



Tome 3  
Diagnostic biologique des parasitoses et mycoses  
Animaux et champignons venimeux et vénéneux

Tome 3



# Diagnostic biologique des parasitoses et mycoses

## Animaux et champignons venimeux et vénéneux



Collège des enseignants-chercheurs  
de Parasitologie-Mycologie africains



## PRÉFACE

C'est un honneur et un privilège pour moi de préfacier le tout premier livre de Parasitologie-Mycologie de la Société Africaine de Parasitologie (SoAP).

Nos pères fondateurs l'avaient déjà rêvé dans les années 90.

A leur suite, le bureau actuel de la SoAP a tout mis en œuvre pour satisfaire ce désir exprimé par tous les enseignants-chercheurs de Parasitologie-Mycologie africains, celui de rendre disponible pour les étudiants en médecine et en pharmacie ainsi que les autres professionnels de la santé, un ouvrage de spécialité qui intègre les réalités épidémiologiques de l'Afrique, ainsi que les nouvelles stratégies développées par les programmes nationaux de lutte contre les maladies parasitaires et fongiques.

La structuration de ce formidable ouvrage est faite de trois (3) tomes qui mettent en exergue la transition épidémiologie avec l'émergence et la réémergence de plusieurs pathologies parasitaires.

Ce livre présente entre autres, des données sur l'Afrique, permettant ainsi d'apprécier et de mesurer l'importance des endémies qui mettent à mal la santé de nos populations. Ses approches de diagnostic clinique et biologique induisent une meilleure prise en charge et des stratégies de prévention adéquates.

Cet évènement inédit me réjouit tout particulièrement, d'autant que la paternité de ce livre revient à tous les enseignants-chercheurs de la SoAP, et avant tout, à nos maîtres qui ne sont plus, et à qui nous rendons un hommage à travers cet ouvrage.

**Professeur Dorothée KINDE GAZARD**  
**Présidente de la SoAP**

## **AVANT-PROPOS**

Cet ouvrage, composé de 3 tomes, est destiné à la formation de base en parasitologie et mycologie des étudiants des sciences médicales et des sciences pharmaceutiques des universités d'Afrique subsaharienne. Son contenu est conforme aux maquettes de cours élaborées dans ces institutions francophones.

Le tome 1 traite des maladies parasitaires endémiques en Afrique et le tome 2 des affections mycosiques. Le plan des leçons dans ces deux tomes est identique et a été conçu et validé par les professeurs titulaires de parasitologie et mycologie des pays membres du CAMES (Conseil Africain et Malgache pour l'Enseignement Supérieur). Le tome 3 est consacré d'une part au diagnostic biologique des parasitoses et mycoses, et d'autre part à l'étude des animaux et champignons venimeux et vénéneux.

Les différents chapitres ont été rédigés par les professeurs titulaires et maîtres de conférences agrégés de parasitologie et de mycologie membres de la Société Africaine de Parasitologie (SoAP). Chaque chapitre, rédigé par un enseignant, a été relu et corrigé par au moins deux autres enseignants. Avec les données épidémiologiques évoluant rapidement grâce à l'impact de la lutte contre les maladies les plus endémiques, et les nouvelles méthodes de diagnostic en développement, nous prévoyons une actualisation périodique de cette première édition de cet ouvrage.

**Professeur Hervé MENAN**

**Vice-Président de la SoAP  
Responsable de l'équipe de coordination**

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier très sincèrement tous les rédacteurs et les relecteurs des différentes leçons. Les uns et les autres ont su donner de leur temps pour que cette première édition soit une réalité.

Nous avons souhaité, dans cet ouvrage, utiliser une iconographie provenant de nos laboratoires africains. Ce sera le défi de la 2<sup>ème</sup> édition. Mais déjà pour cette édition, des efforts ont été faits pour certains cycles biologiques et schémas des parasites et champignons qui ont été réalisés par les Maîtres de Conférences Agrégés (MCA) Vanga, Konaté, Seck ainsi que le MCA Kassi Fulgence qui a assuré la coordination de l'édition des 3 tomes de cet ouvrage avec le MCA Kiki-Barro Pulchérie. Nous leur adressons nos sincères remerciements pour tous les sacrifices consentis.

**Professeur Hervé MENAN**



## LISTE DES REDACTEURS ET REVIEWERS

ADOUBRYN Koffi Daho	(Côte d'Ivoire)
BADIANE Aïda Sadikh	(Sénégal)
BAMBA Sanata	(Burkina Faso)
BOUYOU Marielle	(Gabon)
DABO Abdoulaye	(Mali)
DIALLO Mouctar	(Mali)
DIENG Thérèse	(Sénégal)
DIENG Yemou	(Sénégal)
DJIMDE Abdoulaye	(Mali)
DJOHAN Vincent	(Côte d'Ivoire)
DOLO Amagana	(Mali)
DORKENOO Améyo Monique	(Togo)
DOUMBO Ogobara	(Mali)
DOUMBO Safiatou Naré	(Mali)
EBOUMBOU Moukoko Carole	(Cameroun)
FAYE Babacar	(Sénégal)
GAYE Oumar	(Sénégal)
GUIGUEMDE Robert	(Burkina Faso)
HOUNTO Aurore	(Bénin)
KASSI Kondo Fulgence	(Côte d'Ivoire)
KIKI BARRO Pulchérie Christiane	(Côte d'Ivoire)
KINDE-GAZARD Dorothée	(Bénin)
MENAN Hervé	(Côte d'Ivoire)
MOYOU-SOMO Roger	(Cameroun)
NDIAYE Daouda	(Sénégal)
NDIAYE Jean Louis Abdourahim	(Sénégal)
NDIAYE Mouhamadou	(Sénégal)
N'DIR Oumar	(Sénégal)
NZENZE Solange	(Gabon)
SAME EKOBO Albert Legrand	(Cameroun)
SANGARE Ibrahim	(Burkina Faso)
SISSINTO Savi de Tove Yolande	(Bénin)
THERA Mahamadou	(Mali)
TINE Roger	(Sénégal)
TRAORE Boubacar	(Mali)
YAVO William	(Côte d'Ivoire)

## HOMMAGES

Les auteurs de ce manuel de la Société Africaine de Parasitologie (SoAP) saisissent l'occasion de cette publication pour rendre un vibrant hommage aux Maîtres et Pères Fondateurs de la SoAP. L'enseignement et la guidance de qualité qu'ils ont donnés avec générosité ont permis de produire cet ouvrage, un précieux héritage pour les générations à venir. L'apport des Maîtres soutient l'adage selon lequel « pour se laver, le corps ne saurait bénéficier de toute l'eau du bain ». Qu'ils trouvent ici, l'expression de leur sincère reconnaissance.

