

Chapitre 3

Echantillonnage des endoparasites



Méthodes de collectes des échantillons de Kystes hydatique

L'échinococcose humaine est une zoonose. Causée par des parasites, les ténias du genre *Echinococcus*, elle se décline en 4 formes:

- l'échinococcose cystique, ou hydatidose, due à *Echinococcus granulosus*;
- l'échinococcose alvéolaire, due à *E. multilocularis*;

- l'échinococcose polycystique, due à ***E. vogeli***;
- l'échinococcose unicystique, due à ***E. oligarthrus***.

D'un point de vue médical et sur le plan de la santé publique, les 2 formes principales chez l'homme sont l'échinococcose cystique et l'échinococcose alvéolaire.

L'hydatidose est une zoonose parasitaire due à l'infestation par le tænia *Echinococcus granulosus*.
Les œufs constituent la forme libre du parasite.

Après ingestion, ils infestent les hôtes intermédiaires, principalement des animaux d'élevage (ovins, bovins, caprins, équins)

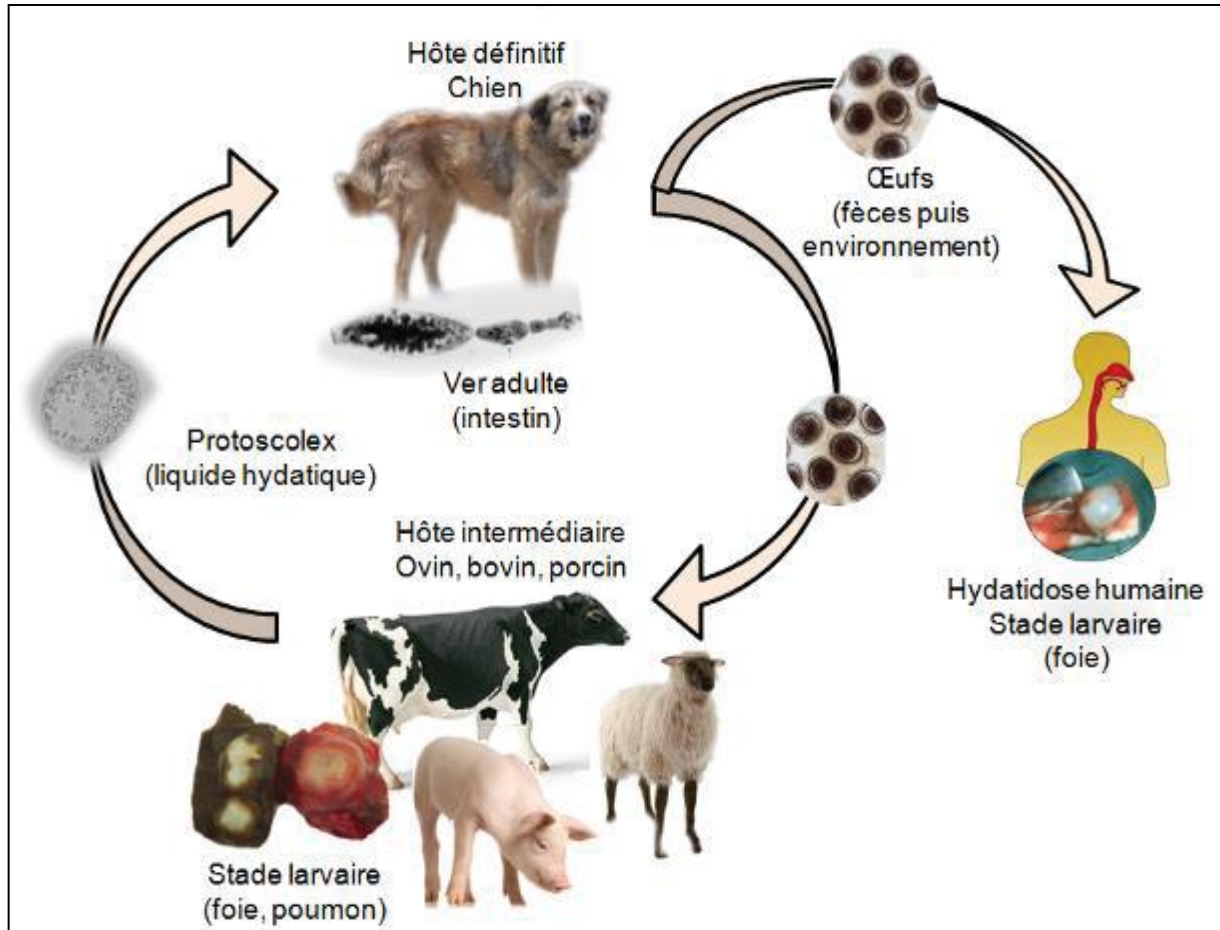
Le **stade larvaire** du parasite se développe alors au niveau du foie et/ou des poumons formant des kystes hydatiques contenant des protoscolex

Lors de la consommation de viscères contaminées par un hôte définitif carnivore, principalement le chien, les protoscolex migrent vers l'intestin et évoluent en vers adultes.

