particules de latex sensibilisées avec une fraction purifiée de glycoprotéine de surface de trypanosomes.

Hémagglutination indirecte (HAI)

À signaler le test Cellognost® Trypanosomiasis commercialisé en France par Dade Behring S.A. Immeuble Berkeley, 19/29 rue du Capitaine Guynemer, 92903 Paris la Défense. Test enregistré auprès de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. Il s'agit d'hématies de mouton sensibilisées avec un antigène de *T. b. gambiense*. Les réactifs, lyophilisés, comprennent des sérums de contrôle positif et négatif. Ils se conservent 4 semaines après reconstitution. Il est préférable d'utiliser le test sur sérum plutôt que sur plasma.

Immunofluorescence (photo n° 256)

Réactif antigénique gratuitement disponible sur demande au laboratoire de Sérologie de l'Institut de Médecine tropicale, Nationalestraat 155, B-200 Antwerpen, Belgique.

Les trypanosomes sous forme de gouttes séchées sont déposés dans les cercles (spots) de lames siliconées. L'antigène séché et emballé se conserve plusieurs mois au congélateur (-25 °C). Procédure : une goutte du sérum du patient (ou de l'éluat de sang séché) est incubée sur les spots pendant 30 minutes à température ambiante en chambre humide. Lavage de 10 minutes en tampon PBS. Incuber avec le conjugué fluorescent, une goutte par spot pendant 30 minutes. Lavage 10 minutes en PBS. Montage avec une grande lamelle en glycérine tamponnée et lecture au microscope en lumière ultraviolette.

Autres tests

D'autres techniques peuvent être utilisées pour détecter les anticorps. Des tests immunoenzymatiques de type ELISA, utilisés en zone d'endémie, ne sont pas disponibles en France. De même, des tests de détection antigéniques, en cours d'évaluation, semblent particulièrement prometteurs.

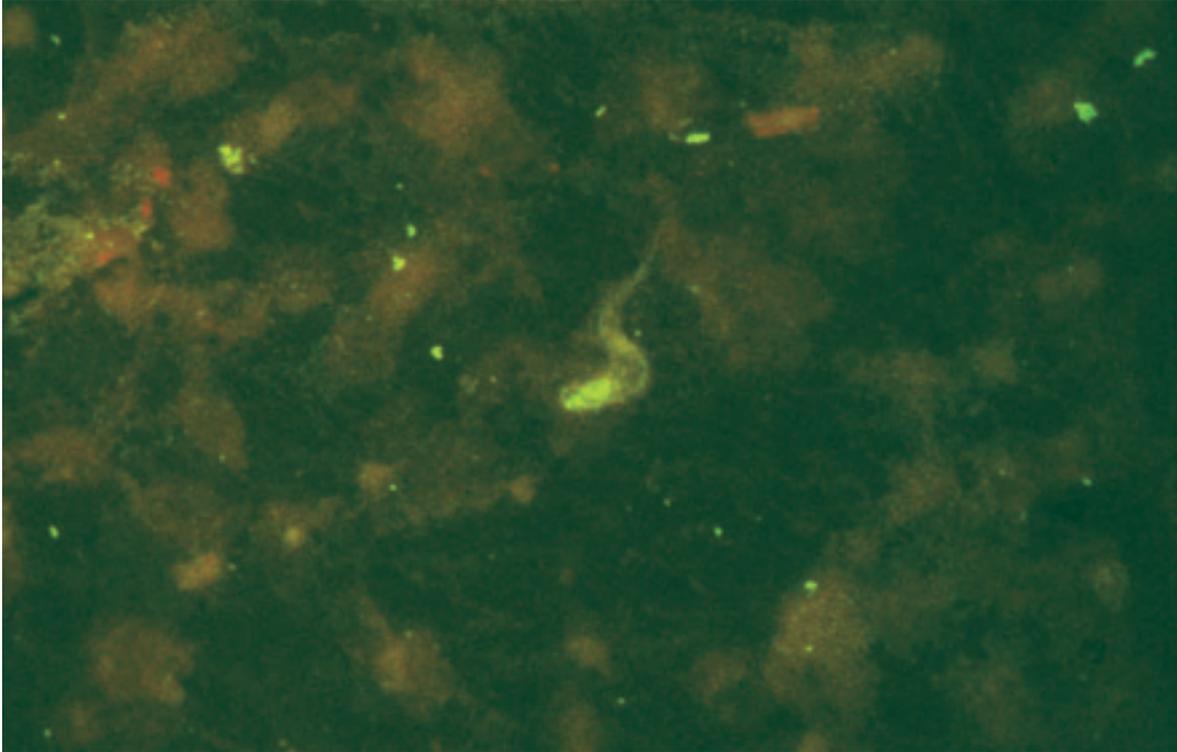


Photo n° 256 : Trypanosoma brucei gambiense. Immunofluorescence indirecte.

VII

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA TRYPANOSOMIASE AMÉRICAINE (MALADIE DE CHAGAS)

La trypanosomiase (syn. trypanosomose) américaine ou maladie de Chagas doit son nom au médecin brésilien Carlos Chagas qui en fit la description pour la première fois en 1909 (437). L'agent de cette parasitose est *Trypanosoma cruzi*, protozoaire transmis par des insectes hématophages nommés réduves, sorte de grosses punaises appartenant aux genres *Rhodnius* et *Triatoma*. C'est une zoonose des animaux domestiques (chiens, chats) et sauvages (marsupiaux, édentés). Chez l'homme *T. cruzi* est présent sous deux formes : la forme intracellulaire amastigote, forme de multiplication, qui infecte les cellules de différents viscères (cœur, tube digestif) et la forme flagellée extracellulaire circulante, sanguine.

EPIDÉMIOLOGIE

Transmissions

Par les déjections de punaises

L'homme est infecté par les déjections des réduves ou triatomes (photo n° 257). Le parasite, contenu dans les déjections des réduves, pénètre l'organisme humain par l'intermédiaire de doigts souillés au travers de la conjonctive oculaire ou encore au travers de l'épiderme à l'occasion de lésions de grattage favorisées par le prurit qui suit la morsure indolore des réduves.

De la mère à l'enfant

Par voie transplacentaire, la transmission est responsable d'avortement de prématurité. Plus tardivement, par allaitement.

Par transfusion

Le risque transfusionnel pose un véritable problème de santé publique dans les pays concernés. Le dépistage se fait par sérologie. L'adjonction au sang suspect de violet de gentiane (dilution au 1/4000) permet de détruire les trypanosomes.

Par inoculation accidentelle

Attention

D'assez nombreuses contaminations de Laboratoire ont été rapportées que ce soit à l'occasion du repiquage des souches (438), d'inoculation d'animaux (445) ou de l'examen de déjections de réduves infectées (441).

La voie de pénétration, transmuqueuse ou transcutanée (à partir de la plus légère excoriation), justifie le port de gants et de lunettes lors de la manipulation de tout prélèvement suspect.

Répartition géographique

Cette maladie n'existe que sur le continent Sud Américain, du Mexique au sud de l'Argentine (18 ° de latitude nord et 39 ° de latitude sud). Dans cette zone, la répartition de cette maladie, essentiellement rurale, n'est pas homogène. Bien que 25 % de la population d'Amérique latine

(100 millions) soit exposée à la maladie, le nombre de malades est estimé à 16-18 millions par l'OMS. En zone habitée, la maladie ne sévit que dans les habitations précaires non cimentées (torchis, bois, cartons, briques empilées, toits de feuillage...). En effet, les rédues domestiques se nourrissent à proximité de leurs gîtes. Dans la journée, elles sont immobiles, à l'obscurité, dans les fentes des murs ou autres interstices de l'habitation. C'est la nuit qu'elle infectent les habitants. La maladie de Chagas est un véritable marqueur de la pauvreté qui diminue avec le développement économique.

CLINIQUE

La maladie comporte deux phases : la phase aiguë qui apparaît quelques jours après l'infection et la phase chronique qui s'installe après plusieurs années. Entre ces deux périodes il existe une période asymptomatique dite « indéterminée ».

Forme aiguë. Cette forme s'observe essentiellement chez l'enfant. L'incubation varie de 5 à 20 jours. La fièvre est irrégulière, atteignant progressivement 39°C en quelques jours. Si la porte d'entrée est conjonctivale le malade présente un œdème bipalpébral unilatéral indolore qui peut entraîner l'occlusion de l'œil et s'accompagner d'adénopathies satellites (signe de Romana). Après plusieurs semaines, la fièvre disparaît progressivement. L'état général est bien conservé mais l'on peut parfois observer des adénopathies généralisées ainsi qu'une hépatosplénomégalie. Toutefois, le plus souvent, cette période est totalement asymptomatique, l'infection passant inaperçue. La guérison spontanée en quelques semaines est habituelle. Des décès, exceptionnels, peuvent survenir par méningo-encéphalite ou myocardite.

Forme chronique. Après une période silencieuse, de plusieurs années, les lésions musculaires irréversibles peuvent devenir symptomatiques. L'atteinte la plus fréquente (27 %) concerne le myocarde, suivi par les localisations digestives (6 %) caractérisées par l'apparition de méga-organes. Les lésions cardiaques sont les plus graves, elles peuvent être responsables de troubles du rythme, de troubles de la conduction, d'insuffisance cardiaque gauche ou globale, l'ensemble étant à l'origine de syncopes et de morts subites (5 %). Les atteintes digestives peuvent se manifester par une dysphagie (méga-œsophage) ou une constipation (mégacôlon).

Maladie de Chagas et SIDA. L'infection par le VIH favorise les réactivations d'infections anciennes qui se manifestent alors sous forme d'encéphalites et de myocardites.

MODIFICATIONS HÉMATOLOGIQUES NFS

Hématies

Pas d'anomalie

Leucocytes

- Leucocytose avec monocytose en phase aiguë.
- Leucopénie avec lymphomonocytose en phase chronique (439).

RECHERCHE DES TRYPANOSOMES

Prélèvements

Sang

C'est le prélèvement de choix. Prélever sur citrate de soude, 10 à 20 ml chez l'adulte.

LCR

Permet l'isolement de *T. cruzi* dans 1/3 des rares formes nerveuses.

Ganglions, peau, moëlle osseuse, liquide de péricardite

Sont autant de sites d'isolements atypiques de *T. cruzi* pouvant parfois aider au diagnostic (447).

Recherche dans le sang

– mise en évidence des formes trypomastigotes, flagellés, surtout pendant la phase aiguë (90 % de détection), rarement pendant la phase chronique (5 % de détection).

– La technique de la goutte épaisse est à proscrire en raison de l'extrême fragilité du parasite. Des trypanosomes altérés ne persistent que le blépharoplaste volumineux et le flagelle.

– A frais : recherche de la mobilité

Entre lame et lamelle

Attention : s'il y a trop peu de sang sous la lamelle, celle-ci écrase les trypanosomes, ce qui limite leur mobilité et gêne le diagnostic.

Si le prélèvement est négatif, la poursuite de la recherche, 3 jours de suite, est recommandée.

Méthode de Strout

Laisser coaguler dans un tube 5 ml de sang. Après rétraction du caillot, le sérum est centrifugé. Les trypanosomes conservent leur mobilité dans le sérum.

Buffy coat® (*Tubes à microhématocrite*)(voir page 282)

Même procédure que pour la recherche de *Trypanosoma brucei* : après centrifugation en tube capillaire de sang prélevé sur citrate, les trypanosomes, mobiles, sont concentrés dans la couche leucocytaire. La fragilité du parasite qui rend cette technique assez aléatoire impose la recherche immédiate du parasite après centrifugation. On peut traiter 5 à 10 ml de sang par la phytohémagglutinine et rechercher les trypanosomes après centrifugation des cellules restées libres dans le plasma.

Colonne échangeuse d'ions

La séparation des hématies par 2 passages sur une colonne échangeuse d'ions permet de traiter de grandes quantités de sang et sert aussi à la préparation des antigènes à partir du sang d'animaux fortement infectés (440).

– Frottis colorés au May-Grünwald-Giemsa

Dans les frottis, rechercher les trypanosomes dans les zones les plus épaisses.



Photo n° 257 : Partie antérieure de Rhodnius (Réduve)

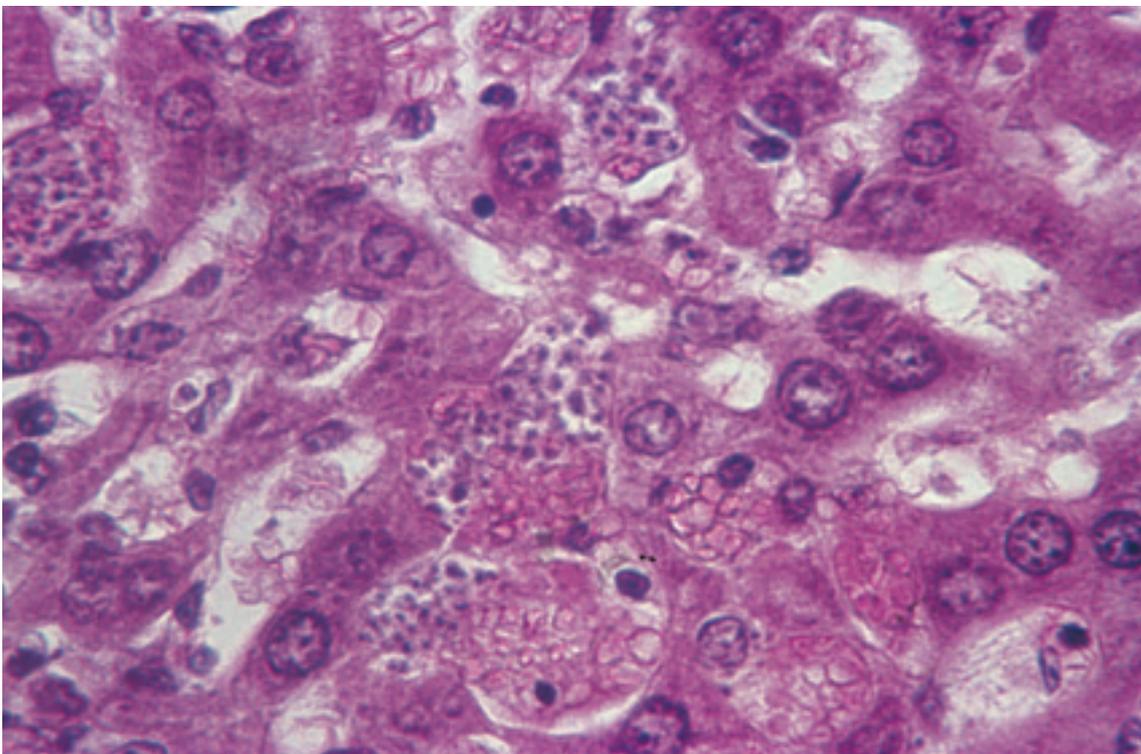


Photo n° 258 : Coupe histologique de foie. Trypanosoma cruzi : nombreuses formes amastigotes intracellulaires souvent en amas. Coloration hémateine-éosine. Obj. × 100.

– PCR

La PCR, technique en cours d'évaluation, semble particulièrement intéressante pour diagnostiquer les formes chroniques (447) et les formes congénitales (446).

DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE

Morphologie

Deux stades parasites peuvent être mis en évidence (photos n° 259 et 260)

La forme trypomastigote circulante

– C'est la forme extracellulaire, mobile flagellée. Sa taille varie de 16-22 microns, selon qu'il s'agisse de formes dites « effilées » ou « trapues ». Coloré par le Giemsa, le cytoplasme apparaît bleu alors que le noyau et le kinétoplaste apparaissent rouge foncé. La membrane ondulante est étroite et peu plissée, avec seulement deux ou trois ondulations. *T. cruzi* se distingue des autres espèces de trypanosomes par 2 éléments : son volumineux kinétoplaste subterminal et la fréquence des formes en croissant (dites encore en C ou U)

La forme amastigote tissulaire (voir chapitre anatomie pathologique) (photo n° 258)

C'est la forme intracellulaire, tissulaire. Arrondie, elle mesure de 1,5 à 5 microns de diamètre et se caractérise par la présence d'un kinétoplaste. D'une morphologie proche des formes amastigotes de leishmanies, elle s'en distingue par sa présence sous forme de pseudokystes dans les cellules parenchymateuses musculaires ou neuronales. Par ailleurs, comme pour les formes amastigotes de leishmanies, on peut les retrouver dans les cellules du système réticulo-endothélial. Le seul élément en faveur de *T. cruzi* est l'aspect particulièrement volumineux du kinétoplaste.

Attention

Dans les mêmes régions, un autre trypanosome, non pathogène est susceptible d'infecter l'homme : *Trypanosoma rangeli*.

**Tableau XXII : Différences morphologiques (frottis colorés)
entre *T. cruzi* et *T. rangeli* (442 et 443)**

	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>
Forme	Larges en « C » Minces en « S »	Minces uniquement avec extrémités effilées
Longueur	15 µm formes larges 20 µm formes minces	25 à 35 µm
Kinétoplaste	Grand et rond Près de l'ext. Postérieure	Petit Loin de l'ext. Postérieure

INOCULATION A L'ANIMAL

Cette méthode est à déconseiller pour le diagnostic. Les jeunes rats, souris, cobayes sont réceptifs mais toutes les souches ne sont pas également virulentes.



Photo n° 259 : *Trypanosoma cruzi*. Frottis. Forme trypomastigote circulante en croissant, effilée. Gros blérophaste subterminal, membrane ondulante présente. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

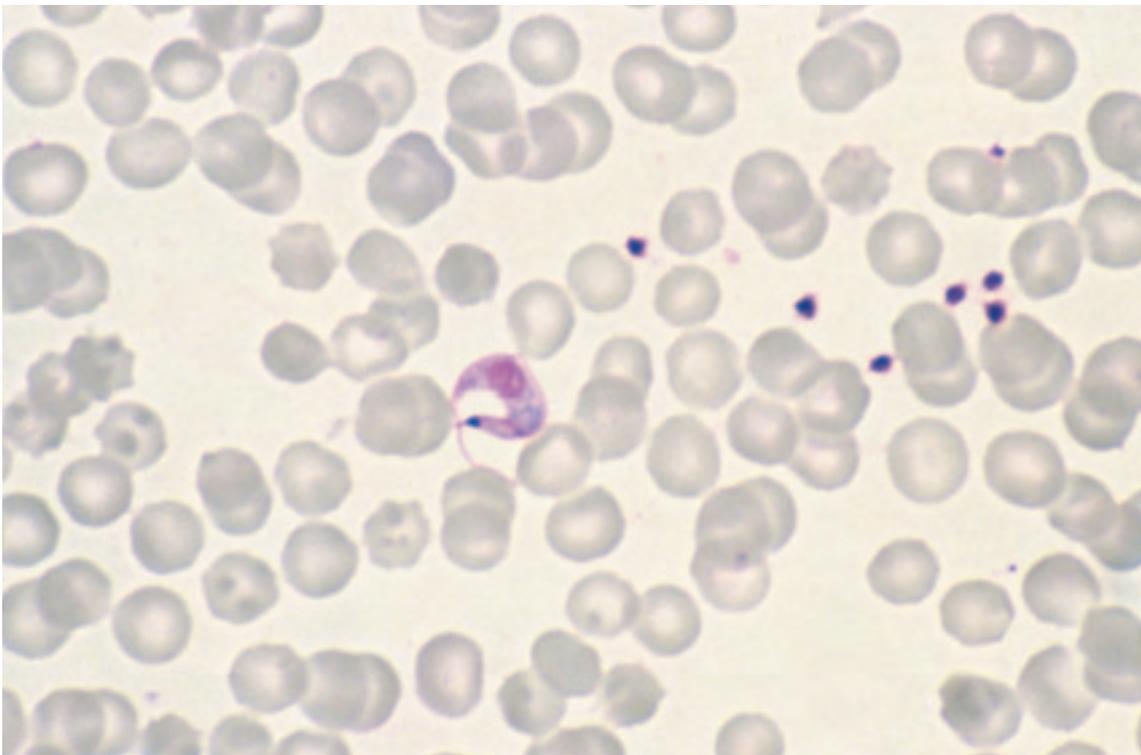


Photo n° 260 : *Trypanosoma cruzi*. Frottis. Forme trypomastigote circulante, en croissant, trapue, gros blérophaste subterminal. Membrane ondulante peu visible. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

De plus, ils présentent de très longues périodes prépatentes et développent des parasitémies très basses avec les isolats humains.

CULTURE

C'est une méthode diagnostique très sensible. *T. cruzi* peut être facilement cultivé sur différents milieux tels le milieu Novy-McNeal-Nicole (NNN), le milieu de Tobie (448), le « Kit for In Vitro Isolation » (KIVI). Ils permettent, après une dizaine de jours d'incubation à 22-25°C, d'obtenir des formes flagellées dites épimastigotes. *T. cruzi* peut également se multiplier sur les milieux semi-synthétiques de type GLSH, enfin la culture à 38 °C sur cellule d'embryon de poulet est possible.

Xénodiagnostic

Cette technique, considérée comme la plus sensible, a été imaginée et mise au point par le parasitologue français Emile Brumpt en 1914 (436). Elle consiste à faire se nourrir des réduves d'élevage sur les patients suspects (piqûres indolores). La recherche du parasite se fait soit un mois plus tard par examen des déjections (obtenu par compression abdominale), soit 2 mois plus tard, par dissection et recherche intestinale. La sensibilité de la technique augmente avec le nombre de vecteurs utilisés pour le même malade. Il est important d'utiliser, dans la mesure du possible, l'espèce de réduve vectrice dans le pays où le malade est susceptible de s'être infecté.

Zymodèmes

L'étude des profils électrophorétiques d'iso-enzymes issues d'isolats a permis de caractériser différentes variétés de *T. cruzi* : Z1, Z2 et Z3. Le zymodème Z1 prédomine au Vénézuéla où il n'y a pas de méga-organes, il coexiste avec Z3 dans le bassin de l'Amazonie (atteintes humaines rares). Le zymodème Z2, lui, est présent dans l'est et le centre du Brésil, où des méga-organes sont fréquemment retrouvés.

DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE

Au stade aigu, la sérologie est le plus souvent négative et donc peu contributive. Elle est par contre essentielle pour le diagnostic des formes chroniques et le dépistage.

Attention

- Les réactions croisées avec les leishmanies (leishmaniose viscérale ou kala azar) justifient une titration des anticorps avec les deux antigènes de genre.
- Des réactions croisées s'observent chez les porteurs de *T. rangeli* (voir ch. Morphologie).

Immunofluorescence indirecte

C'est la méthode la plus répandue. On utilise comme antigènes des cultures formolées de *T. cruzi* séchées sur lame. Elle est positive dès le 15^e jour qui suit la contamination.

Précipitation en gel avec un antigène soluble (extrait total de *T. cruzi*)

Révèle la présence de plusieurs systèmes précipitants, en analyse immuno-électrophorétique l'arc 5 correspond à un antigène spécifique de *T. cruzi* qui ne croise pas avec les autres Trypanosomatidae (dont les leishmanies).

Autres techniques

Sont également utilisées, par les laboratoires spécialisées les méthodes d'hémagglutination indirecte, l'ELISA (449). La méthode des « confettis » est largement utilisée dans les études épidémiologiques.

ANATOMIE PATHOLOGIQUE (444)

Le diagnostic histologique est particulièrement utile pour le diagnostic de la phase chronique où l'isolement sanguin de *T. cruzi* est peu performant. Les formes intracellulaires, amastigotes peuvent être retrouvées dans les fibres musculaires digestives et myocardiques (à la différence des leishmanies qui ne sont présentes que dans les cellules du système réticulo-endothélial).

Myocardiopathie

– Macroscopiquement : amincissement focal typique du myocarde avec anévrisme apical gauche dans plus de 50 % des cas.

– Microscopiquement : myocardite diffuse avec infiltration de lymphocytes et de macrophages, et, dans une moindre mesure, de plasmocytes et d'éosinophiles. Les fibres myocardiques peuvent subir une cytolysse et être remplacées par une fibrose focale et interstitielle. *T. cruzi* n'est découvert, dans le myocarde, que dans 15 à 30 % des cas.

Méga-œsophage, Mégacôlon

Les examens histologiques décèlent des infiltrations focales de cellules mono-nuclées au niveau de la tunique musculaire et du plexus d'Auerbach, siège d'une inflammation majeure avec fibrose.