Hommages aux Professeurs Kossivi AGBO, Martin AKOGBETO, Feu Ndri ASSALE, Aka ASSOUMOU, Isabella BAH, Feu Samba DIALLO, Feu Oumar Talla DIAW, Yemou DIENG, Feu Ogobara K. DOUMBO, Oumar FAYE, Ousmane FAYE, Oumar GAYE, Arona GUEYE, Robert Tinga GUIGUEMDE, Maryvonne KOMBILA, Feu Moussa KONE, Achille MASSOUGBODJI, Roger MOYOU-SOMO, Oumar NDIR, Jean OUHON, Jean Louis PANGUI, Feu Benoît Christophe SADELER, Albert SAME EKOBO, Bhen Sikina TOGUEBAYE, Yéya Tiemoko TOURE et Feu Seydil Moctar TOURE.

## SOMMAIRE

1 GÉNÉRALITÉS SUR LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE EN PARASITOLOGIE .....	12
2 MODIFICATIONS HÉMATOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES AU COURS DES PARASITOSEES ...	37
3 DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DES PARASITOSEES.....	50
4 DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PARASITOSEES.....	84
5 EXAMENS PARASITOLOGIQUES DU SANG .....	96
6 EXAMENS PARASITOLOGIQUES DES SELLES .....	125
7 EXAMENS PARASITOLOGIQUES DIVERS .....	150
8 DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DES PARASITES SANGUICOLES.....	164
9 DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DES PARASITES INTESTINAUX ET URO-GÉNITAUX.....	188
10 TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC MYCOLOGIQUE .....	206
11 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES AFFECTIONS PARASITAIRES ET MYCOSIQUES OPPORTUNISTES DU SIDA .....	246
12 LES ANIMAUX VENIMEUX.....	255
13 LES ANIMAUX VENENEUX.....	287
14 LES CHAMPIGNONS VENENEUX.....	307

## LISTE DES FIGURES

Figure 2. 1 : Courbe d'évolution de l'éosinophilie sanguine au cours de parasitoses (Courbe de Lavier) 1. Infestation - 2. Apparition de l'éosinophilie après une phase de latence - 3. Maximum de la courbe - 4. Emission des œufs dans les selles par les vers adultes.....	39
Figure 3. 1 : Cinétique de la réponse humorale .....	54
Figure 3. 2 : Réaction de lyse des toxoplasmes (Dye test) .....	56
Figure 3. 3 : Réaction d'immunofluorescence directe et indirecte .....	58
Figure 3. 4 : Plaque d'hémagglutination indirecte Source .....	60
Figure 3. 5 : Gel d'agarose d'électrosynérèse .....	61
Figure 3. 6 : Résultat du test d'Ouchterlony, 24 heures après les dépôts .....	62
Figure 3. 7 : Différentes techniques ELISA .....	63
Figure 3. 8 : Coating de l'antigène spécifique .....	63
Figure 3. 9 : Fixation de l'antigène à doser .....	64
Figure 3. 10 : Fixation du conjugué.....	64
Figure 3. 11 : Plaque de réaction ELISA .....	65
Figure 3. 12 : Etapes d'une réaction ELISA inverse ou sandwich « dite immunocapture » .....	66
Figure 3. 13 : Dosage d'un antigène par la méthode du double sandwich .....	66
Figure 3. 14 : Western Blot (WB) : cas de toxoplasmose congénitale et néonatale .....	67
Figure 3. 15 : Résultats de réaction d'immunoélectrophorèse .....	68
Figure 3. 16 : Interprétation des résultats de TDR à HRP2.....	72
Figure 4. 2 : Principe de la PCR .....	89
Figure 5. 1 : Sites de prélèvement du sang capillaire .....	99
Figure 5. 2 : Prélèvement de sang capillaire .....	99
Figure 5. 3 : Confection du frottis sanguin .....	101
Figure 5. 4 : Kit de réactifs RAL555 .....	102
Figure 5. 5 : Confection de la goutte épaisse .....	103
Figure 5. 6 : Confection d'un frottis sanguin mixte .....	105
Figure 5. 7 : Frottis mixte sur lame graisseuse .....	105
Figure 5. 8: Frottis mixte confectionné avec « trop » de sang .....	106
Figure 5. 9 : Frottis confectionné avec « trop » peu de sang .....	106
Figure 5. 10 : Frottis confectionné avec une lame d'étalement à bord ébréché .....	106
Figure 5. 11 : Mauvais positionnement du frottis mixte.....	107
Figure 5. 12 : Globules rouges d'un frottis sanguin non immédiatement séché par agitation.....	107
Figure 5. 13 : Sens d'observation d'une goutte épaisse au microscope.....	108
Figure 5. 14 : Technique du QBC™ .....	112
Figure 5. 15 : Schéma d'un tube de QBC™ après centrifugation .....	113
Figure 5. 16 : Trophozoïtes de <i>Plasmodium</i> au QBC™.....	113
Figure 5. 17 : Représentation schématique d'une cassette de TDR .....	115

Figure 8. 1 : Schéma de Trophozoïte jeune ou stade annulaire de <i>Plasmodium</i> .....	165
Figure 8. 2 : Schéma de Trophozoïte âgé de <i>Plasmodium</i> .....	166
Figure 8. 3 : Schéma de Schizonte jeune ou immature .....	166
Figure 8. 4 : Schéma de Schizonte mûr de <i>Plasmodium</i> .....	166
Figure 8. 5 : Trophozoïtes de <i>P. falciparum</i> .....	167
Figure 8. 6 : Polyparasitisme et forme en haltère de <i>P. falciparum</i> .....	168
Figure 8. 7 : Trophozoïte de <i>P. falciparum</i> avec des taches de Maurer.....	168
Figure 8. 8 : Schizonte de <i>P. falciparum</i> .....	169
Figure 8. 9 : Gamétocyte femelle de <i>P. falciparum</i> .....	169
Figure 8. 10 : Trophozoïte de <i>P. vivax</i> .....	170
Figure 8. 11 : Schizonte de <i>P. vivax</i> .....	171
Figure 8. 12 : Gamétocyte de <i>P. vivax</i> .....	171
Figure 8. 13 : Trophozoïtes en forme de bande équatoriale de <i>P. malariae</i> .....	172
Figure 8. 14 : Schizonte de <i>P. malariae</i> .....	172
Figure 8. 15 : Schizonte de <i>P. malariae</i> , «forme en marguerite ».....	173
Figure 8. 16 : Gamétocyte de <i>P. malariae</i> .....	173
Figure 8. 17 : Gamétocyte de <i>P. malariae</i> .....	174
Figure 8. 18 : Trophozoïtes de <i>P. ovale</i> .....	174
Figure 8. 19 : Schizonte de <i>P. ovale</i> .....	175
Figure 8. 20 : Gamétocyte de <i>P. ovale</i> avec des bords frangés.....	175
Figure 8. 21 : Schéma de la forme amastigote de Leishmanie.....	176
Figure 8. 22 : Forme amastigote de Leishmanie.....	176
Figure 8. 23 : Forme promastigote en culture sur milieu NNN .....	177
Figure 8. 24 : Schéma de la forme trypomastigote .....	178
Figure 8. 25 : Forme trypomastigote X40 .....	178
Figure 8. 26 : Schéma de la forme Epimastigote de <i>Trypanosoma</i> .....	179
Figure 8. 27 : Schéma de la forme Tachyzoïte libre.....	179
Figure 8. 28 : Schéma des formes intracellulaires (Tachyzoïtes).....	180
Figure 8. 29 : Tachyzoïte intra et extracellulaires de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	180
Figure 8. 30 : Schéma de kyste tissulaire .....	181
Figure 8. 31 : Kyste de <i>Toxoplasma gondii</i> dans le tissu cérébral d'une souris.....	181
Figure 8. 32 : Schéma de la forme oocyste .....	182
Figure 8. 33 : Microfilaire de <i>Loa loa</i> X100.....	182
Figure 8. 34 : Microfilaire de <i>W. bancrofti</i> X100 .....	183
Figure 8. 35 : Microfilaire de <i>Brugia malayi</i> .....	184
Figure 8. 36 : Microfilaire d' <i>O. volvulus</i> X 40.....	185
Figure 8. 37 : Microfilaire de <i>M. perstans</i> X 100l.....	186