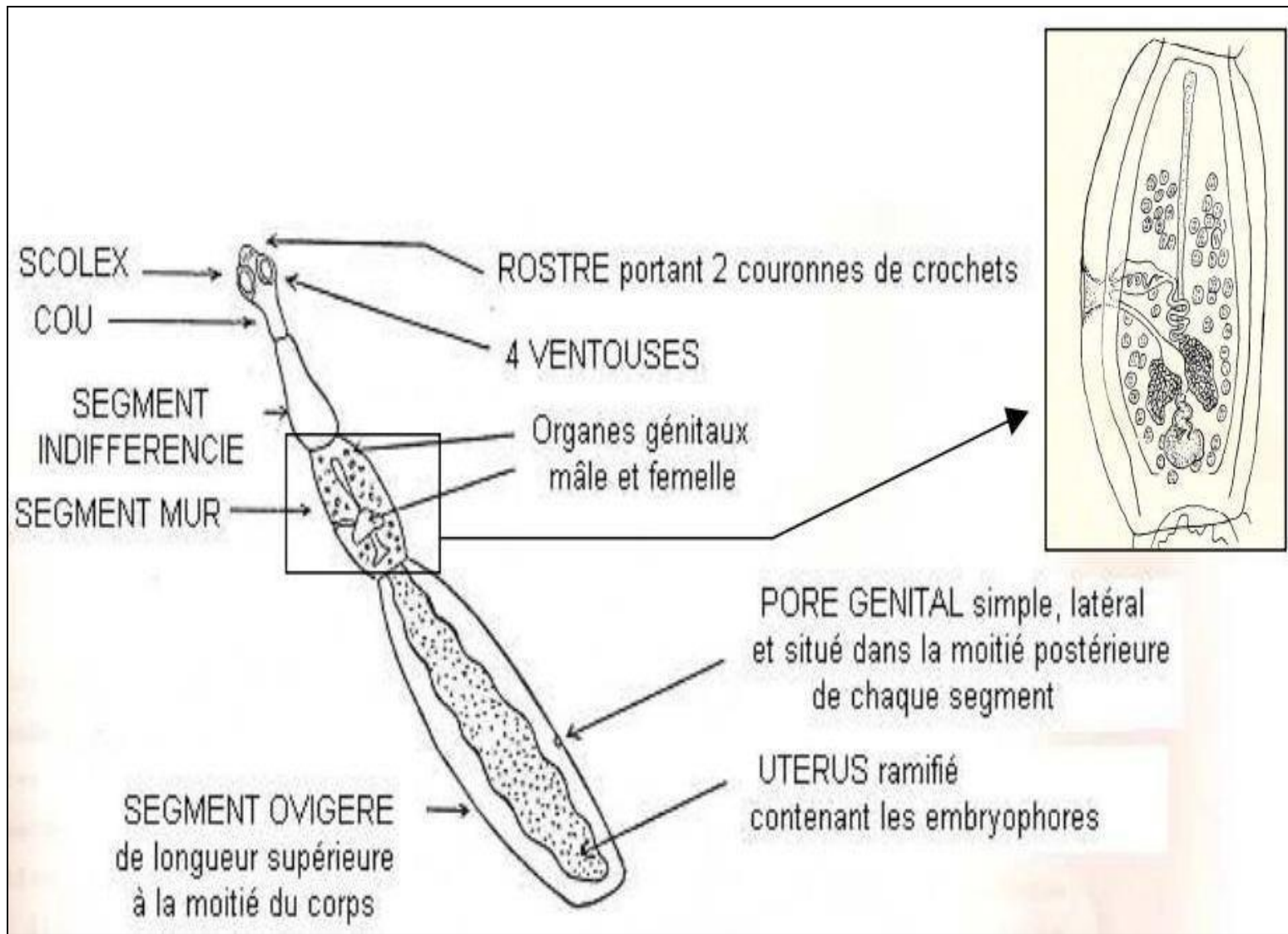
Après atteinte de la maturité sexuelle, les vers libèrent régulièrement leur sac ovigère, contenant les œufs via les fèces, entraînant ainsi la dissémination des œufs infectieux dans l'environnement

L'Homme se contamine essentiellement par ingestion accidentelle d'œufs présents sur des végétaux

