

Objectifs :

Les parasites des genres *Giardia* et *Cryptosporidium* sont des protozoaires à transmission hydrique et alimentaire qui affectent un large éventail de la population humaine et animale et ils sont devenus un problème préoccupant pour divers groupes professionnels aussi bien de la santé humaine que de la santé animale (médecins, vétérinaires, fermiers, infirmiers, etc.).

Pour cette raison, le but de la présente étude s'est attelé à définir les points suivants :

- Détermination de la fréquence des parasitoses particulièrement les protozooses digestives chez deux types de patients hospitalisés et consultants (internes et externe) ;
- Estimation de la fréquence particulièrement de *Giardia intestinalis* et de *Cryptosporidium* sp. chez ces patients en fonction de la provenance des échantillons de selles, le statut clinique, l'âge, le sexe, présence ou absence de la diarrhée, la saison et les éventuels degré d'association

Pour cela, nous avons analysé tous les échantillons fécaux diarrhéiques ainsi que les prélèvements de selles provenant des sujets à risque tels que les enfants et les sujets immunodéprimés reçus au niveau de l'unité de Parasitologie-Mycologie du laboratoire Mère-Enfant de l'Hôpital Issad Hassani (CHU de Béni-Messous) de 02/09/2012 à 10/10/2013.

II.1. Matériel et méthodes :

II.1.1. Matériel :

II.1.1.1. Les patients :

Notre étude a porté sur un effectif total de 2054 échantillons (soit 1735 patients consultants contre 319 hospitalisés).

II.1.1.1.1. Patients consultants (externes) :

Pendant notre stage, nous avons reçu au niveau de l'unité de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital de Béni-Messous plusieurs demandes d'exams coproparasitaires et ce, pour rechercher d'éventuelles infestations parasitaires digestives. En général, les bilans parasitaires sont demandés suite à la présence de manifestations suivantes :

- Troubles digestifs (maladies abdominales, diarrhées, etc....) ;
- Hyper-éosinophilie sanguine ;
- Réactions allergiques ;
- Lors de l'embauchage des cuisiniers et des boulangers.

Au total, 1735 prélèvements fécaux sont recueillis des sujets externes, puis traités en vue des examens parasitaires.

II.1.1.1.2. Patients hospitalisés :

Concernant les prélèvements de fèces provenant des enfants hospitalisés, ceux-ci ont été effectués de façon systématique dans deux services de pédiatrie les services de Mantoux et R-Dumas qui reçoivent les malades atteints de divers syndromes tels que :

- Maladies métaboliques ;
- Maladies génétiques ;
- Hémopathies malignes.

Au total, 319 échantillons de selles sont collectés puis analysés au laboratoire. Chaque prélèvement de selle est accompagné d'une fiche de renseignement comportant certaines informations comme (l'âge, le sexe, les signes cliniques, le statut immunitaire, la prise de médicament) (voir annexe VI).

II.1.1.2. Prélèvements :

Durant la période d'étude, Sur 2054 échantillons de fèces analysés, 568 se sont montrés positifs et sont collectés de 544 sujets externes contre 24 prélèvements fécaux de patients hospitalisés (Tableau 9).

Tableau 09 : Répartition des prélèvements fécaux en fonction de leur provenance

Origine ou provenance		Nombre d'échantillons (+) collectés
Patients externes (non hospitalisés)		544
Patients hospitalisés	Service Mantoux	5
	Service R-Dumas	10
	Service Néphrologie	2
	Service Mussy	4
	Service Epidémio	1
	Service CCI	2

❖ **Conditions de prélèvement :**

Afin d'éviter l'altération des formes parasitaires tels les (œufs, kystes et oocystes) dans les échantillons de selles d'une part et d'avoir une bonne lecture des préparations d'autres part, c'est-à-dire, l'élimination des débris entravant la lecture des lames et des pseudoparasites, nous avons établie pour chaque échantillon de fèces récolté la démarche suivante :

- Arrêt de toute thérapie pouvant gêner l'examen comme le charbon végétal, le produit de contraste pour examen radiologique et particulièrement arrêt de traitement antiparasitaire, une semaine avant l'examen ;

- La non utilisation des substances grasses comme les suppositoires, laxatifs ou les huiles purgatives ;

- Arrêt de prendre des médicaments entraînant une diarrhée (antibiothérapie, chimiothérapie....etc.).