BIBLIOGRAPHIE

Trypanosomiase africaine

414. ANCELLE T., PAUGAM A., BOURLIOUX F., MERAD A., VIGIER J-P. Détection des trypanosomes dans le sang par la technique du Quantitative Buffy Coat (QBC) : évaluation expérimentale. *Med. Trop.*, 1997, **57**, 245-248.
415. BOISSON C., MATTEI X., BOISSON M.E. Le flagelle de *Trypanosoma gambiense* étudié au microscope électronique. *C.R. Soc. Biol.*, 1965, **159**, 228-230.
416. BRODEN A., RHODAIN J. Le liquide cérébro-spinal dans la trypanosomiase humaine. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1908, **1**, 496-499.
417. BRUTSAERT ET HENRARD. *C.R. Soc. Biol.*, 1938, 1469-1472.
418. CAILLIEZ M. Étude et interprétation statistique du profil protéique et immunologique dans la trypanosomose africaine humaine. Thèse Pharmacie, Paris, 1981.
419. HARTMANN A. *J.A.M.A.*, 1934, **103**, 1349.
420. JADIN J., WERY M. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 1963, **5**, 831-842.
421. KOHAGNE T.L., NKININ S.W., GRÉBAUT P., NJIOKOU F., PENCHENIER L. Cinétique de *Trypanosoma brucei gambiense* en culture sur milieu KIVI et Cunningham. *Bull. OCEAC*, **33**.
422. MARTIN, LEBŒUF, ROUBAUD. La maladie du sommeil au Congo français. Masson Paris, 1909, 264-266.
423. NEUJEAN G. Contribution à l'étude des liquides rachidiens et céphaliques dans la maladie du sommeil à *T. gambiense*. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1950, **30**, 1171-1190.
424. NOIREAU F., GOUTEUX J.P., DUTEURTRE J.P. Valeur diagnostic du test d'agglutination sur carte (Testryp Catt) dans le dépistage de masse de la trypanosomiase humaine au Congo. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1987, **80**, 797-803.
425. O.M.S. Les trypanosomioses africaines. Rapports techniques, 1979.
426. O.M.S. Trypanosomes : recherche dans le sang, concentration. Manuel des techniques de base pour le laboratoire Médicale. *Bull. W.H.O.*, 1982, 220-224.
427. O.M.S. Parasitologie médicale : technique de base pour le laboratoire. 1993.
428. O.M.S. La trypanosomiase africaine ou la maladie du sommeil. Aide-Mémoire n° 259, Mars 2000.
429. PAUGAM A., ANCELLE T., BOUDIOUX F., MERAD A., VIGIER J-P. Apport de la technique Quantitative Buffy Coat (QBC) dans le diagnostic de la trypanosomose humaine africaine. Évaluation expérimentale par l'étude de sang humain mélangé avec *Trypanosoma brucei gambiense* à des concentrations décroissantes. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 1997, **15**, 135-140.
430. PLAINFOSSE B., HOEFFEL J.-C., BRUMPT L., LANGE J.-C., SERINGE P. Un cas de trypanosomose vraisemblablement congénitale chez une enfant de deux ans. *Presse Méd.*, 1966, **74**, 2633-2636.
431. STEPHENS J.W.W., FANTHAM H.B. On the peculiar morphology of a trypanosome from a case of sleeping sickness and the possibility of its being a new species (*Trypanosoma rhodesiense*). *Proc. Roy. Soc.*, 1910, **83**, 28.
432. VAN MEIRVENNE N., JANSSENS P.G., MAGNUS E., MOORS A. Column separation and membrane filtration : a routine method for the detection of african trypanosomes in human blood. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 1973, **53**, 109-112.

433. WEINMAN D. Cultivation of the African sleeping sickness trypanosomes from the blood and cerebrospinal fluid of patients and suspects. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1960, **34**, 180-190.
434. WÉRY M. Trypanosoma brucei et les salivaria. Les trypanosomiases africaines. *Protozool. Med.*, De Boeck Université, 1995, **ch 10**, 103-122.
435. WÉRY M. Trypanosomoses africaines, maladie du sommeil. *Encycl. Med. Chir.* (Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS Paris) Maladies Infectieuses. 2000, **8-504**, **A-20**, 20 p.

Trypanosomiase américaine

436. BRUMPT E. Le xénodiagnostic – Applications au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la trypanosomose de Chagas. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1914, **7**, 706-710.
437. CHAGAS C. Nouvelle espèce de trypanosomiase humaine. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1909, **2**, 304-307.
438. COUDERT J., DESPEIGNES J., BATTISTI M.R., MICHEL-BRUN J. Un cas de maladie de Chagas par contamination accidentelle de laboratoire avec *Trypanosoma cruzi*. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1964, **57**, 208-213.
439. DIAZ E.Z. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1912, **4**, 34-61.
440. Lanham S.M. Separation of trypanosomes from the blood of infected rats and mice by anion-exchangers. *Nature* (London), 1968, **218**, 1273-1274.
441. MELZER H., KOLLERT W. *Deutsch Med. Woch.*, 1961, **88**, 371-377.
442. O.M.S. Trypanosomiase américaine : Maladie de Chagas. In Manuel des techniques de base pour le laboratoire médicale. 1982, **225**, 487p.
443. O.M.S. Parasites sanguins. In Parasitologie médicale : technique de base pour le laboratoire. 1993 réédition 2000, **92**, 118 p.
444. OUAISSI M.A. *Trypanosoma cruzi*. Maladie de Chagas : Aspects cliniques. *Encycl. Méd. Chir. Paris. Maladies infectieuses*. 1993, 8-505-A-20.
445. PIZZI T., NIEDMANN G., JARPA A. Comunicacion de tres casos de enfermedad de Chagas aguda producidos por infecciones accidentales de laboratorio. *Bol. Chileno. Parasitol.*, 1963, **18**, 32-36.
446. RUSSOMANDO G., DE TOMASSONE M., DE GUILLEN I. ACOSTA N., VERA N., ALMIRON M., CANDIA N., CALCENA M., FIGUEREDO A. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1998, **59**, 637-642.
447. TANOWITZ H.B., KIRCHHOFF L.V., SIMON D., MORIS S.A., WEISS L.M., WITTNER M. Chagas' Disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1992, **5**, 400-419.
448. TOBIE E.J. Culture of mammalian trypanosomes. *J. Protozol.*, 1964, **11**, 418-423.
449. TOUSSAINT A.J. *Exp. Parasitol.*, 1966, **19**, 71-76.

VIII

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA LEISHMANIOSE VISCÉRALE

Tableau XXIII : Leishmania donovani/Leishmania tropica, formes amastigotes. Résultats du Contrôle National de Qualité en Parasitologie en France.

DATE D'ENVOI	NOMBRE DE RÉPONSES	RÉSULTATS CONFORMES	DEUXIÈME RÉPONSE	TROISIÈME RÉPONSE
11/80	1 618	53,5 %	<i>Toxoplasma gondii</i> 0,7 %	
03/93	1 034	71 %	<i>Toxoplasma gondii</i> 6,1 %	<i>Pneumocystis carinii</i> 2,1 %
06/95	1 182	55,6 %	<i>Toxoplasma gondii</i> 3,8 %	<i>Pneumocystis carinii</i> 1,9 %
10/99 (Bioforma)	3 817	95,2 %	<i>Trypanosoma brucei</i> ou <i>cruzi</i> 1,2 %	<i>Toxoplasma gondii</i> 0,2 %

La leishmaniose viscérale (Kala-azar = maladie noire = maladie mortelle) est une maladie généralisée aux organes hématopoïétiques. *Leishmania infantum* observé en France est un opportuniste. Non traitée la maladie est habituellement mortelle.

TAXONOMIE

Les *Leishmania* désignent des Kinétoplastidae parasites de Mammifères. Le genre *Leishmania* comprend douze espèces principales (519).

La cryopréservation des souches dans différents centres, notamment par le Professeur J.A. Rioux à Montpellier, l'utilisation des lectines, la méthode enzymatique, l'étude du pouvoir pathogène expérimental, le traitement numérique (518) ont conduit à une nouvelle classification (519).

Les agents de la leishmaniose viscérale sont :

- *Leishmania donovani*, agent du Kala-azar indien,
- *Leishmania archibaldi*, pour le foyer du Soudan anglo-égyptien,
- *Leishmania infantum*, pour le foyer méditerranéen, synonyme *Leishmania chagasi* pour le foyer sud-américain.

Les anciennes dénominations des différents stades morphologiques de flagellés ont été remplacées par Hoare et Wallace par de nouveaux termes comprenant le suffixe mastigote = flagelle.

Ce sont :

- amastigote au lieu de leishmania, stade caractérisé par l'absence de flagelle.
- promastigote au lieu de leptomonas : le flagelle part du kinétoplaste situé en avant du noyau et émerge à l'extrémité antérieure.
- épimastigote au lieu de crithidia : le flagelle part d'un kinétoplaste juxta-nucléaire et émerge à l'extrémité antérieure. Une membrane ondulante est présente.

– trypomastigote au lieu de trypanosome : le flagelle part d'un kinétoplaste postérieur et émerge à l'extrémité antérieure. Une membrane ondulante est apparente.

Cette néoterminologie est en même temps usitée et discutée. En particulier pour les formes leishmania dites amastigote, c'est-à-dire sans flagelle : la microscopie électronique a révélé la présence d'un petit flagelle. Ainsi a été proposée, pour ce stade, le terme de micromastigote (488).

ÉPIDÉMIOLOGIE

Transmission

L'agent vecteur est un diptère le phlébotome (photo n° 261), qui se nourrit de sucs de plantes, mais la femelle doit avoir deux repas sanguins au moins pour assurer la maturation des œufs. Les espèces pouvant transmettre les leishmanies sont nombreuses. De nombreux animaux servent de réservoir de parasites comme les rongeurs, et aussi les chiens. Ceux-ci, surtout les animaux sauvages, assurent la pérennité des leishmanioses et rendent leur éradication non envisageable.

RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE (469)

En France, dans le « midi », cinq zones d'infection peuvent être individualisées :

- la zone niçoise, étendue sur l'ensemble du littoral des Alpes-Maritimes,
 - la zone marseillaise reliée, semble-t-il, à la zone précédente,
 - la zone corse qui semble occuper une grande partie de l'île,
 - la zone cévenole couvrant à l'ouest du Rhône la bordure méridionale du Massif Central,
 - la zone catalane dont seule la partie nord occidentale intéresse la France.
- à titre exceptionnel, ont été signalés des cas autochtones dans la région parisienne et les Vosges.

22 cas de leishmaniose viscérale autochtone ont été recensés en France en 1999, dont sept cas chez des enfants de moins de six ans et six chez des malades atteints de SIDA.

Europe : Toute la région méditerranéenne en particulier l'Italie, Yougoslavie, Albanie, Grèce ++, Liban, Syrie, Turquie, Espagne ++ ainsi que le Portugal ++, Chypre, Malte ++.

Asie : l'est de l'Inde + + + +, Chine + + + +, le Pakistan, Bangladesh, Sumatra, Iran, Irak ++, Koweït, Arabie Saoudite, sud de l'U.R.S.S. ++, Corée du Nord, Liban, Syrie +, Yemen...

Amérique du Sud : Brésil + + + et Paraguay, Argentine, Guatemala, Pérou, Vénézuéla, Bolivie, Colombie.

Afrique : outre l'Afrique du nord Algérie, Maroc, Tunisie, Egypte, Tchad, Gabon, Côte d'Ivoire, Soudan + + +, Ethiopie, Kenya + + +, Ouganda, Somalie ++, Zaïre, Angola.

Les infections familiales ne sont pas exceptionnelles et quand le diagnostic d'un cas est porté, il y a lieu d'explorer la famille (492).

PRÉLÈVEMENTS

– **la moelle osseuse** de préférence : elle est très souvent positive et la ponction médullaire est en général bénigne. L'étude doit en être prolongée (30 minutes au moins), surtout si l'on y trouve un nombre augmenté de plasmocytes ou de cellules de Mott. Les bords du frottis sont plus riches en parasites que le reste de la préparation (photo n° 262).

En cas de résultat négatif, on peut refaire un prélèvement 30 minutes après injection sous-cutanée de 1 mg d'adrénaline qui provoque une chasse de parasites de la rate par spléno-contraction (500).

– **les ganglions superficiels**, de ponction facile et sans danger. Ils peuvent être seuls atteints dans le cas de leishmaniose ganglionnaire (462) (photos n° 263 à 265). Ils sont trouvés positifs dans 60 % des cas de leishmaniose viscérale. Aux plasmocytes et cellules de Mott, on trouve associés des macrophages contenant des débris cellulaires de diverses natures.

– **le sang** très facile à obtenir mais pauvre. On fait des gouttes épaisses ou des concentrations comme pour les microfilaires. Il n'est positif que dans moins de 20 % des cas à l'examen direct, mais vient en premier dans la leishmaniose après cytoconcentration.

– **la cytoconcentration du sang** (514) donne de très bons résultats en général, et d'excellents résultats en cas de SIDA. Supérieurs à ceux de la culture et du médulogramme : 1 à 150 *Leishmania* dans un sédiment étalé sur 28 mm² coloré au May-Grünwald-Giemsa, chez 7 malades atteints du SIDA. Les leishmanies étaient présentes non seulement dans les monocytes mais également dans les polynucléaires neutrophiles chez 5 patients où il se multiplie également. La cytoconcentration permet également un très bon suivi du traitement chez ces malades (photos n° 266 à 269).

– **la rate prélevée par ponction** : c'est l'organe le plus riche mais aussi le plus dangereux à prélever. On ne pratiquera la ponction qu'après un bilan de coagulation qui doit être normal chez un malade hospitalisé pour pouvoir faire éventuellement une splénectomie d'urgence. On utilise une aiguille à intra-musculaire que l'on retire très vite, entre deux mouvements respiratoires. Il est classique ensuite de mettre un bandage avec vessie de glace sur l'abdomen (photos n° 270 et 271).

– **le foie par ponction** à l'aiguille.

PHYSIOPATHOLOGIE CLINIQUE

La pancytopenie est très caractéristique du Kala-azar. L'hypersplénisme joue un rôle pathogénique majeur démontré par la relation entre la taille de la rate et l'importance de l'anémie et de la leucopénie (493).

La survie d'hématies transfusées marquées au chrome 51 est de 16 jours chez les enfants atteints de Kala-azar évolutif et de 25 jours après traitement. Cette nette diminution démontre une destruction périphérique des hématies (494).

La même étude montre aussi une diminution de la durée de vie des polynucléaires neutrophiles par destruction périphérique surtout dans la rate.

Il existe aussi une margination vasculaire.

Il y a une hépato-splénomégalie avec polyadénopathie, une fièvre anarchique, et un amaigrissement important.

MODIFICATIONS BIOLOGIQUES

1) HÉMATOLOGIQUES (467)

– **Hématies** : il existe une diminution du nombre des hématies, des leucocytes et des plaquettes qui s'aggrave avec l'évolution de la maladie et l'augmentation de volume de la rate.

Cette anémie est généralement modérée à 3 000 000-3 500 000/ μ l baissant jusqu'à 1 500 000 dans une phase avancée. Le chiffre le plus bas obtenu est de 700 000, la valeur moyenne 2 900 000 (493).

Elle est souvent normochrome, avec rarement une normoblastose.

L'hémoglobine est diminuée inférieure à 7 g. pour cent dans un tiers des cas (467). Le diamètre des hématies est presque normal ; parfois largement augmenté, plus rarement légèrement diminué. Chez l'enfant, par contre, l'anémie est hypochrome (494).

La sidérémie est normale ou augmentée (494 et 513).

La réticulocytose est normale ou légèrement augmentée, 2 à 3 % en valeur relative. Avec un nombre moyen de 3 000 000 de globules rouges, cela donne 50 000 à 100 000 réticulocytes par μ l (493). La polychromatophilie et la réticulocytose sont, en général, absentes ou existantes mais modérées dans un cas sur cinq.

La normoblastose sanguine est peu fréquente et faible quand elle est présente. Il n'y a pas de poikilocytose.

Habituellement, il y a donc une anémie modérée avec des hématies normales sauf facteurs surajoutés (malnutrition).

– **Leucocytes** : une leucopénie est habituelle

Le nombre est de (493) :

inférieur à 1 000/ μ l dans 3 %	entre 3 000 et 4 000/ μ l dans 19 %
entre 1 000 et 2 000/ μ l dans 22 %	entre 4 000 et 5 000/ μ l dans 13 %
entre 2 000 et 3 000/ μ l dans 34 %	et supérieur à 5 000/ μ l dans 7 %

Le chiffre le plus faible trouvé a été de 300/ μ l (492).

Des chiffres encore plus faibles prêtant à confusion avec une agranulocytose ont été observés. Le pourcentage est en moyenne de 33 % de polynucléaires neutrophiles (467). Il n'y a pas de myélocytes dans le Kala-azar chinois, le nombre moyen de leucocytes était de 2 800/ μ l. La leucopénie dans le Kala-azar est due à une neutropénie, non seulement le pourcentage mais la valeur absolue des polynucléaires neutrophiles sont diminués.

Les lymphocytes sont augmentés en pourcentage et légèrement diminués en valeur absolue : en moyenne 1 500/ μ l (467). Les monocytes sont augmentés en pourcentage et normaux ou diminués en valeur absolue qui est en moyenne de 250/ μ l (467).

Le parasitisme préférentiel et paradoxal des monocytes est lié à l'existence de déterminants spécifiques pour les formes promastigotes sur la membrane de ces macrophages (491). Il est à souligner que ce parasite, avec multiplication des leishmanies existe aussi pour les polynucléaires neutrophiles (514) (photo n° 269)

Thrombocytes (468) : leur nombre est diminué en moyenne à 150 000/ μ l, inférieur à 100 000/ μ l dans près de 314 des cas. Une thrombopénie marquée s'accompagne d'un syndrome hémorragique. Le chiffre moyen est même trouvé inférieur à 100 000/ μ l (467).

2) VITESSE DE SÉDIMENTATION

Est très accélérée, en relation avec l'anémie et l'hypergammaglobulinémie. Elle est, en moyenne, de 92 mm à la première heure (493).

3) IMMUNOGLOBULINES TOTALES : Dans 23 cas de leishmaniose viscérale infantile les IgA ont été trouvées normales, les IgG augmentées 22 fois moyenne de 26,6 g/l (N = 10,45), les IgM augmentées 20 fois moyenne 3,60 g/l (N = 0,9) (487).

4) LA MOELLE OSSEUSE

Il existe une plasmocytose modérée de l'ordre de 3 à 5 % avec présence de cellules de Mott (photo n° 263). C'est un important signe d'appel à la recherche prolongée de leishmanies dans la moelle ou les ganglions. Il y a souvent une diminution, voire une absence de mégacaryocytes. Les polynucléaires sont également diminués. Par contre, il y a fréquemment une érythroblastose.

DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE

(photos n° 262 à 271)

Après coloration au May-Grünwald-Giemsa, les leishmanies ou formes amastigotes sont généralement intra-cellulaires à l'intérieur des monocytes ou des polynucléaires neutrophiles. On les trouve parfois libres à la suite de l'éclatement des cellules. Il y a de un à quelques dizaines de parasites par cellules (photos n° 266 et 267).

Taille : en moyenne 2,5 µm de largeur et 5 µm (4,5 à 5,5 µm) de long.

Forme : ovulaire, parfois complètement arrondie.

Noyau : occupe le tiers de la surface, de couleur rouge violacée, de forme arrondie, de structure chromatidienne lâche.

Cytoplasme : coloré en bleu pâle.



Photo n° 261 : Dessin de Phlebotomus papatasi, un des agents vecteurs de Leishmania infantum. Collection Emile Brumpt.

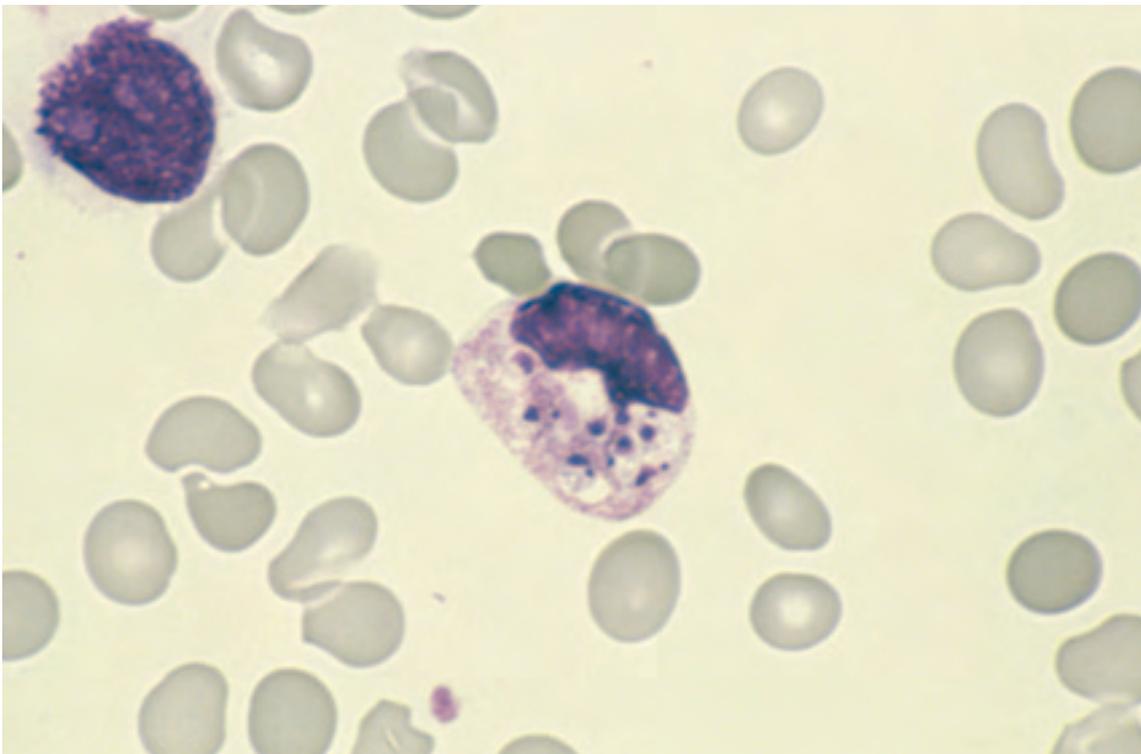


Photo n° 262 : Leishmania infantum. Frottis de moëlle. Six amastigotes dans une cellule mononuclée dans un cas de SIDA. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

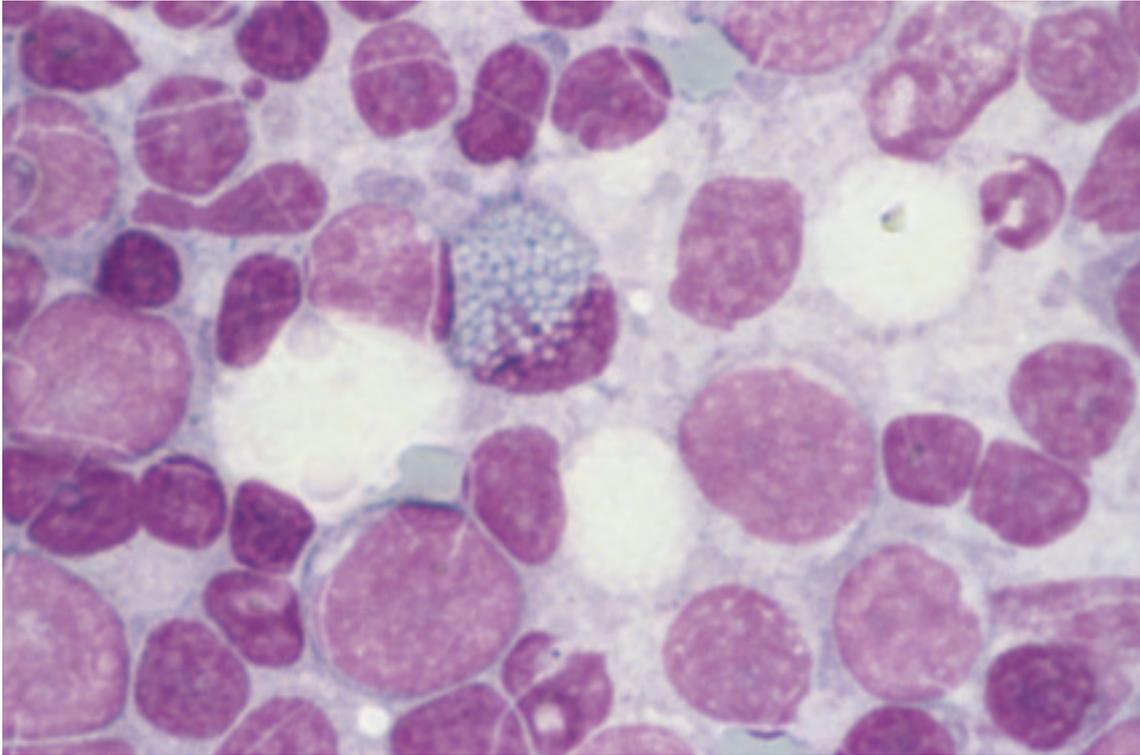


Photo n° 263 : Leishmaniose ganglionnaire. Aspect cytologique. Au centre une cellule de Mott typique. Rajeunissement global du ganglion, environ 15 % de lymphoblastes et 10 % de cellules réticulo-histiocytaires. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

