

# Chapitre 1

## Parasitologie : techniques élémentaires

### Examens directs

#### Indications

La recherche microscopique de parasites sera orientée par la nature du prélèvement. Elle s'applique à un grand nombre de parasites, sous diverses formes : formes végétatives et kystes de parasites unicellulaires, larves et œufs d'helminthes dans les selles ; œufs de schistosomes dans les urines ; formes végétatives de *Trichomonas* dans les urines, les sécrétions vaginales ou la salive ; formes végétatives de *Trichomonas*, œufs de *Paragonimus*, larves d'anguillules, scolex ou crochets d'*Echinococcus* sur des prélèvements respiratoires (expectoration, aspiration bronchique et lavage bronchiolo-alvéolaire [LBA]) ; *Giardia*, cryptosporidies et autres coccidies ou amibes dans les biopsies digestives (duodénales et coliques) ; œufs de schistosomes dans les biopsies rectale et vésicale, etc. Cet examen pourra être complété par la mise en œuvre de colorations spécifiques (voir au chapitre 1 « Techniques de coloration »).

#### Mise en œuvre

L'examen microscopique direct d'un échantillon ou du culot de centrifugation peut être réalisé :

- directement entre lame et lamelle (selles liquides, prélèvements respiratoires et urines) ;
- après adjonction de sérum physiologique (selles, biopsies des muqueuses rectale, vésicale et digestive) ;

- après utilisation de colorants (lugol, ou merthiolate-iode-formol [MIF], ou réactif commercialisé contenant de l'iode) pour les selles ;
- après utilisation d'agents éclaircissants (gomme au chloral ou lactophénol) pour les biopsies rectales ou vésicales.

Il doit être effectué dès que possible (moins de 4 heures après le prélèvement) à partir des selles non fixées fraîchement émises et sur les biopsies duodénales et coliques pour la recherche de formes végétatives de *Giardia intestinalis* et d'*Entamoeba histolytica* (trophozoïtes).

### Techniques

#### Examen direct des selles

Monter une goutte de suspension fécale entre lame et lamelle en veillant à effectuer une préparation mince pour faciliter la lecture (figure 1.1).

Si les selles ne sont pas émises au laboratoire, il est conseillé d'en fixer une partie dès l'émission à l'aide de merthiolate-formol (MF) [1], d'acide acétique-acétate de sodium-formol (*Sodium Acetate-Acetic Acid-Formaldehyde* [SAF]) [2], ou de formol à 10 %, d'alcool polyvinyle, etc. La coloration obtenue avec le MF est généralement suffisante pour le diagnostic d'espèce des amibes (voir au chapitre 1 « Techniques de coloration » et « Méthodes de fixation-conservation »).

Un examen direct en contraste de phase permettra de mettre en évidence rapidement les oocystes de coccidies (notamment *Cryptosporidium* spp.).