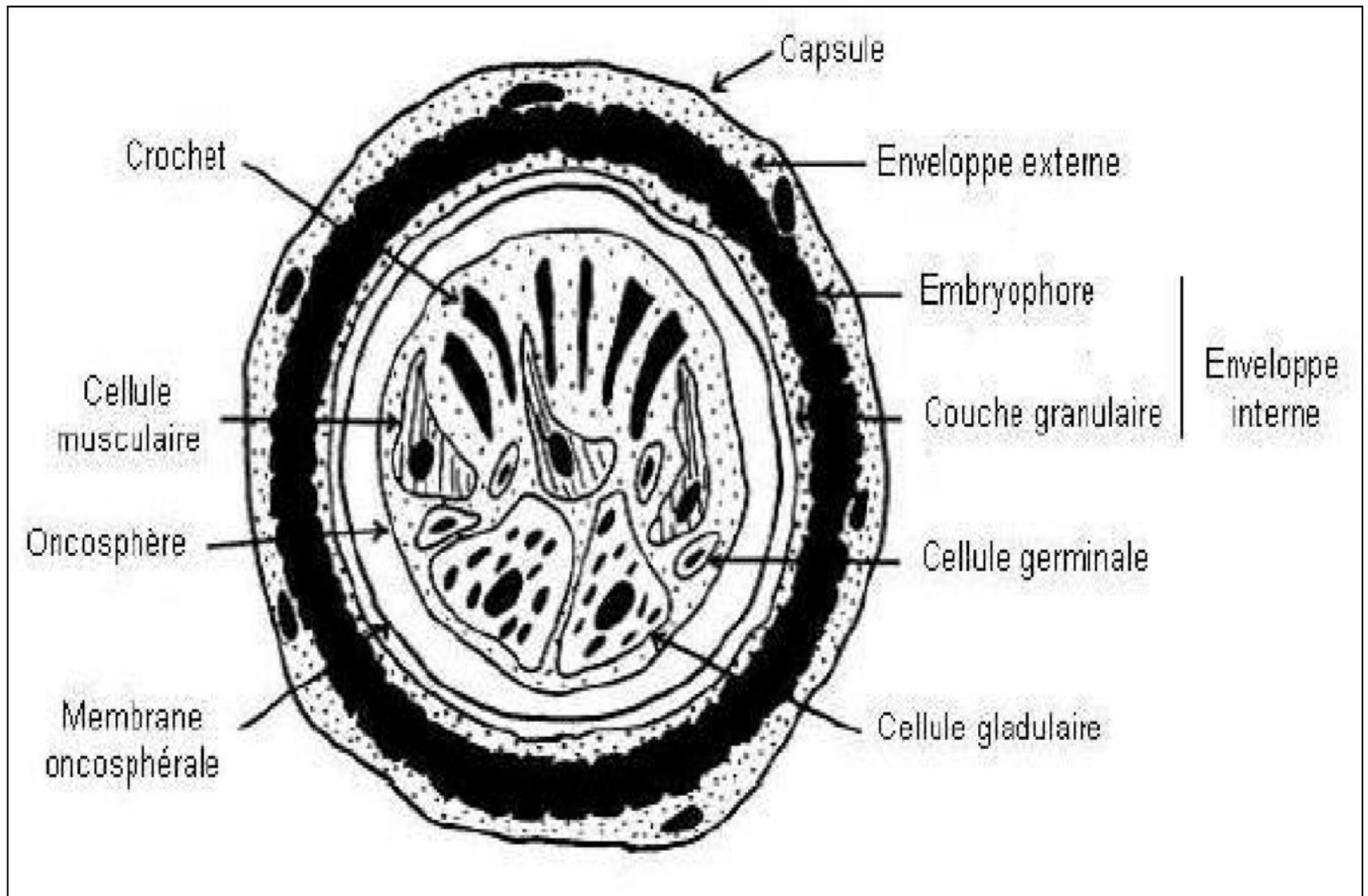




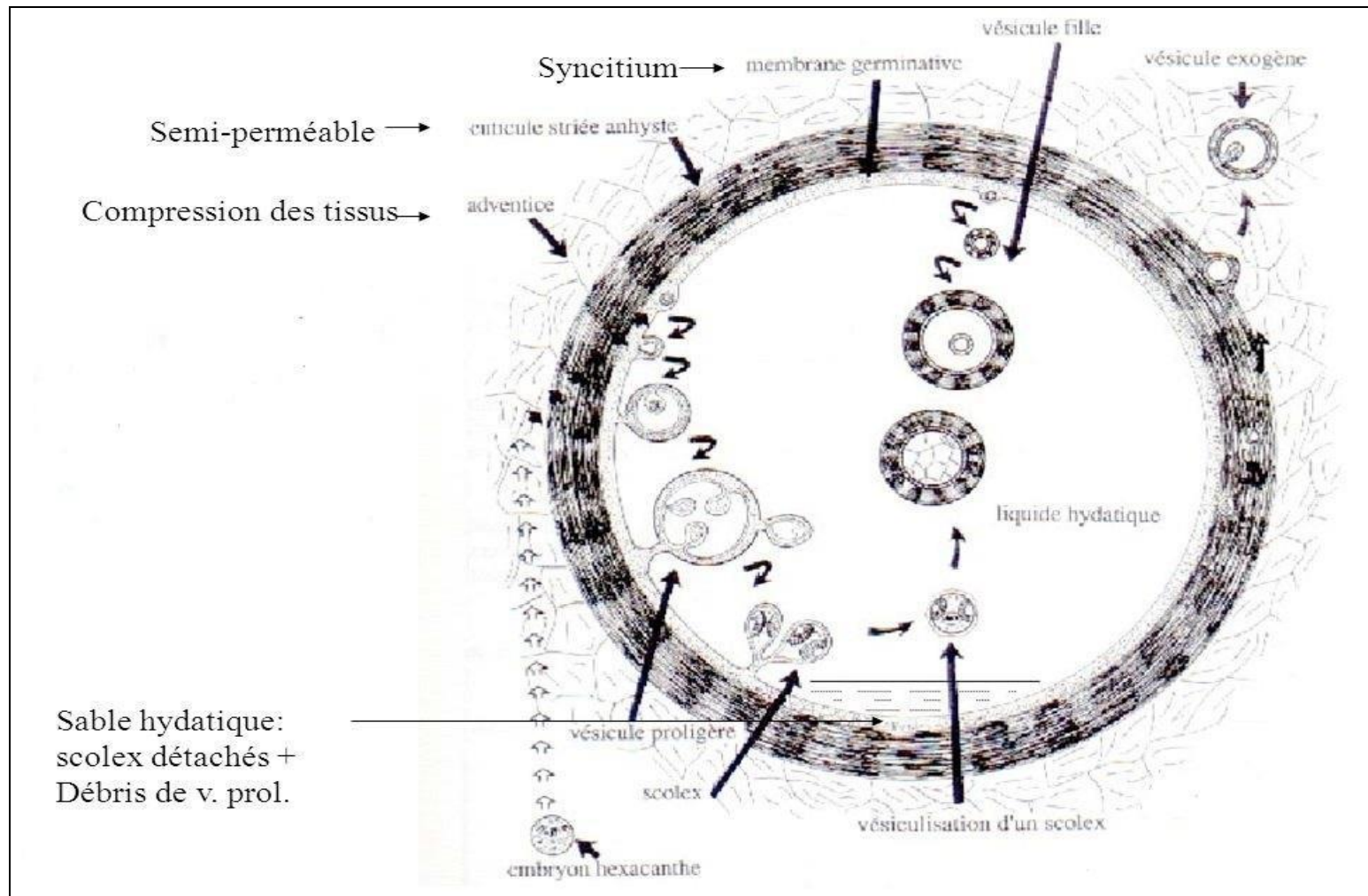
Cycle parasitaire d'*E. granulosus*



Représentation schématique de la forme adulte d'EG



Représentation schématique d'un oeuf d'EG



Représentation schématique d'une larve d'EG

Méthodes de diagnostic d'hydatidose chez l'homme

Kyste hydatique du foie



Les formes habituelles simples et non compliquées



Hépatomégalie est l'expression clinique habituelle



Les formes compliquées



Une infection qui est la complication la plus fréquente et qui peut être peu symptomatique



Angiocholite



Kyste hydatique du foie

Les hydatides du foie sont couramment associés à des douleurs abdominales, nausées et vomissements.

Lorsque le poumon est affecté, les signes cliniques incluent la toux chronique, les douleurs thoraciques et l'essoufflement.