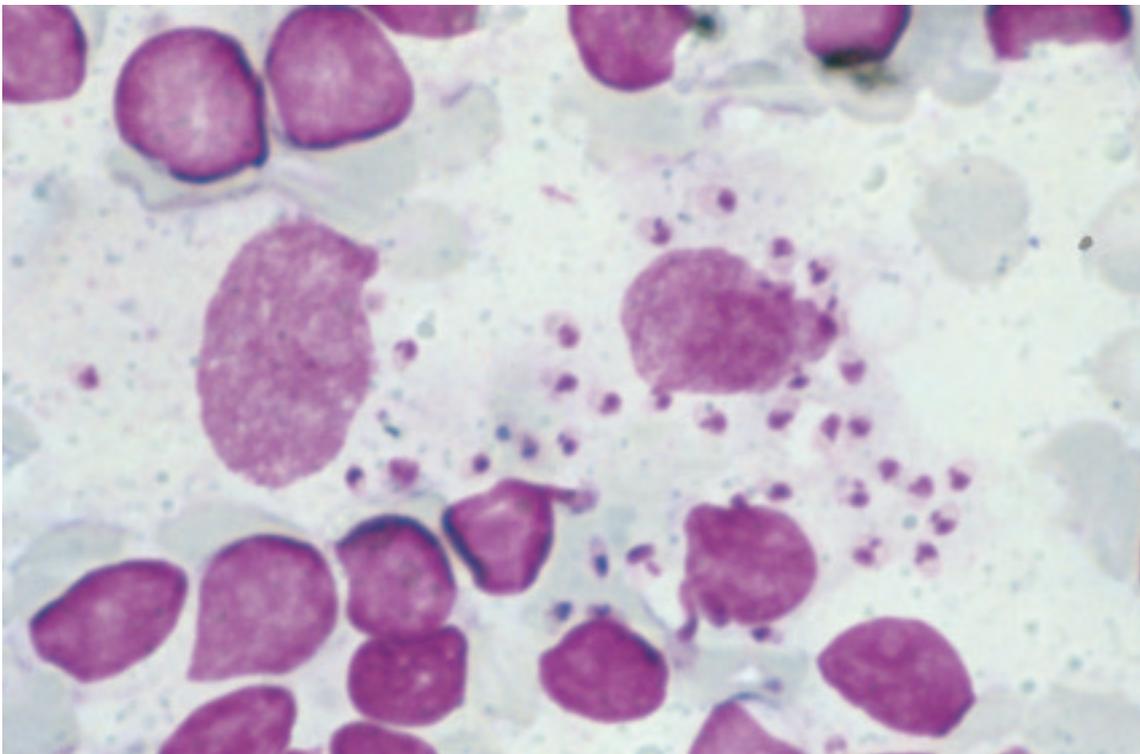
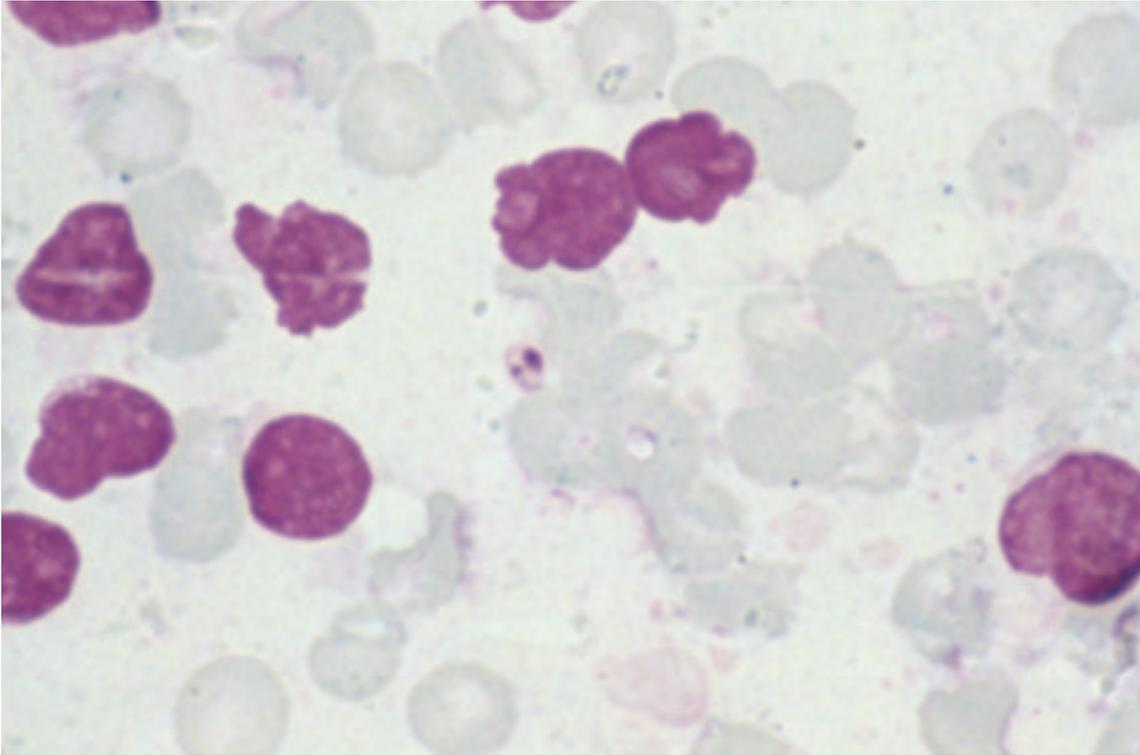
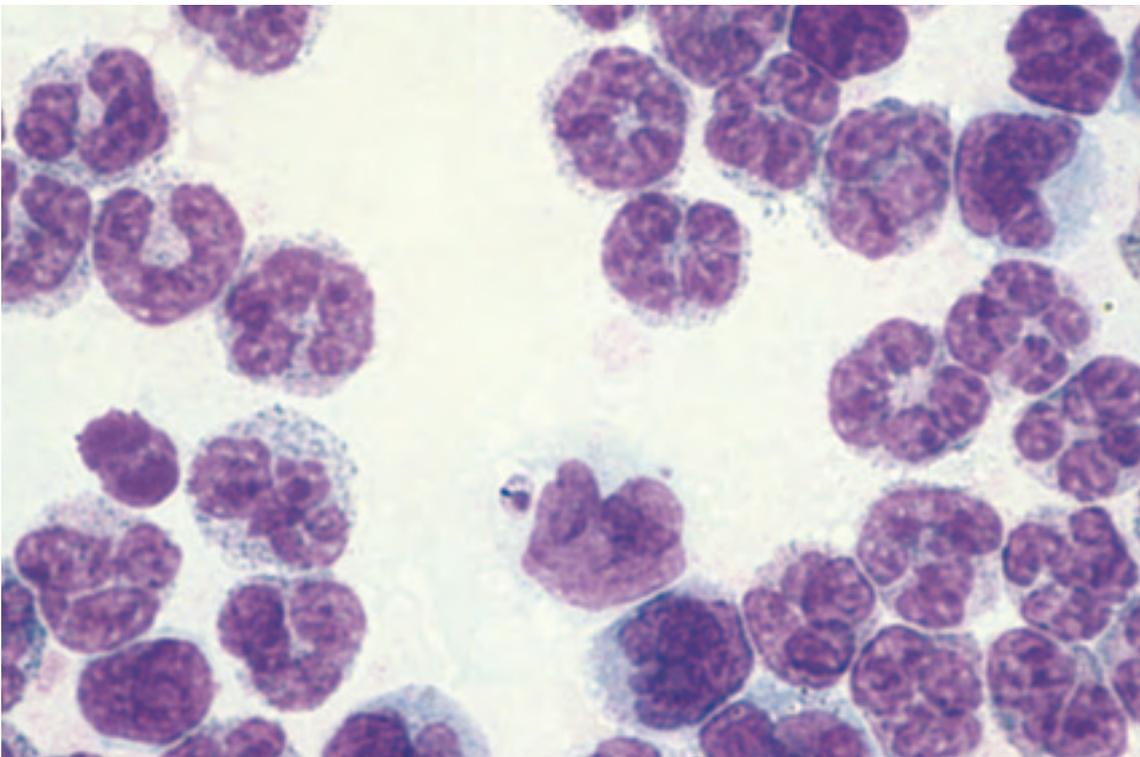


Photo n° 264 : Leishmania infantum. Frottis ganglionnaire même cas que la photo n° 263. Nombreux amastigotes intra-cellulaires (cellules géantes). Coloration M.G.G. Obj. × 100.



*Photo n° 265 : Leishmania infantum. Frottis ganglionnaire amastigote isolé.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



*Photo n° 266 : Leishmania infantum. Cytoconcentration. Une leishmanie isolée (SIDA).
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

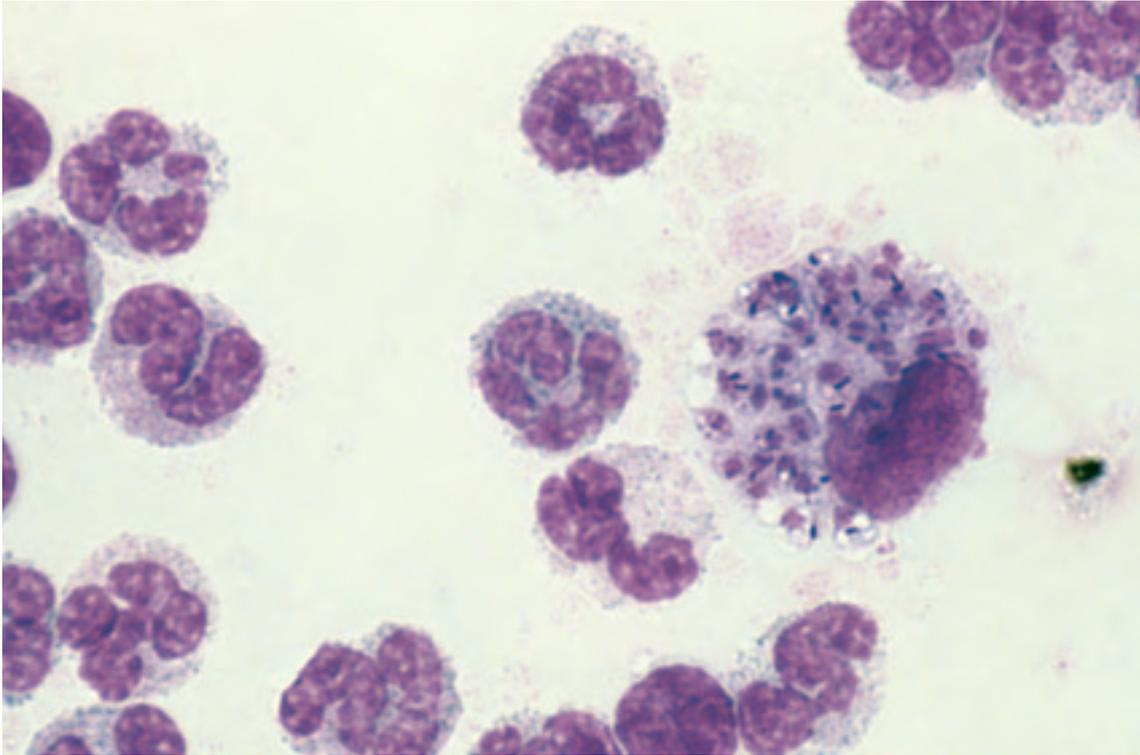


Photo n° 267 : Leishmania infantum. Cytoconcentration. Monocyte contenant une trentaine d'amastigotes (SIDA). Coloration M.G.G. Obj. × 100.

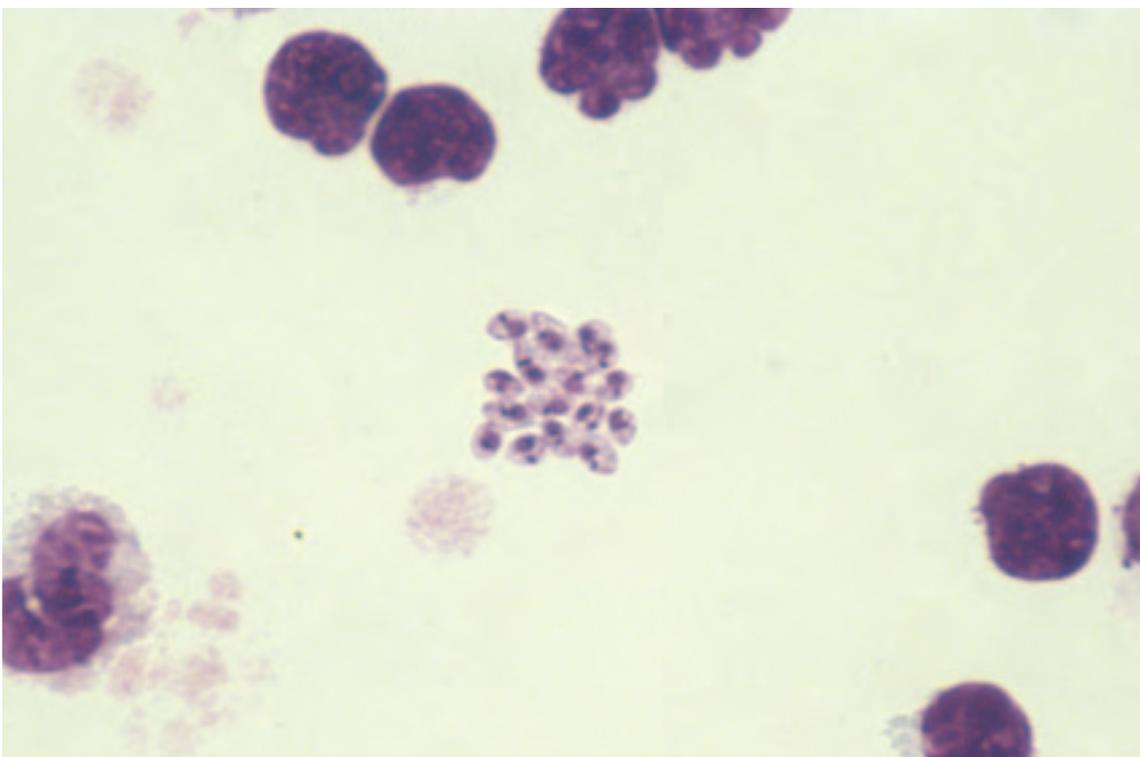


Photo n° 268 : Leishmania infantum. Cytoconcentration. Amas d'amastigotes extracellulaires dans un cas de SIDA. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

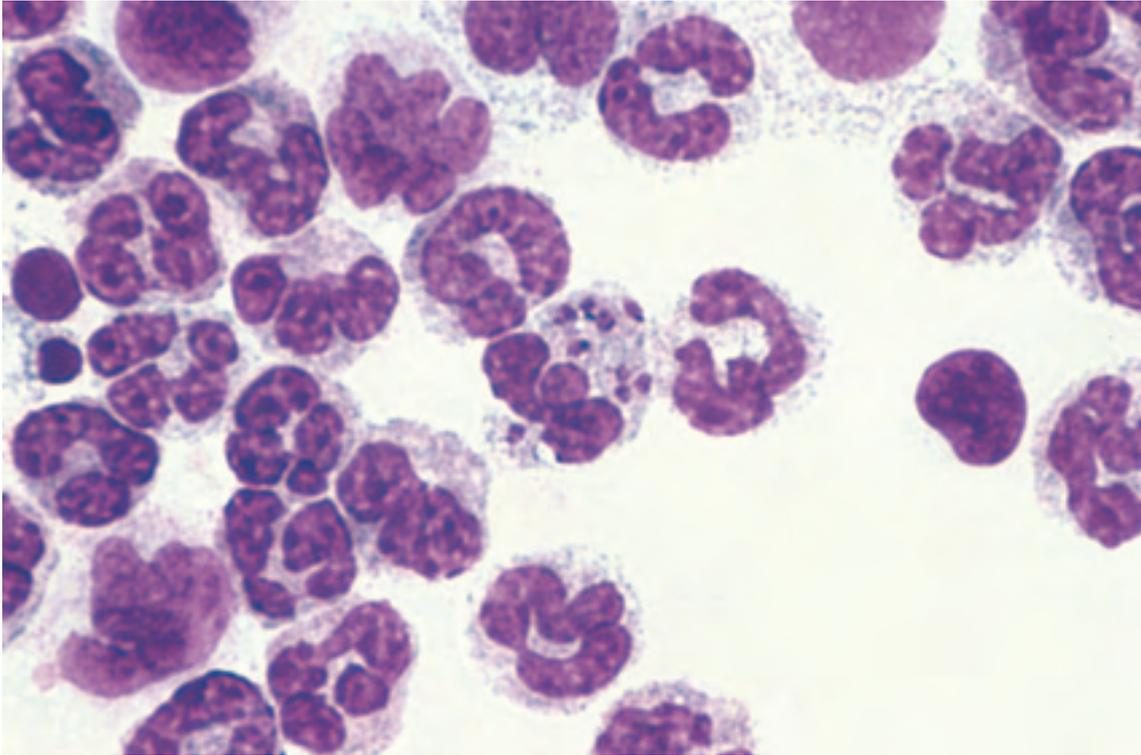


Photo n° 269 : Leishmania infantum. Cytoconcentration. Un polynucléaire neutrophile contenant 9 amastigotes montrant une multiplication à l'intérieur du leucocyte (SIDA). Coloration M.G.G. Obj. × 100.

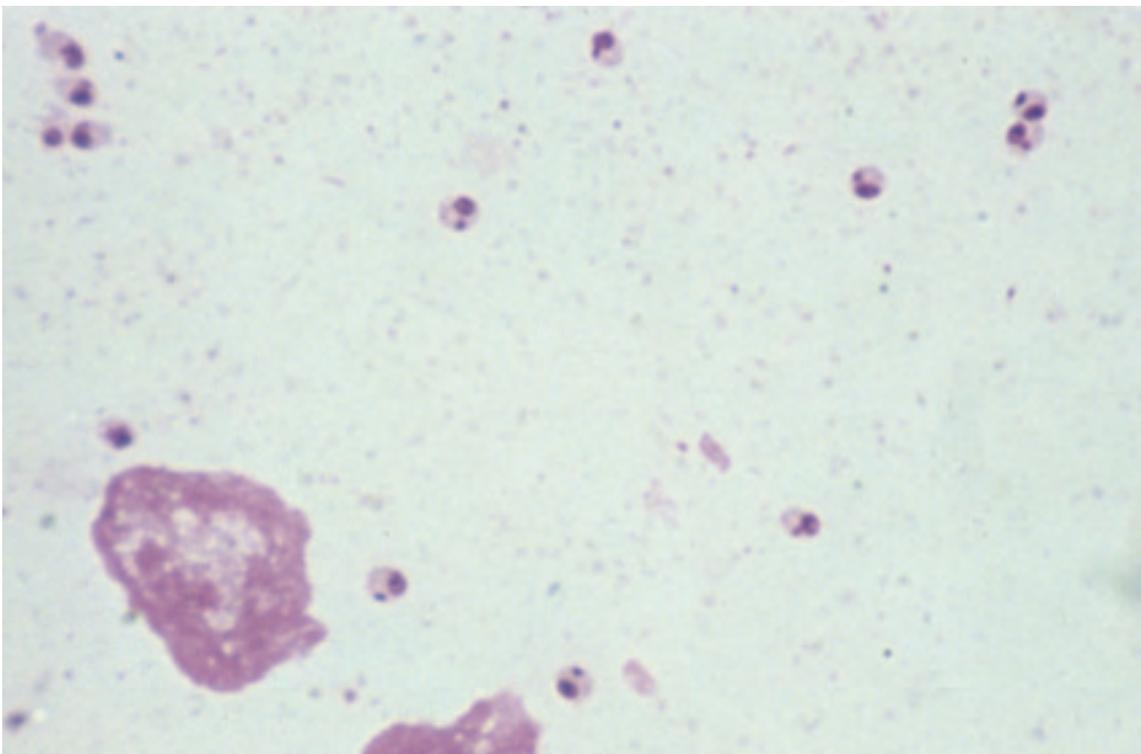


Photo n° 270 : Leishmania infantum. Apposition de rate. Formes amastigotes libres. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

Le kinétoplaste : c'est un bâtonnet de coloration très foncée, souvent disposé perpendiculairement au noyau. Selon la position du parasite, il est parfois vu sous forme d'un point.

Le kinétoplaste est formé d'un corps parabasal fortement coloré et d'un blépharoplaste punctiforme ou centriole, ce point très fin est souvent invisible en microscopie optique.

Le rhizoplaste : c'est une ligne fine, colorée en rouge foncé, partant du kinétoplaste pour aller jusqu'au bord du parasite : c'est l'amorce du flagelle. Il est inconstamment visible, et peut aussi se présenter selon la position du parasite sous forme d'un point.

CULTURE

Le plus ancien milieu employé, toujours avec succès est celui de Novy, Mac Neal, modifié par Nicolle (509 et 510) milieu N.N.N. C'est une gélose salée additionnée de sang de lapin.

1) **sang de lapin** : prélèvement par ponction cardiaque. Raser le thorax d'un lapin adulte. Désinfecter la peau du lapin à la teinture d'iode et les mains de l'opérateur à l'alcool. Faire immobiliser le lapin sur le dos par un aide qui tient les pattes avant et arrière. Repérer à droite du sternum la pointe du cœur par ses battements. Piquer un centimètre au-dessus. Aspirer doucement le sang. On peut prélever chez un lapin adulte jusqu'à 40 ml de sang. Retirer rapidement la seringue. Nettoyer à l'alcool.

La mortalité, lors de ce prélèvement, est assez forte.

Mettre le sang dans un récipient stérile contenant 4 ml de citrate de soude stérile et 250 000 U.I. de pénicilline. Mélanger. Conserver au maximum 24 heures à + 4 °C.

2) **gélose** : faire fondre

Agar	14 g
CINa	6 g
Eau distillée	900 ml

L'emploi du milieu de Parker 199 donne de meilleurs résultats que la solution chlorurée simple.

Stériliser à l'autoclave. Refroidir à 50 °C.

Répartir par 3 ml dans des tubes à essai. Ajouter toujours stérilement 1 ml de sang de lapin environ par tube. Mélanger. Incliner les tubes presque horizontalement et laisser solidifier.

Avant l'emploi, vérifier la stérilité en plaçant les tubes 24 heures à 37 °C. Cette préincubation favorise également l'exsudation de l'eau. Conserver au maximum 15 jours à + 4 °C.

Ensemencer près d'un bec Bunsen le prélèvement : sang récolté sur citrate de soude, moelle, suc splénique ou ganglionnaire, dans l'eau de condensation. Pour le sang, il faut ensemencer 6 tubes avec 0,5 à 1 ml chaque.

Incuber à 22 °C pour les leishmanies, à 37 °C pour les trypanosomes.

Pour les leishmanies, faire une lecture entre lame et lamelle toutes les semaines, en faisant après huit jours une subculture si la première lecture est négative. Conserver les tubes au moins un mois.