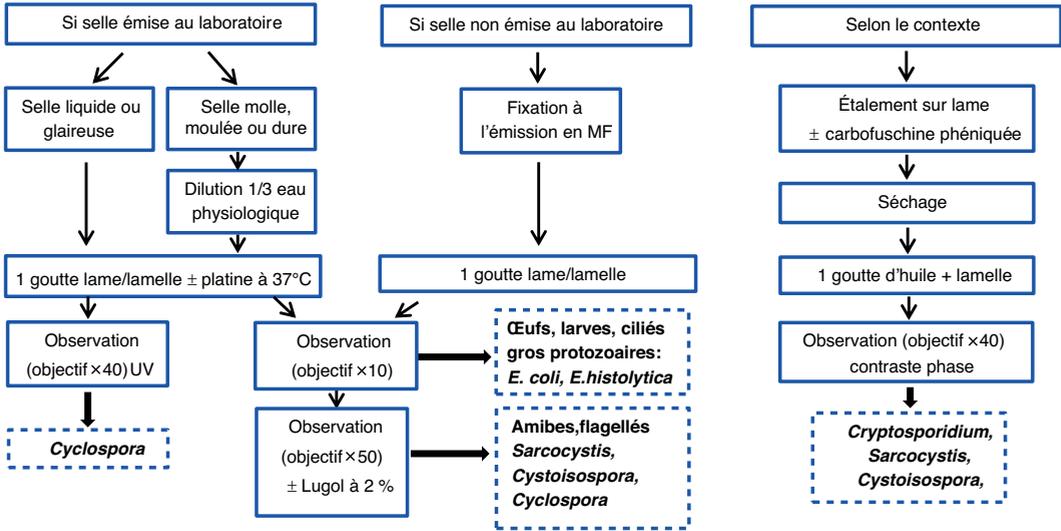


Figure 1.1. Conduite à tenir devant une selle (examen direct).

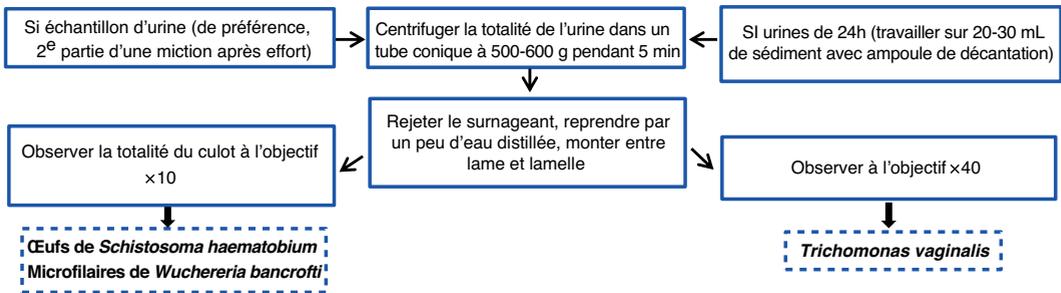


Figure 1.2. Conduite à tenir devant une urine (examen direct).

### Examen direct en contraste de phase

- Étaler la selle sur une lame directement ou dans une goutte de carbofuschine phéniquée (technique de Heine ; voir au chapitre 1 « Techniques de coloration » [3]).
- Laisser sécher et déposer immédiatement une goutte d'huile à immersion. Recouvrir d'une lamelle.
- Observer à l'objectif  $\times 40$  en contraste de phase : les cryptosporidies et autres coccidies apparaissent réfringentes sur le fond gris de la préparation.

L'observation en épifluorescence à 340-360 nm permet de détecter facilement les oocystes de *Cyclospora cayetanensis* et de *Cystoisospora belli* et les sporocystes de *Sarcocystis hominis* qui présentent une fluorescence bleue [4].

### Examen direct des urines

Cet examen s'effectue pour la recherche des œufs de schistosomes, directement sur le culot urinaire

d'une miction complète (ou au minimum 50 mL), obtenu par centrifugation à 500-600 g pendant 5 minutes (figure 1.2).

La recherche peut également se faire par observation directe d'un filtre type polycarbonate après filtration des urines à l'aide d'une seringue montée sur un porte-filtre (voir au chapitre 5 « Examen parasitologique des prélèvements génito-urinaires »).

### Examen direct des sécrétions vaginales

Cet examen s'effectue directement sur les sécrétions recueillies à la pipette ou sur les sécrétions vaginales prélevées sur écouvillon avec milieu de transport (figure 1.3).

### Examen d'un prélèvement respiratoire

Il s'effectue de préférence sur le culot de centrifugation d'un LBA, d'une aspiration ou d'une

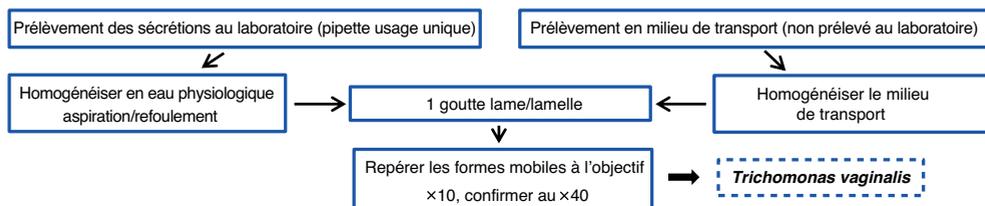


Figure 1.3. Conduite à tenir devant des sécrétions vaginales (examen direct).