Les autres signes dépendent de l'emplacement du ou des hydatides et de la pression exercée sur les tissus environnants.

Les signes non spécifiques sont en particulier l'anorexie, la perte de poids et l'asthénie

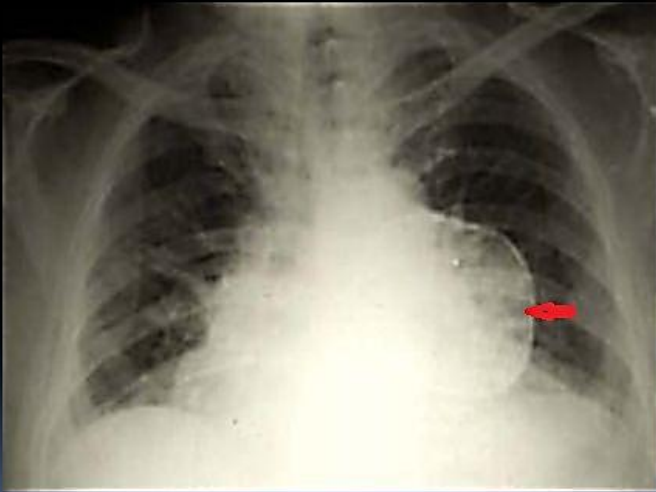


Kyste hydatique du poumon

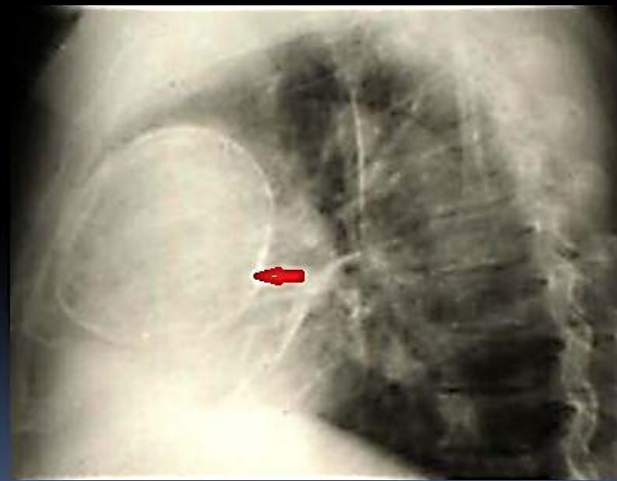
La localisation pulmonaire du kyste hydatique vient au **deuxième rang** des localisations viscérales après la localisation hépatique.

Le kyste hydatique est **primitif** dans la majorité des cas, que l'embryon hexacanthé force le barrage hépatique ou qu'il emprunte des shunts porto-cave ou le canal thoracique à partir des chylifères intestinaux pour gagner directement le poumon.

face



profil



Hydatidose pulmonaire

Cliniquement on distingue deux phases

- Primitive

Le kyste est découvert lors d'examen systématique ou lors d'une maladie intercurrente et se traduit par une toux, dyspnée ou hémoptysie

- Secondaire

A la rupture dont l'expression clinique est la «vomique hydatique»: le patient rejette par la bouche et les narines une importante quantité de liquide au goût salé, avec des débris parasitaires comparés à des «peaux de raisins sucées».

Autres localisations

Le **kyste hydatique** peut toucher plusieurs organes : cœur, os, cerveau, muscles, rein, rate

Prélèvements et méthode d'analyse

Analytes recherchés	<i>Echinococcus granulosus</i>	Remarques
Produit alimentaire concerné	Foie Poumons (des espèces bovine, ovine, caprine, équine)	Considération - des kystes identifiés comme hydatiques quelle que soit la viscère (même autres que foie et poumon), - des kystes douteux

Quantité minimum
à prélever

Kyste(s) seul(s) de
préférence
intact(s)

Organe entier si
peu volumineux

En cas de kyste
unique : réaliser un
prélèvement en
découpant
grossièrement
l'organe et en
prenant soin de **ne
pas léser
le kyste.**

En cas de kystes
multiples : réaliser
un prélèvement des
kystes les plus
volumineux.

Descripteurs des échantillons	N° d'identification de l'animal afin de déterminer son âge et son origine.	
Nombre d'échantillons et d'unités de prélèvement	En fonction des saisies en abattoir	
Conditionnement	Pot ou sac en plastique propre individuel fermé hermétiquement	Prélèvement en fin de chaîne d'abattage, lors de l'inspection visuelle.

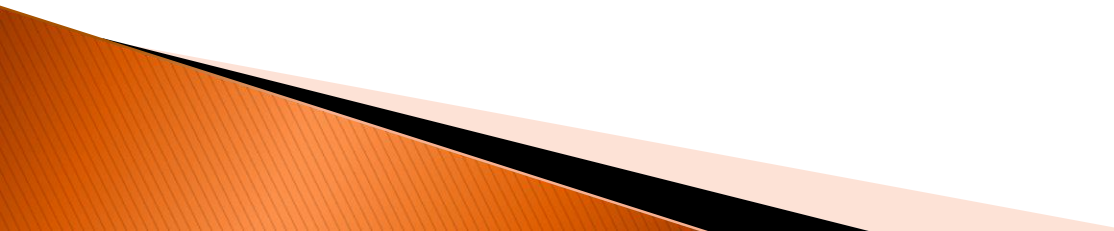
Conservation avant analyse	Congélation entre -20°C et -30°C, 3 mois maximum.	Exceptionnellement, si non réalisable dans l'alcool à 70° (à + 4°C).
Délai d'acheminement au laboratoire	24h sous forme congelée	
Type de technique	Diagnostic visuel - PCR - Génotypage	Présence/absence. Qualification du génotype.

Matrice analysée	Viscères de bovins, caprins, ovins, équins.	
Méthode d'analyse	Extraction amplification du génomme de l'échinocoque par PCR et séquençage : méthode qualitative.	Génotypage en cas d'identification de larve d'échinocoque.