Figure 9. 1 : <i>Entamoeba histolytica / dispar/moshkovskii</i> . A) Trophozoïte hématophage ( <i>Entamoeba histolytica</i> ) ; B)Kyste à 2 noyaux ; C) Kyste mature .....	189
---	-----

Figure 9. 2 : <i>Entamoeba coli</i> – A : Forme végétative ; B : Kystes .....	190
Figure 9. 3 : Formes végétative et kystique d' <i>E. polecki</i> .....	191
Figure 9. 4 : <i>Entamoeba hartmanni</i> . A) Forme végétative ; B) : pré-kyste ; C) Kyste à 1 noyau ; D) Kyste mature à 4 noyaux .....	191
Figure 9. 5 : <i>Endolimax nanus</i> A) Forme végétative ; B) Kyste à un noyau ; C) Kyste 2 noyaux ; D) Kyste mature à 4 noyaux. ....	192
Figure 9. 6 : Formes végétatives et kystique de <i>Pseudolimax butschlii</i> .....	193
Figure 9. 7 : Morphologie schématique de <i>Dientamoeba fragilis</i> .....	193
Figure 9. 8 : Vers adultes et oeufs d' <i>Ascaris lombricoides</i> : A) œuf fécondé ; B) œuf non fécondé.....	194
Figure 9. 9 : Vers adultes et Œuf d' <i>Enterobius vermicularis</i> .....	195
Figure 9. 10 : Vers adultes et Œuf de <i>Trichuris trichiura</i> .....	195
Figure 9. 11 : Adultes male et femelle d' <i>Ankylostoma duodenale et Necator americanus</i> .....	196
Figure 9. 12 : Œuf d'Ankylostomes.....	196
Figure 9. 13 : Femelle parasite de <i>Strongyloides stercoralis</i> .....	197
Figure 9. 14 : Adultes libres de <i>Strongyloides stercoralis</i> .....	197
Figure 9. 15 : Larves de <i>Strongyloides stercoralis</i> .....	198
Figure 9. 16 : Anneaux et scolex des différents Teania .....	199
Figure 9. 17 : Embryophore de Teania .....	199
Figure 9. 18 : Œuf de Botriocephale .....	200
Figure 9. 19 : Œuf d' <i>Hymenolepis nana</i> .....	200
Figure 9. 20 : Morphologie de <i>Fasciolopsis buski</i> .....	201
Figure 9. 21: Morphologie de <i>Heterophyes heterophyes</i> .....	202
Figure 9. 22 : Shistosomes adultes .....	202
Figure 9. 23 : Œuf de <i>Shistosoma mansoni</i> .....	203
Figure 9. 24 : Œuf de <i>Shistosoma heamatobium</i> .....	203
Figure 9. 25 : Trophozoïte de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	204
Figure 10. 1 : Septomycètes (filaments septés) .....	215
Figure 10. 2 : Siphomycètes (filaments non septés).....	215
Figure 10. 3 : Pseudo-filaments (chaînes de blastospores) .....	215
Figure 10. 4 : <i>Malassezia furfur</i> , examen direct d'un test à la cellophane adhésive coloration au bleu <i>lactique</i> . (× 100). ....	216
Figure 10. 5 : Test de blastèse (tube germinatif après coloration au Giemsa <i>Candida albicans</i> / <i>Candida</i> <i>dubliniensis</i> .....	222
Figure 10. 6 : Pseudofilament : <i>C. albicans</i> ou <i>Candida dubliniensis</i> .....	223
Figure 10. 7 : Gelose PCB ou RAT.....	224
Figure 10. 8 : Levures bourgeonnantes + pseudomycélium + blastospores .....	224
Figure 10. 9 : Les chlamydospores ( <i>Candida albicans</i> ).....	224
Figure 10. 10 : Identification des espèces de <i>Candida</i> sur Milieu chromID <i>Candida</i> .....	225
Figure 10. 11 : Test d'agglutination au latex .....	226
Figure 10. 12 : <i>Cryptococcus neoformans</i> ( <i>Filobasidiella neoformans</i> ) à l'encre de Chine .....	228
Figure 10. 13 : Têtes aspergillaires uni et bisériée .....	233
Figure 10. 14 : Têtes aspergillaires .....	234
Figure 10. 15 : Résultats ATF avec les bandelettes d'E-test d'antifongiques.....	239
Figure 10. 16 : Résultats ATF avec les disques d'antifongiques.....	239