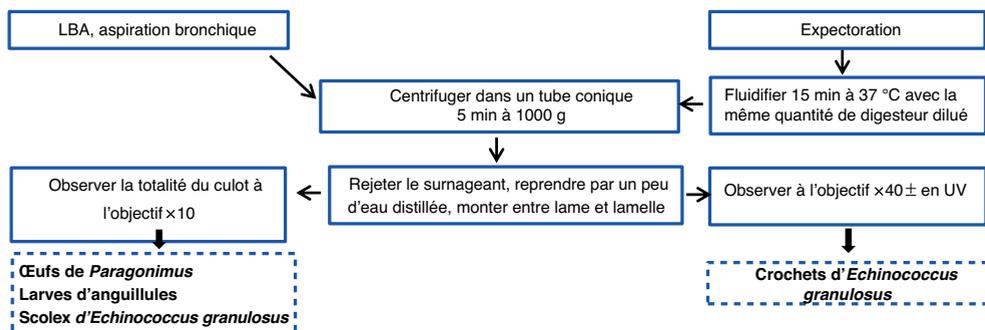


Figure 1.4. Conduite à tenir devant un prélèvement respiratoire (examen direct).

expectoration (figure 1.4). Pour les échantillons visqueux, la centrifugation sera réalisée après adjonction d'un agent mucolytique. En cas de suspicion d'hydatidose pulmonaire (vomique hydatique), l'observation du culot en épifluorescence à 340-360 nm facilite la détection des crochets qui apparaissent bleus fluorescents.

### Biopsies des muqueuses rectale, vésicale et digestive (duodénale et colique)

Les examens visant à rechercher les formes végétatives de parasites unicellulaires doivent être effectués le plus rapidement possible après réalisation

du prélèvement (figure 1.5). Pour la recherche des œufs de schistosomes, la préparation peut être éclaircie à la gomme au chloral ou au chloral lactophénol en chambre humide [5].

## Frottis

### Frottis sanguin

#### Indications

Elles concernent principalement la recherche des hématozoaires (*Plasmodium* spp., *Babesia* spp.),

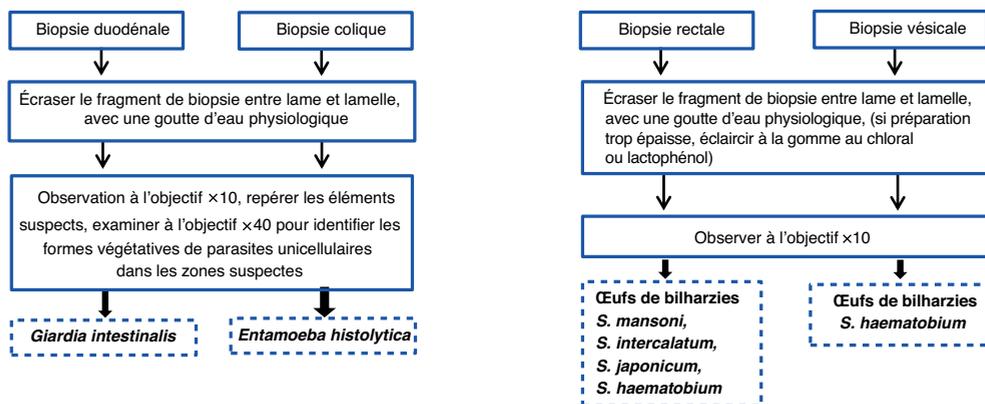


Figure 1.5. Conduite à tenir devant une biopsie des muqueuses rectales, vésicales et digestives (examen direct).