- En outre, pour un bon examen coproparasitaire, les selles doivent être collectées séparément des urines et remises dans les plus brefs délais minimum 6 heures et ce, pour avoir d'une part plus de chance d'observer les formes végétatives de protozoaires encore vivants et d'autre part, éviter l'altération de certains éléments parasitaires comme l'évolution des œufs en larves.

- Quand le malade ne pouvait pas se déplacer ou qu'il lui était impossible de déféquer le prélèvement était fixé le jour même avec solution de conservation (l'eau formolée à 5 %) et ce, afin de conserver les formes kystiques des protozoaires, les œufs d'helminthes et les oocystes de *Cryptosporidium*.

- Quant aux prélèvements effectués en vue de la recherche des œufs d'oxyure (Scotch test ou test de Graham). Il est impératif de faire le prélèvement avant toute toilette au matin juste après le réveil, en donnant des explications nécessaires pour l'établir. Il consiste à appliquer sur la marge anale dépliée, la partie adhésive d'une bande de cellophane transparente qui est aussitôt collée sur la lame porte-objet avec pression (pour éviter la formation des bulles d'air entre la bande de cellophane et la lame porte-objet).

II.1.1.3. Matériel de laboratoire :

II.1.1.3.1. Matériel pour les prélèvements :

- Des récipients (boîtes) propres et secs à fermeture hermétique pour les selles;
- Lames porte-objet et un scotch transparent pour le scotch test.

II.1.1.3.2. Matériel pour réalisation de l'examen direct (dilution) :

- Verres à pied ;
- Agitateur en verre ;
- Pissette ;
- Microscope optique ;
- Portoirs pour tubes à centrifugation;
- Lames porte-objet ;
- Lamelles ;
- Pipettes pasteur ;
- Solution de Lugol (voir annexe VIII) ;
- Eau physiologique stérile (voir annexe VIII) ;

II.1.1.3.3. Techniques de concentration :

A. Technique de Ritchie modifiée (Allen et Ridley, 1970) :

- Tubes coniques en verre ;
- Portoir pour tubes à centrifugation à extrémité conique ;
- Centrifugeuse ;

- Lames et lamelles ;
- Réactifs (eau formolée à 10% et Ether diéthylique)

B. Technique de Willis (Akam, 2004) :

- portoir pour tubes à essai de 10 ml ;
- Lames et lamelles ;
- Minuterie ;
- Solution de chlorure de sodium (NaCl) saturée à 25%.

C. Technique de coloration de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz (1981) :

- Lames bien dégraissées ;
- Bacs à coloration ;
- Minuterie ;
- Pinces ;
- Réactifs (Méthanol, Fuschine phéniquée, Acide sulfurique à 2% et Vert de malachite à 5% (voir l'annexe VIII).

II.1.2. Méthodes :

Dès la réception de l'échantillon de fèces au niveau du laboratoire, nous avons suivi le protocole d'un examen coproparasitologique standard qui consiste à effectuer un :

- Examen macroscopique des selles ;
- Examen direct, après dilution ;
- Enrichissement avec au moins deux techniques par sédimentation et/ou par flottation ;
- Frottis fécal après sur le culot de concentration par sédimentation et coloration au Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Polhenz (1981) (Annexe IX).

II.1.2.1. Examen macroscopique : L'examen macroscopique d'une selle est une étape importante qui nous renseignera sur :

- La consistance des selles.
- Leur aspect particulier : couleur, odeur.
- La présence d'éléments surajoutés non parasitaires.
- La présence de parasites.

A. Consistance des selles : en relation avec la vitesse du transit intestinal, elle doit être précisée sur le compte rendu d'analyse. Toutefois Il faut savoir que les formes végétatives de protozoaires, en général ne se rencontrent que dans les selles liquides ou en bouse.

B. La couleur des selles : est conditionnée par plusieurs éléments entre autres, les pigments biliaires, les aliments, les médicaments et les saignements.

C. Les éléments surajoutés : Ce sont les glaires et/ou le sang.

Les Glaires : traduisent une hypersécrétion de mucus due à une irritation du gros intestin.

Le Sang rouge : s'il est mélangé aux selles : il s'agit d'une hémorragie basse et s'il est déposé sur la selle est une lésion anale ou hémorroïdaire.

L'examen macroscopique nous permet parfois d'observer les vers adultes comme les oxyures femelles, les anneaux de *tenias* ou d'*ascaris* adulte.