Les parasites se multiplient sous la forme *Leptomonas* (= promastigote) (photo n° 272) qui ont une taille de 20 µ avec un flagelle de même longueur. Elles sont faciles à repérer car mobiles. Elles possèdent un flagelle antérieur mais pas de membrane ondulante. Elles se colorent bien par le May-Grünwald-Giemsa.

Attention aux manipulations : ces leptomonas sont infectieux pour l'homme.

AUTRES MILIEUX DE CULTURE

Milieu de Schneider pour culture de cellules d'insectes commercialisé additionnée de 30 % de sérum de veau fœtal (485). La culture avant traitement est positive en 3 jours.

L'urine humaine est proposé pour remplacer le sérum de veau fœtal (523).

Dans le cas de sidéens infestés par *Leishmania infantum*, l'hémoculture sur milieu N.N.N. donne de bons résultats (471).

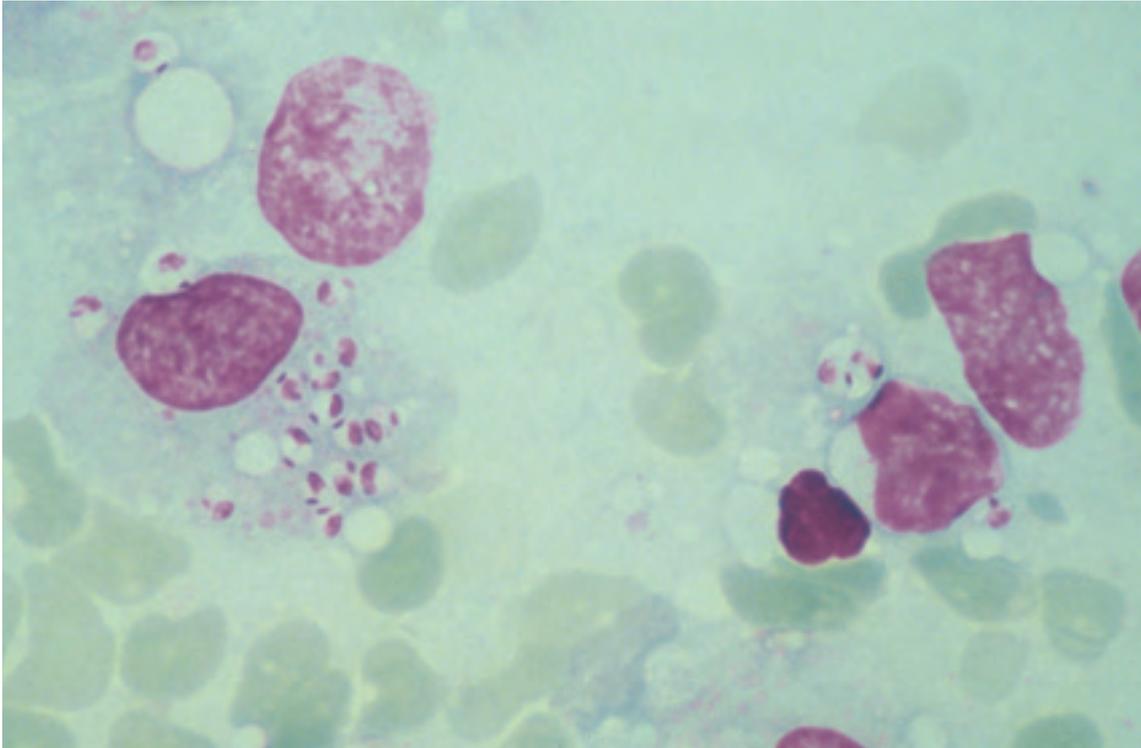


Photo n° 271 : Leishmania infantum. Apposition de rate. Amastigotes intra-cellulaires. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



Photo n° 272 : Leishmania infantum. Culture de 15 jours sur milieu N.N.N. Formes promastigotes (= Leptomonas) SIDA. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

ATTENTION : les cultures de *Leishmania donovani* restent virulentes pour l'homme même après 4 ans et demi de repiquage soit 115 passages (511).

INOCULATION À L'ANIMAL

Les divers prélèvements peuvent être inoculés. L'animal de choix est le hamster, par voie intrapéritonéale. On utilise au moins deux animaux.

Les animaux sont sacrifiés en fonction de leur aspect après 2 à 4 mois. Les leishmanies sont recherchées dans les appositions de foie et de rate, colorées au May-Grünwald-Giemsa. La lenteur de l'isolement fait que cette méthode qui a un intérêt scientifique certain est peu utilisée pour le diagnostic courant.

IMMUNOLOGIE

DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE

DOSAGE DES IMMUNOGLOBULINES

RÉSULTATS : Leishmaniose viscérale (487)

Moyenne pour 23 malades (enfants de 1 à 6 ans) :

* IgA : 2,10 g/l

* IgG : 26,60 g/l (normale pour 1 sérum)

* IgM : 3,60 g/l (normale pour 3 sérums)

La production d'IgM est précoce et disparaît rapidement.

Après traitement, le retour à la normale des IgG se fait en trois mois environ.

Réactions sérologiques spécifiques

Immunofluorescence

Technique : Antigènes :

– Frottis ou coupe à congélation de formes amastigotes de *Leishmania donovani*, provenant de foie ou de rate de hamster infestés depuis cinq mois environ. Ces préparations se conservent d'une manière prolongée, six mois au moins, à une température de -70 °C.

– Les formes promastigotes de culture ou les leishmanies prélevées sur l'animal donnent des résultats équivalents (460).

– Les formes promastigotes de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania braziliensis pifanoi* et les formes amastigotes de *Leishmania donovani* donnent des résultats équivalents dans la leishmaniose cutanéomuqueuse (463).

Sérum : première dilution du sérum au 1/50^e.

Contre-coloration par le Bleu d'Evans à 1/10 000.

RÉSULTATS

La dilution seuil significative varie largement selon les laboratoires, en général elle est de 1/100^e (516). Le titre peut atteindre 1/15 000.

Tableau XXIV : Sensibilité de la réaction d'immunofluorescence dans les leishmanioses

Références		Oddo 1963	Duxbury 1964	Bittencourt 1968	Kien 1969	Walton 1972	Budiardini 1973	Ranque 1975
Leishmanioses viscérales	Nombre % positifs	4 100 %	30 70 %		17 100 %		22 100 %	86 93 %
Leishmanioses cutanéomuqueuse	Nombre % positifs		31 22 %	29 100 %		28 89 %		
Leishmanioses cutanées	Nombre % positifs	3 100 %	5 0 %		32 15 %	30 93 %		49 0 %

Dans l'ensemble, la réaction d'immunofluorescence est en règle positive dans la leishmaniose viscérale, elle est habituellement positive dans la leishmaniose cutanéomuqueuse et plus rarement ou jamais positive dans les leishmanioses cutanées sèches.

Chez les bébés de moins de cinq mois et les malades soumis à des traitements par immunosuppresseurs, les anticorps peuvent manquer mais, dans ce cas, les corps de Leishman pullulent dans les organes.

Tableau XXV : Spécificité de la réaction d'immunofluorescence dans les leishmanioses.

Références		Oddo 1963	Kien 1969	Walton 1972	Budiardini 1973	Ranque 1975
Témoins normaux	Nombre % positifs	4 0 %	30 3 %	100 4 %	1796 0 %	
Affections diverses	Nombre % positifs			75 10 %	282 0 %	512 0 %
Tuberculose	Nombre % positifs				22 4 %	
Syphilis	Nombre % positifs		10 0 %		41 0 %	
Dysglobulinémies	Nombre % positifs				30 3 %	11 0 %
Affections parasitaires diverses	Nombre % positifs	15 7 %	100 1 %			45 0 %
Toxoplasmoses	Nombre % positifs		20 0 %		4 0 %	15 0 %
Trypanosomœs africaines	Nombre % positifs	16 0 %	20 5 %			33 0 %
Paludisme	Nombre % positifs	23 13 %	20 0 %			
Maladie de Chagas	Nombre % positifs	13 15 %				

Les réactions croisées sont particulièrement importantes dans le paludisme : près de la moitié à un taux de 1/100^e (516).

ÉVOLUTION

Chez l'animal d'expérience, les anticorps apparaissent très rapidement, une semaine après l'inoculation.

Après traitement, chez l'homme, les anticorps fluorescents diminuent pendant les deux premiers mois. Un taux résiduel de 1/100^e peut persister plus d'un an (516).

RÉACTIONS DE PRÉCIPITATION EN MILIEUX GÉLIFIÉS

TECHNIQUES

L'antigène utilisé est extrait de formes promastigotes de différentes espèces de leishmanies cultivées sur bouillon additionné de sang de lapin (460, 464 et 517).

On peut utiliser les méthodes d'Ouchterlony, d'immunoélectrophorèse et d'électrosynérèse.

Références	Bray 1966	Ranque 1975
Méthodes	Ouchterlony	
Leishmaniose viscérale		
Nombre :	4	86
% positifs	100 %	62 %
Leishmaniose cutanéomuqueuse		
Nombre :	2	82
% positifs	100 %	20 %
Leishmaniose cutanée		
Nombre :	8	49
% positifs	0 %	14 %

Tableau XXVI : Sensibilité de l'Ouchterlony dans la leishmaniose.

Tableau XXVII : Spécificité de l'Ouchterlony dans la leishmaniose

Références	Bray 1966	Ranque 1975
Méthodes	Ouchterlony	
Témoin normal		
Nombre :	5	
% positifs	0 %	
Affections diverses		
Nombre :		523
% positifs		0 %
Parasitoses diverses		
Nombre :		45
% positifs		0 %
Toxoplasmose		
Nombre :		15
% positifs		0 %
Trypanosomose africaine		
Nombre :		33
% positifs		0 %

RÉACTION D'AGGLUTINATION DIRECTE (peu employée)

L'antigène est une suspension formolée de formes promastigotes de *L. donovani* traitées par le trypsine. 97 % des sérums de Kala-azar donnent une agglutination à un titre supérieur ou égal à 1/32 et seulement 2 % des témoins normaux (453).

TESTS CUTANÉS DANS LES LEISHMANIOSES

Test à la leishmanine ou de Monténégro.

C'est une intradermo-réaction pratiquée avec la leishmanine, antigène provenant de la culture de *Leishmania* sous forme promastigote.

ANTIGÈNE

Monténégro (502) utilisa initialement un extrait de formes promastigotes de culture sur milieu N.N.N. de *Leishmania tropica* et de *Leishmania braziliensis* après macération en solution de Coca à la température du laboratoire.

L'espèce de *Leishmania* n'a pas d'importance puisque *L. braziliensis* a donné des résultats positifs dans le Kala-azar soudanais (497), Monténégro a employé indifféremment *L. tropica* et *L. braziliensis*.

TECHNIQUE

Injection de 0,10 ml d'antigène dans la région deltoïdienne en intra-dermique. Du côté opposé, injecter à titre de témoin, la même quantité de soluté salé isotonique phénolé à 0,4 %. Chez les Noirs, on peut pratiquer l'injection au niveau de l'éminence thénar pour mieux voir la réaction érythémateuse, mais cette méthode est douloureuse (502).

LECTURE

Pratiquer 3 lectures, après 24, 48 et 72 heures (478). La réaction est d'apparition très précoce et persiste toute la vie.

Tableau XXVIII : Sensibilité des tests cutanés utilisés dans la leishmaniose.

Type clinique	Espèce en cause	Nombre de malades	Pourcentage de positifs	Auteurs
Leishmaniose cutanéomuqueuse	<i>Leishmania braziliensis</i>	37	86,5 %	Monténégro 1926
Leishmaniose cutanéomuqueuse	<i>Leishmania braziliensis</i>	50	92 %	Lopes 1945
Bouton d'Orient	<i>Leishmania tropica</i>	261	91,6 %	Dostrowsky 1946
Leishmaniose cutanée forestière	<i>L. tropica guyanensis</i>	53	98 %	Floch 1955
Kala-azar chinois	<i>Leishmania donovani</i>	170	1,7 %	Wang 1959

Tableau XXIX : Spécificité des tests cutanés utilisés dans la leishmaniose.

Témoins	Nombre de témoins	Pourcentage de positifs	auteurs
Malades divers et 10 syphilitiques	36	8 %	Monténégro 1928
Malades divers et 5 pians	15	0 %	Lopes 1945
Témoins divers	94	2,2 %	Dostrowsky 1946
Témoins non parasités	37	0 %	Floch 1955

Les témoins choisis étaient, en général, des sujets sains mais vivant en zone d'endémie et ayant pu faire une affection leishmanienne passée inaperçue. De faux positifs ont été observés dans la tuberculose ganglionnaire et la lèpre.

Il s'agit donc d'une réaction ayant une bonne spécificité et une bonne sensibilité dans les leishmanioses cutanées ou cutanéomuqueuses.

Dans les leishmanioses viscérales elle est négative dans la période aiguë mais peut se positiver tardivement.

LEISHMANIOSE VISCÉRALE À *L. INFANTUM* ET IMMUNODÉFICITS : Immaturité Immunologique Infantile, Corticothérapie et SIDA

L. infantum a été ainsi nommé par Ch. Nicole en 1908 (509 et 510), car la maladie qu'il provoque dans le pourtour méditerranéen atteint presque uniquement les enfants : les 11 malades chez qui il le découvrit en Tunisie étaient tous des enfants âgés de 5 mois à 6 ans.

La très forte prévalence d'infection chez l'enfant doit être en relation avec une immunité spécifique insuffisante et probablement liée à l'Immaturité Immunologique Infantile.

Dans la zone géographique de *L. infantum*, s'observent chez l'adulte des formes ganglionnaires pures, qui régressent sans traitement (462) (photos n° 263, 264 et 265), correspondant à des infections latentes à cette période de la vie. Ces formes abortives de leishmaniose ont été également observés dans d'autres pays, 19 cas en Iran (456). Les cas publiés concernant surtout le pourtour méditerranéen mais ont été vus aussi en Inde (508). Une forme non évolutive a néanmoins été à l'origine d'un cas de Kala-azar infantile transfusionnel (455). La publication de tels cas reste actuellement rare en raison de la pauvreté du tableau clinique. Leur nombre réel doit être beaucoup plus important ce qui est en faveur de nombreuses formes inapparentes. L'apparition de leishmaniose viscérale à la suite de traitement immuno-suppresseur, longtemps après un séjour en pays d'endémie chez des personnes n'ayant jusque là présenté aucune atteinte

leishmanienne, est un autre élément démontrant la fréquence des contaminations asymptomatiques de l'adulte.

La leishmaniose viscérale est ainsi apparue 4 ans (465) 5 ans (526) 20 ans (457) après un séjour dans un pays d'endémie.

Ces éléments montrent que *Leishmania infantum* peut se conduire en commensal chez l'Homme adulte d'une manière prolongée. Les formes parasitaires quiescentes peuvent se multiplier et ainsi devenir pathogènes à l'occasion de la survenue d'un immuno-déficit chez l'adulte. Les deux principaux cas étant un traitement immunodépresseur à base de corticoïdes et le SIDA (photos n° 266 à 269).

Un cas de leishmaniose viscérale dans les zones d'endémie à *L. infantum* doit toujours faire rechercher un immunodéficit.

Leishmania infantum est donc pour l'adulte un parasite opportuniste, sa pathogénicité apparaissant dans deux cas principaux d'immuno-dépression : les adultes recevant une corticothérapie, et ceux atteints par le Virus de l'Immunodéfiscience Humaine.

L'Immaturité Immunologique infantile

La leishmaniose viscérale dans le pourtour méditerranéen s'observe presque exclusivement chez l'enfant. En Algérie en 1984, 97,6 % des cas étaient diagnostiqués chez des enfants de moins de 15 ans (459).

L'Immaturité Immunologique Infantile (I.I.I.) concerne :

- les IgA absentes à la naissance et dont le taux de l'adulte est atteint entre 5 et 15 ans (525 et 529).
- les IgE dont le taux de l'adulte est atteint vers 5 et 10 ans (473). L'IgE a été impliquée dans le rôle du monoxyde d'azote dans l'activité leishmanicide des macrophages humains (506).
- les lymphocytes CD4-4B4 et CD8 (530).
- les cellules NK (450 et 489) dont le taux de l'adulte est atteint vers 15 ans. Il a été trouvé un manque d'activité des cellules NK dans le mécanisme immum de la leishmaniose cutanée (505).
- le sérum déficient en facteur C6 du complément est inefficace contre les formes amastigotes de *L. tropica* (486).

Adultes sous corticothérapie : jusqu'en 1989 nous en avons retrouvé 33 cas dans la littérature (Tableau XXX). Ce nombre est très sous estimé, d'abord parce que le recensement en est difficile, par exemple les cas 1 et 2 étaient méconnus des revues de la littérature (503 et 522), ensuite de nombreux cas sont non diagnostiqués ou non publiés.

La corticothérapie favorise également la contamination, sans que celle-ci donne obligatoirement une atteinte évolutive. Ainsi sur 16 sérums d'adultes ou d'adolescents étudiés systématiquement en radio-immunologie pour la recherche d'anticorps anti *Leishmania major* et trouvés positifs, dix prenaient des corticoïdes contre seulement 1 pour 22 séro-négatifs (476).

Dans les formes évolutives le sexe masculin prédomine, (13 cas contre 7 chez la femme), mais on observe ce fait également chez l'enfant (459).

Des cas ont été signalés au Brésil (457 et 498), mais il convient de souligner que *Leishmania chagasi* est maintenant rattaché au complexe *Leishmania infantum* (505).

La mortalité est de 40 % mais elle est souvent liée à la maladie (leucémie) qui a nécessité la corticothérapie.

À la corticothérapie d'autres agents immuno-dépresseurs sont fréquemment associés : azathioprine, sérum anti lymphocytaire, vincristine, arabinoside, chlorambucil... Mais les corticoïdes suffisent à eux seuls, à rendre pathogènes les leishmanies (457, 498, 503, 507 et 526). Il est donc incertain que ces autres thérapeutiques jouent un rôle.

Le diagnostic parasitologique est très facile, les leishmanies sont toujours nombreuses ou très nombreuses dans la moelle, par contre le diagnostic sérologique est un peu plus souvent défaillant que chez les sujets immuno-compétents (477, 480 et 524).

Tableau XXX : Leishmaniose viscérale chez des malades ayant reçu une corticothérapie

	Sexe	Âge	Présence de Leishmanies	Immunofluorescence leishmanies	Autres agents immuno-dépresseurs	Autre pathologie	Évolution	Pays de contaminations	Référence
1	F	78	nombreux			Pleurésie	Mortelle	France	Mora 1975
2	F	68	très nombreux		Azathioprine				Schaison76
3	M	45	+		Sérum anti lymphocytaire	Transplantation rénale, pancréatite	Mortelle (pancréatite)	France Sud Maroc	Broeckart 1979
4	M	37	nombreux		Azathioprine	Transplantation rénale	Mortelle	Malte	Ma 1979
5	M	19	+	100	Vincristine	Leucémie aigüe. Lymphoblastique en rémission	Guérison	France (Var)	Hauteville 80
6	M	67	très nombreux	1 600	Azathioprine	Hépatite chronique	Guérison	France (Var)	Herne 80
7	M	19	+	100	Vincristine Antimitotiques	Leucémie aigüe lymphoblastique	Guérison	France (Var)	Herne 80
8	F	21	nombreux	0	Antimitotiques	Leucémie aigüe en rémission	Guérison	France (Bouches du-Rhône)	Gastaut 81
9	F	56	très nombreux	0	Azathioprine	Maladie de Crohn	Mortelle	France Sud Est	Troncy 81
10	F	32	+	80		Lupus érythémateux	Guérison	Hong Kong	Wallis 83
11	M	15	nombreux		Cytosine Arabinoside	Leucémie aigüe lymphoblastique	Décès (leucémie)	Espagne	Aguado 83
12	F	30	très nombreux	1 600	Antimitotiques	Hodgkin, splénectomie	Guérison (décès dû à Hodgkin)	France Grèce	Frances 84
13	M		nombreux				Mortelle	France, Brésil	Martinez 86
14	M	27	+			Colite ulcéraive, giardase	Mortelle	Brésil	Badaro 86
15	M	11	+	2 048	Cyclophosphamide	Syndrome néphrotique	Guérison		Badaro 86
16	M	43	nombreux	128	Azathioprine Sérum anti lymphocytaire	Transplantation rénale	Décès septicémie à <i>P. aeruginosa</i>	Espagne (Alicante)	Aguado 86
17			+	NF		Transplantation rénale	Mortelle	Espagne	Fernandez 87
18	M	34	nombreux	640	Vincristine antimitotiques	Hodgkin	Rechute	Espagne	Fernandez 87
19			+	NF		Leucémie aigüe	Guérison	Espagne	Fernandez 87
20			+	20		Transplantation rénale	Guérison	Espagne	Fernandez 87
21			-	160		Lupus érythémateux	Guérison	Espagne	Fernandez 87
22	F	25	culture positive nombreux	NF		Lupus érythémateux	Mortelle	Espagne	Fernandez 87
23	M	57	très nombreux	2 560	Chlorambucil	Polyarthrite, rhumatoïde	Guérison	France Sud Est	Moreau 87
24	M	41	+	800		Sarcoïdose	Guérison	France (Gard)	Mulliez 87
25	A	32	7 cas						Quilici 87
33								France Sud Ouest	Hari 88

S.I.D.A. : épidémiologie

Le premier cas a été diagnostiqué en Espagne chez un hémophile contaminé (470). En 1988 il y avait pour l'ensemble du monde quinze cas publiés de leishmaniose viscérale chez les malades atteints de S.I.D.A. Dans le département des Alpes Maritimes cette affection était constatée chez 2 % des malades atteints du S.I.D.A. (499). La forte prédominance masculine est en relation avec l'homosexualité, principal groupe de population à risque pour le V.I.H.

En 1993, 200 cas de co-infection *Leishmania*, V.I.H. étaient comptabilisés en Espagne (454).

En 1995, 50 cas avaient été diagnostiqués dans le Sud Est de la France. *Leishmania infantum* zymodème MON-1 était en cause dans 86 % des cas (521).

Épidémiologie : les cas ont été surtout observés dans le pourtour méditerranéen (France, Espagne, Portugal, Italie), ce qui correspond à une infestation par *Leishmania infantum*. Mais quelques cas ont été découverts dans les pays d'Amérique du Sud (Brésil, Pérou). Le nombre de nouveaux cas suit la progression actuelle du S.I.D.A.

Clinique : l'aspect est souvent atypique : la fièvre peut être absente alors qu'elle est souvent fréquente dans le S.I.D.A évolutif. Des localisations inhabituelles peuvent être observées : gastro-intestinales, coliques, rectales, pleurales. Des cas de localisations sur sarcome de Kaposi ont été signalées (499).

Les deux tiers de cas d'évolution défavorable avec rechute ou décès, sont liés à la gravité et à l'évolution propre du S.I.D.A.

Au total, ces cas survenant chez les immuno-déprimés adultes modifient les données épidémiologiques antérieures ou les enfants étaient presque seuls atteints, puisque maintenant en France 50 % des cas sont diagnostiqués chez les adultes (515).

Sérologie : la sérologie de la leishmaniose est souvent négative dans les cas d'immuno-déficit. La sérologie est là aussi plus souvent défailante, 4 fois sur 13, qu'elle ne l'est habituellement dans la leishmaniose (499).

Cela doit conduire le biologiste :

– à rechercher chez les immuno-déprimés les leishmanies dans la moelle, par l'examen de frottis colorés au May-Grünwald-Giemsa et pratiquer la myéloculture sur milieu N.N.N. Les leishmanies peuvent également être trouvées dans une biopsie digestive. Elles doivent être recherchées par cyto-concentration (514).

– chez l'adulte atteint de leishmaniose, rechercher un immuno-déficit, en particulier dû au V.I.H.

– un cas de leishmaniose cutanéomuqueux avec atteinte de la muqueuse nasale a été observé au Pérou (475). L'évolution persistante et la résistance au traitement a fait découvrir un S.I.D.A. avec CD4 à 46/μl.