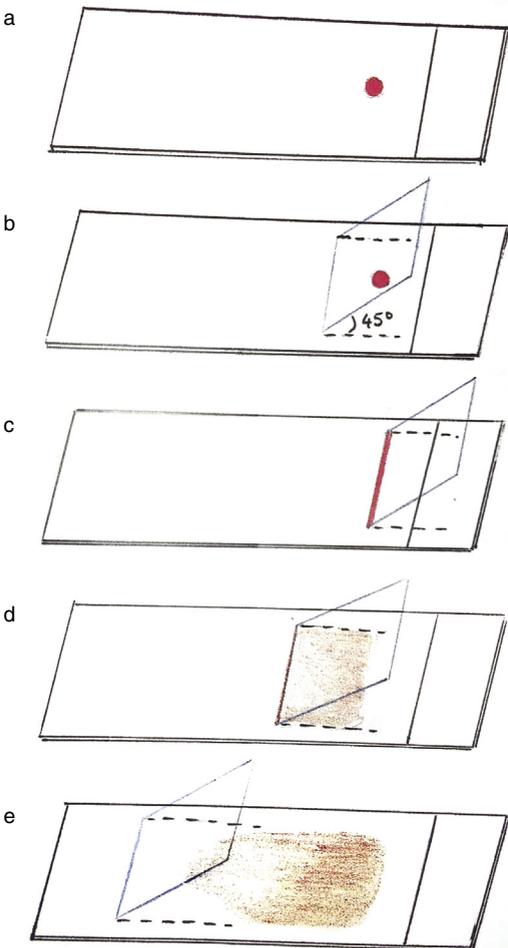
des trypanosomes et des microfilaires, mais également certaines bactéries spirochètes (*Borrelia* spp.).

### Mise en œuvre

Le frottis mince est effectué à partir de sang prélevé par piqûre au bout du doigt (vaccinostyle stérile) ou par ponction veineuse sur anticoagulant (généralement EDTA ou ACD).

### Détails techniques

Déposer une petite goutte de sang de 2 à 3  $\mu\text{L}$  sur une lame porte-objet (figure 1.6a). Poser ensuite une lamelle sur la lame en laissant un angle de  $45^\circ$  (figure 1.6b) et revenir vers la goutte de sang.



**Figure 1.6.** Étapes de réalisation d'un frottis sanguin.  
Source : d'après Petithory JC, Ardoin-Guidon F. Parasites sanguins.  
Cahier de formation, biologie médicale 2001 ; (23) : 1-357.

Laisser diffuser le sang par capillarité le long de l'arête de la lamelle (figure 1.6c). Étaler le sang en couche mince, uniforme, par un geste régulier continu, ni trop rapide ni trop lent (figure 1.6d) ; ce mouvement, effectué d'un seul tenant, doit entraîner la gouttelette de sang derrière la lamelle et non la chasser. Étaler le plus uniformément et le plus finement possible de façon à obtenir des franges en queue de frottis (figure 1.6e). Le frottis sera séché rapidement en secouant énergiquement la lame.

### Précautions à prendre

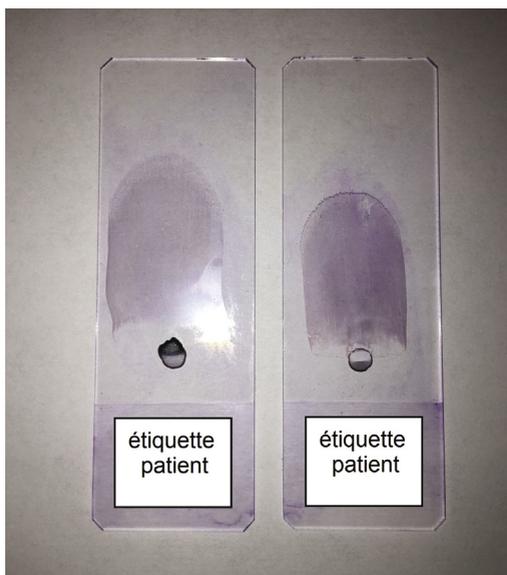
- S'assurer de l'homogénéité du prélèvement sanguin (homogénéiser par retournements doux).
- Effectuer l'étalement très rapidement après le dépôt de la goutte de sang sur la lame, avant qu'elle ne sèche.
- Utiliser des lames à bords rodés et avec une extrémité en verre dépoli (permet l'identification de la lame). Les lames doivent être propres et non grasses (dégraisser au méthanol si besoin).
- Utiliser une lamelle moins large que la lame afin que les bords du frottis soient lisibles.
- Sécher les frottis à l'air très rapidement après étalement afin d'éviter la déformation des hématies et la rétraction des leucocytes. Ne pas utiliser de source de chaleur.