II.1.2.2 Examen microscopique :

II.1.2.2.1 : Examen microscopique direct :

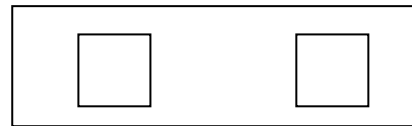
La recherche des parasites dans les selles doit toujours commencer par un examen direct, c'est la seule méthode permettant de voir les trophozoïtes et les formes végétatives et/ou d'autres formes de protozoaires vivants (Figure 21).

La technique de l'examen direct dépend de la consistance des selles.

A. Examen direct des selles non diluées : convient pour les selles glairo-sanguinolentes ou les selles fluides. Deux précautions doivent être prises pour pouvoir observer des formes végétatives vivantes (les trophozoïtes sont sensibles à la déshydratation et au refroidissement), à savoir :

- L'analyse doit être faite immédiatement après l'émission des selles, sur selles chaudes.
- L'examen microscopique doit se faire à 37°C en utilisant une platine chauffante ou une étuve de Foot (enceinte contenant le micro)

En pratique, prélever un fragment de glaires ou de selles liquides à l'aide d'une anse de platine ou une pipette pasteur, déposer sur une lame propre maintenue à 37°C, recouvrir d'une lamelle et regarder au microscope d'abord au faible grossissement Gx10, ce qui permet un examen complet et rapide de la préparation, et à chaque fois que l'on repère un élément intéressant passer au grossissement Gx40 pour voir les détails ou voir le grossissement Gx100 pour voir les petits œufs.



Etat frais lugol

B. Examen direct des selles diluées : Cet examen est effectué pour les selles normales ou dures et est réalisé de la manière suivante :

- Déposer dans un verre à pied une noix de selles prélevée à différents endroits avec un agitateur en verre, puis ajouter peu à peu du sérum physiologique (1 partie pour 10 de sérum physiologique) très lentement en écrasant la selle, surtout quand elle est dure.

- Porter une goutte de cette dilution sur une lame, recouvrir d'une lamelle et observer au microscope.

