

Le four à micro-ondes pour le séchage des gouttes épaisses. Intérêt et limites dans l'observation microscopique des trophozoïtes et des gamétocytes de *Plasmodium falciparum*.

G. Le Goff, J.-Y. Le Hesran & V. Robert (1)

(1) Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération (ORSTOM), Organisation de coordination pour la lutte contre les grandes endémies en Afrique centrale (OCEAC), BP 288, Yaoundé, Cameroun.

Manuscrit n°1893. "Parasitologie". Accepté le 26 janvier 1998.

Correspondance et tirés-à-part : V. Robert, Laboratoire de paludologie, ORSTOM, BP 1386, Dakar, Sénégal. Vincent.Robert@orstom.sn

Summary: The Micro-Wave Oven for the Drying of Thick Blood Smears. Advantages and Drawbacks in the Microscopic Observation of *Plasmodium falciparum* Trophozoites and Gametocytes.

Key-words: Malaria - Microscopy - Micro-wave oven - Thick smear - Trophozoite - Gametocyte - *Plasmodium falciparum*

The micro-wave oven permits a rapid drying of thick blood smears classically used for parasitological malaria diagnosis. In order to evaluate this type of drying on the microscopic reading, a study was carried out in an hyperendemic area of malaria with 382 asymptomatic volunteers of all ages. Two thick smears were made for each volunteer, one immediately dried with a micro-wave oven for one minute, the second dried in the open air without any intervention. A single microscopist examined all the thick smears. The observation of *Plasmodium falciparum* trophozoites differed significantly between the two methods, the prevalence was 50% by normal drying versus 41% by the micro-wave oven. The geometric mean of the trophozoite number for positive thick smears was significantly lower with the micro-wave oven. When the parasitological density with normal drying was lower than 200 trophozoites/ μ l of blood, 54% of results were wrongly negative with the micro-wave oven. On the other hand, the observation of *P. falciparum* gametocytes was significantly facilitated after drying with the micro-wave oven; the prevalence was 8% with normal drying versus 12% by micro-wave oven.

In conclusion, the use of the micro-wave oven for the drying of thick smears is not recommended for malaria diagnosis although it improves the observation and counting of *P. falciparum* gametocytes.

Résumé :

Le four à micro-ondes permet de sécher rapidement les gouttes épaisses de sang classiquement utilisées pour le diagnostic parasitologique du paludisme. Dans le but d'évaluer l'influence du séchage des gouttes épaisses par le four à micro-ondes sur la lecture des gouttes épaisses, une étude a été menée en zone d'hyperendémie paludéenne sur 382 volontaires asymptomatiques de tous âges. Deux gouttes épaisses ont été réalisées pour chaque volontaire, l'une immédiatement séchée au four à micro-ondes pendant une minute, l'autre séchée à l'air libre sans intervention. Le même microscopiste a examiné toutes les gouttes épaisses. L'observation des trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* a été significativement différente entre les deux méthodes avec une prévalence de 50 % avec le séchage normal et de 41 % avec le séchage au four à micro-ondes. La moyenne géométrique du nombre de trophozoïtes pour les gouttes épaisses positives a été significativement inférieure avec le four à micro-ondes. Quand la densité parasitaire en séchage normal était inférieure à 200 trophozoïtes/ μ l de sang, 54 % des résultats ont été faussement négatifs avec le four à micro-ondes. Par contre, l'observation des gamétocytes de *P. falciparum* a été significativement favorisée par le séchage au four à micro-ondes avec une prévalence de 8 % en séchage normal contre 12 % en séchage au four à micro-ondes.

En conclusion, l'usage du four à micro-ondes pour le séchage des gouttes épaisses n'est pas conseillé dans le cas du diagnostic de paludisme, mais il constitue une technique intéressante pour améliorer le dépistage et le dénombrement des gamétocytes de *P. falciparum*.

Mots-clés : Paludisme - Microscopie - Four à micro-ondes - Goutte épaisse - Trophozoïte - Gamétocyte - *Plasmodium falciparum*

Introduction

La technique de base pour le diagnostic parasitologique du paludisme reste la goutte épaisse. CHEVALIER *et al.* (2) rapportent avoir utilisé un four à micro-ondes pour réduire le temps de séchage des gouttes épaisses. Toutefois, on ignore si ce séchage rapide influence l'examen microscopique de la goutte épaisse, en particulier s'il peut

faciliter l'identification microscopique des gamétocytes de *Plasmodium falciparum* en fixant leur morphologie avant la phase d'activation pour les femelles et d'activation-exflagellation pour les mâles. Une étude a été menée pour connaître l'influence éventuelle de ce type de séchage sur la lecture des gouttes épaisses en analysant séparément les observations de trophozoïtes et de gamétocytes de *P. falciparum*.