Techniques d'analyses au laboratoire pour les échantillons de kyste hydatique

Les techniques de diagnostic/dépistage utilisées se distinguent essentiellement selon **le stade parasitaire** et donc le type d'hôte, définitif ou intermédiaire, concerné.

Le dépistage des infestations intestinales est basé sur l'identification directe du parasite par l'utilisation de techniques morphologiques, immunologiques ou moléculaires, généralement à partir d'intestins ou de fèces.



Diagnostic d'orientation non spécifique

Eosinophilie sanguine: le plus souvent normale, élevée en phase d'invasion et en cas de fissuration d'un kyste. L'hyperéosinophilie peut être associée à des manifestations allergiques.


Bilan hépatique: perturbé si compression des voies biliaires.

IgE totales et spécifiques: élevées dans 60% des cas.

Diagnostic spécifique direct

Son intérêt est très limité, car il n'est possible de rechercher l'agent pathogène que dans des prélèvements per-opératoires du kyste hydatique.

Il est formellement **contre-indiqué** de réaliser une ponction de kyste, car il y aurait un risque de déssimination avec échinococose secondaire, et de choc anaphyltique.



Diagnostic indirect

Les réactions sérologiques sont nombreuses et utilisent des qualités d'**antigènes différents** (solubles ou figurés), ce qui leur confère des variations de sensibilité et de spécificité.

Techniques sérologiques

L'immunofluorescence indirecte

Utilise des antigènes figurés (coupes de scolex d'*Echinococcus granulosus* obtenues à partir de sable hydatique) et donne des réactions croisées avec *E. multilocularis* et la cysticercose.

La réaction d'hémagglutination indirecte

Utilise des hématies de mouton sensibilisés par du liquide hydatique. Mais elle donne des réactions croisées avec d'autres helminthes.

La réaction Elisa

Utilise un antigène hydatique purifié à partir de kystes fertiles, et a une bonne spécificité.

Elle est automatisable et bien adaptée au dépistage de masse.



Confirmation

L'immunoélectrophorèse

La présence de l'arc 5, spécifique du genre *Echinococcus* permet d'évoquer une hydatidose.

La technique d'immunoempreinte

Plus sensible et spécifique, avec une lecture plus aisée. Les profils permettent le plus souvent d'orienter vers une infection due à *E. granulosus* ou *E. multicularis*, ou à défaut, Au genre *Echinococcus*

La sérologie reste l'étape essentielle du diagnostic pré-opératoire, associée à l'imagerie.

Echantillonnage des Hémoparasites

Il existe différents parasites sanguins qui peuvent infecter les animaux domestiques et l'être humain.

La Méthode microscopique classique.

Méthode de référence selon l'OMS. Elle implique la réalisation de 2 techniques complémentaires dans l'idéal à savoir la Goutte épaisse (GE) et le Frottis mince (FM).

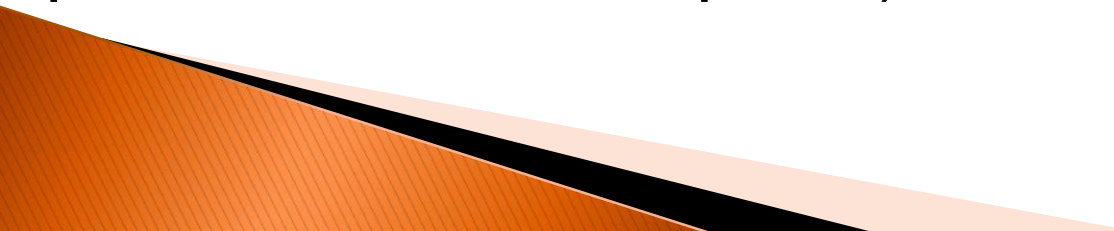
Dans les deux cas, une goutte de sang est étalée sur une lame (goutte plus fine pour le FM).

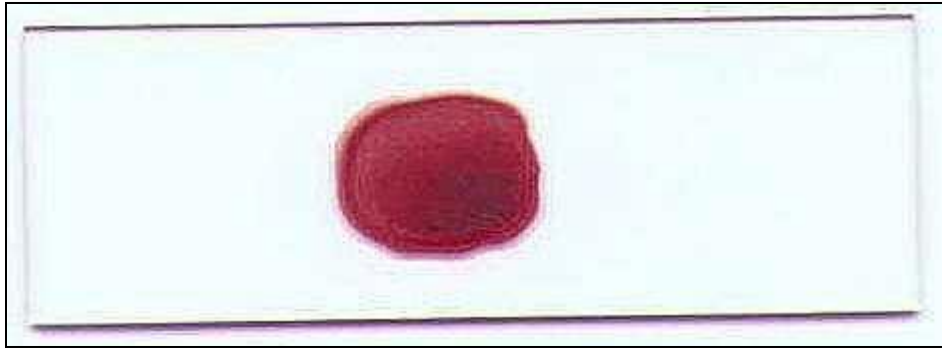


Confection d'une GE

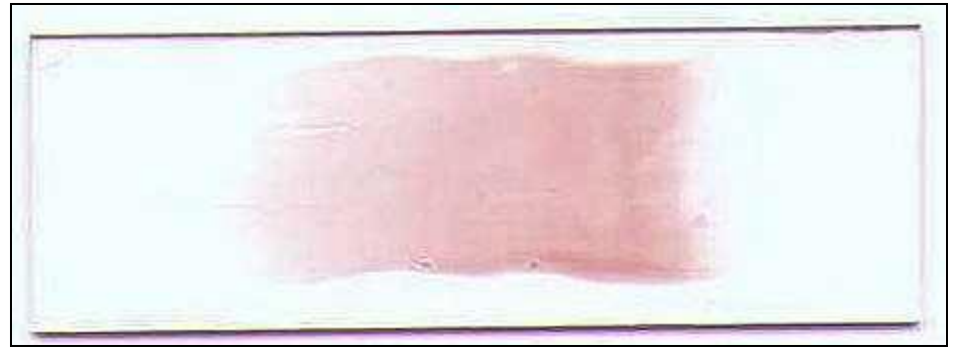
- o Prélever une grosse goutte de **sang capillaire** ou veineux sur EDTA.
- o Étaler une grosse goutte de sang au centre d'une lame propre
- o A l'aide du coin de la deuxième lame, étaler la goutte sur 1 cm de diamètre en tournant pendant quelques secondes
- o Etiqueter et laisser sécher à l'abri des poussières et de la chaleur, ***ne jamais fixer*** Ce séchage peut prendre plusieurs heures sauf si on ne dispose pas d'une étuve