Figure 12. 1 : Distribution géographique des serpents venimeux.....	258
Figure 12. 2 : Serpent aglyphe (boa) autour d'un crocodile.....	259
Figure 12. 3: Serpent opisthogyph (couleuvre) .....	259
Figure 12. 4: Serpent protéroglyphe (cobra).....	259
Figure 12. 5: Serpent solenogyph (vipère) .....	259
Figure 12. 6 : Schémas des dentures des serpents.....	259
Figure 12. 7: Morphologie des têtes de la vipère, couleuvre, naja et mamba.....	260
Figure 12. 8 : Incidence annuelle d'envenimations ophidiennes dans le monde .....	262
Figure 12. 9 : Test de coagulation en tube sec .....	266
Figure 12. 10 : Protocole de prise en charge d'une envenimation.....	267
Figure 12. 11 : Distribution géographique des scorpions .....	270
Figure 12. 12 : Scorpion .....	272
Figure 12. 13 : Les araignées venimeuses. A : <i>Latrodectus mactans</i> (la veuve noire) B : <i>Selenocosmia crassipes</i> (mygale siffleuse d'Australie).....	273
Figure 12. 14: Nécrose du pouce, suite d'une morsure d'araignée aranéomorphe, <i>Loxosceles sp</i> .....	274
Figure 12. 15 : Principaux genres d'hyménoptères venimeux (fourmis exclues) A : abeille ; B : bourdon ; F : frelon ; G : guêpe.....	277
Figure 12. 16 : <i>Scolopendra gigantea</i> .....	279
Figure 12. 17 : Extrémité antérieure d'une scolopendre montrant les forcipules à l'aide d'une pince. ....	279
Figure 12. 18 : Cônes. A : <i>Conus amadis</i> B : <i>Conus textile</i> avec le proboscis (trompe) inoculateur de venin et le siphon aspirateur des aliments .....	280
Figure 12. 19 : Pieuvre/Poulpe .....	281
Figure 12. 20 : Anémone de mer .....	281
Figure 12. 21 : Les méduse.....	281
Figure 12. 22 : Cnidoblaste.....	282
Figure 12. 23 : Lésions de piqûres venimeuses d'une cuboméduse.....	283
Figure 12. 24 : Poissons venimeux. A : rascasse volante (Scorpaenidé). B : Raie (Dasyatidé) C : Grande vive (Trichinidé). D : poisson-pierre (Scorpaenidé).....	285
Figure 13.1 : <i>Phyllobates terribilis</i> .....	290
Figure 13. 2 : Gastéropodes toxiques, a : <i>Buccinum undatum</i> , b : <i>Euspira heros</i> , c : <i>Littorina sp</i> .....	291
Figure 13. 3 : Quelques bivalves potentiellement toxiques : A : moules ( <i>Metylida sp</i> ) ; B : huître ( <i>Ostrea sp</i> ) ; C : <i>Mya truncata</i> ; D : Palourde ( <i>Corbicula sp</i> ) .....	291
Figure 13. 4 : Dinoflagellés redoutés pour leur toxicité : A) <i>Alexandrium sp</i> ; B) <i>Gonyaulax sp</i> ; C) <i>Dinophysis sp</i> .....	292
Figure 13. 5 : Crabe de genre <i>Zosimus sp</i> .....	292
Figure 13. 6 : Annélide du genre <i>Hermodica</i> (A) Eponge du genre <i>Fibulila</i> (B) .....	293
Figure 13. 7 : Distribution mondiale de la ciguëta .....	294
Figure 14. 1 : <i>Amanita phalloides</i> .....	310
Figure 14. 2 : Syndromes d'intoxication par les champignons supérieurs en fonction du délai et de la symptomatologie.....	311

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2. 1 : Tableau synthétique des principales étiologies d'éosinophilie parasitaire.....	42
Tableau 6. 1 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de coproculture des helminthes ....	145
Tableau 8. 1: Caractères différentiels des microfilaires.....	187
Tableau 10. 1 : Prélèvements cutané-phanériens et muqueux : modalités de réalisation, d'acheminement et de conservation .....	209
Tableau 10. 2 : Prélèvements profonds .....	212
Tableau 10. 3 : Caractères morphologiques des principaux genres de levures d'intérêt médical.....	220
Tableau 10. 4 : Deux exemples de galeries minigaleries commercialisées.....	227
Tableau 10. 5 : Eléments caractéristiques des dermatophytes .....	230
Tableau 10. 6 : Identification des dermatophytes.....	231
Tableau 10. 7 : Diagnostic d'espèce du genre <i>Aspergillus</i> .....	235
Tableau 10. 8 : Pouvoir pathogène, Caractères macroscopiques et microscopiques des champignons filamenteux opportunistes.....	237
Tableau 11. 1 : Agents pathogènes responsables d'infections opportunistes au cours du SIDA.....	248
Tableau 11. 2 : Chronologie de la survenue des affections opportunistes en fonction du taux des CD4 .....	250
Tableau 12. 1 : Répartition des serpents en fonction de leurs familles et genres .....	258
Tableau 12. 2 : Signes d'envenimation neurotoxiques des mambas et cobras .....	264
Tableau 12. 3 : Signes d'envenimation nécrotiques et hémorragiques .....	264
Tableau 12. 4 : Evaluation clinique de la gravité d'une envenimation .....	265
Tableau 12. 5 : Quelques sérums antivenimeux commercialisés en Afrique.....	268
Tableau 12. 6 : Quelques sérums antivenimeux commercialisés en Afrique.....	268
Tableau 12. 7 : Principales espèces et genres des scorpions et araignées venimeux .....	271
Tableau 12. 8 : Principales familles d'Hyménoptères avec les genres et les espèces correspondants .....	276
Tableau 12. 9 : Principales manifestations cliniques dues aux piqûres d'hyménoptères (Müller, 2016).....	278
Tableau 13. 1 : Poissons, types d'intoxications et organes vénéneux impliqués.....	302
Tableau 13. 2 : Poissons, types d'intoxications et parties vénéneuses impliquées .....	303



# **1 GÉNÉRALITÉS SUR LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE EN PARASITOLOGIE**

---

*Rédigé par Pr Dolo Amagana (Mali), Relu par Pr Diallo Mouctar (Mali),  
Pr Guiguemdé Robert (Burkina Faso) et Pr Dorkenoo Ameyo Monique (Togo)*

## **Introduction**

Les maladies parasitaires sont responsables de forte morbidité et mortalité dans le monde, particulièrement dans les zones tropicales d'Afrique. Ces affections sont responsables de symptômes variés, non spécifiques, qui ne permettent pas d'établir un diagnostic précis. Le laboratoire joue un rôle essentiel dans la prise en charge correcte du fait de son apport dans l'établissement d'un diagnostic précis et fiable permettant de mettre en route un traitement approprié efficace.

La démarche diagnostique en parasitologie comporte les étapes suivantes :

- Détermination des données socio-démographiques, épidémiologiques et cliniques du patient. L'histoire du malade, sa résidence habituelle, la notion de voyage, ses habitudes alimentaires, l'hygiène du milieu, la présence de certains signes cliniques et biologiques particuliers permettent d'orienter le diagnostic;
- Prélèvements : un prélèvement approprié pour la technique utilisée, correctement effectué est nécessaire pour la qualité des résultats d'analyse ;
- Examen macroscopique. Il aide à l'établissement de diagnostic de certitude de certaines parasitoses : helminthoses (taeniasés, ascaridiose, oxyurose), ectoparasitoses (pédiculoses) ;
- Choix des techniques appropriées;
- Interprétation des résultats.

Actuellement l'application des principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) et de Biosécurité (gestion et élimination des déchets) et de Biosûreté est obligatoire dans les services de diagnostic de routine et de recherche en parasitologie. Les procédures opératoires standardisées écrites doivent être disponibles pour toutes les techniques effectuées dans le laboratoire.