Matériels et méthodes

Une enquête transversale a été réalisée en avril 1994 parmi des habitants d'Eboulawa dans le sud du Cameroun. Elle a porté sur toutes les tranches d'âge d'une population asymptotique lors de l'examen. Deux gouttes épaisses ont été réalisées simultanément pour chaque individu à partir d'un prélèvement sanguin par piqûre au bout d'un doigt. Une goutte épaisse a séché spontanément à température ambiante et à l'air libre, et l'autre goutte épaisse a été immédiatement placée dans un four à micro-ondes (puissance restituée maximale de 600 watts, fréquence des ondes à 2450 MHz), thermostat sur moyen, pendant une minute en présence de 100 ml d'eau nécessaire au bon fonctionnement du four. Dans le laboratoire de l'OCEAC à Yaoundé, les deux séries de gouttes épaisses ont été colorées au Giemsa à 10 % pendant 20 minutes. Les lames ont été lues une seule fois par un même microscopiste qui ignorait le traitement subi par chaque goutte épaisse. La lecture a été faite à l'objectif 100x à immersion pour 200 globules blancs, soit environ 0,025 µl de sang, avec un seuil de détection de 40 parasites/µl pour une estimation de 8000 globules blancs par µl de sang. L'espèce plasmodiale a toujours été notée. Le stade plasmodial a été observé pour *P. falciparum* mais pas pour *P. malariae*.

L'analyse statistique a débuté par le calcul du coefficient de corrélation r des densités parasitaires obtenues par les deux méthodes de séchage des gouttes épaisses. La comparaison des pourcentages de réponses positives pour chacune des deux méthodes a été effectuée par le test de l'écart-réduit en tenant compte de l'appariement des séries. Les moyennes parasitaires ont été présentées sous forme de moyennes géométriques (Log_e). La comparaison des moyennes de deux séries appariées a été effectuée par la méthode des couples avec le test de l'écart-réduit. La comparaison des moyennes de deux séries non appariées a été effectuée par le test non paramétrique U de MANN-WHITNEY. Dans tous les cas, le seuil de signification a été fixé à 5 %.

Résultats

Les résultats ont porté sur 382 paires de gouttes épaisses. Quelle que soit la méthode de séchage, au moins un *Plasmodium* a été observé chez 235 individus (61,5 %) qui se répartissaient en 188 (49,2 %) porteurs de *P. falciparum*, en 4 (1,0 %) porteurs de *P. malariae* et en 43 (11,3 %) porteurs des deux espèces plasmodiales. Les densités maximales observées par µl de sang ont été de 13 560 trophozoïtes de *P. falciparum*, de 400 gamétocytes de *P. falciparum* et de 760 *P. malariae*.

Dans les deux séries de séchage des gouttes épaisses, la corrélation des lectures de trophozoïtes de *P. falciparum*, de gamétocytes de *P. falciparum* et des divers stades de *P. malariae* a été hautement significative (respectivement $r = 0,73$, $r = 0,78$ et $r = 0,43$; $p < 10^{-6}$ dans les trois cas).

Trophozoïtes de *P. falciparum* - La prévalence des trophozoïtes de *P. falciparum* a été de 50,3 % avec le séchage normal et de 41,1 % avec le séchage au four à micro-ondes ($\chi^2 = 6,46$; ddl = 1; $p = 0,01$); le séchage au four à micro-ondes permet donc moins fréquemment la détection d'au moins un trophozoïte (tableau I).

La moyenne géométrique des densités parasitaires des 66 gouttes épaisses positives en séchage normal et négatives en séchage au four à micro-ondes était de 110 trophozoïtes/µl et celle des 31 négatives en séchage normal et positives en séchage

Tableau I.

Répartition qualitative pour les 382 paires de gouttes épaisses séchées soit normalement à l'air libre, soit au four à micro-ondes, en fonction du résultat de lecture.

Qualitative distribution of the 382 pairs of thick smears dried either normally in the open air or in a micro-wave oven, according to results recorded.

	+	-	+	-	test statistique
séchage normal					
séchage au micro-ondes	+	-	+	-	
trophozoïtes de <i>P. falciparum</i>	126	66	31	159	= 3,55 ; $p < 10^{-3}$
gamétocytes de <i>P. falciparum</i>	18	13	29	322	= 2,47 ; $p = 0,02$
tous stades de <i>P. malariae</i>	23	12	12	335	ns

ns = non significatif

au four à micro-ondes était de 81,3 trophozoïtes/µl (test U de MANN-WHITNEY non significatif; $p = 0,21$). Sur ces effectifs, la comparaison des pourcentages de ces résultats discordants, 17 % (66/382) vs 8 % (31/382), a montré un meilleur dépistage après séchage normal (tableau I).

En ne considérant que les gouttes épaisses positives, la moyenne géométrique des trophozoïtes de *P. falciparum* décelés microscopiquement a été inférieure de 6 % avec le four à micro-ondes (tableau II). Parmi ces gouttes épaisses, celles avec une densité inférieure à 1000 trophozoïtes/µl dans chacune des deux méthodes de séchage (soit avec un maximum de 24 trophozoïtes observés) étaient au nombre de 90 et présentaient une densité moyenne supérieure avec le séchage normal (184,9 contre 165,7; $t = 2,04$, $p = 0,05$).

Tableau II.

Comparaison des densités parasitaires pour les 382 paires de gouttes épaisses séchées normalement à l'air libre et séchées au four à micro-ondes.