Confection d'un frottis mince

- o Prélever une goutte de sang mais plus petite que précédemment
 - o Déposer la au milieu du premier 1/3 d'une lame bien propre et dégraissée déposée sur un plan horizontal.
 - o Glissez une seconde lame aux bords rodés (ou une lamelle) faisant une inclinaison d'environ 45 degrés avec la lame première, sur la première, laisser le sang s'étaler sur la largeur puis tirer d'un coup sec. (le résultat c'est que nous obtenons un étalement de sang qui, épais au début du frottis s'amincit au fur et à mesure qu'on arrive vers la queue).
- 



Frottis épaisse



Frottis mince

Exemple de coloration de la goutte épaisse

Matériel nécessaire

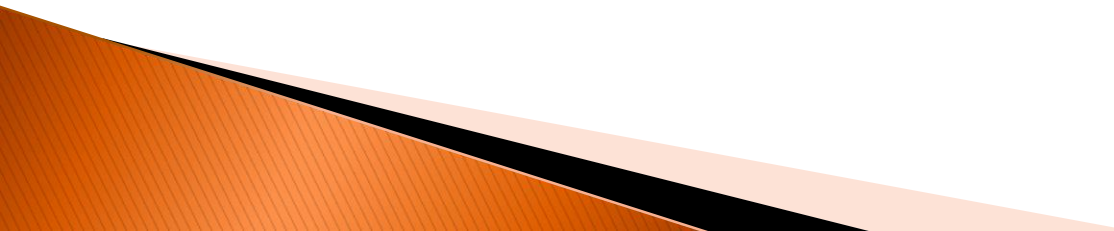
Éprouvette de 50 ml
Pipette en verre de 5 ml
Poire en caoutchouc
Bac à coloration
Agitateur
Pinces à lame
Râtelier à lames
Minuterie
Colorant de Giemsa
Eau du robinet ou de pluie

Préparation du Giemsa à 4 %

- Remplir le bac à coloration avec 48 ml d'eau du robinet ou de pluie
- Ajouter 2 ml de colorant de Giemsa à l'aide d'une pipette plastique
- Mélanger à l'aide d'un agitateur

NB : La solution de Giemsa à 4 % ne se conserve que 2 jours

Coloration des lames

- Plonger les lames à colorer dans la cuve à coloration contenant la solution de Giemsa à 4 %
 - Laisser colorer pendant 20 minutes
 - Sortir la lame, rincer en laissant la lame sous un filet d'eau du robinet
 - Laisser sécher la lame à l'air pendant 30 minutes en position horizontale
- 

Exemple de Coloration du frottis mince

Matériel nécessaire

Coloration rapide Kit RAL 555 (3 x 100 ml)

Recharge fixateurs RAL 555

Recharge Eosine RAL 555

Recharge Bleu RAL 555



C'est la coloration **May-Grünwald** qui contient un colorant acide, **l'éosine**, et un colorant basique, le **bleu de méthylène**.

Coloration des lames

Plonger 30 secondes la lame dans le fixateur (flacon 1)

Plonger 30 secondes la lame dans l'éosine (flacon 2)

Rincer la lame à l'eau du robinet

Plonger la lame 2 minutes dans le bleu (flacon 3)

Sortir la lame, rincer en laissant la lame sous un filet d'eau du robinet

Laisser sécher la lame à l'air pendant 30 minutes en position horizontale

Remarque

La plupart des laboratoires d'analyses parasitologiques utilisent les deux colorations pour avoir les deux particularités: **coloration et fixation**



COLORATION au MGG

- Déposer 10 à 15 gouttes de May-Grünwald sur le frottis et couvrir pour éviter l'évaporation. Pendant 3 mn. **C'est la Fixation.**
- Déposer 10 à 15 gouttes d'eau tamponnée et mélanger par rotation de la lame. 1 mn
- Égoutter
- Recouvrir de Giemsa dilué 15 mn. **C'est la coloration.**
- Égoutter
 - Laver à l'eau neutre.
 - Sécher

NB

Le prélèvement doit avoir lieu en **période fébrile** pour les **trypanosomes**, Babesia et Borrelia ,

ou conformément à la rythmicité d'émission des microfilaires selon la filariose suspectée (prélèvement à minuit dans la filariose lymphatique à Brugia malayi et Wuchereria bancrofti , à midi dans la loase).

Les techniques immunochromatographiques ou Tests de Diagnostic Rapides (TDR)

Ils sont basées sur la détection des antigènes (Ag) spécifiques de l'espèce parasite dans le sang à partir des anticorps (Ac) monoclonaux spécifiques d'une ou plusieurs espèces

Ces tests ont l'avantage d'être simple d'usage, permettent de rendre les résultats dans un délai relativement court (moins de 20 minutes), permettent une meilleure standardisation des résultats.

Les techniques utilisant la microscopie à fluorescence

Les exemples les plus connus sont le QBC[®] (Quantity Buffy Coat) et plus récemment le Cyscope[®].

Le QBC[®] fonctionne sur le principe suivant : **Le sang est prélevé dans un tube micro-hématocrite** contenant un fluorochrome (acridine orange) et un flotteur

L'acridine se fixe alors sur l'ADN des différentes espèces.