### Critères de qualité d'un frottis

Un frottis bien réalisé ne recouvre pas forcément toute la longueur de la lame, mais est continu, sans « trou », avec une queue d'étalement arrondie et régulière (en flamme) (figure 1.7). Les bords du frottis sont distants des bords de la lame, donc accessibles à l'observation microscopique. Il doit comporter une plage de lecture suffisante avec des hématies non chevauchantes.

### Délai de réalisation et de conservation

Pour les échantillons prélevés sur tube EDTA, les frottis seront réalisés dans les 4 heures. Au-delà, les parasites s'altèrent, les hématies se modifient, rendant le diagnostic d'espèce difficile en cas de paludisme. Les frottis sanguins non colorés se conservent moins d'un mois. L'utilisation de frottis positifs comme contrôle interne de la qualité (CIQ) de coloration nécessite donc de les



**Figure 1.7.** Frottis de bonne qualité.

Source : Collection ANOFEL, CHU de Montpellier et CHU de Dijon.

renouveler régulièrement ou de les conserver fixés au méthanol, à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Une fois colorés, les frottis sanguins ont une conservation illimitée dans le temps à condition d'éliminer l'huile d'immersion utilisée pour la lecture au microscope (dégraissage par du solvant). Pour une conservation optimale, luter les lames avec une lamelle collée par un milieu de montage.

### Causes d'erreurs dans la réalisation d'un frottis

Les principales causes d'erreurs sont résumées dans le [tableau 1.1](#).

**Tableau 1.1.** Principales causes d'erreur dans la réalisation d'un frottis.

Causes d'erreur	Conséquences sur le frottis
Lames mal dégraissées	Trous
Lames sales, poussiéreuses	Trainées
Irrégularités du mouvement	Stries
Appui sur la lamelle	Stries et franges importantes
Angle trop aigu	Frottis trop fin et/ou trop long avec franges
Angle trop obtus	Frottis trop épais et/ou trop court
Goutte non étalée en entier	Frottis non représentatif du sang
Arrêt du mouvement avant épaissement du sang	Barre épaisse en bout de frottis

## Frottis de moelle osseuse

### Indications

Recherche de parasites sanguicoles intracellulaires (leishmanies, toxoplasmes), plus rarement de champignons intracellulaires, notamment dimorphiques (histoplasmes) après fixation et coloration de type MGG.

### Mise en œuvre

La moelle osseuse est prélevée par ponction sternale ou iliaque et recueillie dans un tube contenant de l'EDTA ou du citrate de sodium. Deux techniques d'étalement de moelle osseuse sont possibles.

### Détails techniques

- Frottis par étalement : étaler une goutte déposée sur une lame à l'aide d'une lamelle inclinée à  $45^{\circ}$  (comme pour le frottis sanguin).
- Méthode d'écrasement des « grains » : prélever avec l'extrémité d'une lame un ou plusieurs « grains » de moelle osseuse et les placer au tiers supérieur d'une lame. Prendre une lame propre et la faire glisser parallèlement sur la première sans écraser trop fortement, jusqu'à l'autre extrémité de la lame. Les lames sont séchées à l'air, sans ventilation ni agitation ni source de chaleur. Les critères de qualité des frottis, précautions à prendre et délais de réalisation et conservation sont les mêmes que pour les frottis sanguins.