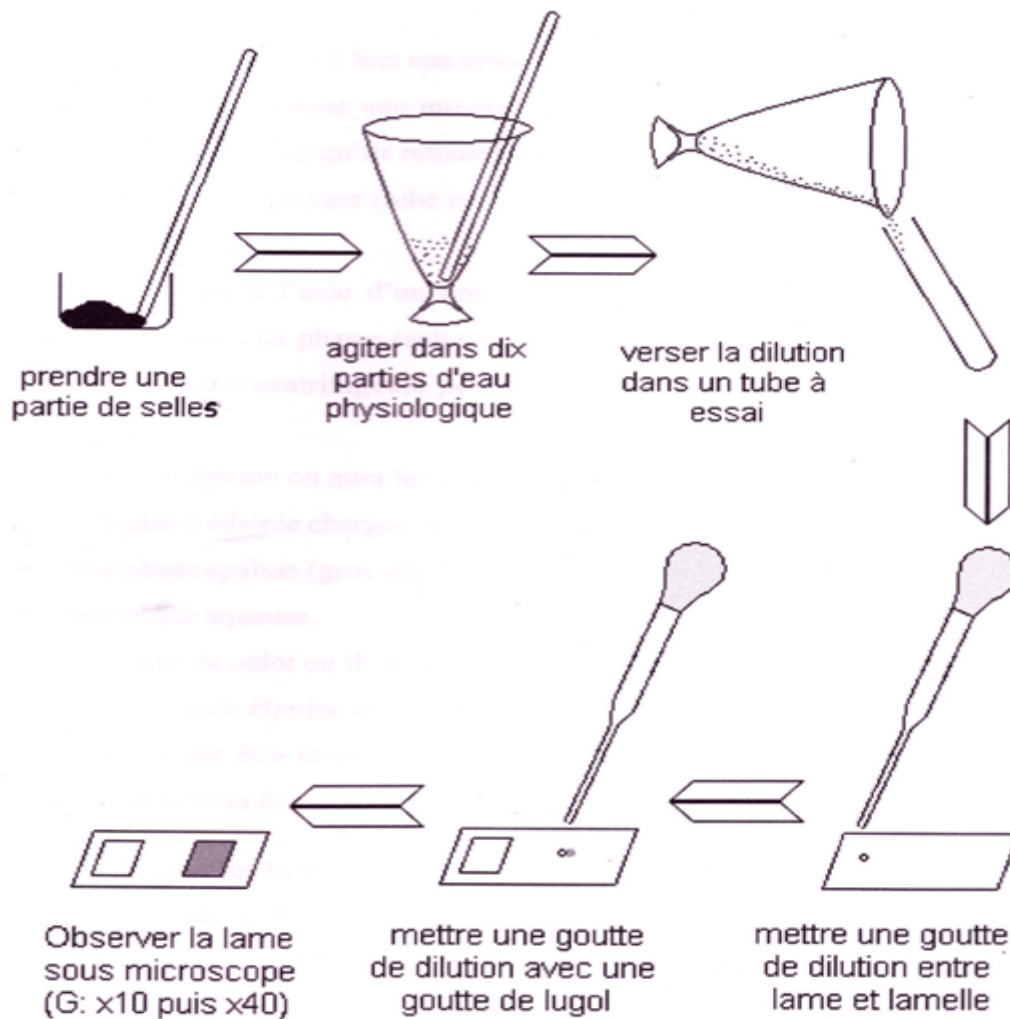


Figure 21 : Protocol de préparation des dilutions pour l'examen direct (Personnelle)

II.1.2.2.2. Examen microscopique après concentration parasitaire :

Il est à noter que la technique de concentration est effectuée systématiquement quelque soit le résultat de l'examen direct. Ces techniques ont pour objectif de rassembler ou concentrer le maximum d'éléments parasitaires initialement dispersés dans une grande masse de matière fécale.

A. Technique de Ritchie modifiée par (Allen et Ridley, 1970) :

C'est une méthode diphasique basée sur la mise en présence de deux phases non miscibles, l'une hydrophile (aqueuse) et l'autre lipophile, on aura donc un coefficient de partage permet de concentrer les éléments parasitaires dans le culot de centrifugation. Cette technique est très utilisée dans les laboratoires de parasitologie car elle est simple et ne nécessitant que des réactifs à la portée de tous (Figure 22).

❖ Mode opératoire :

- Diluer une noisette de selles dans dix fois son volume de solution de formol à 10%
- Laisser décanter pendant une minute pour éliminer les gros débris (il est déconseillé d'utiliser un tamis ou une gaze, parce qu'ils retiennent les éléments parasitaires ;
- Dans un tube conique à centrifuger mettre 2/3 du volume de la solution fécale et un volume d'éther correspond à 1/3 de volume total ;
- Boucher le tube à l'aide d'un bouchon de caoutchouc et mélanger énergiquement pendant une minute les deux phases jusqu'à l'homogénéité ;
- Centrifuger pendant 3 minutes à 1500 tours/minutes ;
- Après centrifugation on aura de haut en bas les phases suivantes :
 - Une phase étherée chargée de graisses.
 - Une phase épaisse (gros débris).
 - Une phase aqueuse.
 - Le culot où sont concentrés éventuellement les parasites s'ils sont présent.