BIBLIOGRAPHIE

450. ABO T., COOPER M.D., BALCH C.M. Postnatal expansion of the natural killer and killer cell population in humans identified by the monoclonal HNK-1 antibody. *J. Exp. Med.*, 1982, **155**, 321-326.
451. AGUADO J.M., GOMEZ BERNE J., FIGUERA A., DE VILLALOBOS E., FERNANDEZ-GUERRERO M.L., SANCHEZ FAYOS J. Visceral leishmaniasis (Kala-azar) complicating acute leukaemia. *J. Infect.*, 1983, **7**, 272-274.
452. AGUADO J.M., BONET F., PLAZA J.J., ESCUDERO A. Leishmaniasis in a renal transplant recipient: a diagnostic and therapeutic challenge. *J. Infect.*, 1986, **13**, 301-302.
453. ALLAIN D.S., KAGAN I.G. A direct agglutination test for leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1975, **24**, 232-236.
454. ALVAR J. Leishmaniasis and AIDS co-infection: The Spanish example. *Parasitol. Today*, 1994, **10**, 160-163.
455. ANDRÉ R., BRUMPT L., DREYFUS B., PASSELECQ A., JACOB S. Leishmaniose cutanée, leishmaniose cutanée-ganglionnaire et Kala-azar transfusionnel. *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1957, **25-26**, 1-7.
456. AZADEH B. "Localized" *leishmania lumphadenitis*: a light and electron microscopic study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1985, **34**, 447-455.
457. BADARO R., CARVALHO E.M., ROCHA H., QUEIROZ A., JONES T. *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *Lancet*, 1986, **i**, 647-648.
458. BASSET D., PRATLONG F., RAVEL C., PUECHBERTY J., DEREURE J., DEDET J.P. Les leishmanioses déclarées en France en 1999. *Bull. Épid. Hebdo.*, 2001, **5**, 19-24.
459. BELLAZZOUNG S., ADDADI K., MOKRANI T., HAFIRASSOU N., HAMRIOUI B., BELKAID M. La leishmaniose viscérale en Algérie : étude des cas hospitalisés entre 1975 et 1984. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1985, **65**, 329-335.
460. BENEX J., LAMY L. *Ann. Inst. Pasteur*, 1967, **115**, 91-96.
461. BENEX J. *Ann. Inst. Pasteur*, 1968, **91**.
462. BERTEIN J., BERTHARION J., PETITHORY J.C. À propos de deux cas de leishmaniose ganglionnaire observés en Algérie. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1960, **53**, 407-413.
463. BITTENCOURT *Rev. Inst. Med. Trop. Sao-Paulo*, 1968, **10**, 247-252.
464. BRAY R.S., LAINSON R. The immunology and serology of leishmaniasis IV results of Ouchterlony double diffusion tests. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1966, **60**, 605-609.
465. BROECKAERT-VAN-ORSHOVEN A., MICHILSEN P., VANDEPITTE J. Fatal leishmaniasis in renal-transplant patient. *Lancet*, 1979, **ii**, 740-741.
466. BUDIARDINI G. et coll. *Nuovi Ann. Ig. Microb.*, 1973, **24**, 395-418.
467. CARTWRIGHT G., HUI-LAN CHUNG, AN CHANG. Studies on the pancytopenia of Kala-azar. *Blood*, 1948, **3**, 249-275.
468. CHATTEROA J., SENGUPTA J. *J. Ind. Med. Assoc.*, 1970, **54**, 547.
469. DEDET J.P. La leishmaniose viscérale dans le monde : étapes des connaissances, répartition biogéographique et fréquence. *Bull. Inst. Pasteur*, 1976, **74**, 413-434.
470. DE LA LOMA A., ALVAR J., MARTINEZ GALIANO E., BALNQUEZ J., ALCALA MUNOZ A., NAJERA R. Leishmaniasis or AIDS? *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1985, **79**, 421-422.

471. DEREURE J., PRATLONG F., REYNES J., BASSET D., BASTIEN P., DEDET J.-P. Haemoculture as a tool for diagnosing visceral leishmaniasis in HIV-negative and HIV-positive patients: interest for parasite identification. *Bull. OMS*, 1998, **76**, 203-206.
472. DOSTROWSKY A., SAGHER F. The intra cutaneous test in cutaneous leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Paras.*, 1946, **40**, 265-259.
473. DUTAU C., ENJAUNE C., ROCHICCIOLI P. Valeurs normales des IgE sériques totales chez l'enfant de la naissance à 16 ans. *Arch. Fr. Pédiatr.*, 1979, **36**, 795-800.
474. DUXBURY R.E., SADUN E.H. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1964, **13**, 525, 529.
475. ECHEVARRIA J., CAMPOS P., CHANG J., CUÉLLAR L., GOTUZZO E., PAZ L., LLANOS-CUENTAS A. Mucocutaneous leishmaniasis and AIDS: case report. *Trans. Roy. Soc. Med. Hyg.*, 1993, **87**, 186.
476. FEINSOD F.M., SARAH A.J. Immunosuppressive medication associated with leishmanial antibodies in adultes residing in an endemic focus of infantile visceral leishmaniasis—a case/control study. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1988, **82**, 457-460.
477. FERNANDEZ-GUERRERO M.L., AGUADO J.M., BUZON L., BARROS C., MONTALBAN C., MARTIN T., BOUZA E. Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts. *Am. J. Med.*, 1987, **83**, 1098-1102.
478. FLOCH H., CASILE M. Intra dermo réaction de Monténégro à la leishmaniose. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1955, **48**, 636-642.
479. FRANCES C., MERLE BERAL H., FRANCESCHINI PH., LESSANA-LEIBOWITCH M., ESCANDE J.P. Kala-azar chez l'immunodéprimé. À propos d'un cas révélé par des signes cutanés. *Pres. Méd.*, 1984, **13**, 2433-2436.
480. GASTAUT J.A., BLANC A.P. IMBERT C.L., SABAHOOR G., CARVASSONE Y. Leishmaniose viscérale méditerranéenne de l'adulte au cours de la rémission complète d'une leucémie aiguë lymphatique. *Nouv. Pres. Méd.*, 1981, **10**, 1332.
481. HARLE J.R., DUMON H., WEILLER P.J., MONGIN M. Le Kala-azar de l'adulte en région d'endémie : sa place parmi les infections opportunistes. *Méd. Hyg.*, 1988, **46**, 621-625.
482. HAUTEVILLE D., CHAGNON A., CAMILLERI G., HERNE N. Leishmaniose viscérale méditerranéenne chez une leucémique en rémission. *Nouv. Pres. Méd.*, 1980, **9**, 1713.
483. HERNE N., HAUTEVILLE D., VERDIER M. CHAGNON A., ABGRALL J., RAILLORT A. Kala-azar méditerranéen chez deux adultes traités par immuno-suppresseur. *Rev. Méd. Int.*, 1980, **1**, 237-240.
484. HOARE C.A., WALLACE *Nature*, 1966, **212**, 1385-1386.
485. HOCKMEYER W.T., KAGER P.A., REES P.H., HENDRICKS L.D. The culture of *Leishmania donovani* in Schneider's insect medium: its value in the diagnosis and management of patients with visceral leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1981, **75**, 861-863.
486. HOOVER D.L., BERGER M., NACY C.A., HOCKMEYER W.T., MELTZER M.S. Killing of *Leishmania tropica* amastigotes by factors in normal human serum. *J. Immunol.*, 1984, **132**, 893-897.
487. IRUNBERRY J., BENALLÈGUE A., GRANGAUD J.-P., MAZOUNI M., KHATI B., KHEDARI M. Étude des immunoglobulines plasmatiques dans le Kala-azar. *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 1968, **46**, 102-113.
488. JADIN J., CREEMERS J. *Proc. Ind. Int. Contr. Parasitol.*, Washington, 1970.
489. KAPLAN J., SHOPE T.C., BOLLINGER R.O. Human Newborns are deficient in natural killer activity. *J. Clin. Immunol.*, 1982, **2**, 350-355.
490. KIEN T. et coll. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1969, **62**, 1079-1084.

491. KLEMPNER M.S., CENDRON M., WYLER J. *J. Infec. Dis.*, 1983, **148**, 377-384.
492. KNOWLES R. A study of Kala-azar. Part I. An interim report on the Kala-azar work from 1917 on 1919. *Indian J. Med. Res.*, 1920, **8**, 140-161.
493. KUROYA M., YOUNG S., TANG L.C., HONG L.Y. Kala-azar in Pi-Hsien district, Kiangsu Province, China. I6 The blood picture and the sedimentation rate of red blood cells in Kala-azar. *J. Shanghai Sci. Inst.*, 1939, **4**, 165-227.
494. LI VOLTI S., FISHER A., MUSUMECI S. Hematological and serological aspects of Mediterranean Kala-azar in infancy and childhood. *Acta Trop.*, 1980, **37**, 351-365.
495. LOPES C.F., LAENDER J.F. A intradermo reação de Montenegro no diagnostico da leishmaniose tegumentar Americana. Ampugos de antígenos velhos intradermoreação negativa em casos de boubá. *Bras. Med.*, 1945, **59**, 41-46.
496. MA D.D.F., CONCANNON A.J., HAYES J. Fatal leishmaniasis in renal-transplant patient. *Lancet*, 1979, **ii**, 311-312.
497. MANSON-BAHR P.E.C., HEISCH R.B., GARNHAM P.C.C. Studies in leishmaniasis in East African. The Montenegro test in Kala-azar in Kenya. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1959, **53**, 380-383.
498. MARTINEZ L., DE LETONA J., MASA VAZQUEZ C., PEREZ MAESTU R. Visceral leishmaniasis as an opportunistic infection. *Lancet*, 1986, **i**, 1094.
499. MARTY P., LE FICHOUX Y. Leishmanioses à *L. infantum* et immunodépression acquise. *Rev. Fr. Lab.*, 1991, **223**, 116-121.
500. MAYRINK W., MAGALHAES P. Diagnostico do Calazar. I- Emprêgo da espirocontração om adrenalina. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 1969, **2**, 11-12.
501. MERINO F., CRUZ I. Natural killer activity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, 1984, **73**, 347-351.
502. MONTÉNÉGRO J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Arch. Derm. Syph.*, 1926, **13**, 187-194.
503. MORA M., TATALOVIC N. La leishmaniose viscérale méditerranéenne n'est pas l'apanage de l'enfant. *Nouv. Pres. Méd.*, 1975, **10**, 744.
504. MOREAU K., VILON Ph., COTTIN S., MORIN O., MIEGEVILLE M. Diagnostic entre Kala-azar et syndrome de Felty chez un sujet immunodéprimé. *Sem. Hôp. Paris*, 1987, **63**, 143-145.
505. MORENO G., RIOUX J.A., LANOTTE G., PRATLONG F., SERRES E. Le complexe *L. donovani* sp. *Leishmania*. Taxonomie – Phylogénèse. *I.M.E.E.E.*, 1986, 105-107.
506. MOSSALAYI M.D. Mise en évidence du rôle du monoxyde d'azote (NO) dans l'activité leishmanicide des macrophages humains : implications des IgE et du Fc_{RII}/CD23. *Eurobiol.*, 1995, **19**, 13-21.
507. MULLIEZ Ph., DALOUZ R., DEMOUY J.L., DARRAS A., CRINQUETTE J. Une observation de leishmaniose chez un malade traité par corticoïdes pour sarcoïdose. *Méd. Mal. Infect.*, 1987, **6-7**, 412-413.
508. NANDY A., CHOWDHURY A.B. Lymphatic leishmaniasis in India. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1988, **42**, 411.
509. NICOLLE Ch. Culture du parasite du bouton d'Orient. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1908, **146**, 842-843.
510. NICOLLE Ch. Nouvelles acquisitions sur le Kala-azar : cultures, inoculations au chien, étiologie. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1908, **146**, 498-499.
511. NICOLLE Ch., CHATTON E. Longue conservation de la virulence pour l'homme de la *Leishmania tropica* en cultures. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1914, **7**, 700-702.

512. ODDO F.G., GASCIO G. Il test d'immuno-fluorescenza nelle leishmanioses visceral e cutaneo. *Riv. Ist. Sieroter. Ital.*, 1963, **38**, 139-145.
513. PATANE R., MUSUMECI S. Il comportamento del Fe serico nella leishmaniosi viscerale infantile. *Riv. Ped. Sicil.*, 1968, **28**, 323-332.
514. PETITHORY J.C., ARDOIN F., ASH L.R., VANDEMEULEBROUCKE E., GALEAZZI G., DUFOUR M., PAUGAM A. Microscopic diagnosis of blood parasites following a cytoconcentration technique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1997, **57**, 78-83.
515. QUILICI M., DUNAN S., DUMON H., FRANCK J., GAMBARELLI F., TOGA I. La leishmaniose viscérale humaine en Provence. Considérations d'actualité. *Méd. Chir. Dig.*, 1987, **16**, 511-514.
516. RANQUE J., QUILICI M., DUNAN S., RANQUE Ph. Diagnostic immunologique de la leishmaniose viscérale (10 années d'expérience). *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1975, **55**, 579-584.
517. RANQUE Ph., QUILICI M., BERENGIER C. Préparation massive d'antigènes de trypanosomides. *C. R. Soc. Biol.*, 1970, **164**, 2599-2601.
518. RIOUX J.A. *Leishmania*. Taxonomie – Phylogénèse. Institut Méditerranéen d'Études Épidémiologiques et Écologiques, Montpellier, 1986.
519. RIOUX J.A., LANOTTE G., SERRES E., PRATLONG F., BASTIEN P., PERIÈRES J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1990, **65**, 111-125.
520. RIOUX J., GOLVAN Y., CROSET H., HOUIN R., TOUR S. Enquête écologique sur les leishmanioses dans le Sud de la France. *I.N.S.E.R.M.*, 1968, **23**, 1125-1164.
521. ROSENTHAL E., MARTY P., POIZOT-MARTIN I., REYNES J., PRATLONG F., LAFEUILLADE A., JAUBERT D., BOULAT O., DEREURE J., GAMBARELLI F., GASTAUT J.-A., DUJARDIN P., DELLAMONICA P., CASSUTO J-P. Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1995, **89**, 159-162.
522. SCHAISON G. Les pièges du Kala-azar. Actualités hématologiques, 10^e série, 1976, 107-114.
523. SHAMSUZZAMAN S.M., FURUYA M., KORENAGA M., IMAMURA K., HASHIGUCHI Y. Use of urine samples from healthy humans, nephritis patients or other animals as an alternative to foetal calf serum in the culture of *Leishmania (L.) donovani* *in vitro*. *Annal. Trop. Med. Parasitol.*, 1999, **93**, 613-620.
524. TRONCY J., GIRARD D., GUYOT Ph., BEL A., CŒUR P. Leishmaniose viscérale méditerranéenne mortelle sur terrain immunodéprimé. *Nouv. Pres. Méd.*, 1981, **10**, 3726-3727.
525. UFFELMAN J.A., ENGELHARD W.E., JOLLIFF C.R. Quantitative of immunoglobulins in normal children. *Clin. Chim. Acta*, 1970, **28**, 185-192.
526. WALLIS J.W., CLARK C.J.M. Visceral leishmaniasis complicating systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*, 1983, **42**, 201-202.
527. WALTON B.C. BROOKS W.H., ARJONA I. Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1972, **21**, 296-299.
528. WANG C.T., LIU H.A., KAO C.T. Intra dermal tests of various antigens prepared from *L. donovani* or its flagellar forms as mean of diagnosis of Kala azar. *Chinese Med. J.*, 1959, **78**, 162.
529. WEST C.D., HONG R., HOLLAND N.H. Immunoglobulin levels from the newborn period to adulthood and in immunoglobulin deficiency states. *J. Clin. Invest.*, 1962, **41**, 2054-2064.
530. YACHIE A., MIYAWAKI T., NAGAOKI T., YOKOI T., MUKAI M., UWADANA N., TANIGUCHI N. Regulation of B cell differentiation by T cell subsets defined with monoclonal OKT4 and OKT8 antibodies in human cord blood. *J. Immunol.*, 1981, **127**, 1314-1317.

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués à l'ensemble des LABORATOIRES D'ANALYSES de BIOLOGIE MEDICALE en FRANCE.

▮

TOUT LE CONTENU DE CE FICHER RESTE LA PROPRIETE DE BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

▮

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

▮

Seule une impression pour une copie personnelle (étudiant, interne, biologiste de labm) est permise.



IX

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES BORRELIOSSES OU FIÈVRES RÉCURRENTES

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Tableau XXXI : *Borrelia* sp. Résultats du Contrôle de Qualité National en Parasitologie en France

DATE D'ENVOI	NOMBRE DE RÉPONSES	RICHESSSE*	RÉSULTATS CONF.	DEUXIÈME RÉPONSE	TROISIÈME RÉPONSE
11/86	1 030	1 à 3	86,21 %	<i>Trypanosoma brucei</i> 1,65 %	<i>Plasmodium</i> divers 2,03 %
11/88	1 145	1 à 3	88,2 %	<i>Trypanosoma brucei</i> 2,3 %	<i>Plasmodium vivax</i> 1,9 %
11/91	1 166	10 à 15	76,8 %	<i>Plasmodium falciparum</i> 1,3 %	<i>Plasmodium</i> divers 2,3 %
11/97	1 217	1	75,4 %	<i>Trypanosoma</i> sp. 18,2 %	<i>Leishmania</i> sp. 1,8 %

* Nombre de champs × obj. 100 pour trouver un parasite.

Les borrelioses sont dues à des bactéries, les *Borrelia* sp. p. Elles sont néanmoins souvent étudiées par les parasitologues pour deux raisons :

- leur diagnostic de base se fait sur frottis sanguins, ce qui est habituel pour les parasites sanguins.
- leur transmission est faite par l'intermédiaire d'agents vecteurs, souvent étudiés par les parasitologues.

Le diagnostic de la maladie de Lyme (photo n° 273), due à *Borrelia burgdoferi* est basé sur l'épidémiologie, la clinique et la sérologie : ces *Borrelia* ne sont pas présentes dans le sang.

Les borrelioses se manifestent par un accès fébrile durant quelques jours, 3 à 7, suivi d'une rémission durant une semaine environ, puis d'un ou plusieurs nouveaux accès fébriles qui sont les récurrences.

ÉPIDÉMIOLOGIE

- une fièvre récurrente cosmopolite due à *Borrelia recurrentis* et transmise par écrasement de pou contaminé a pratiquement disparu sauf en Éthiopie et au Soudan.
- des fièvres récurrentes régionales transmises par piqûres de tiques du genre *Ornithodoros* existent en Afrique du centre et de l'est. Par exemple, *Borrelia duttoni* est transmis par *Ornithodoros moubata* (voir tableau XXXII).

Les fièvres récurrentes ne sont pas autochtones en France et les cas observés sont importés.

PRÉLÈVEMENTS

Les *Borrelia* sont recherchées dans les prélèvements de sang. Elles ne s'y trouvent qu'au moment des accès fébriles.

Elles peuvent parfois être trouvées dans le liquide céphalo-rachidien.

Pour éviter les déformations, il convient de fixer les frottis encore humides par l'alcool méthylique.

TECHNIQUES – COLORATIONS

- en frottis, après coloration par le May-Grünwald-Giemsa prolongé une heure,
- en frottis, après imprégnation argentique mais l'identification des spirochètes y est parfois délicate,
- en frottis, après coloration de Vago au mercurochrome. Cette méthode ne nous a pas donné de meilleurs résultats que le May-Grünwald-Giemsa prolongé,
- en frottis, coloré par le violet de gentiane,
- en goutte épaisse, colorée par une des méthodes précédentes après déshémoglobination.

DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE

Examen direct : une goutte de sang est examinée extemporanément entre lame et lamelle, en fond noir ou en contraste de phase. Les borrelia sont très mobiles et se déplacent suivant l'axe général de l'hélice à partir de n'importe laquelle des deux extrémités.

Ce sont des germes spiralés de 10 à 30 μm de long sur 0,2 à 0,5 μm de large. Ils comportent de 4 à 10 spires en moyenne, extrêmes 3 à 18 (535) (photos n° 274 et 275).

Les dimensions varient selon les espèces (538)

- *Borrelia duttoni* : longueur 24 à 30 μm , largeur 0,45 μm
- *Borrelia recurrentis* : longueur 19 à 20 μm , largeur 0,39 μm
- *Borrelia novyi* : longueur 17 à 20 μm , largeur 0,31 μm

Mais ces différences de taille sont insuffisantes à elles seules pour différencier les espèces et il convient d'y ajouter d'autres critères immunologiques et de pathogénicité pour l'animal (voir après).

Ils se reproduisent en 10 à 15 minutes, par division transversale après allongement, ce qui conduit à observer dans le sang des formes longues atteignant le double de la longueur des formes normales et parfois davantage.

Dans le sang, ils sont habituellement nombreux dans le cas de la fièvre récurrente mondiale et l'examen est positif dans trois quarts des cas. Dans les borrélioses régionales, ils sont assez nombreux au début de la maladie au moment de la poussée thermique, puis ils se raréfient et deviennent impossibles à trouver à l'examen direct.

Dans le liquide céphalo-rachidien, ils sont retrouvés à peine dans 10 % des cas de récurrentes et encore moins souvent dans celles à tiques. Le nombre des lymphocytes varie de 15 à 20 000 par μl et les protéines de 0,3 à 19 g par litre (533).

DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

Leptospires : (leptospirose ictéro-hémorragique), après May-Grünwald-Giemsa ou imprégnation argentique.

C'est un filament hélicoïdal, à pas à droite, ayant une vingtaine de tours de spires. Longueur 10 µm pouvant atteindre 20 à 30 ; largeur 0,3 µm présentant deux courbures terminales brusques donnant à une ou aux deux extrémités une forme en crochet. La forme générale est ainsi en J, en S ou en C allongé.

Tréponèmes : (*Treponema pallidum*), ils sont colorés par imprégnation argentique ou par la méthode de Vago mais très mal par le May-Grünwald-Giemsa. Filament hélicoïdal de 4 à 16 µm de long sur 0,2 µm de large, 6 à 12 tours de spires régulières.

Flagelles : provenant d'exflagellation de gamétocytes mâles de *P. vivax* surtout (photo n° 276).

INOCULATION À L'ANIMAL

C'est une méthode de mise en évidence dans le cas de faible parasitémie et d'identification en fonction des animaux sensibles (537 et 540), qui est pratiquée par les laboratoires spécialisés.

Le sang veineux est recueilli sur du citrate de soude à 4 pour cent et injecté dans le péritoine (voir tableau).

Les animaux inoculés doivent être gardés en observation pendant un mois avant d'être déclarés négatifs. Pendant cette période, le germe doit être recherché dans le sang et la température surveillée.

CULTURE

Différents milieux peuvent être utilisés. Les *Borrelia* sont des germes anaérobies microaérophiles.

Le milieu de NOGUCHI (538) est le plus utilisé.

Dans des tubes de 200 × 20, placer un morceau assez gros de rein de lapin stérile et fraîchement prélevé. Ajouter quelques gouttes de sang citraté à étudier, prélevé stérilement, puis 15 ml de liquide d'ascite stérile sans bile ou de liquide d'hydrocèle. Ne pas chauffer à 56 °C ce liquide. On peut ajouter à la surface du milieu un peu d'huile de paraffine stérile mais *Borrelia recurrentis* cultive mieux en son absence. Placer les tubes à 37 °C. La culture, importante après 4 à 6 jours, est maximum après 8 ou 9 jours.

Le milieu TSY.S. de Dodge (535) est actuellement préféré :

- Trypticase soy broth base (B.B.L.) 7,5 g
- Extrait de levure Difco 2,5 g
- Gelatine 4,3 g
- Indicateur Bleu de bromothymol à 0,8 % 6,2 ml
- Eau distillée 250 ml
- Ajuster le pH à 7,4

Distribuer en tubes à essai à bouchon vissé, 5 ml par tube.

Autoclaver 15' à 121 °C.

Après refroidissement, ajouter 2,1 ml du supplément stérilisé par filtration, obtenu en mélangeant les trois solutions suivantes :

- Albumine bovine fraction V (Armour) 10 g
Dissoudre dans eau distillée 100 ml
Ajuster le pH à 7,8
- N acétyl glucosamine 0,2 g
sodium pyruvate 0,26 g
NaH Co₃ 0,54 g
Dissoudre dans eau distillée 25 ml
- Mélange de sérum de lapin 22 ml

Ajouter à chaque tube 0,4 ml d'une solution stérile de sucrose à 10 %.