Le diagnostic des affections parasitaires est basé essentiellement sur de nombreuses techniques biologiques. La majorité des tests couramment utilisés ne permettent pas de différencier les infections anciennes des infections latentes, des infections aiguës et des infections réactivées. Aussi, ces tests ne permettent pas toujours d'effectuer un suivi thérapeutique après traitement.

Le diagnostic des maladies parasitaires s'effectue par 2 principaux groupes de méthodes :

- diagnostic direct : mise en évidence du parasite dans le prélèvement (sang, liquides pathologiques, excréta) ; culture du parasite sur un milieu; culture par inoculation à l'animal ;
- diagnostic indirect : dans les cas où il est impossible de retrouver le parasite en cause, on effectue la recherche des anticorps spécifiques dirigés contre l'agent pathogène (techniques immunologiques).

Ces stratégies diagnostiques sont actuellement renforcées par les techniques de biologie moléculaire.

Le diagnostic de certitude des parasitoses s'effectue en général par des techniques morphologiques parasitaires. Mais, un diagnostic par des techniques immunologiques aux stades tissulaires est nécessaire dans certains cas : toxoplasmose, hydatidose, cysticercose, amibiase tissulaire. A l'heure actuelle, le diagnostic de certitude effectué par la biologie moléculaire (leishmanioses) est de plus en plus pratiqué dans certains laboratoires. Le développement récent de nouveaux outils diagnostiques a toutefois ouvert de nouvelles perspectives pour une amélioration de la détection des parasites. Tout d'abord, un certain nombre de nouveaux tests basés sur l'immunologie, très spécifiques et sensibles, ont émergé, tels que le test d'ELISA de dépistage de Falcon (FAST-ELISA), Dot-ELISA, système de détection d'antigène rapide (TDRs). Aussi, les approches basées sur la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel ont montré un fort potentiel d'utilisation dans le diagnostic de parasites avec une spécificité et une sensibilité élevées. Enfin, la technologie protéomique a également été introduite pour la découverte de biomarqueurs utilisant des tissus ou des fluides biologiques provenant de l'hôte infecté. D'autres techniques plus rapides et relativement moins coûteuses telles que la spectrométrie de masse comme le MALDI-TOF, sont actuellement utilisées pour le diagnostic en microbiologie.

Les méthodes de diagnostic biologique sont présentées comme suit :

- Modifications séro-hématologiques ;
- Techniques parasitologiques ;
- Techniques immunologiques ;
- Techniques moléculaires ;
- Autres méthodes : techniques histologiques et anatomo – pathologiques; culture des parasites ; inoculation à l'animal.

## **I. Modifications séro-hématologiques**

Il s'agit des modifications sérologiques et hématologiques qui permettent d'orienter le diagnostic des parasitoses. Le protidogramme, la numération formule sanguine et les marqueurs de l'inflammation sont des éléments d'orientation, mais difficiles à interpréter en cas de multiparasitisme dans les zones rurales des pays tropicaux.

### **A. Modifications sérologiques**

Au cours de la leishmaniose viscérale, on observe une forte augmentation des gamma globulines ; l'électrophorèse des protides indique une inversion du rapport albumine / globuline. L'hypoglycémie due à l'utilisation des glucides par le parasite et aggravée par l'effet hypoglycémiant de la quinine est un bon indicateur des formes graves et compliquées du paludisme.

## B. Modifications hématologiques

La numération formule sanguine permet de mettre en évidence les modifications des paramètres sanguins, induites par la présence de certains parasites dans l'organisme humain: anémie, leucopénie, hyperéosinophilie, mononucléose, thrombopénie. Une pancytopénie périphérique par exemple est une modification cytohématologique qui accompagne la leishmaniose viscérale.

### **Modifications des globules rouges**

L'anémie est le résultat d'une infestation parasitaire, de la malnutrition et d'autres infections bactériennes et virales associées chez le même malade dans les zones tropicales. Les principales causes d'anémies parasitaires sont l'anémie palustre chez l'enfant (lyse des globules rouges suite à la schizogonie intra-érythrocytaire), l'ankylostomose (vers hématophages spoliateurs). D'autres parasitoses sont anémiantes comme les leishmanioses viscérales (kala-azar), les bilharzioses hépato spléniques (*S. mansoni* ou *S. japonicum*, *S. mekongi*) qui sont accompagnées d'anémie normochrome, régénérative hémorragique, et la bothriocéphalose rare, pouvant entraîner une anémie macrocytaire mégalo-blastique par carence en vitamine B12 (ce tænia se nourrit des précurseurs de la vitamine B12).

### **Modifications des leucocytes**

**Une leucopénie.** Elle est décrite dans le paludisme viscéral évolutif. Elle est notée au cours de la leishmaniose viscérale (pancytopénie).

**Un syndrome mononucléosique.** Il est mis en évidence dans le cas de toxoplasmose acquise et de la trypanosomose humaine africaine.

**L'éosinophilie.** Une hyperéosinophilie sanguine est constante dans la plupart des parasitoses à helminthes (vers). Cette hyperéosinophilie est rapidement croissante en période de migrations larvaires surtout tissulaires et se stabilise souvent à un niveau plus faible en période d'installation des adultes (Courbe de Lavie). Les étiologies parasitaires des hyperéosinophilies sont nombreuses: ankylostomoses, filarioses, anguillulose, bilharzioses. L'auto infestation dans le cas de l'anguillulose entraîne une hyperéosinophilie oscillante avec des pics correspondant à l'auto-infestation. Elle est aussi notée au cours d'une trichinose, d'une distomatose et du syndrome de *larva migrans* viscérale. L'éosinophilie sanguine est normalement de 1 à 3% des leucocytes soit 100 à 300 éosinophiles/mm<sup>3</sup>.

### **Modifications des plaquettes**

**La thrombopénie.** Elle est décrite au cours de la leishmaniose viscérale, dans l'accès palustre aigu, dans le paludisme viscéral évolutif et dans les bilharzioses.

## II. Diagnostic parasitologique

### Prélèvements en parasitologie

Un prélèvement bien fait facilite l'exécution correcte des techniques et l'obtention d'un résultat précis et fiable. Les différents types de prélèvements réalisés en parasitologie concernent les prélèvements de sang, de selles, d'urines, les prélèvements génitaux, les prélèvements cutanéophanériens, les prélèvements des liquides cérébro-spinaux, les biopsies/ponctions tissulaires et des prélèvements divers (crachats, liquides broncho-pulmonaires, pus, ganglions). Les prélèvements s'effectuent dans les tubes ou pots propres et stériles dans certains cas.

### Techniques parasitologiques

Les techniques de diagnostic parasitologique seront étudiées selon le plan suivant :

- Diagnostic des parasites sanguicoles ;
- Examen parasitologique des selles ;
- Examen parasitologique des urines ;
- Examen parasitologique des prélèvements de la peau/phanères/muqueuses ;
- Examen parasitologique du liquide cérébro-spinal (LCS) (ou liquide céphalo-rachidien) (LCR) ;
- Examen parasitologique de divers prélèvements: génitaux, crachats, pus, sucs ganglionnaires, liquides broncho – pulmonaires.