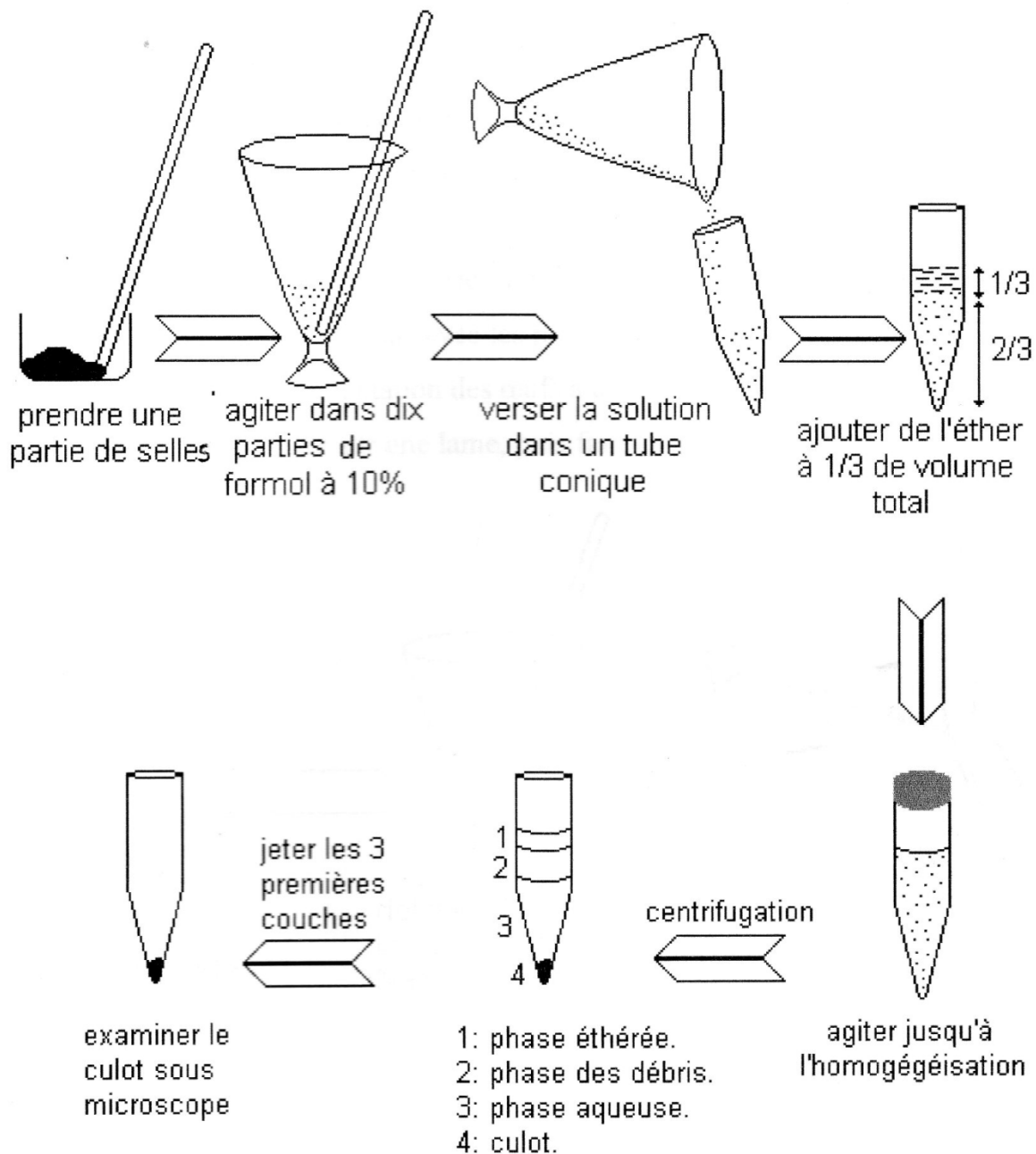
On élimine énergiquement les trois premières phases parce qu'on ne garde que le culot, à l'aide d'une pipette pasteur, on prélève une à deux gouttes de ce dernier que l'on dépose entre lame et lamelle (Il est à noter que les tubes coniques à centrifuger doivent être identifiés

au moyen d'une étiquette ou d'un feutre spécial et les rotors de centrifugeuse doivent être équilibrés si l'on centrifuge avec un nombre impair de tubes).

- ✓ Lecture : prendre une goutte du culot après homogénéisation, à l'aide d'une pipette pasteur.

La recherche des œufs d'helminthes se fait au grossissement x10, et celle des kystes et des oocystes se réalise au grossissement x40 et x100.

Cette technique est indiquée pour concentrer les kystes et les oocystes de protozoaires et les œufs d'helminthes mais contre indiquée pour les formes végétatives.



Protocol de réalisation de la technique de Ritchie modifiée

B. Technique de Willis :

Elle constitue l'une des techniques de flottation la plus utilisée en parasitologie pour concentrer les œufs d'helminthes. C'est une technique de flottation basée sur le principe suivant, les éléments parasitaires ayant une densité inférieure de celle du liquide de dilution (solution saturée en NaCl à 25 %), vont flotter à la surface et adhérer au verre (Figure 23).

❖ Mode opératoire :

- Diluer une noisette de selles dans la solution saturée de NaCl à 25% dans un verre à pied ;
- Laisser décanter quelques secondes ;
- Transvaser, dans un tube, jusqu'à ras bord pour former un ménisque convexe ;
- Placer délicatement au dessus une lamelle sans faire de bulles d'air et laisser reposer pendant 15 minutes au maximum, sinon il y aura sédimentation et déformation des œufs chargés de sel ;
- Déposer la lamelle sur une lame et examiner au microscope.
- Lire au microscope à G x10

Cette technique a les mêmes avantages que les précédentes, elle est simple et utilise un matériel rudimentaire, mais il faut savoir que toutes les manipulations (c'est à dire dilution, concentration et prélèvement) doivent être effectuées rapidement car les liquides utilisés peuvent altérer ou imprégner les œufs d'helminthes qui vont alors s'alourdir et tomber au fond. Elle est efficace pour les œufs de petites tailles (oocystes, kystes, œufs) de nématodes.