Le sang est prélevé sur des tubes vacutainer contenant du polyanéthol sulfonate de sodium. Après centrifugation à 900 TM pendant 5 minutes, le plasma surnageant est prélevé et ensemencé.

Les tubes de culture sont incubés à 36 °C dans une atmosphère contenant 0,4 % de CO₂. Le maximum de multiplication est atteint en trois jours.

Le milieu de Kelly peut être également employé.

N.B. : ATTENTION : Les prélèvements de sang sont contaminants, les souches, même après plusieurs repiquages, restent virulentes et peuvent être l'occasion de contaminations de laboratoire.

Tableau XXXII : Caractères des principales fièvres récurrentes humaines (Rhodain - annales)

Espèce borreliose	Maladie	Répartition géographique	Hôte naturel	Vecteur habituel	Animal de laboratoire sensible
<i>B. recurrentis</i>	Fièvre récurrente cosmopolite à poux	Potentiellement cosmopolite	Homme	Pou	Singe
<i>B. duttoni</i>	« East African tick-fever »	Afrique orientale et centrale	Homme	<i>O. moubata</i>	Singe Rongeur (sauf cobaye)
<i>B. hispanica</i>	Fièvre récurrente hispano-nord-africaine	Espagne, Portugal, Afrique du Nord	Rat	<i>O. erraticus</i>	Cobaye
<i>B. du groupe crocidurae</i>	Fièvre récurrente dakaroise	Afrique inter-tropicale, Moyen-Orient, Iran	Rongeurs sauvages	<i>O. sonrai</i>	Rongeurs nouveaux-nés Souris
<i>B. persica</i>		Asie centrale soviétique, Moyen-Orient, Iran	Rongeurs sauvages Homme	<i>O. tholozani</i>	Cobaye
<i>B. hermsi</i> <i>B. parkeri</i>		Ouest des U.S.A. et du Canada	Rongeurs sauvages	<i>O. hermsi</i> <i>O. parkeri</i>	Lapin et cobaye nouveaux-nés
<i>B. turicatae</i>		U.S.A., Mexique	Rongeurs et carnivores sauvages	<i>O. turicata</i>	Lapin et cobaye nouveaux-nés
<i>B. venezuelensis</i>		Amérique centrale et du Sud	Homme	<i>O. venezuelensis</i>	Singe

IMMUNOLOGIE

La rechute (récurrence) est due à la multiplication de germes devenus séro-résistants. Les récurrences sont en relation avec l'apparition successive de sérotypes différents (534).

Les immunoglobulines IgM augmentent très rapidement après l'infection, suivi après quelques jours par la présence de *Borrelia* dans le sang, puis l'augmentation des IgG. Le début de la période fébrile est marquée par la disparition de la parasitémie et une diminution des immunoglobulines. À chaque récurrence correspond une augmentation des IgM, suivie d'une augmentation des IgG (536).

Les réactions croisées des sérums de borrélioses avec *T. pallidum* et des sérums syphilitiques avec des *Borrelia*s sont fréquentes. Les borrélioses sont, en particulier, à l'origine de fausses réactions de Kahn et de Kline (539).

Les sérums de malades atteints par *Borrelia recurrentis* agglutinent fréquemment le *Proteus* OXK.

SPIROCHETOLYSINES (532)

TECHNIQUE : mélanger du sang riche en *Borrelia* (0,1 ml), du sérum suspect (0,1 ml, pur et dilutions) et du sérum frais de cobaye apportant le complément (0,05 ml). Contact deux heures à 38 °C. Lecture au microscope de frottis après coloration au Giemsa.

RESULTATS : présence de spirochéto lysines dans 100 % des cas avec un titre du sérum pur au 1/20 000 persistant 8 à 10 mois après la guérison.

IMMOBILISINES

Les immobilisines sont spécifiques à chaque espèce, par exemple les immobilisines anti-*Borrelia duttoni* sont sans action contre *Borrelia hispanica* (541). Cela est intéressant pour l'identification d'une souche isolée mais empêche pour cette méthode l'utilisation d'un seul antigène pour le diagnostic sérologique.

IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE (531)

Elle est pratiquée sur *Borrelia* en frottis contenant au moins 50 éléments par champ $\times 40$. Une souche de *Borrelia hispanica* peut être utilisée (531). Les résultats ont tous été positifs chez onze malades atteints de fièvre récurrente hispano-nord américaine, à un titre variant de 1/200 à 1/10 800. Ces titres étaient très élevés (1 000 à 10 000) sur les sérums prélevés 1 à 2 semaines après le diagnostic bactériologique, mais n'étaient plus que de 200 à 400 deux à trois mois après. Les titres se maintiennent ou diminuent d'une dilution seulement après traitement par un ultrasonat de Tréponèmes de Reiter. Les mêmes sérums ont donné des résultats positifs en immunofluorescence avec un antigène *Treponema pallidum* qui disparaissent après absorption par un ultrasonat de tréponème de Reiter. Les réactions classiques de la syphilis sont négatives.

Témoins : sur 50 témoins normaux, 2 positifs au 1/200 et 1/400 se sont négativés après traitement par tréponème de Reiter. Un seul a été positif au 1/600, non modifié par traitement : il s'agissait du père d'une fillette atteinte de borréliose.

Sérums de syphilitiques : ils sont positifs avec *Borrelia hispanica* dans 80 % des cas mais à un titre moins élevé qu'avec *T. pallidum* et se négativent après traitement par ultrasonat de tréponème de Reiter (539).

Leptospirose : 4 des 8 sérums testés ont été légèrement positifs et se sont négativés après traitement.

La fixation par le méthanol pur 30' à 37 °C donne les meilleurs résultats pour l'adhérence des *Borrelia* à la lame et l'absence de fluorescence du fond (534).

COFFEY (534) : avec des immuns sérums expérimentaux des quatre sérotypes de *Borrelia hermsi* n'obtient pas de réactions croisées vis-à-vis de *Borrelia hermsi* entre les quatre sérums, ni avec les antigènes de tréponèmes et de leptospires.



Photo n° 273 : Erythema chronicum migrans. Éruption cutanée de la maladie de Lyme. Borrelia burgdoferi n'est pas trouvée dans le sang.

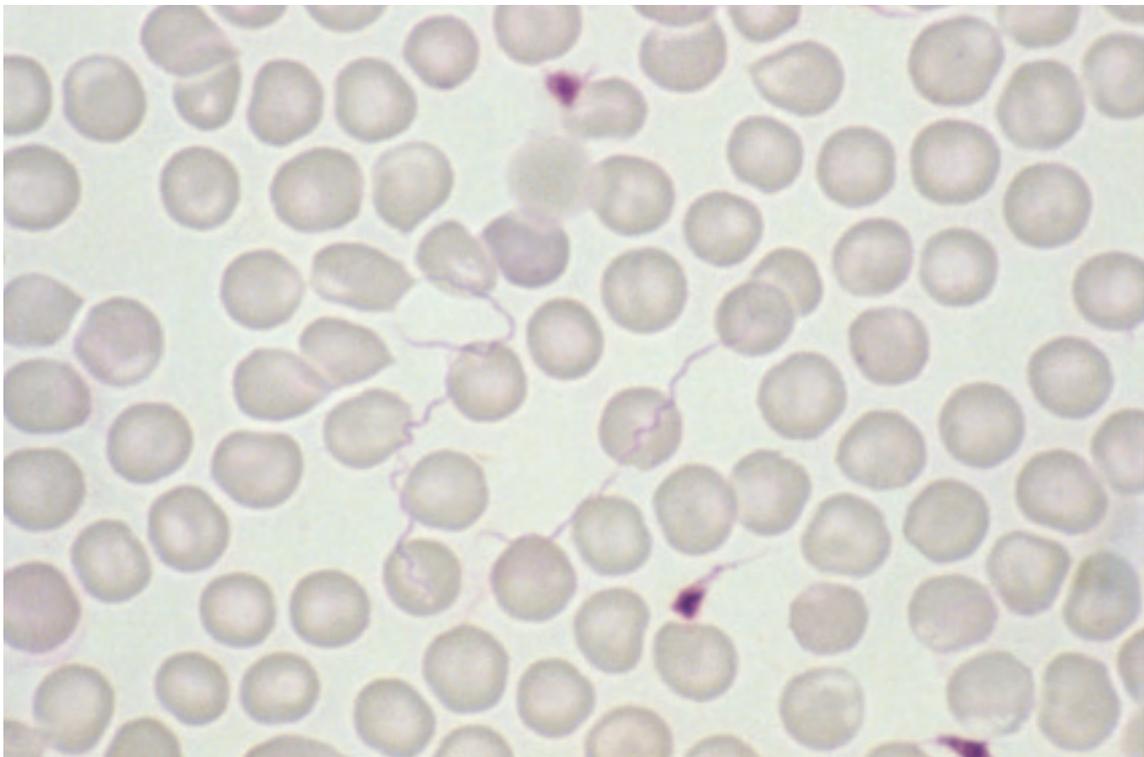
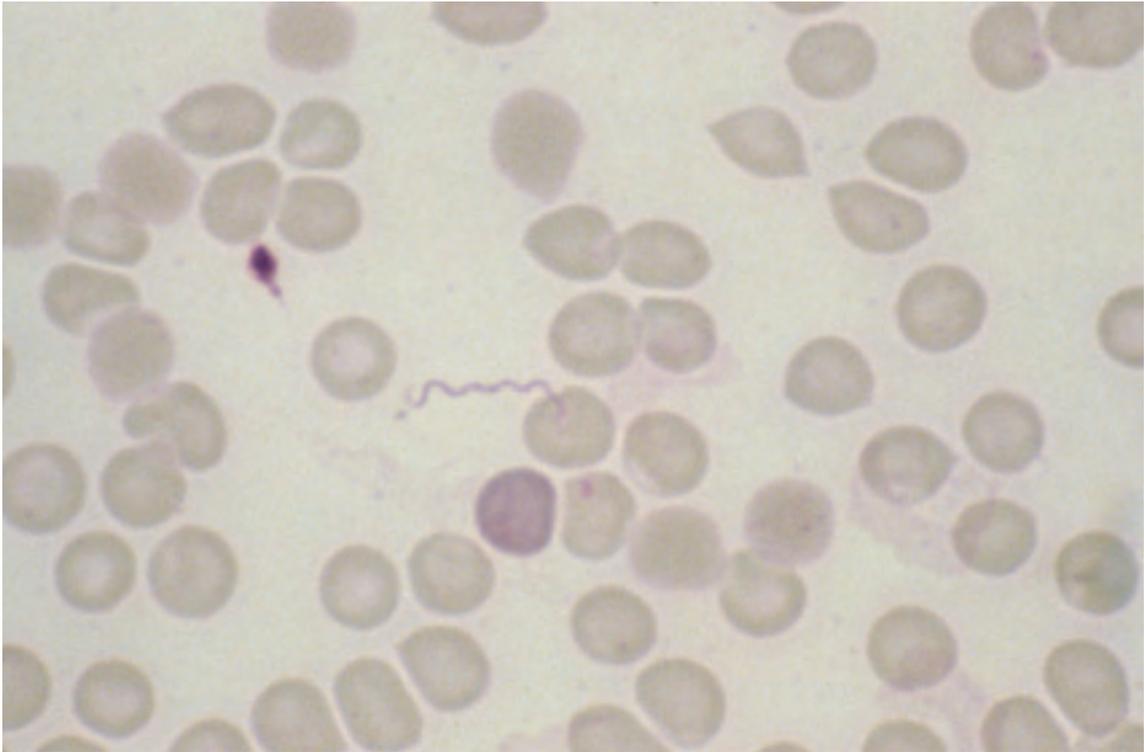
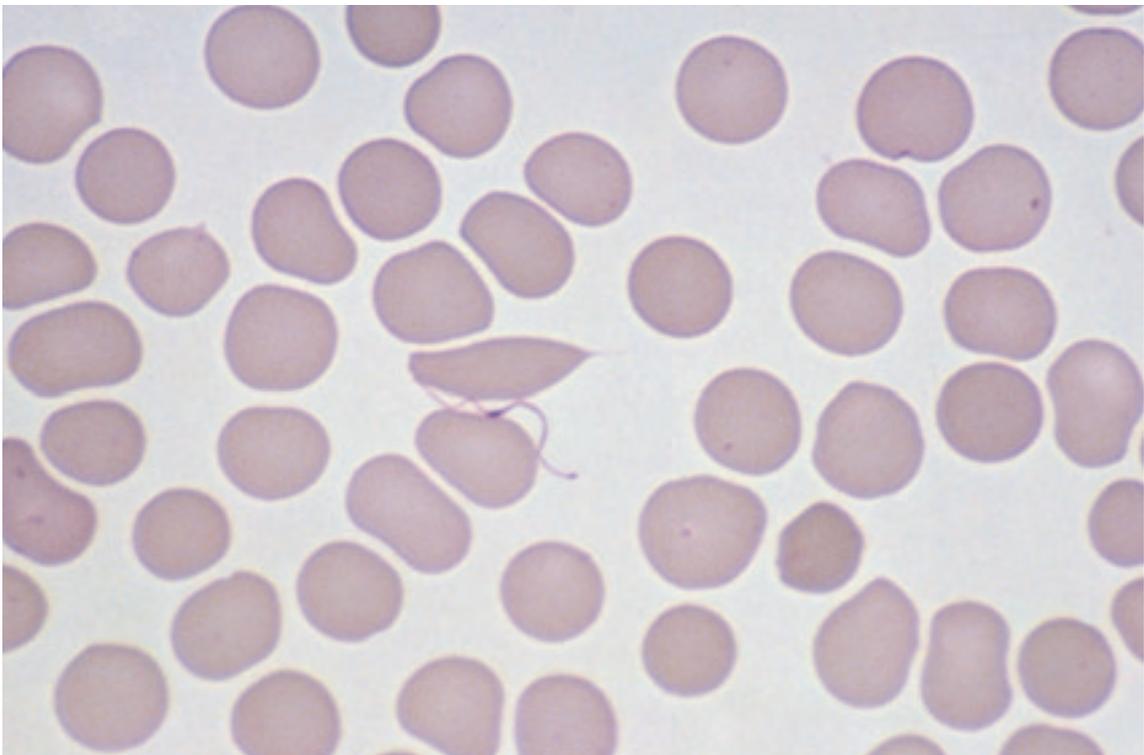


Photo n° 274 : Borrelia sp. Frottis. Deux borrelia très longues, étirées, (taille double de la normale) sur le point de se diviser. Une troisième de forme générale arrondie et de taille normale. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



*Photo n° 275 : Borrelia sp. Isolée. Frottis. Huit spires bien visibles.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*



*Photo n° 276 : Plasmodium vivax. Frottis. Flagelle isolé provenant de l'exflagellation
d'un gamétocyte mâle pouvant être confondu avec une borrelia.
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

Bibliographie

531. ALLINNE M., MARX R. Le diagnostic des borrélioses par immunofluorescence. *Ann. Inst. Pasteur*, 1966, **3**, 28-35.
532. BALLIF L., CONSTANTINESCO N., CHELARESCO M. Spirochétolysines et réactions de spirochétolyse dans la fièvre récurrente humaine. *Presse Méd.*, 1947, **55**, 586-587.
533. BRYGOO E.R., MAILLOUX M. Maloine Paris, 1976.
534. COFFEY E.M., EVELAND W.C. Experimental relapsing fever initiated by *Borrelia hermsi*. I. Identification of major serotypes by immunofluorescence. *J. Infect. Dis.*, 1967, **117**, 23-28. II. Sequential appearance of major serotypes in the rat. *J. Infect. Dis.*, 1967, **117**, 29-34.
535. DODGE R.W. Culture of Ethiopian strains of *Borrelia recurrentis*. *Appl. Microbiol.*, 1973, **25**, 935-939.
536. FELSENFELD O., WOLF R.H. Immunoglobulins and antibodies in *Borrelia turicatae* infections. *Acta Tropica*, 1969, **26**, 156-166.
537. FELSENFELD O., WOLF R.H. The indirect immunoenzyme test for the detection of antibodies against North American Borreliae. *A.J.C.P.*, 1975, **61**, 839-848.
538. NOGUCHI H. *J. Exp. Med.*, 1972, **16**, 119-120.
539. RANQUE J., QUILICI M., ASSADOURIAN Y. Étude des parentés antigéniques entre *Treponema pallidum* et *Borrelia hispanica*. *Med. Trop. Basel*, 1967, **27**, 519-524.
540. RODHAIN F. *Borrelia* et fièvres récurrentes : aspects épidémiologiques actuels. *Bull. Inst. Pasteur*, 1976, **74**, 173-218.
541. VAISMAN A., HAMELIN R., LEVADITI C. Spécificité des immobilisines récurrentielles entre le *Borrelia duttoni* et le *Borrelia hispanica*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 774-777.

X

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA TOXOPLASMOSE

Les toxoplasmes ont été découverts en 1908 chez des lapins au Brésil (Splendore 552) et chez un rongeur tunisien, le *Ctenodactylus gondi* (Nicolle 548).

La toxoplasmose de l'adulte immunocompétent et la toxoplasmose congénitale ont un diagnostic basé sur la sérologie, dont nous n'envisagerons pas les méthodes ici.

ÉPIDÉMIOLOGIE

Cycle

L'évolution de *Toxoplasma gondii* comprend deux phases :

– une phase anciennement connue, asexuée, se déroulant chez des hôtes divers dits hôtes intermédiaires (oiseaux, mammifères dont l'homme), et qui peut aboutir à la formation de kystes = bradyzoïtes, en particulier dans le système nerveux et les muscles.

– une phase découverte plus récemment (546) de type coccidie, se déroulant dans l'intestin du chat, hôte définitif, et comprenant :

* un cycle asexué ou schizogonie : un mérozoïte ou un sporozoïte pénètre dans une cellule épithéliale intestinale, grossit, divise son noyau pour devenir un schizonte. Le schizonte mûr est constitué de mérozoïtes disposés en éventail qui, une fois libérés, viennent infester de nouvelles cellules.

* un cycle sexué ou gamogonie : un microgamète (mâle) féconde un macrogamète (femelle) pour donner un oocyste de $10\ \mu\text{m} \times 12\ \mu\text{m}$ qui est éliminé dans les fèces. Dans le milieu extérieur, l'oocyste mûrit. Il contient alors 2 sporocystes dont chacun contient 4 sporozoïtes, soit 8 sporozoïtes au total, de $7\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$.

Cet oocyste est la forme sporulée de résistance qui contamine par voie orale :

- soit un chat, hôte définitif,
- soit un hôte intermédiaire (oiseaux, mammifères dont l'homme).

RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE

Toxoplasma gondii a une diffusion mondiale, avec des variations selon les régions.

MODIFICATIONS CYTOLOGIQUES

Elles sont observées au cours de la toxoplasmose acquise.

SANG (542)

– GLOBULES ROUGES : en règle générale non modifiés. Possibilité exceptionnelle d'une anémie hémolytique.

– GLOBULES BLANCS : Leucocytose à 10 000 - 12 000 avec lymphocytose à 40-50 % et neutropénie surtout relative à 30-40 %. Parfois existence d'une mononucléose avec cellules

hyperbasophiles rappelant celles de la mononucléose infectieuse. Cette leucocytose disparaît après 1 à 2 mois d'évolution.

Eosinophilie légère, décrite par quelques auteurs, survenant le plus souvent pendant les deux premiers mois de la maladie seulement. En outre, la toxoplasmose survient volontiers chez les personnes atteintes d'affections malignes hématologiques. Il est à noter que toxoplasmose et toxocarose peuvent se transmettre par la terre ce qui rend possible une coinfection et une éosinophilie élevée due à la toxocarose.

Plaquettes : thrombopénie avec purpura très rare.

GANGLIONS

Ils sont augmentés de volume dans la toxoplasmose acquise. L'aspect anatomo pathologique est celui d'une réticulose bénigne.

■ RECHERCHE ET MISE EN ÉVIDENCE DES TOXOPLASMOSES

Trois méthodes : I. Examen microscopique direct,

II. Culture cellulaire,

III. Inoculation à l'animal sensible.

I – EXAMEN DIRECT

PRÉLÈVEMENTS

– Dans la forme acquise, chez les malades immunocompétents les toxoplasmes sont toujours extrêmement rares dans les divers prélèvements : l'examen direct est donc très rarement positif.

Ce sont surtout dans les frottis ou appositions ganglionnaires dans la forme acquise, les appositions ou coupes histologiques du cerveau dans la forme congénitale, que les parasites peuvent être trouvés. Dans les ganglions, on recherchera les formes végétatives ; dans le tissu nerveux : les formes végétatives et les kystes. Le parasite a été retrouvé de façon exceptionnelle dans différentes variétés de prélèvements : sang, moëlle osseuse, L.C.R., salive, humeur aqueuse, frottis palpébral, muscle, poumon, rate, rein, foie, placenta...

– **Le Sida** a modifié considérablement cette situation et en cas de toxoplasmose on trouve les parasites assez facilement dans le lavage broncho-alvéolaire dans le sang ainsi que dans les biopsies cérébrales, ce dernier prélèvement comprenant plus de risques.

MORPHOLOGIE

Le toxoplasme, chez l'homme, se présente sous deux formes :

1) forme végétative, extra ou intra-cellulaire = tachyzoïte

2) forme enkystée ou kyste = bradyzoïte

La forme végétative : elle peut être libre ou intra-cellulaire (photos n° 277 à 280)

a) Forme libre ou extra-cellulaire

Immobile à l'état frais.

Dimensions : 4 à 7 µm de long sur 2 à 4 µm de large.

Forme arquée, en croissant (toxoplasme veut dire cytoplasme arqué), avec une extrémité plus arrondie, l'autre plus effilée.

Cytoplasme coloré en bleu par le May-Grünwald-Giemsa. Il ne contient pas de flagelle.

Le noyau situé vers le centre ou l'extrémité arrondie est coloré en rouge dans les mêmes conditions. Il est de forme arrondie ou légèrement ovale. La chromatine est assez lâche.

b) Forme intra-cellulaire (photos n° 278 et 280)

S'observe dans les cellules du système réticulo-endothélial, les monocytes, les grands lymphocytes, parfois les polynucléaires neutrophiles, les cellules du système nerveux central, jamais dans les hématies.

Dimensions : plus petites, 4 µm de long × 2,5 µm de large environ.

Forme : plus ovale et arrondie que la précédente, souvent accolée deux par deux par leur face la plus plane.

Nombre : variable, de 8 à 40 selon la cellule, formant un « pseudo-kyste ».

Cytoplasme et noyau : semblables à ceux de la forme libre.

Kystes (photos n° 281 et 282) : La biopsie cérébrale parfois pratiquée en cas de SIDA permet de les trouver chez l'Homme.

Dimensions 15 à 40 µm de diamètre, jusqu'à 100 µm.

Forme : arrondie dans le cerveau, allongée dans le sens des fibres dans les muscles.

Contient de nombreux toxoplasmes (parfois plus de cent), de forme ovale, de 3 à 4 µm de diamètre, avec un noyau volumineux entouré d'une mince couche de cytoplasme.

DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL AVEC LES LEISHMANIES

Leur taille est voisine : les deux parasites peuvent être intra ou extra-cellulaires, ce qui explique la confusion fréquente.

Nicolle et Manceaux avaient d'ailleurs initialement considéré *Toxoplasma gondii* comme faisant partie du genre *Leishmania* (549).

Le tableau ci-dessous rappelle les principales différences morphologiques entre ces deux protozoaires. C'est surtout la présence du blépharoplaste et du rhizoplaste des formes amastigotes des leishmanies qui est caractéristique.

Tableau XXXIII : Diagnostic différentiel Leishmania/Toxoplasma

	<i>Leishmania sp.</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Taille	2 × 4 µm en moyenne	4-7 × 2-4 µm en moyenne
Contenu	– noyau assez gros – noyau assez gros – kinétoplaste sous la forme d'un bâtonnet violet foncé souvent sous forme d'un trait, inconstamment visible	– noyau assez gros – pas de kinétoplaste
Forme (parasite extra-cellulaire)	arrondie ou ovale	allongée et arquée

II – CULTURE

T. gondii ne peut être reproduit qu'en culture cellulaire, habituellement employée pour les cultures virales. Différentes cultures de tissus ont été proposées Souche Hela, souche K.B., souche de fibroblastes d'origine murine (547). Mais c'est la culture sur fibroblastes humains (souche M.R.C. 5) qui s'est avérée la meilleure méthode d'isolement du parasite à partir de placentas humains (544).