## A. Diagnostic des parasites sanguicoles

### 1. Indications

Les principaux parasites rencontrés dans le sang sont des protozoaires (*Plasmodium*, trypanosomes, leishmanies, *Babesia* et *Theileria*) ou des helminthes (microfilaires sanguicoles appartenant à diverses espèces : *W. bancrofti*, *Brugia malayi*, *Loa-loa*, *Mansonella perstans*, *Mansonella ozzardi*)

### 2. Prélèvements (phase pré - analytique)

**Une collaboration entre le parasitologue et le clinicien :** Eléments d'orientation : origine géographique du patient, voyages récents ; renseignements cliniques du malade (signes observés) et paracliniques (NFS), traitements déjà prescrits.

Sang périphérique (prélèvement digital, sang veineux).

Trois types de prélèvements peuvent être réalisés dans le but de réaliser différentes techniques:

- Prélèvement d'une goutte de sang pour réaliser un étalement en vue d'un examen microscopique à l'état frais ;
- Prélèvement d'une goutte de sang pour réaliser un étalement de sang épais ou mince, qui doit être séché, puis coloré en général au Giemsa (goutte épaisse et frottis minces) ;
- Prélèvement de sang total dans un tube avec anticoagulant pour la réalisation de technique de concentration : triple centrifugation, leuco-concentration, Quantitative Buffy Coat (QBC). La nature de l'anticoagulant utilisé est importante. Les tubes de prélèvements utilisés sont les tubes EDTA (Ethylène Diamine Tetracétate Tripotassique). Les tubes à héparine et citratés donnent des résultats moins satisfaisants.

NB : Le temps du prélèvement peut varier selon la périodicité du parasite dans le sang. Par exemple, le prélèvement est nocturne (22h - 2 h) pour la recherche de *W. bancrofti* et diurne pour les autres microfilaires.

### **3. Techniques**

#### **- Etat Frais**

*Principe:* Cette technique consiste à faire un étalement de sang si possible fraîchement prélevé et de l'observer entre lame et lamelle au microscope optique. Elle permet de voir les parasites sanguicoles mobiles: trypanosomes et microfilaires (filarioses lymphatiques).

#### **- Goutte épaisse et frottis mince**

*Principe:* La goutte épaisse consiste à réaliser un étalement épais de sang circonscrit dans un cercle de 1cm de diamètre sur une lame porte objet. Cette lame est ensuite déshémoglobinisée et colorée au Giemsa. C'est une méthode de concentration parasitaire pour le diagnostic du paludisme.

Le frottis mince consiste à étaler une goutte de sang uniformément sur une lame de manière à obtenir une seule couche de cellules. Il permet après fixation et coloration, d'effectuer l'étude morphologique des éléments figurés du sang. Le frottis mince est indiqué pour l'identification des espèces plasmodiales dans le diagnostic du paludisme.

Indication : recherche de *Plasmodium*, de trypanosome et des microfilaires sanguicoles

#### **- Techniques de concentration de sang:**

##### **Centrifugation du sang :**

Cette technique est pratiquée particulièrement dans le diagnostic de la Trypanosomose Humaine Africaine. La densité des trypanosomes est proche de celle des leucocytes mais significativement différente de celle des érythrocytes. Ainsi, les trypanosomes sont séparés des érythrocytes. La technique classique de triple centrifugation de 10ml de sang n'est plus

utilisée. Elle est remplacée par une micro méthode utilisant un tube hématocrite permettant de séparer les cellules sanguines et la concentration des trypanosomes avec les leucocytes.

***Leuco-concentration :***

Indication: plasmodies, trypanosomes, microfilaires.

Principe : Cette technique consiste à prélever du sang veineux avec anticoagulant (5 ou 10ml), de faire la lyse des érythrocytes avec quelques gouttes de saponine à 1%, puis observer les parasites dans le culot après centrifugation. C'est une technique très sensible.

***QBC (Quantitative Buffy Coat)***

Indication : plasmodies, trypanosomes, microfilaires.

Principe : Cette technique utilise le même principe que la centrifugation du sang veineux et un tube capillaire dont la paroi est tapissée d'un colorant d'ADN, l'acridine orange, colorant de l'ADN parasitaire aussi.

Procédure : Le sang prélevé dans le tube capillaire est centrifugé ; les parasites dont les ADN sont colorés par l'acridine orange paraissent fluorescents au niveau de la couche leucocytaire (entre la couche de plasma et des érythrocytes). L'observation s'effectue à l'aide d'un microscope à fluorescence dans une chambre noire. Cette technique utilisant un matériel lourd et cher, est pratiquement abandonnée au profit des tests de diagnostic rapide (TDR) dans le diagnostic du paludisme.

***Technique de concentration par filtration :***

Elution du sang sur résines échangeuses d'ions

Principe. Les différentes cellules sanguines possèdent une charge électrique de surface connue, différente de celles des parasites. Les résines échangeuses d'ions sont des réseaux cellulose en suspension dans une solution tamponnée, et ont la capacité de retenir des cellules ayant une charge électrique précise. A l'heure actuelle, différentes colonnes à résines échangeuses d'ions sont conçues pour retenir des parasites précis.

Ainsi, la colonne contenant la cellulose DEAE (Diethylaminoethyl cellulose), en position verticale, permet de retenir les trypanosomes en utilisant le tampon m-AECT (mini Anion Exchange Centrifugation Technique). Les kits de mini colonne sont actuellement disponibles. Le liquide est recueilli au bas de la colonne, centrifugé, et le culot est examiné entre lame et lamelle.

***- Techniques de coloration du sang :***

Coloration au Giemsa. C'est une technique couramment utilisée. Les gouttes épaisses bien séchées sont colorées au Giemsa dilué en général entre 3% et 10% avec de l'eau distillée selon les protocoles. La durée de la coloration varie selon les dilutions de Giemsa. Le Giemsa dilué assure la déshémoglobination - coloration. Les frottis sont fixés par la même solution de Giemsa ou au May Grunwald Giemsa. L'utilisation du May Grunwald améliore la coloration des leucocytes.

Coloration histologique en parasitologie. Les colorations à l'hématoxyline et au PAS (Periodic acid-Schiff) sont utilisées en histologie pour l'identification des parasites. L'hématoxyline

colore les noyaux des trophozoïtes en rouge et le cytoplasme en bleu, alors que le PAS colore les noyaux en bleu et le cytoplasme en vert.

**- Identification des parasites**

La recherche des **trypanosomes et des microfilaires** dans le sang à l'état frais permet de visualiser les parasites selon leur forme, taille et mouvement, mais ne permet pas leur identification. L'identification des espèces s'effectue après la coloration au Giemsa.