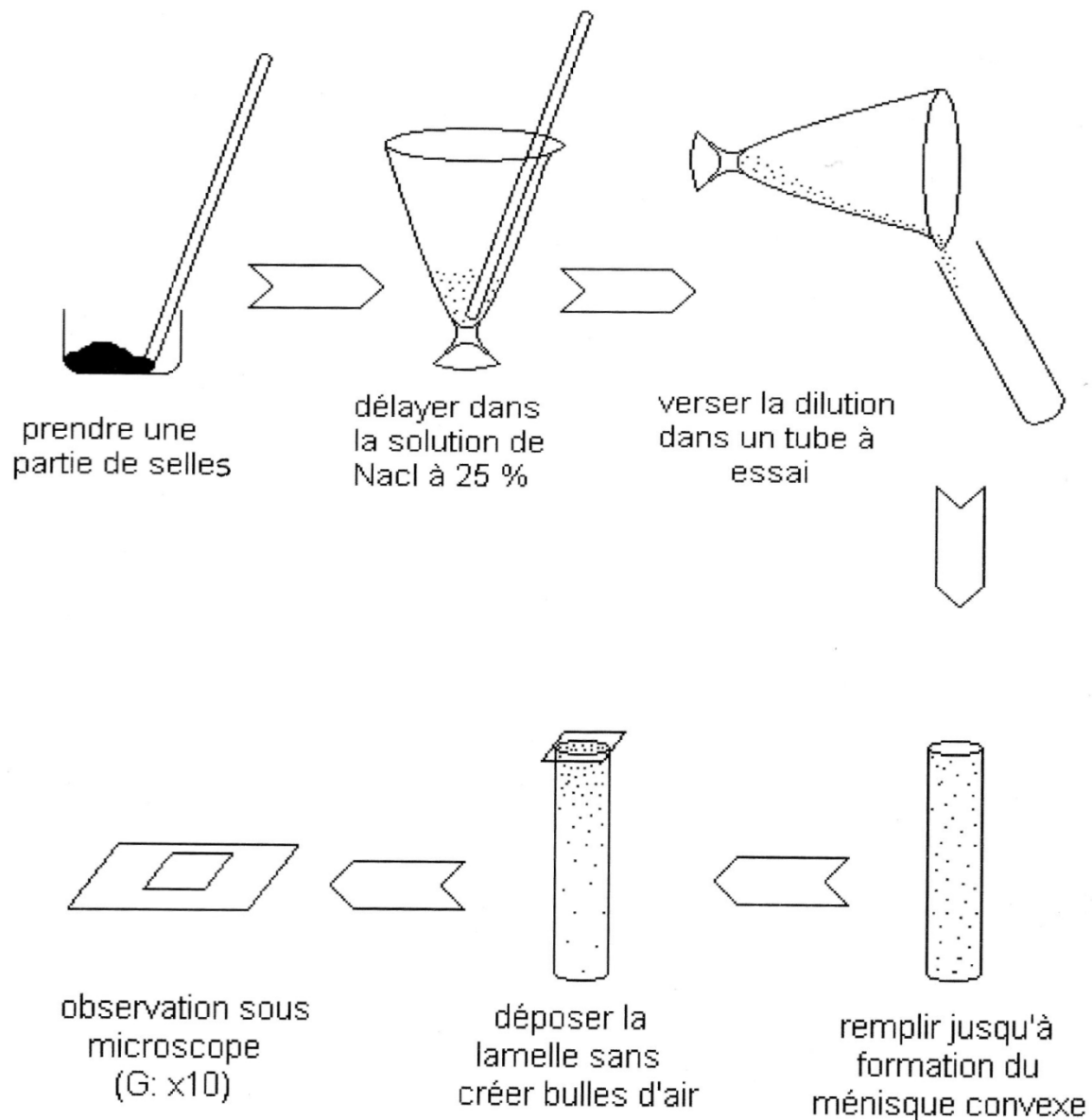


Figure 23 : Réalisation de la technique de Willis (Personnelle)

C. Technique de Graham (scotch –test) :

C'est une technique biologique basée sur le cycle de l'oxyure, les femelles d'oxyures pondent leurs œufs à la marge anale après avoir forcé le sphincter anal, donc on retrouvera les œufs au niveau des plis autour de l'anus.