## Frottis de ganglion

### Indications

Recherche selon le contexte de trypanosomes et de leishmanies principalement, exceptionnellement de microfaires, de toxoplasmes ou d'histoplasmes, après coloration de type MGG.

### Mise en œuvre

Pour la recherche de *Trypanosoma brucei gambiense* ou *T. b. rhodesiense*, un examen extemporané à l'état frais du suc ganglionnaire, réalisé entre lame et lamelle, permet d'observer les parasites mobiles. Dans les autres cas, l'échantillon peut être placé dans un flacon stérile ou laissé dans la seringue ayant servi au prélèvement. Le

volume prélevé étant généralement faible, le frottis doit être fait rapidement pour éviter tout dessèchement. Les frottis de suc ganglionnaire seront séchés à l'air. Pour les fragments tissulaires, des empreintes ou appositions ganglionnaires sont réalisées à partir d'une section d'un fragment à l'état frais apposé sur des lames.

Les frottis ganglionnaires sont fixés au méthanol puis colorés au MGG ou coloration équivalente. L'observation se fait au microscope à faible grossissement puis à l'immersion (objectifs  $\times 50$  et  $\times 100$ ).

## Frottis de selles

### Indications

Recherche de microsporidies et de coccidies (cryptosporidies, *Cystoisospora belli* et *Cyclospora cayatanensis*) dans les selles par colorations spécifiques. Les frottis sont aussi réalisés pour la coloration permanente des kystes et des formes végétales d'amibes et de flagellés intestinaux.

### Mise en œuvre

Déposer une goutte de sérum physiologique sur la lame, puis étaler une petite quantité de selles prélevée à l'öse en plusieurs endroits (selles moulées ou pâteuses), ou bien déposer directement une goutte (environ 50  $\mu\text{L}$ ) de selles liquides. Réaliser un mélange homogène en tournant l'öse sur la lame.

Les frottis peuvent être fixés avant séchage de l'étalement (frottis humides) ou après séchage (frottis secs).

Frottis secs : laisser sécher à température ambiante pendant au minimum une heure. Un séchage à 60 °C au maximum pendant 5 à 10 minutes est possible pour certaines colorations (recherche de cryptosporidies).

Il est important que le frottis de selles ne soit pas trop épais (éviter des superpositions gênantes) et adhère à la lame (lame dégraissée), en alternant les zones minces et les zones plus épaisses. L'épaisseur du frottis dépend de la consistance de la selle et de la vitesse d'étalement : plus le mouvement est lent, plus le frottis est mince.

La selle peut avoir été fixée au préalable par du formol à 10 %, du SAF, du Bouin ordinaire ou du Bouin alcoolique (3 volumes de fixateur pour 1 volume de selles) (voir ci-dessous « Techniques de coloration »). Ces frottis se conservent plusieurs mois.

## Frottis vaginal

### Indications

Recherche de parasites (*Trichomonas vaginalis*) dans l'exsudat vaginal après coloration. Cette technique permet également la mise en évidence des levures.

### Mise en œuvre

Les prélèvements se font à l'écouvillon ou par aspiration des sécrétions vaginales. Le frottis sur lame consiste à dérouler l'écouvillon le long de la lame. Sécher rapidement le frottis à l'air. Les frottis sont ensuite colorés au MGG ou au Giemsa.

## Techniques de coloration

Les colorations sont une étape importante de la réalisation de l'examen parasitologique et de nombreuses variantes sont proposées en fonction des parasites recherchés et de la nature du prélèvement biologique. Certaines de ces colorations sont également adaptées à la détection de champignons. Ces colorations peuvent nécessiter, en amont, la réalisation de frottis ou d'autres étalements et des méthodes de fixation associées (voir dans ce chapitre « Frottis » et « Méthodes de fixation-conservation ») et, en aval, des méthodes de conservation des préparations ainsi colorées. Les principales colorations en fonction du type de prélèvement et des parasites recherchés sont synthétisées dans le [tableau 1.2](#).