**Paludisme.** La goutte épaisse est lue à l'aide d'un microscope binoculaire, à l'objectif x100 à immersion, au grossissement 1000. La présence d'un noyau rouge et d'un cytoplasme bleu sont les critères d'identification obligatoire dans le diagnostic du paludisme. La parasitémie est déterminée suivant la méthode quantitative. Les parasites sont comptés en même temps que les leucocytes ; puis le nombre de parasites par mm<sup>3</sup> de sang est calculé en estimant 6000 à 8000 le nombre moyen de leucocytes / mm<sup>3</sup> de sang.

Le frottis mince est lu à l'aide d'un microscope binoculaire, à l'objectif x100 à immersion, au grossissement 1000. Le diagnostic spécifique des espèces plasmodiales est posé selon les critères d'identification propres à chaque espèce. L'identification des espèces de *Plasmodium* humain s'effectue sur un frottis mince par la recherche des modifications de l'hématie parasitée (taille, forme, coloration, granulation) et des caractéristiques morphologiques (taille, forme, abondance des pigments malariques, granulations) des différents stades parasitaires (trophozoïtes jeunes et âgés, schizontes et gamétocytes).

**Les Babesia et Theileria** sont responsables de fièvre hémoglobinurique. L'examen de goutte épaisse ou de frottis mince permet d'observer des parasites intra – globulaires avec un noyau entouré de cytoplasme homogène. Les globules rouges contiennent 2 à 4 parasites. Le diagnostic différentiel concerne deux points: absence de gamétocytes morphologiquement identifiables, absence de pigments.

L'identification des **trypanosomes** après coloration : le parasite se présente sous deux formes : formes longues (25-35µm /2-3µm) et des formes courtes (14-25µm /4-5µm). Après coloration, le cytoplasme est en bleu, le noyau ovalaire ou sphérique en position centrale, coloré en rouge violet.

La clé d'identification **des microfilaires** est basée sur la périodicité, la répartition géographique et surtout sur leurs caractéristiques morphologiques. Les microfilaires sont retrouvées dans le sang périphérique seulement dans la nuit (périodicité nocturne) ou seulement dans la journée (périodicité diurne) ou tout au long des 24 heures (apériodique). La périodicité des espèces de microfilaire n'est pas stricte et ne constitue pas à elle seule une valeur diagnostique. La répartition géographique constitue un critère d'orientation du diagnostic. Ainsi, la transmission de *Loa Loa* s'effectue en Afrique Centrale.



**Caractéristiques morphologiques des microfilaires :**

- La gaine : sa présence est un bon critère diagnostique, mais sa mise en évidence n'est pas facile, car elle n'est pas colorée par le colorant habituel (Giemsa). *W. bancrofti*, *Brugia malayi* et *Loa Loa* possèdent des gaines.
- La taille : il existe des microfilaires de grandes tailles (300 / 8µm) : *W. bancrofti*, *B. malayi*, et *Loa Loa*) et de petites tailles (200 – 250 / 6µm) : *M. perstans*, *M. ozzardi*.

Le diagnostic différentiel des microfilaires s'effectue en plus de la gaine et de la taille, par la forme et la disposition des noyaux somatiques, la longueur de l'espace céphalique et les caractéristiques de l'extrémité postérieure.

## B. Examen parasitologique des selles

### 1. Indications

- diagnostic des protozoaires intestinaux (amibes, flagellés, coccidies, ciliés).
- diagnostic des helminthes intestinaux : schistosomes, douves, nématodes, cestodes.

### 2. Prélèvements (phase pré – analytique)

Certaines règles doivent être respectées pour que l'examen parasitologique des selles soit précis et efficace:

***Une collaboration entre le parasitologue et le clinicien :***

Éléments d'orientation : origine géographique du patient, voyages récents ; renseignements cliniques du malade (signes observés par le malade) et paracliniques (NFS), traitements déjà prescrits. Ces éléments importants devraient être mentionnés par le clinicien dans le bulletin d'examen.

***Préparation du malade à l'examen coprologique :***

Il faut interdire certains produits (laxatifs huileux, produits barytés, charbon, pansements intestinaux, fer) et éviter les aliments à résidus (légumes secs, légumes verts), aliments colorés (betterave).

Il est conseillé de répéter deux ou 3 fois les examens, pour éliminer une « période négative ».

***Effectuer correctement le prélèvement de la selle :***

Il faut utiliser toujours un récipient propre et sec. Il est nécessaire de prélever des fragments de selles à différents endroits à l'aide d'une spatule.

***Conservation des selles (par le froid, par les liquides fixateurs)***

La conservation des selles s'effectue par le froid (+ 4°C) ou par des liquides fixateurs (formol). La conservation provisoire à + 4°C pendant quelques jours présente le risque de développement de champignons. La conservation définitive utilisant l'eau formolée à 5% permet une bonne conservation des kystes, des œufs d'helminthes et des vers adultes. Cependant, les formes végétatives des protozoaires et certaines larves d'helminthes sont lysées pendant la conservation.

### **3. Examen des selles**

#### ***Examen macroscopique des selles :***

Il permet de noter l'aspect et la consistance des selles (liquide, dure, pâle), présence de glaires, de sang ou de vers adultes (ascaris, tænia, oxyure)

#### ***Examen microscopique des selles :***

L'examen microscopique permet d'observer les protozoaires (kystes, formes végétatives), les helminthes (œufs, larves, adultes ou fragments d'adulte) et les éléments non parasitaires (fibres végétales, cristaux).

#### ***Techniques***

##### ***Etat frais***

Principe : Il consiste à diluer les selles fraîchement émises avec de l'eau physiologique et d'observer entre lame et lamelle au microscope. Cette technique permet la mise en évidence des œufs, de kystes, des formes végétatives et des larves des parasites à partir des critères morphologiques.

Indications : l'intérêt de cette technique est d'observer les parasites mobiles (amibes, flagellés, ciliés)

##### ***Techniques de concentration des selles***

Les techniques de concentration sont celles par lesquelles, à partir d'une grande quantité de selles recueillies ; on obtient dans un faible volume des œufs, larves, kystes par élimination des déchets.

Les selles destinées aux techniques de concentration, doivent être préalablement homogénéisées avec de l'eau physiologique (NaCl à 9<sup>0</sup>/<sub>00</sub>), puis filtrées à travers une passoire à maille de 1mm<sup>2</sup> environ. Il existe deux types de techniques de concentration: les méthodes physiques de sédimentation et de flottation (Willis) ; les méthodes physico - chimiques dites diphasiques (Ritchie).

***Méthodes physiques de sédimentation et de flottation.*** La simple sédimentation ne nécessite pas l'utilisation de produit chimique, présente un intérêt pour la recherche des larves d'anguillule et des œufs non fécondés d'ascaris. Les méthodes de flottation reposent sur le principe que les œufs ont une coque qui les protège de la pénétration des liquides denses ; une dilution avec ces liquides laissent les œufs flotter en surface et les résidus

lourds dans le fond des récipients. Parmi ces techniques de flottation, la méthode de Willis utilisant une solution de NaCl à saturation (25g dans 100ml d'eau distillée) est indiquée pour la recherche des œufs d'ankylostome et d'oxyure. Il existe d'autres méthodes de sédimentation ou de flottation : méthode de Faust, méthode de Janecko et Urbanyl.