Le prélèvement se fera le matin avant toute toilette et avant la défécation car les femelles pondent surtout la nuit. Donc pour la mise en évidence de leurs œufs, on effectue ce test. La lecture se fait directement sous microscope avec l'objectif x10. Cette technique détecte bien les œufs d'oxyures et les anneaux de *Teania saginata*.

II.1.2.2.3. Examen microscopique après coloration temporaire au Lugol :

A. Examen direct après coloration au Lugol (voir l'annexe VIII) : Cette coloration est faite parallèle avec l'examen frais. On ajoute une goutte de Lugol sur la suspension fécale qui est sur la lame porte-objet. Elle permet de mieux visualiser le contour des noyaux des kystes, cette technique permet aussi de mettre en évidence *Pseudolimax butschlii* car sa vacuole iodophile est colorée marron. En même temps que l'examen direct on associe une technique de :

B. Lecture après l'examen direct : les levures se colorent en jaune-brun, les cryptosporidies ne se colorent pas avant 15 minutes, de ce fait, la lecture doit être immédiate, cette technique n'est pas tellement efficace, par rapport à la technique de coloration spécifique Ziehl-Neelsen modifiée.

C. Recherche des oocystes de *Cryptosporidium* :

Les oocystes de *Cryptosporidium* sont difficilement identifiables à cause de leur petite taille. Ils se présentent sous la forme sphérique (5 à 6µm de diamètre), (AKAM, 2004). Leur paroi est mince avec un cytoplasme granuleux présentant une tache sombre (corps résiduel) et 4 petites taches (sporozoïtes), cette structure ne se manifeste pas bien, mais elle est plus claire au microscope de contraste de phase (AKAM, 2004). Enfin pour qu'ils ne soient pas confondus avec les levures, il est indispensable d'utiliser les colorations différentielles telles que les variantes de **Ziehl-Neelsen modifiée** (AKAM, 2004).

D. La mise en évidence rapide à la glycérine : elle permet de les mieux distinguer, il suffit de prendre une goutte de dilution fécale avec une goutte de la glycérine pure entre lame et lamelle.

La lecture se fait après une minute sous microscope au grossissement 40 : les oocystes apparaissent ronds ou légèrement ovalaires de diamètre 4 - 5µm avec un aspect transparent bleuté. Après quelques minutes, les oocystes flottent et se rassemblent juste sous la lamelle, en se détachant des autres éléments non parasitaires, il ne faut pas dépasser 15 minutes car les éléments parasitaires ne seront pas visibles, mais il est possible de les confondre avec les levures.

Pour développer la qualité d'observation, utiliser un filtre bleu sur la source lumineuse de côté contraste.

II.1.2.2.4. Examen microscopique après coloration permanente de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz (1981) :

Durant la période notre stage à l'unité de Parasitologie-Mycologie, la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée a été systématiquement effectuée, que ce soit pour les selles suspectées ou diarrhéiques pour mieux reconnaître facilement les oocystes dans les frottis fécaux d'origine humains (Figure 24).