Après une centrifugation à grande vitesse, ce flotteur qui se trouve dans la zone de densité correspondant à celle des hématies parasitées ne laisse qu'un film d'hématies entre lui-même et la paroi du tube, ce qui permet d'examiner cette zone à l'aide d'un dispositif adapté comme le microscope à fluorescence

Les technique de biologie moléculaire / Polymerise Chain Reaction (PCR)

Elle consiste à amplifier l'ADN de l'espèce à partir d'un échantillon de sang prélevé afin de le rendre détectable.

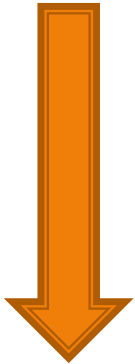
Ce sont donc des méthodes très sensibles et très spécifiques mais leur mise en place est limitée par leur coût élevé et la nécessité des compétences particulières des techniciens

Les Méthodes sérologiques

Elles consistent à rechercher les anticorps spécifiques des espèces parasitaires par différentes techniques telles que l'ELISA, l'Immunofluorescence Indirecte (IFI) etc

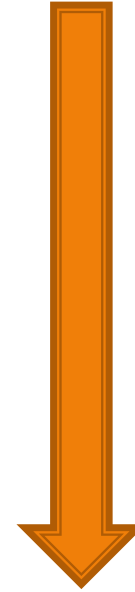
Examen parasitologique des selles

Examen macroscopique



mettre en évidence des **helminthes adultes** de grande taille (ascaris, oxyures, anneaux de ténias).

Examen microscopique direct



À **l'état frais**, indiqué particulièrement pour les parasites mobiles et pour apprécier la vitalité de certains œufs.



Après coloration pour mettre en évidence et identifier les kystes de protozoaires et les œufs d'helminthes, voire certains protozoaires, qui exigent des colorations spéciales



Examen microscopique après concentration méthodes de concentration, souvent nécessaires pour bien mettre en évidence les kystes, œufs et larves, ceux-ci étant souvent excrétés de façon intermittente

Examen direct à l'état frais

Pratiqué sur des selles fraîchement émises si possible dans l'heure précédente (prélèvement au laboratoire), en diluant un petit fragment de selle dans une goutte de sérum physiologique, et en l'examinant entre lame et lamelle.

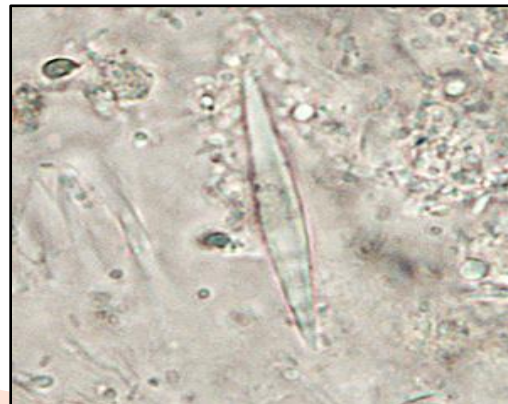
Retrouver les formes parasitaires **mobiles**, comme les **formes végétatives** d'amibe ou de Giardia , d'apprécier la vitalité de certains œufs (schistosomes), mais aussi de mettre en évidence les **kystes** de protozoaires, les **œufs** voire les **larves d'helminthes**, s'ils sont assez nombreux.

Il permet par ailleurs de quantifier les leucocytes et hématies, de visualiser des cristaux de Charcot-Leyden.

Les cristaux de Charcot-Leyden, semblent provenir de la destruction d'une variété de **globules blancs** : les **polynucléaires éosinophiles**.

Ces cristaux ont également été trouvés :

- A l'intérieur de la **rate**, et de la **moelle osseuse**, chez les individus présentant une **leucémie par Charcot**.
- Dans les **helminthiases**.



Techniques de concentration

Elles sont destinées à enrichir le prélèvement à analyser, afin d'augmenter le rendement de détection de kystes, d'œufs ou de larves d'helminthes, surtout en cas de pauci-infestation.

Méthodes
diphasiques

Méthodes
spéciales

Méthodes
physiques



	Avantages	Inconvénients
Sédimentation Technique de Faust	Nécessite que l'eau physiologique ou non	Longue, nécessite 3 sédimentations de 30 mn à 1 h. Non pour les selles riches en résidus de féculents
Flottation Technique de Willis	Utilisation dans les enquêtes épidémiologiques sur l'ankylostome	Simple

→ Points communs à toutes les méthodes

1 Prélever à différents endroits de la selle



2 Ajouter liquide de dilution



3 Obtenir une dilution homogène

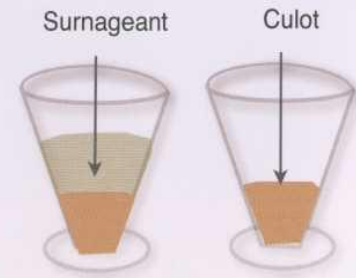


4 Éliminer les débris volumineux



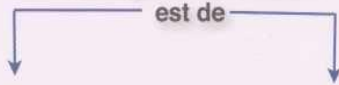
Rincer
Brosser
Flamber
après usage

5 Après 1 minute de repos



Sédimentation

A Le liquide de dilution est de



faible densité
Eau physiologique

forte densité
Eau glycinée 0,5 %

Méthode de Faust



Les œufs tombent
AU FOND



Les œufs remontent
A LA SURFACE

Flottation

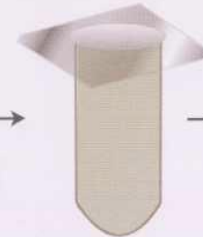
B Le liquide de dilution est du NaCl à 25 %

Méthode de Willis

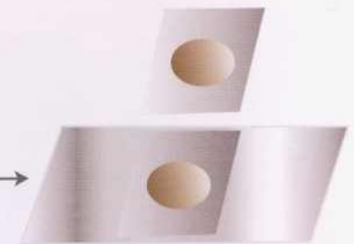
Les selles diluées dans NaCl et tamisées sont versées dans un tube