### Dégraissage et conservation des lames

#### Dégraissage et nettoyage des lames

Si de l'huile à immersion a été déposée sur la lame, il est nécessaire de la nettoyer avant de la conserver. Pour cela, plonger la lame dans du xylène ou de l'acétate d'éthyle. Ces produits peuvent être remplacés par un solvant à base de d-Limonène moins toxique et commercialisé.

#### Conservation des lames par lutage

##### À la paraffine

Faire fondre la paraffine dans une cupule de verre ou de porcelaine à l'étuve à 56 °C.

La déposer le long des quatre côtés de la lamelle avec un fer à luter ou une anse de platine chauffée et plongée dans la paraffine. Vérifier l'étanchéité au centre de la lamelle avec une pointe de crayon.

#### Au vernis à ongles

Après avoir recouvert l'étalement de selles avec une lamelle, laisser sécher quelques instants afin d'éliminer toute trace d'humidité sur la lame et sur la lamelle. Déposer au pinceau une mince pellicule de vernis le long des quatre côtés de la lamelle en débordant largement et laisser sécher. Vérifier l'étanchéité au centre de la

lamelle avec une pointe de crayon. Appliquer éventuellement une seconde couche de vernis.

#### Produits de montage

Ce terme regroupe tous les produits commercialisés qui permettent de fixer la préparation sur une lame avec une lamelle. Ces produits sont la plupart du temps des résines semi-synthétiques associées à du xylène. Des problèmes peuvent survenir au cours de la conservation des lames traitées par ces produits en raison de leur opacité, de leur dureté et de leur coloration.

**Tableau 1.2.** Récapitulatif des principales colorations en fonction du type de prélèvement et des parasites recherchés.

Parasites recherchés	Prélèvements	Colorations	Résultats de la coloration
Amibes Flagellés	Selles, biopsies digestives, liquides biologiques	MIF	Kystes mûrs clairs (reflets verdâtres) sur fond rose, noyaux nets fixés par le formol et parfois colorés par l'iode. Puis l'éosine pénètre à l'intérieur des kystes : la membrane nucléaire devient rouge foncé à noire, la chromatine n'est pas colorée et apparaît par sa seule réfringence, le cytoplasme est rouge.
		Hématoxyline ferrique	Structures nucléaires colorées en noir intense sur fond incolore ou à peine coloré
		Coloration de Bailenger-Faraggi	Cytoplasme et cristalloïdes colorés en rouge, structures nucléaires en noir
		Lugol à 1 %	Visualisation des éléments d'identification des kystes (vacuole, noyau, caryosome)
		Noir chlorazol	Noyaux et caryosome, corps sidérophiles et membrane cellulaire vont du vert clair au noir, fond de la préparation gris-vert (frottis mince), ou plus ou moins rouge (frottis épais)
		APV-Trichrome	Coloration des formes végétatives. Noyaux colorés en rose avec structures nucléaires très nettes
Cryptosporidies, <i>Cystoisospora belli</i> et <i>Cyclospora cayetanensis</i>	Selles, biopsies digestives, liquides biologiques	Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz	<i>Cryptosporidium</i> spp. : oocystes colorés en rouge vif pouvant renfermer des sporozoïtes agencés autour d'un corps résiduel arrondi
		Coloration de Heine	<i>En microscopie à fond clair</i> : oocystes non colorés et très réfringents sur fond rose de la préparation <i>En microscope à contraste de phase</i> : oocystes non colorés très brillants avec un point rouge central, sur fond noir
		Technique de Kinyoun	Oocystes (acido-résistants) colorés en rose ou rouge brillant
Amibes libres	Prélèvements divers	Uvitex® 2B, calcofluor white	Coloration bleue fluorescente des kystes et des formes végétatives
Parasites sanguicoles ( <i>Plasmodium</i> spp., <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Babesia</i> spp., <i>Trypanosoma</i> spp., <i>Leishmania</i> spp., Filaires)	Sang	Giemsa rapide ou lent sur frottis ou goutte épaisse	Cytoplasme bleu, masses nucléaires rouge rubis ou grenat, vacuole nutritive incolore, taches de Maurer rouge brique et granulations de Schüffner orange ou roses
		May-Grünwald Giemsa	Cytoplasme des parasites coloré en bleu, noyau en rouge, vacuole incolore