La culture devient positive dès J + 2.

Cette méthode est au moins aussi sensible que l'inoculation à la souris chez qui l'infection se révèle beaucoup plus tardivement (545).

Ainsi dans deux cas de toxoplasmose cérébrale les cultures sur cellules M.R.C. 5 et l'inoculation à la souris furent toutes les deux positives mais la première en 3 à 7 jours et la deuxième en 4 à 6 semaines (551).

III – INOCULATION À L'ANIMAL (Réf. 543 et 550).

– Prélèvements : les mêmes que ceux étudiés précédemment, surtout broyat ganglionnaire, tissu cérébral, moëlle osseuse, culot de sédimentation de L.C.R., placenta, etc.

– Animaux inoculés : l'animal de choix est la souris parce qu'elle est toujours indemne de toxoplasmose spontanée.

PLACENTA

– Faire les prélèvements de placenta pour l'histo-pathologie et la bactériologie.

– Hâcher finement au bistouri 50 grammes de placenta.

– Conserver le reste du placenta à + 4 °C pendant une semaine sans fixateur.

– Les mettre dans 500 ml de la solution suivante :

- Trypsine 5 grammes (Prolabo®)
- Pénicilline 190 000 U.I. (dissoudre 200 000 U.I. dans 2 ml, en prélever 1,9 ml).
- Solution de ClNa 9 grammes pour mille 1 litre

– Digestion avec brassage lent pendant deux heures à 37 °C.

Centrifuger 10 minutes à 2 000 tours/minute. Laver le culot deux fois dans le soluté de ClNa à 9 grammes pour mille.

Prélever une petite partie du culot (1/5 environ) pour faire des frottis et y rechercher les toxoplasmes par immunofluorescence.

Ajouter au reste du culot 6 ml de ClNa à 9 grammes pour mille contenant 5.000 unités de pénicilline (0,05 ml de la solution précédente).

– Inoculer en intra-péritonéal 1 ml de la suspension à 5 souris.

SURVEILLANCE DES SOURIS

– Décès dans les 24 ou 48 heures : il est en général accidentel. Si plusieurs souris meurent, les vérifier (May-Grünwald-Giemsa, gram, culture) et en réinoculer d'autres avec le placenta conservé.

– Souris mortes plus tard (une semaine environ) : rechercher les toxoplasmes dans le liquide péritonéal et sur apposition de rate et poumon, si l'état de la souris le permet. Rechercher les toxoplasmes dans le liquide péritonéal des autres souris.

– Souris « souffrantes » ; se déplaçant difficilement, au poil hérissé, après une semaine environ : rechercher les toxoplasmes dans le liquide péritonéal prélevé par ponction.

– Souris vivantes : contrôle sérologique après 3 à 6 semaines.

Prélever du sang à la queue : peser des tubes rhésus en polystyrène (ou en verre) = P.1

Couper l'extrémité de la queue, faire couler à plusieurs reprises du sang dans le tube. Peser à nouveau les tubes = P.2

$$\text{POIDS DU SANG} = S = P.2 - P.1$$

Ajouter 10 fois le volume de tampon phosphate pH 7,2 le poids S de sang prélevé. Agiter. Centrifuger. Faire une réaction d'agglutination (Toxo-Screen) avec le surnageant, ce qui correspond à 4 U.I. par ml environ.

Si la réaction est positive, rechercher les kystes de toxoplasmes dans le cerveau en l'écrasant. Broyer cerveau et rate dans un mortier, ajouter 2 ml de ClNa à 9 grammes pour mille avec 2 000 U.I. de pénicilline.

Inoculer 1 ml de suspension à 2 souris.

Noter tous les contrôles et résultats sur un cahier : une page par inoculation.

■ TOXOPLAMOSE ET SIDA

La toxoplasmose est la première cause d'atteinte cérébrale dans le SIDA survenant dans 2,5 à 25 % des cas, suivant les études (553, 559, 566 et 574).

Comme chez la plupart des malades immuno-déprimés, les formes graves de toxoplasmose résultent d'une réactivation d'une infection ancienne et exceptionnellement d'une primo-infection. Leur fréquence est donc directement liée à la prévalence de l'infection dans la population générale. Ceci explique certainement les différences de fréquence observées suivant les études réalisées soit aux U.S.A. où la prévalence de la toxoplasmose est faible, soit en Europe et en France particulièrement où la prévalence est forte.

Dans près de 60 % des cas la toxoplasmose cérébrale est inaugurale du SIDA (554).

La toxoplasmose peut survenir isolément ou être associée à d'autres infections opportunistes, tuberculose en particulier (561).

La localisation cérébrale est la plus fréquente mais d'autres localisations peuvent être observées isolément ou en association : rétinienes (6 %) (556), pulmonaire (2 à 3 %), hépatique, médullaire orchite, péritonite, lésions cutanées (562, 564, 565 et 572).

Modification biologique des lymphocytes

Le taux de CD4 est en moyenne de 24/ μ l à la survenue de la toxoplasmose (554), donc très abaissé.

RECHERCHE DU PARASITE

Les toxoplasmes peuvent être retrouvés sur différents types de prélèvement, notamment dans le L.C.R., la moëlle, le sang, les lavages broncho-alvéolaires et les biopsies cérébrales...

La recherche directe après coloration est souvent négative. Il est nécessaire d'inoculer le prélèvement à la souris, mais les résultats de cette inoculation ne peuvent être connus qu'au bout de 30 à 45 jours par la mise en évidence de kystes dans le cerveau des souris.

La culture cellulaire sur fibroblastes a permis d'isoler le toxoplasme du sang dans un cas de SIDA (563).

En cas de localisation cérébrale, la recherche de toxoplasme peut être faite sur biopsie cérébrale (573), mais ce type de prélèvement n'est pas sans risque. Des coupes à congélation faites immédiatement après le prélèvement permettent assez souvent de découvrir le parasite dans des prélèvements riches (570).

Les colorations habituelles peuvent être employées mais l'identification des toxoplasmes peut être difficile (557), ainsi que la différenciation avec *L. infantum*, fréquemment associé aussi au SIDA (voir page 318).

Une technique fine est la méthode immunocytologique avec révélation de la fixation des anticorps anti-toxoplasme par un système peroxidase-anti-peroxidase (558 et 567).

C'est une technique très sensible, très spécifique mais de réalisation complexe. Elle n'est utilisée que par quelques laboratoires.

Quelle que soit la méthode histologique utilisée, seule la mise en évidence de foyers de trophozoïtes apporte la preuve d'une infection évolutive : la présence de kystes peut en effet correspondre à une infection ancienne.

IMMUNOLOGIE

Une toxoplasmose avec manifestations cliniques, en particulier cérébrale, n'a été observée que chez des malades ayant une sérologie toxoplasmique positive (559, 566 et 569), à l'exception d'un cas de toxoplasmose pulmonaire (560).

En immunofluorescence, en cas de toxoplasmose cérébrale, le titre est égal ou supérieur à 400 U.I. dans 71 % des cas, et il est normal ou légèrement augmenté dans 29 % des cas (559). Les IgM ne sont décelables à une dilution égale ou supérieure au 1/100 que chez 6 % (568) à 15 % (559).

Cet aspect sérologique particulier, titre élevé d'U.I. IgG sans IgM, montre qu'il s'agit souvent d'une réactivation d'une toxoplasmose antérieure et beaucoup plus rarement d'une primo-infection.

Paradoxalement, certains malades infectés par le V.I.H. ont un titre élevé d'anticorps, voire une augmentation du titre des anticorps IgG, sans signes cliniques associés. Cette fréquence de forts titres d'anticorps est significativement plus élevée chez les sujets ayant une sérologie V.I.H. positive (avec ou sans infection opportuniste), que dans une population normale de même âge et de même origine. Ceci semble indiquer une fréquence plus importante de réactivations sérologiques. L'étude suivie de 177 patients a montré que sur 30 malades ayant présenté une ascension des anticorps 5 ont fait une toxoplasmose cérébrale et 25 sont restés asymptomatiques (560).

Parmi les autres méthodes sérologiques, aucune n'apporte d'argument de diagnostic complémentaire.

* Le dye-test est souvent peu élevé, égal ou supérieur à 1 024 chez seulement 32 % des malades (565 et 568).

* L'hémagglutination indirecte ne donne pas de meilleurs résultats (568).

* L'agglutination directe IgG est plus fréquemment élevée (566 et 568)

* L'agglutination utilisant un antigène traité à l'acétone (571) permet de différencier les infections acquises des réactivations sérologiques.

La recherche d'antigènes toxoplasmiques peut être positive dans le liquide céphalo-rachidien (555).

La sérologie apporte donc souvent d'importants éléments diagnostiques mais ne permet pas toujours de conclure. Elle doit être interprétée avec prudence. Un titre faible et stable n'exclut en aucun cas un diagnostic de toxoplasmose évolutive.

Un titre élevé ou une ascension de titre est une indication de chimioprophylaxie antitoxoplasmique.

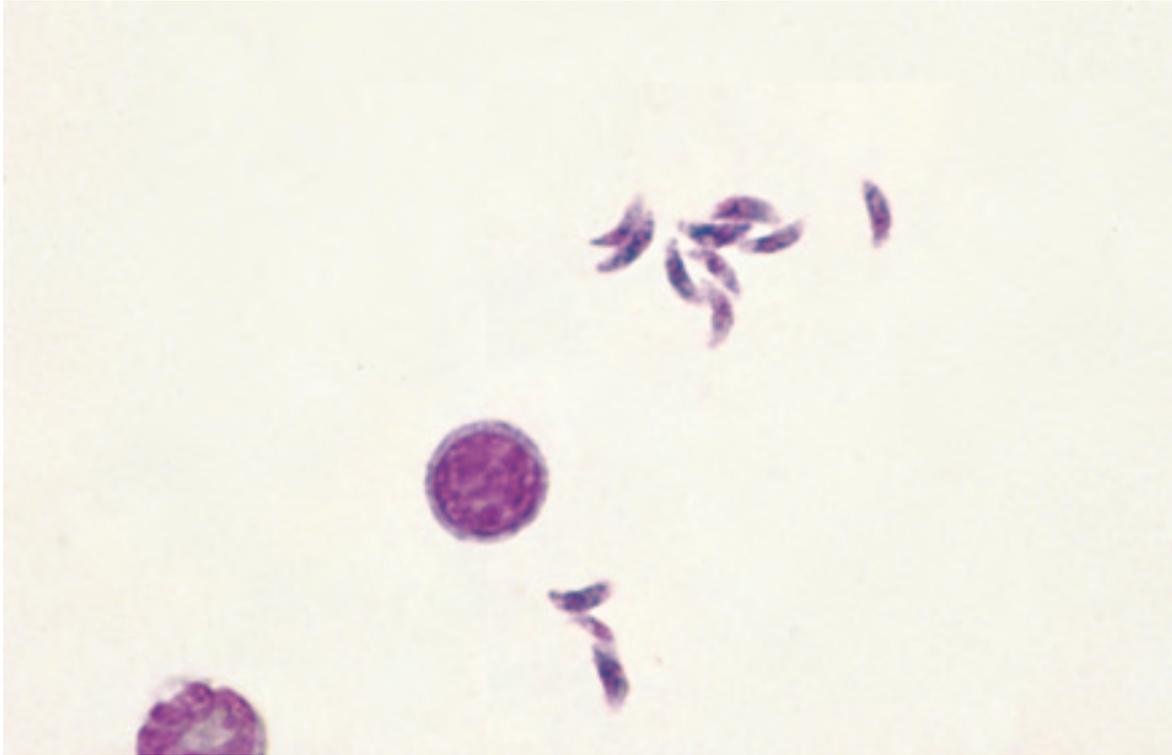


Photo n° 277 : *Toxoplasma gondii*. Frottis d'ascite de souris. Tachyzoïtes libres (= formes végétatives) de forme arquée. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

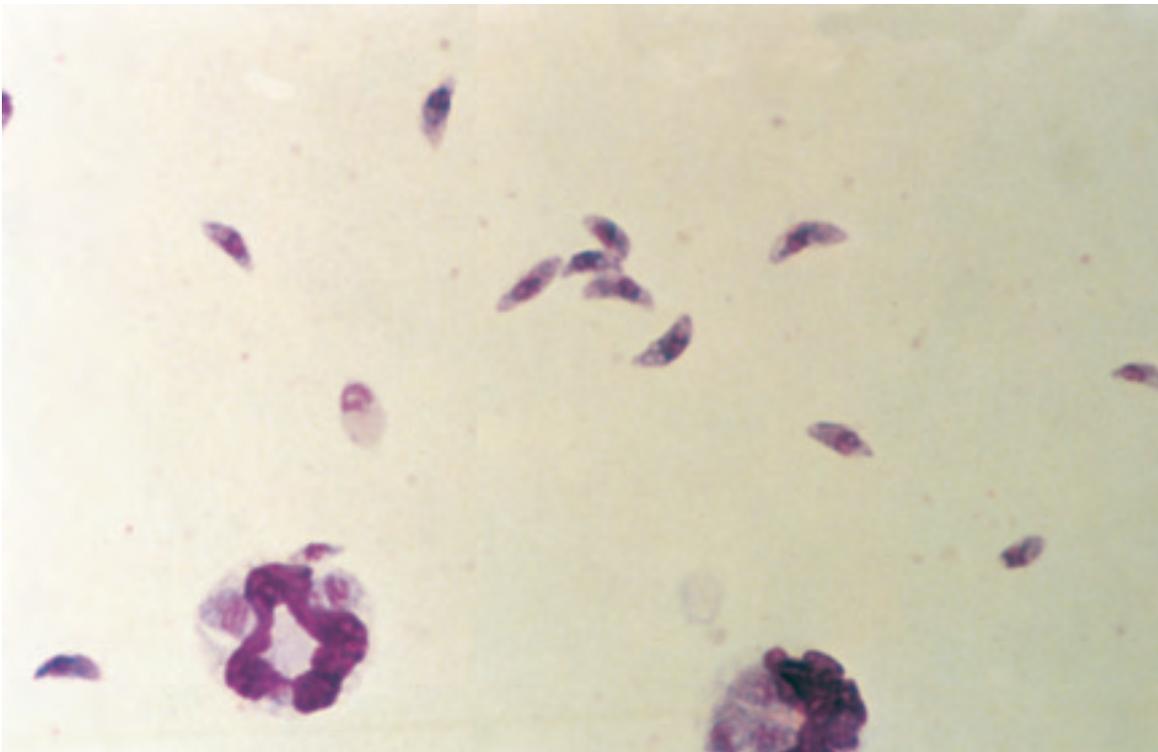


Photo n° 278 : *Toxoplasma gondii*. Frottis d'ascite de souris. Une douzaine de tachyzoïtes libres (= formes végétatives) de forme arquée, deux tachyzoïtes arrondis intra-leucocytaires et au dessus un autre de forme ovulaire. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

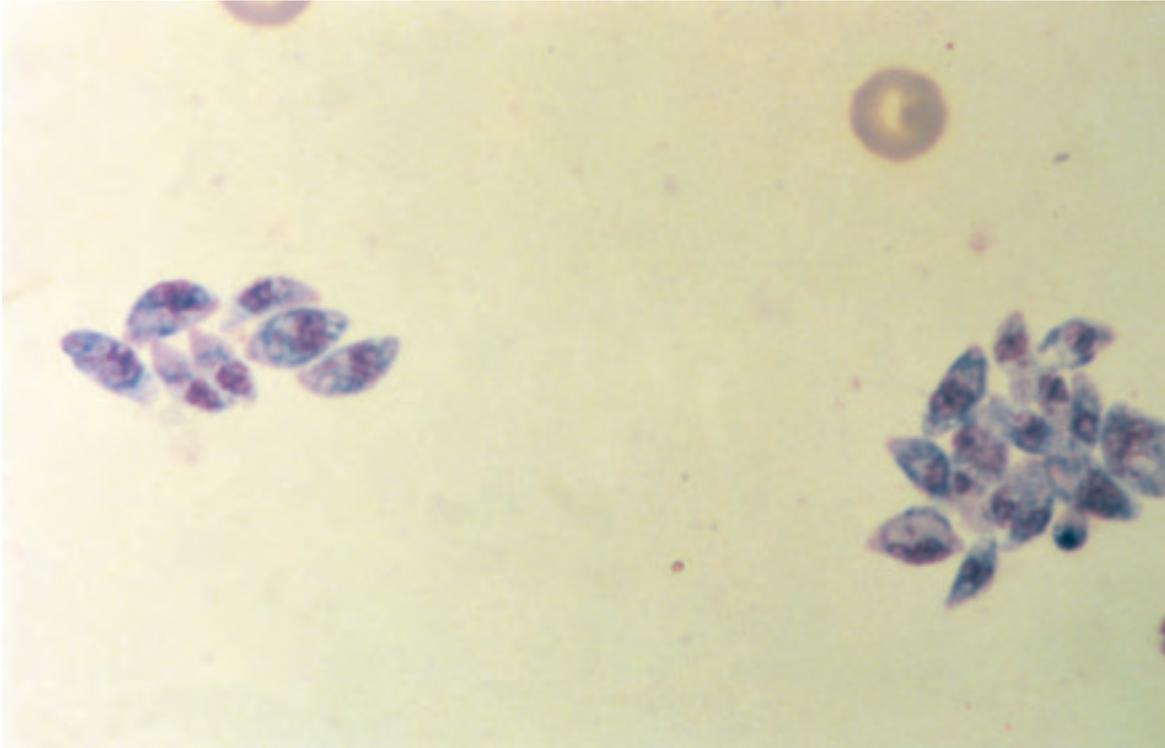


Photo n° 279 : *Toxoplasma gondii*. Frottis d'ascite de souris. Deux amas de tachyzoïtes (= formes végétatives) de forme arquée. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

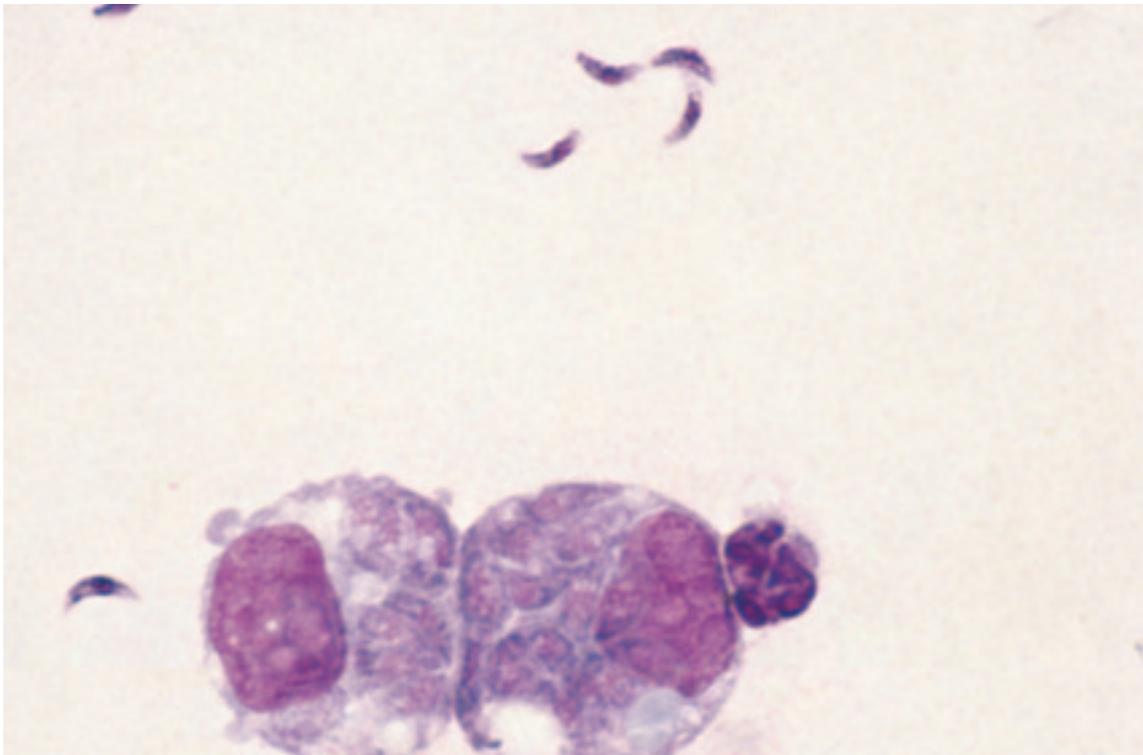
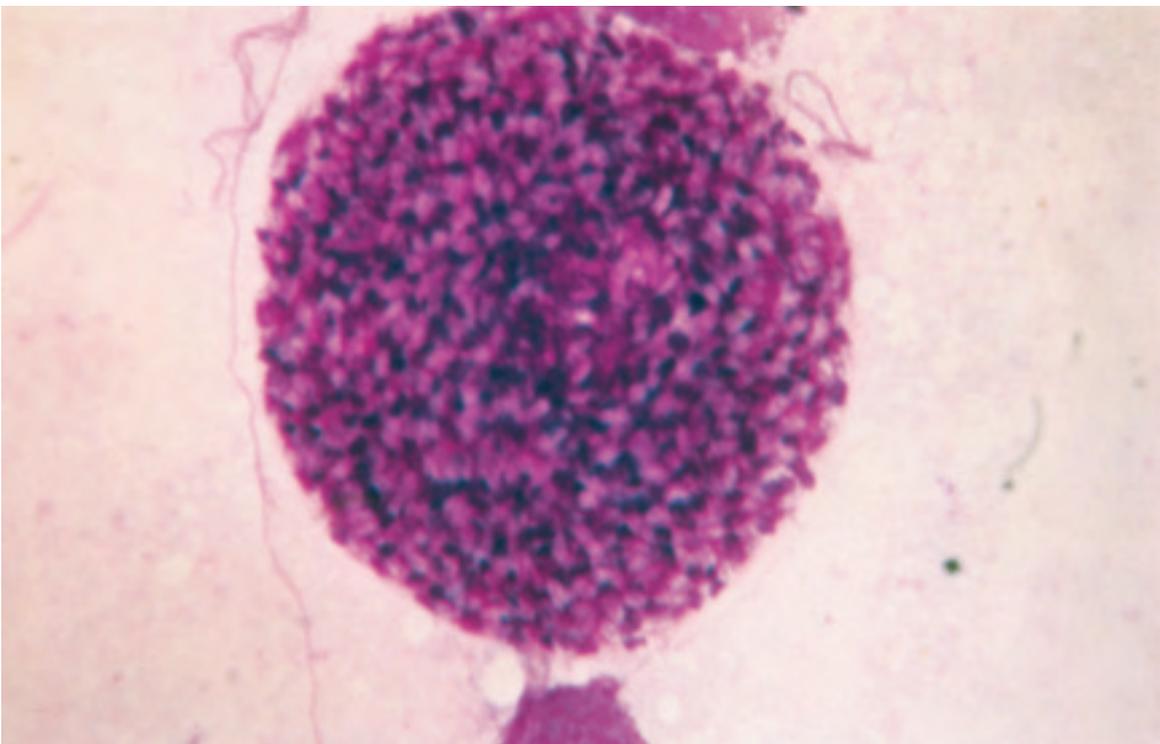


Photo n° 280 : *Toxoplasma gondii*. Frottis d'ascite de souris. Cinq tachyzoïtes (= formes végétatives) libres et de nombreux de forme plus ou moins arrondie dans les deux macrophages. Coloration M.G.G. Obj. × 100.