Comparison of parasitic densities in the 382 pairs of thick smears dried either normally in the open air or in a micro-wave oven.

	séchage normal	séchage au micro-ondes	moyenne*	test statistique
trophozoïtes de <i>P. falciparum</i>	246,4	231,4	= 2,18 ; $p = 0,03$	
gamétocytes de <i>P. falciparum</i>	57,3	51,5	= 1,49 ; $p = 0,14$ ns	
tous stades de <i>P. malariae</i>	96,9	120,2	= 0,77 ; $p = 0,44$ ns	

ns = non significatif

* moyenne géométrique/µl de sang pour les seules valeurs non nulles

Gamétocytes de *P. falciparum* - La prévalence des gamétocytes de *P. falciparum* a été de 8,1 % avec le séchage normal et de 12,3 % avec le séchage au four à micro-ondes. La comparaison du pourcentage des paires discordantes, 3 % (13/382) positives en séchage normal et négatives au séchage micro-ondes vs 8 % (29/382) négatives en séchage normal et positives au séchage au four à micro-ondes, a montré un meilleur dépistage après séchage au four à micro-ondes (tableau I).

Les analyses portant sur les moyennes des densités observées sur l'ensemble des lames positives (tableau II) et sur les moyennes des densités pour les lames positives dans les deux techniques ($n = 18$; test U de MANN-WHITNEY, $p = 0,94$) n'ont pas mis en évidence de différence significative.

P. malariae - La prévalence de *P. malariae* a été de 9,2 % avec les deux types de séchage des gouttes épaisses (tableau I). La moyenne des densités n'était pas significativement différente entre les deux méthodes de séchage (tableau II).

Discussion

Nos résultats montrent que le séchage des gouttes épaisses au four à micro-ondes est moins performant dans la décelabilité microscopique des trophozoïtes de *P. falciparum*. Ceci concerne essentiellement les faibles densités parasitaires. Ces résultats conduisent à recommander d'éviter le séchage des gouttes épaisses au four à micro-ondes quand il s'agit de réaliser un diagnostic de paludisme. Il semble que le four à micro-

ondes entraîne une destruction des caractéristiques morphologiques de certains trophozoïtes, peut-être due à l'altération ultrastructurale du réticulum endoplasmique des cellules soumises à des micro-ondes (1). De telles altérations existent probablement aussi chez *P. malariae*, mais la reconnaissance microscopique de ces formes est largement basée sur la présence de pigments dont l'aspect reste inchangé après passage au four à micro-ondes.

En ce qui concerne la reconnaissance des gamétocytes de *P. falciparum*, nos résultats démontrent l'avantage du séchage au four à micro-ondes. Cet effet semble explicable par la rapidité du séchage qui empêche l'activation des gamétocytes mâles et femelles. La morphologie caractéristique, dite "en banane", du gamétocyte est alors fixée, facilitant ainsi sa reconnaissance microscopique. Au contraire, avec un séchage normal, nettement plus lent car dépassant habituellement une dizaine de minutes, l'activation débute, le gamétocyte devient sphérique et la distribution des granules de pigments se modifie (3), le gamétocyte mâle peut même exflageller ; ces gamétocytes activés sont d'identification délicate et nombre d'entre eux restent non comptabilisés. Dans ces conditions, il est logique qu'avec la méthode du four à micro-ondes, qui est plus sensible, la densité moyenne soit inférieure (quoique de façon non significative) à cause du plus grand nombre de sujets très faiblement positifs. Par ailleurs, la détermination du sexe des gamétocytes a été beaucoup plus aisée avec le four à micro-ondes du fait de la fixation des caractéristiques morphologiques de chacun des deux sexes. Les avantages manifestes du four à micro-ondes pour l'identification et la détermination du sexe des gamétocytes

de *P. falciparum* devraient pouvoir être utilisés quand le dépistage des porteurs de gamétocytes est utile, notamment dans le domaine des recherches relatives à un vaccin antipaludique bloquant la transmission.

Conclusion

L'usage du four à micro-ondes pour le séchage des gouttes épaisses n'est pas conseillé pour le diagnostic de paludisme, car il rend indiscernable certains trophozoïtes de *P. falciparum*. Par contre, concernant les gamétocytes de *P. falciparum*, il améliore la sensibilité de la goutte épaisse et facilite leur dépistage, leur dénombrement et la détermination de leur sexe.

Remerciements

Nous remercions Rose NYAMBAM pour sa parfaite assistance technique.

Références bibliographiques

1. BOUCHET F, BOULARD Y, BACCAM D & LEGER N - Ultrastructural studies of alterations induced by microwaves in *Toxocara canis* eggs: prophylactic interest. *Z Parasitenkd*, 1986, **72**, 755-764.
2. CHEVALIER B, CAVALLO JD, BAUDET JM, SAMSON T, GROS P *et al.* - Diagnostic rapide du paludisme. Le four à micro-ondes. *Bull Soc Path Ex*, 1992, **85**, 223-225.
3. SINDEN RE, CANNING EU, BRAY RS & SMALLEY ME - Gametocyte and gamete development in *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the Royal Society London*, 1978, B **201**, 375-399.