## Indications

Pour les selles, les colorations sont effectuées pour détecter et identifier spécifiquement les parasites unicellulaires et les microsporidies. Pour le sang, elles permettent la mise en évidence et l'identification des parasites unicellulaires et leur quantification par l'estimation d'une parasitémie, ou la mise en évidence et l'identification des microfilaires. Elles sont aussi mises en œuvre pour l'analyse d'exsudats, de liquides de ponction ou d'apposition de biopsies de divers tissus. Outre la détection des parasites au sein de ces prélèvements, les colorations panoptiques de type MGG permettent de détecter des éléments fongiques et d'évaluer la qualité et la nature des cellules.

Les colorations sont plus ou moins complexes à réaliser. À noter que certaines nécessitent l'emploi de produits toxiques, ce qui doit être pris en considération dans le choix de la technique à privilégier.

Le choix de la coloration doit donc se faire également selon les critères suivants :

- la nature du prélèvement biologique à examiner (selles, sang, biopsies, liquides de ponction) ;
- le délai de prise en charge du prélèvement (les formes végétatives des amibes sont très fragiles et ne pourront donc pas être recherchées dans des selles émises depuis plusieurs heures) ;
- les parasites recherchés et leur éventuelle affinité tinctoriale ;
- la facilité de sa réalisation (type de réactifs, nombre d'étapes de la coloration, durée de réalisation) ;
- la quantité de prélèvements à traiter dans une même série, surtout pour les techniques les plus longues et les plus complexes ;
- la possibilité de les automatiser.

## Mise en œuvre

La préparation du prélèvement avant coloration est une étape primordiale pour la réalisation de colorations de bonne qualité. Le mode d'étalement des frottis ainsi que les différentes techniques de fixation pour la réalisation des colorations de frottis sont décrits dans le [chapitre 1](#) au paragraphe « Frottis ». D'une manière générale, les colorations utilisant des solvants doivent être

effectuées sous une hotte chimique. L'élimination des solvants et des colorants doit se faire en respectant la réglementation en vigueur. La conservation des réactifs doit également se faire dans une armoire dédiée et adaptée pour les solvants et produits inflammables.

### Réglementation

Les colorants, solvants et fixateurs sont soumis aux dispositions du Code du travail relatives à la prévention des risques chimiques (articles L. 4412-1 et R. 4412-1 à R. 4412-160), distinguant les agents chimiques dangereux (articles R. 4412-1 à R. 4412-58) et les agents chimiques classés CMR (cancérogènes, mutagènes, reprotoxiques) (articles R. 4412-59 à R. 4412-93).

Le mode de préparation des différents réactifs utilisés pour les colorations est détaillé ci-dessous. Toutefois, il est préférable d'utiliser, quand ils sont disponibles, des réactifs commercialisés et prêts à l'emploi pour éviter la manipulation de produits toxiques et maintenir une qualité constante des préparations utilisées. Il est aussi préférable de contrôler ces réactifs commercialisés avant utilisation par la coloration de lames témoins (commerciales ou préparées au laboratoire). Les contrôles de qualité externes (évaluation externe de la qualité [EEQ]) seront choisis non colorés de préférence afin de vérifier l'étape de coloration.

*Durée de conservation des colorants* : les délais sont très variables : plus d'un an pour le réactif de Kohn, 15 jours après ouverture pour le RAL 555 MGG commercialisé, de quelques heures à 24 heures pour le Giemsa dilué selon les recommandations des fournisseurs. La date de fin d'utilisation devra être définie et figurer sur les réactifs.

Enfin, la lecture de certaines colorations nécessite l'utilisation d'un microscope adapté, en particulier la lecture des colorations utilisant un fluorochrome.

## Colorations des parasites sanguicoles et tissulaires

Les données relatives à l'infection à *Plasmodium* figurent également dans le [chapitre 26](#).