*Photo n° 281 : Toxoplasma gondii. Apposition de cerveau. Kyste (bradyzoïte)
Coloration M.G.G. Obj. × 10.*



*Photo n° 282 : Toxoplasma gondii. Apposition de cerveau. Kyste (bradyzoïte).
Coloration M.G.G. Obj. × 100.*

Bibliographie

Diagnostic biologique

542. BAUFINE-DUCROCQ H., COUZINEAU P., POULAIN C., BLODRIX CH. *Gaz. Méd. de France*, 1972, **79**, 633-640.
543. DESMONTS J., COUVREUR J. *Arch. Fr. Pédi.*, 1974, **31**, 157-166.
544. DEROUIN F., MAZERON M.C., GARIN Y.F. Toxoplasmose congénitale. Diagnostic rapide par mise en évidence de toxoplasmes dans le placenta par culture cellulaire. *Pres. Méd.*, 1986, **15**, 1684.
545. DEROUIN F., MAZERON M.C., GARIN Y.F. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.*, 1987, **25**, 1597-1600.
546. HUTCHISON W.M., DUNACHIE J.F., SIIM J.C., WORK K. Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *Brit. Med. J.*, 1970, 142-144.
547. PIERREUX G. Culture de *Toxoplasma gondii* sur tissus. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1963, **3**, 241-246.
548. NICOLLE C., MEANCEAUX L. Sur un protozoaire nouveau du *gondi* (*Toxoplasma* N. gen.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1908, **1**, 97-103.
549. NICOLLE C., MEANCEAUX L. Sur une infection à corps de leishman (ou organismes voisins du *gondi*. *C.R. Acad. Sci.*, 1908, **147**, 763-766.
550. REMINGTON J.S., MELTON M.L., JACOBS L. Induced and spontaneous recurrent parasitemia in chronic infections with avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, 1961, **87**, 578-581.
551. ROQUES C., BESSIÈRES M.H., SEGUELA J.P. Diagnostic de la toxoplasmose cérébrale par isolement en culture cellulaire de toxoplasmes dans les biopsies cérébrales. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 1988, **6**, 57-64.
552. SPLENDORE A. Un nuovo protozoa parassita de' conigli. *Rev. Soc. Sc. (Sao-Paulo)*, 1908, **3**, 109-112.

Toxoplasmose et SIDA

553. ALLEN J.R., CURRAN J.W. Epidemiology of the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Adv. Host. Defense Mechanisms*, 1985, **5**, 1-27.
554. BOURDILLON F., RAFFI R., PRADIER C. Les principales circonstances de survenue de la toxoplasmose cérébrale chez les patients atteints par le V.I.H. en France. *Bull. Épid. Heb.*, 1996, **7**, 77-78.
555. BROOKS R.G., SHARMA S.D., REMINGTON J.S. Detection of *Toxoplasma gondii* antigens by a dot immunobinding technique. *J. Clin. Microbiol.*, 1985, **21**, 113-116.
556. CHAKROUN M., MEYOHAS M.C., PELOSSE B., ZAZOUN L., VACHEROT B., DEROUIN F., LEPORTE C. Émergence de la toxoplasmose oculaire au cours du SIDA. *Ann. Méd. Interne*, 1990, **141**, 472-474.
557. CHAN J.C., HENSLEY G.T., MOSKOWITZ L.B. Toxoplasmosis in the central nervous system. *Ann. Int. Med.*, 1984, **100**, 615-616.

558. CONLEY F.K., JENKINS K.A., REMINGTON J.S. *Toxoplasma gondii* infection of the central nervous system. Use of the peroxidase-antiperoxidase method to demonstrate toxoplasma in formalin fixed, paraffin embedded tissue section. *Human Pathol.*, 1981, **12**, 690-698.
559. DEROUIN F., BEAUVAIS B., LARIVIÈRE M. Serological study of the prevalence of toxoplasmosis in 167 patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) or chronic lymphadenopathy syndrome. *Biomed. Pharmacother.*, 1986, **40**, 231.
560. DEROUIN F., THULLIEZ Ph., GARIN Y.R. Intérêt et limites de la sérologie de toxoplasmoses chez les sujets V.I.H. +. *Path. Biol.*, 1991, **39**, 255-259.
561. FISCHL M.A., PITCHENIK A.E., SPIRA T.J. Tuberculous brain abscess and toxoplasma encephalitis in a patient with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *J.A.M.A.*, 1985, **253**, 3428-3430.
562. HAUSER W.E., LUFT B.J., CONLEY F.K., REMINGTON J.S. Central nervous system toxoplasmosis in homosexual and heterosexual adults. *N. Engl. J. Med.*, 1982, **307**, 498-499.
563. HOFFIN J.M., REMINGTON J.S. Tissue culture isolation of toxoplasma from blood of a patient with A.I.D.S. *Arch. Inter. Med.*, 1985, **145**, 925.
564. KARKOUCHE B., GREMAIN J., GODEAU P., CHOMETTE G. La toxoplasme du sujet immunodéprimé. À propos de trois observations anatomocliniques. *Sem. Hôp. Paris*, 1986, **62**, 1978-1981.
565. LUFT B.J. CONLEY F., REMINGTON J.S. Outbreak of central nervous system toxoplasmosis in Western Europe and North America. *Lancet*, 1983, 781-783.
566. LUFT B.J., BROOKS R.G., CONLEY F.K., MCCABE R.E., REMINGTON J.S. Encéphalite toxoplasmique au cours du syndrome d'immunodéficit acquis. *J.A.M.A.*, 1984, **252**, 913-917.
567. MASON T.E., PHIFOR R.F., SPICER S.S., SWALLOW R.S., DRESKIN R.D. New immunochemical technique for localizing intracellular tissue antigen. *J. Histochem. Cytochem.*, 1969, **17**, 563-569.
568. MCCABE R.E., GIBBONS D., BROOKS R.G., LUFT B.J., REMINGTON J.S. Agglutination test for diagnosis in AIDS. *Lancet*, 1983, 680.
569. NAVIA B.A., PETITO C.K., GOLD J.W.M. et al. Cerebral toxoplasmosis complicating the Acquired Immune Deficiency Syndrome: clinical and neuropathological in 27 patients. *Am. Neurol.*, 1986, **19**, 224-238.
570. SHER J.H. Cerebral toxoplasmosis. *Lancet*, 1983, 1225.
571. THULLIEZ P., REMINGTON J.S., SANTORO F., OULAQUE G., SHARMA S., DESMONTS G. Une nouvelle réaction d'agglutination pour le diagnostic du stade évolutif de la toxoplasme acquise. *Path. Biol.*, 1986, **34**, 173-177.
572. TOURANI J.M., ISRAEL-BIET D., VENET A., ANDRIEU J.M. Unusual pulmonary infection in a puzzling presentation of AIDS. *Lancet*, 1985, 989.
573. WEINBRECK P., LEYMARIE J.L., GOBEAUX R.F., DARDÉ M.L., DENIS F., LEBOUTET M.J., BORDESSOULE D., PESTRE-ALEXANDRE M. Toxoplasme cérébrale et SIDA : intérêt de la biopsie neurochirurgicale précoce. *Med. Mal. Infect.*, 1985, **15**, 74.
574. WONG B. et al. Central nervous system toxoplasmosis in homosexual men and parenteral drug abusers. *Ann. Intern. Med.*, 1984, **100**, 36-42.

XI

BARTONELLOSE Maladie de Carrion et Verruga péruvienne

Au Pérou, depuis l'époque pré-colombienne, existent deux maladies : l'une grave appelée la fièvre de « Oroya » qui entraîne la mort dans 10 à 40 % des cas, l'autre bénigne, la verruga péruvienne, éruption de type ganuleuse d'une durée de quelques mois. En 1885 l'étudiant en médecine péruvien de 26 ans Daniel Carrion démontra qu'il s'agissait de deux stades de la même maladie : il le fit en s'auto-inoculant le sang contenu dans un verruome le 27 août 1885. Il mourut le 5 octobre 1885 de la fièvre grave, qui depuis s'appelle la maladie de Carrion (577, 579 et 584).

ÉPIDÉMIOLOGIE

La maladie est due à un bacille, *Bartonella bacilliformis* transmis par des phlébotomes : *Phlebotomus noguchii* et *Lutzomyia verrucarum*. Elle n'est pas contagieuse. Elle est transmissible par voie transplacentaire et par transfusion sanguine (577). L'incubation est de 2 à 3 semaines.

Répartition géographique : Pérou elle y est très répandue, elle vient d'y être aussi découverte dans le département amazonien du Pérou (582). Équateur, Chili, Bolivie, Guatemala, Colombie rarement (575). Une *Haemobartonella sp.* voisine a été décrite au Niger (580).

PRÉLÈVEMENTS

B. bacilliformis est recherché principalement dans le sang et le verruome.

MODIFICATIONS BIOLOGIQUES

Dans la forme grave (583) – l'anémie est constante, souvent importante, avec leucocytose à 15-20 000 et polynucléose.

DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE de *B. bacilliformis*, découvert par A. Barton en 1905. C'est une bactérie globulaire (576) 0,2 à 1 µm de diamètre sur 1,5 à 2,5 µm de long (photo n° 283).

Elle se colore par le May-Grünwald-Giemsa long, elle est Gram négatif. Les extrémités du bâtonnet sont plus colorées.

Une seule hématie peut en contenir plusieurs, jusqu'à 30. La moitié des hématies et plus, peuvent être parasitées. Dans les hématies leur aspect varie selon l'angle où on les voit : coccoïde quand on les voit par leur extrémité, bacille quand on les voit en longueur. Ils sont parfois libres dans le plasma (577). Ils peuvent être trouvés également dans les macrophages, en particulier les histocytes des verruomes.

CULTURE : sur gélose au sang, milieu de Noguchi pour leptospires, en aérobiose, à la température de 28-30 °C. La bactérie mobile, grâce à des cils polaires est sensible au chloramphénicol, pénicilline, tétracycline, streptomycine.

INOCULATION AU SINGE : *Cynomolgus* (578).

SÉROLOGIE : Elisa et Immunoblot sont utilisés (581 et 582).

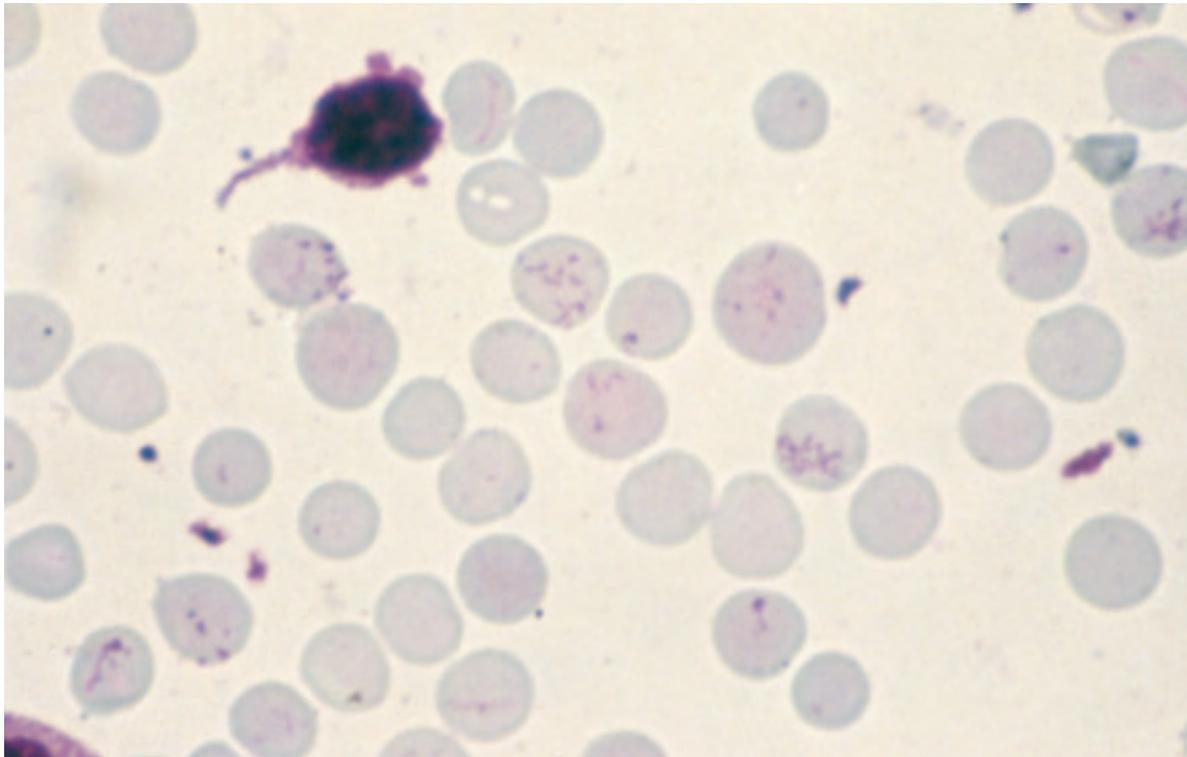


Photo n° 283 : Bartonella muris. Frottis. Nombreuses bactéries de formes bacillaire ou cocoïde dans les hématies. Coloration M.G.G. Obj. × 100.

Bibliographie

575. ALEXANDER B. A review of bartonellosis in Ecuador and Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1995, **52**, 354-359.
576. CUADRA M., TAKANO J. The relationship of *Bartonella bacilliformis* to the red blood cell as revealed by electron microscopy. *Blood*, 1969, **33**, 708-716.
577. ESCOMEL E. La maladie de Carrion ou verruga du Pérou. Les dernières acquisitions. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1938, **31**, 536-554.
578. GALLIARD H., ROBLES R. Inoculation de la verruga au singe *Cynomolgus* (*Cynomolgus*) *fascicularis* avec des cultures de *Bartonella bacilliformis*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1928, **6**, 1-3.
579. GARCIA-CACÉRÈS U., GARCIA F.U. Bartonellosis. An immunodepressive disease and the life of Daniel Alcides Carrion. *A.J.C.P.*, 1991, **95**, 58-66.
580. GRÉTILLAT S., KONARZEWSKI B. Présence d'un procaryote du genre *Haemobartonella* Tyzzer et Weinma, 1939, dans le sang de nigériens de la région de Niamey. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 1978, **71**, 412-416.
581. KNOBLOCH J. Analysis and preparation of *Bartonella bacilliformis* antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1988, **39**, 173-178.
582. KOSEK M., LAVARELLO R., GILMAN R.H., DELGADO J., MAGUINA C., VERASTEGUI M., LESCANO A.G., MALLQUI V., KOSEK J.C., RECAVARREN S., CABRERA L. Natural history of infection with *Bartonella bacilliformis* in a noendemic population. *J. Infec. Dis.*, 2000, **182**, 865-872.
583. MONGE C., WEISS P. À propos de l'hématologie de la maladie de Carrion ou verrue péruvienne. *Rev. Sud-américaine Med. Chirurg.*, 1930, **1**, 569-574.
584. PITTALUGA G. Les « infections à bartonella ». *Bull. Inst. Pasteur*, 1938, **36**, 1-19.

■ INDEX DES PHOTOS

– TECHNIQUES

Conservation des frottis : 1 à 5

– *PLASMODIUM FALCIPARUM* :

Schizontes : 30 à 35

Mérozoïte : 39

Accès pernicieux : 48 à 59

– *PLASMODIUM VIVAX* :

Schizontes : 75, 78 et 79

Gamétocytes : 80 à 84

– *PLASMODIUM OVALE* :

Schizontes : 94 à 97

– *PLASMODIUM MALARIAE*

Trophozoïtes : 108 à 115

Corps en rosace : 119 et 120

Gamétocytes : 122 et 123

Cytoconcentration : 126

– DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DES 4 *PLASMODIUM*

Trophozoïtes jeunes : 130 à 133

Trophozoïtes âgés : 138 à 141

Schizontes : 146 à 149

Gamétocytes : 154 à 157

– MODIFICATIONS CLINIQUES ET BIOLOGIE

Anémie : 163

Elliptocytose : 165

Polynucléaire mélanifère : 167

Cytoconcentration monocyte mélanifère : 169 et 170

– BABÉSIOSES :

Babesia sp. : 179, 181 et 183

– MICROFILAIRES

Cytoconcentration : 185 et 186

Loase

Œdème de Calabar : 189

Loa loa gaine : 194

Loa loa corps interne : 196 à 200

Goutte épaisse : 6 à 9

Trophozoïtes : 10 à 29

Corps en rosace : 36 à 38

Gamétocyte : 40 à 47

P. tenue : 60 et 61

Trophozoïtes : 62 à 75

Corps en rosace : 76 et 77

Exflagellation : 83 à 85

Trophozoïtes : 86 à 93, 102 et 103

Corps en rosace : 98 et 99

Schizontes : 116 à 118

Mérozoïte : 121

Phagocytose d'hématozoaires : 124 et 125

Goutte épaisse : 127 à 129

Trophozoïtes intermédiaires : 134 à 137

Trophozoïtes avec pigment : 142 à 145

Rosaces : 150 à 153

Polyinfestations : 158 à 162

Drépanocytose : 164

Plasmocyte : 166

Monocyte mélanifère : 168

Phagocytose de
P. falciparum : 171 à 176

Babesia divergens : 177 et 178

Babesia canis : 180, 182 et 184

Goutte épaisse : 187 et 188 et 191 à 193

Filaire adulte loase : 190

Loa loa espace céphalique : 195

Loa loa noyaux somatiques : 201

Loa loa sous-cuticulaires : 202 et 203

Microfilaires antigène : 205

207– FILAIRES LYMPHATIQUES

Eléphantiasis : 208 et 209

– *WUCHERERIA BANCROFTI* :

Noyaux somatiques : 214 à 216

– *WUCHERERIA BANCROFTI VAUCELI*

Gaine : 218 et 219

– *BRUGIA MALAYI*

Goutte épaisse : 222

Noyaux somatiques : 224

– *BRUGIA SP.*

Poumon éosinophile tropical
immunoélectrophorèse : 228

– *MENINGONEMA PERUZZII* :

– *MANSONELLA PERSTANS*

Goutte épaisse : 231 et 232

– *MANSONELLA OZZARDI* :

– DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DES MICROFILAIRES

Loa loa et *M. perstans* : 240 et 241

Loa loa, *W. bancrofti* et *M. perstans* : 244 à 246

Helicosporium sp. : 250

– TRYPANOSOMIASE AFRICAINE

T. brucei gambiense : 252 à 253 et 256

– TRYPANOSOMIASE AMÉRICAINE

Rhodnius : 257

– LEISHMANIOSE/LEISHMANIA INFANTUM :

Phlebotomus papatasi : 261

Frottis moelle : 262

Frottis ganglionnaire : 264 et 265

Apposition de rate : 270 et 271

– BORRÉLIOSSES

Erythema chronicum migrans : 273

Flagelle : 276

– TOXOPLASMOSE/TOXOPLASMA GONDII

Ascite de souris : 277 à 280

– BARTONELLOSE

Bactérie : 283

Loa loa dernier noyau : 204

Loa loa Ouchterlony
et immunoélectrophorèse : 206 et

Gaine : 210 à 213

Espace céphalique : 217

Espace céphalique : 220 et 221

Espace céphalique : 223

Noyau terminal : 225 à 227

Coupe ganglionnaire : 229

Goutte épaisse : 230

Noyaux somatiques : 233 à 237

Noyaux : 238 et 239

W. bancrofti et *B. malayi* : 242 et 243

Filaments mycéliens : 247 à 249

Fibre végétale : 251

T. brucei rhodesiense : 254 à 255

T. cruzi : 258 à 260

Cellule de Mött : 263

Cytoconcentration : 266 à 269

Culture : 272

Borrelia sp. : 274 et 275

Apposition de cerveau kystes : 281 et 282

■ INDEX DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I : Étude de 4 eaux minérales ayant un pH entre 7 et 7,4 pour coloration	30
Tableau II : Caractéristiques fournies et mesurées d'eaux minérales d'un pH 7 à 7,4	30
Tableau III : Cyto-concentration : quantité du mélange à centrifuger après hémolyse	36
Tableau IV : Comparaison des principaux caractères épidémiologiques des 4 espèces de <i>Plasmodium</i> de l'Homme	51
Tableau V : Richesse respective des frottis et gouttes épaisses en <i>Plasmodium</i>	65
Tableau VI : Bilan de 3 827 recherches de <i>P. falciparum</i> en frottis et gouttes épaisses	66
Tableau VII : Résultats des tests de contrôle de qualité <i>Plasmodium falciparum</i>	68
Tableau VIII : Liste mondiale des pays impaludés (<i>P. falciparum</i>)	70
Tableau IX : Résultats des tests de contrôle de qualité <i>Plasmodium vivax</i>	106
Tableau X : Résultats des tests de contrôle de qualité <i>Plasmodium ovale</i>	123
Tableau XI : Résultats des tests de contrôle de qualité <i>Plasmodium malariae</i>	138
Tableau XII : Morphologies des 4 espèces de <i>Plasmodium</i> humains	153
Tableau XIII : Morphologies des 4 espèces de <i>Plasmodium</i> humains (suite)	154
Tableau XIV : Résultats des tests de contrôle de qualité <i>Loa loa</i>	219
Tableau XV : Pays ou territoires signalant la présence de filarioses lymphatiques	233
Tableau XVI : Résultats des tests de contrôle de qualité <i>Wuchereria bancrofti</i>	235
Tableau XVII : Résultats des tests de contrôle de qualité <i>Brugia malayi</i>	245
Tableau XVIII : Résultats des tests de contrôle de qualité <i>Mansonella perstans</i>	253
Tableau XIX : Diagnostic différentiel des microfilaires	266
Tableau XX : Différences entre <i>T. brucei gambiense</i> et <i>T. brucei rhodesiense</i>	277
Tableau XXI : Choix du prélèvement pour isoler <i>T. brucei</i>	280
Tableau XXII : Différences morphologiques <i>T. cruzi</i> et <i>T. rangeli</i>	297
Tableau XXIII : Résultats des tests de contrôle de qualité <i>L. donovani/L. tropica</i>	303
Tableau XXIV : Sensibilité de l'immunofluorescence dans les leishmanioses	316
Tableau XXV : Spécificité de l'immunofluorescence dans les leishmanioses	316
Tableau XXVI : Sensibilité de l'Ouchterlony dans les leishmanioses	317
Tableau XXVII : Spécificité de l'Ouchterlony dans les leishmanioses	317
Tableau XXVIII : Sensibilité des tests cutanés dans la leishmaniose	318
Tableau XXIX : Spécificité des tests cutanés dans la leishmaniose	318
Tableau XXX : Leishmaniose viscérale chez des malades sous corticothérapie	320
Tableau XXXI : Résultats des tests de contrôle de qualité <i>Borrelia sp.</i>	327
Tableau XXXII : Caractères des principales fièvres récurrentes humaines	330
Tableau XXXIII : Diagnostic différentiel <i>Leishmania/Toxoplasma</i>	337

■ INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Premier dessin par A. Laveran des hématozoaires	22
Figure 2 : Technique de confection d'un frottis mince	27
Figure 3 : Schéma des cycles sexués et asexués de <i>P. falciparum</i>	50
Figure 4 : Courbe de l'évolution de l'éosinophilie dans les helminthiases (Lavier)	212
Figure 5 : Schémas des organes d'une microfilare et des attitudes en goutte épaisse	216
Figure 6 : Diagnostic différentiel de <i>W. bancrofti</i> et <i>B. malayi</i>	262
Figure 7 : Diagnostic différentiel de <i>Loa loa</i> , <i>W. bancrofti</i> et <i>M. perstans</i>	264

La formation continue est devenue une obligation



BIOFORMA

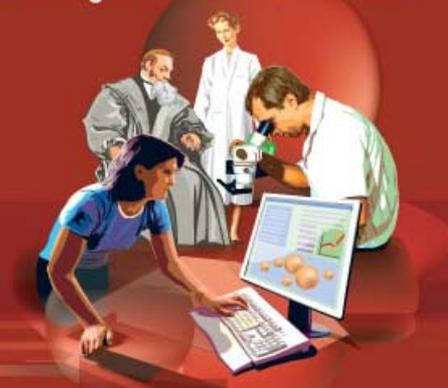
FORMATION CONTINUE DES BIOLOGISTES



80% des LABM se servent des outils BIOFORMA

dates et infos sur
www.bioforma.net

- Simplicité : aucun dossier à remplir, juste s'inscrire
- Prise en charge du coût des formations



BIOFORMA

230, boulevard Raspail 75014 Paris • tél. 01.56.54.39.39 • fax : 01.56.54.39.30 • e-mail : bioforma@wanadoo.fr
Site Internet : www.bioforma.net

ISSN : 1293-2892

ISBN : 2-913 633-32-3

EGOPRIM

30/32 rue du Couëdic - 75014 Paris

Décembre 2001

Dépôt légal : Décembre 2001