Une lamelle est appliquée sur le tube



15 mn après retirer la lamelle Appliquer sur une lame



Les œufs se sont déposés sur la lamelle

Méthodes diphasiques

Techniques	Avantages	Inconvénients
Teleman Rivas	Facile. Concentre les parasites courants. Dédoublé la coque des kystes, sauf <i>E. ntamoeba coli</i>	Concentre mal les œufs d'ascaris, de grande douve et de <i>S. mansoni</i>
Bailenger	Concentre bien, œufs et larves d'helminthes, les kystes de protozoaires	

Techniques	Avantages	Inconvénients
Ritchie	Concentre bien œufs d'ascaris et de schistomes	Beaucoup de manipulations. Longue
M.I.F Concentration	Concentre bien œufs d'ascaris, de schistosomes et hymenelopis et les kystes	Culot abondant
Thébault	Concentre des kystes et protozoaires. Peuvent être colorés par le M.I.F ou le lugol	Longue. Concentre mal les œufs d'ascaris, de grande douve et de <i>S.mansoni</i>

Méthodes diphasiques

→ Points communs à toutes les méthodes

Les résidus fécaux sont dissous et les parasites sont entraînés vers le fond par la centrifugation.



1 Selles



2 Diluer au 1/10^e dans le diluant approprié



3 Tamiser

Rincer
Brosser
Flamber
après usage



4 Verser dans un tube conique



5 Ajouter de l'éther jusqu'à 1 cm du bord et boucher



6 Agiter 1 mn



7 Centrifuger 1500 t/mn 1 à 3 mn



13 Recouvrir d'une lamelle. Observer avec ou sans Lugol à 1 %



12 Déposer le culot sur une lame



11 Examiner tout le culot. Laisser monter par capillarité dans la pipette

Ajouter un peu d'eau, laisser sédimenter 1 mn



10 Essuyer les parois avec un coton et une pince fine



9 Décanté, décoller le culot, laisser couler l'eau dans l'évier pour éliminer l'éther

Ether coloré par les graisses solubilisées
Résidus lipophiles
Solution de dilution
Culot
les parasites sont concentrés

8 Résultats

Formulaire des méthodes

Teleman Rivas

Dilution en eau acétique

Acide acétique cristallisable.....	5ml
Eau distillée.....	1 000 ml

Bailenger

Dilution en solution tampon à Ph 5

Acétate de sodium.....	15g
Acide acétique.....	3,6ml
Eau distillée	1 000 ml

Ritchie

**Dilution au 1 / 10 avec une solution aqueuse
Isotonique**

Tamiser et recueillir le filtrat

Effectuer 2 centrifugations 1 mn 1500 t/ mn

Reprendre le culot à l'eau formolée à 10 %

Laisser reposer 5mn

Ajouter 3ml d'éther et émulsionner

Centrifuger

Examiner le culot

M.I.F Concentration

Dilution au 1 / 10 dans le liquide de M.I.F (à préparer extemporanément)

Solution mère de méthiolate-formol.....	2,35 ml
Teinture de méthiolate à 1 / 1000.....	200 ml
Formol.....	25ml
Glycérine.....	5ml
Eau distillée.....	250 ml
Lugol frais à 5%.....	0,15 ml

Thébault

Dilution de 5g de selles dans 50ml de la solution suivante:

Acide trichloracétique à 20%.....1 ml

Formol.....10 ml

Eau distillée.....100ml

Matériel

Lames et lamelles

Verres à pied

Agitateurs en verre

Tamis à mailles d'acier

Pipettes Pasteur

Tubes à centrifuger

Tubes à centrifuger
coniques

Centrifugeuse

Microscope

Méthodes spéciales

Techniques	Interêts
Baermann	Pour recueillir le liquide, puis rechercher spécifiquement des larves d'anguillules
Numération des oeufs	Apprécier l'intensité d'une infestation et contrôler l'efficacité d'un traitement
Kato	Rechercher les œufs d'helminthes
Scotch anal	Diagnostiquer une oxyurose

Colorations

Entre lame et lamelle	Lugol à 1%	Colore la vacuole iodophile de certains kystes et les noyaux des protozoaires ainsi que la flore iodophile
	Eosine aqueuse à 2%	Les formes végétatives restent vivantes, mobiles et incolores.
	M.I.F	Colore les noyaux, les kystes sont incolores et les formes végétatives, claires.

Colorations		
Sur lame	Ziehl-Neelsen modifiée	Met en évidence des oocystes de <i>Cryptosporidium</i>
En tube	M.I.F	Fixe et colore des formes végétatives et kystiques de protozoaires, fixe des œufs et larves d'helminthes.

Colorations		
Histologiques	Trichrome (Weber)	Recherche des Microsporidies
	Hématoxyline ferrique	Colore les noyaux des amibes en noir sur un fond gris. Longue, technique non utilisable en routine.
	APV trichrome	Les amibes
	Kohn au noir chlorazol	Les protozoaires

Les cultures sont des méthodes optées

Helminthes

Rechercher des larves d'anguillules qui peuvent dans certaines conditions se multiplier dans le milieu extérieur.

Diagnostic différentiel entre les différents types de larves provenant d'œufs

D'ankylostome, *Necator*. Les œufs évoluent en larves infectieuses au bout de 10 à 15 jours.

Les cultures sont des méthodes optées

Protozoaires

Obtenir, pour les étudier, une grande quantité d'amibes ou rechercher des amibes ou des flagellés qui n'ont pas été vus à l'examen direct.

Examen parasitologique des urines

La recherche s'effectue sur les urines du matin ou émises après un effort (marche, sautellement, etc.), voire sur toutes les urines de la journée (dont on recueille le dépôt).

Les urines obtenues sont centrifugées et le culot analysé de façon directe, afin de visualiser les œufs et leur viabilité.

Il permet surtout la détection d'œufs de *Schistosoma haematobium* mais il peut parfois mettre en évidence des microfilaires en cas de chylurie (pour *W. bancrofti*) ou après prise de Notézine[®] (pour toutes les filaires), voire des protozoaires (*Trichomonas vaginalis*)