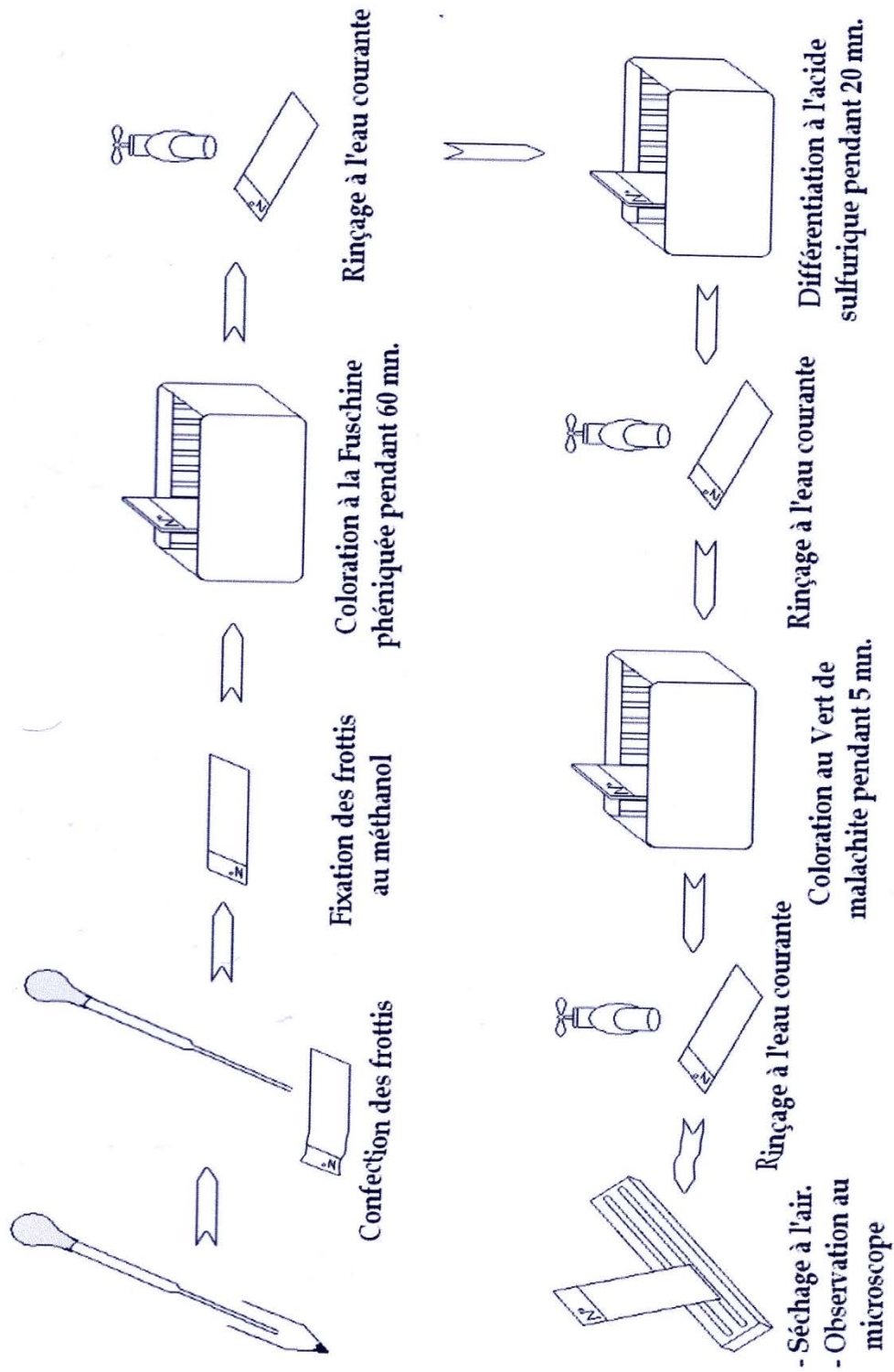
❖ Confection d'un frottis fécal :

Le frottis fécal doit être très mince et bien adhérer à la lame. Le frottis est réalisé à partir du culot de la technique de Ritchie modifié. Une goutte du culot, celle-ci est bien étalée sur la lame porte-objet, puis séchée à température de laboratoire.

❖ Fixation et coloration des frottis : Après séchage du frottis, la fixation et la coloration du frottis se fait comme suit (Figure 24) :

- Fixation du frottis au méthanol pendant 5 minutes ;
- Séchage de la lame à l'air pendant 5 à 10 minutes ;
- Coloration du frottis pendant au moins 1 heure dans une solution de Fuschine phéniquée ;
- Rinçage du frottis coloré sous l'eau courante ;
- Différenciation dans une solution d'acide sulfurique à 2% pendant 20 secondes en immergeant et en retirant le frottis jusqu'à l'élimination de l'excès de la Fuchine
- Rinçage sous l'eau courante ;
- Contre coloration dans une solution de vert de malachite à 5% pendant 5 minutes ;
- Rinçage sous l'eau courante ;
- Séchage à l'air, puis la lecture du frottis sous microscope à Gx40, puis Gx100 ;

Les oocystes de *Cryptosporidium* apparaissent comme des éléments grossièrement sphériques de 5 à 6µm de diamètre, colorés en rose par la Fuschine sur un fond vert bleuté. Quelques oocystes ne prennent pas la coloration « oocystes fantôme » (reste de couleur blanche).



Protocol de réalisation de la technique de coloration de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz (1981)

Analyse Statistique :

Après collecte des données et leur saisie, l'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA 6 adapté à l'épidémiologie. Cette étude permet de calculer les fréquences des variables (le sexe, l'âge, signes cliniques, prévalence...) et le seuil de signification **p** avec un risque d'erreur $\alpha = 5\%$ pour un intervalle de confiance IC à 95 % ($p < 0,05$ S ; $p > 0,05$ NS).