### **Méthodes physico – chimiques (méthodes diphasiques)**

Certaines substances chimiques comme l'éther par exemple ont une affinité pour certains résidus fécaux, d'autres sont dissoutes. Le principe de ces techniques consiste à mélanger les selles avec une solution déterminée d'éther ou d'acétate d'éthyle, d'agiter le tout, puis centrifuger pour avoir un culot contenant les œufs et kystes de parasites.

#### **Technique de Ritchie**

*Principe.* C'est une technique de concentration utilisant le mélange formol-éther. Les matières organiques sont dissoutes dans la phase organique (surnageant) tandis que les œufs et les kystes des parasites intestinaux sont retrouvés dans la phase aqueuse (culot).

*Indication:* c'est une technique très sensible permettant la mise en évidence des œufs / larves d'helminthes, des kystes et oocystes de protozoaires.

Outre la méthode de Bailenger couramment utilisée comme celle de Ritchie, d'autres méthodes diphasiques ont été également testées : méthode de Telemann modifiée par Rivas et méthode de Barthelemy.

#### **Techniques de coloration des selles:**

L'eau physiologique est utilisée pour homogénéiser les prélèvements de selle pour l'examen direct à l'état frais. **L'éosine ou le lugol** peut remplacer l'eau physiologique et permet de mieux visualiser les kystes à l'objectif 40X. Tandis que l'éosine colore le fond de la préparation en rose et les kystes non colorés, le lugol colore en jaune – brun les membranes et les noyaux du kyste.

**MIF** : Le mélange merthiolate - iode – formol (MIF) est utilisé pour colorer et conserver les selles pour éviter l'éventuelle détérioration des protozoaires particulièrement les kystes. L'utilisation du MIF a l'avantage de faire des examens différés.

#### **Technique de coloration de Ziehl Neelson modifiée par Henricksen Pohlenz**

*Principe* : les oocystes de coccidies sont colorés en rouge fuchsia ou en rose sur un fond vert malgré l'action de l'acide et de l'alcool.

*Résultats* : les oocystes de *Cryptosporidium* apparaissent colorés en rose fuchsia, et mesurent 4-6µm selon l'espèce causale. Les *Cyclospora* (10µm), et *Isospora* (15 – 20µm) ont une paroi colorée en rose fuchsia. Les levures sont colorées en vert. Les bactéries acido résistantes sont colorées en rose.

#### **Kato-Katz**

*Principe* : Il repose sur l'éclaircissement des œufs d'helminthes en utilisant une solution éclaircissante, la solution Kato (glycérine + vert de malachite). C'est une technique semi-

quantitative. Tous les œufs d'helminthes rencontrés dans la préparation sont identifiés et comptés. Le nombre total d'œufs observés est exprimé en nombre d'œufs par gramme de selles.

**Techniques spéciales: méthode de Baermann et Lee, scotch test de Graham**

La méthode de Baermann et Lee est une technique d'enrichissement permettant de concentrer les larves. Cette technique est basée sur l'hygrotropisme et le thermotropisme des larves rhabditoïdes de *Strongyloides stercoralis* ou d'ankylostomes. Ce test est très spécifique. Tandis que l'anguillule a une cavité buccale courte mais effilée, l'ankylostome a une longue cavité buccale et très effilée.

**Recherche des oxyures.** La recherche des oxyures (*Enterobius vermicularis*) s'effectue par le scotch test anal, de Graham ou par écouvillonnage anal. Le scotch test anal consiste à coller le scotch au pourtour anal puis le décoller après un temps d'adhésion des parasites sur le scotch qui est ensuite collé sur une lame porte – objet, observée au microscope à l'objectif 10X ou 40X. L'écouvillonnage anal consiste à frotter le pourtour anal avec un écouvillon stérile, à diluer dans de l'eau stérile et examiner entre lame et lamelle. Le prélèvement s'effectue le matin tôt avant toute toilette.

**Identification des éléments parasitaires (morphologie)**

**Protozoaires**

L'identification des formes végétatives s'effectue par l'observation des éléments suivants : mobilité, taille, présence ou absence des pseudopodes / des flagelles / de membrane ondulante / d'axostyle, l'aspect du cytoplasme (présence ou non des vacuoles) et du noyau (caryosome, chromatine).

L'identification des kystes s'effectue par l'observation des éléments suivants : la taille, la forme et la couleur et du contenu (cellules vitellines, blastomères, embryon).

**Helminthes**

L'identification des œufs d'helminthes est basée par l'observation microscopique : taille, forme (ovale ou arrondie), le contenu (larve, blastomères) et la surface (lisse, mamelonnée). NB : Il est très important de différencier les éléments non parasitaires à l'examen microscopique: poil végétal, cellules féculentes, cellules palissadiques de légumes, grains d'amidon, savon, cristaux de Charcot Leyden, cristaux d'acides gras, flore iodophile.

## C. Examen parasitologique des urines

**Indications:** recherche d'œufs de schistosomes, de *Trichomonas vaginalis*, de microfilaires accidentellement.

**Prélèvement:** recueil des urines dans un pot propre et sec.

**Techniques :** Il existe principalement deux techniques: centrifugation et filtration.

### **i. Technique de centrifugation**

Elle consiste à obtenir un culot urinaire après centrifugation (1500 trs / mn pendant 5 mn), puis de rechercher des parasites entre lame et lamelle.

Autres éléments rencontrés : levures, spermatozoïdes, larves de *W. bancrofti*, larves de *O. volvulus*).

### **ii. Filtration des urines (*S. haematobium*)**

Il s'agit d'une technique de concentration qui consiste à filtrer au travers d'un millipore 10ml d'urines pour identifier les œufs de *Schistosoma haematobium* qui apparaissent en violet par l'effet de la ninhydrine ou jaune brun par le lugol.

La charge ovulaire de *S. haematobium* est évaluée en nombre d'œufs par 10ml d'urine. L'intensité de l'infection est définie selon la classification de l'OMS (1985). Trois classes d'intensité ont été définies : négatif (absence d'œufs) ; faibles excréteurs (1-49 œufs/10ml d'urine ; forts excréteurs ( $\geq 50$  œufs/10ml d'urine).

## **D. Examen parasitologique des prélèvements de la peau**

**Indications** : onchocercose, leishmaniose, gale et pédiculoses.

**Prélèvements** : Les prélèvements réalisés sont la « Biopsie Cutanée Exsangue » (BCE) pour le diagnostic de l'onchocercose ; la biopsie, le pus, les squames (leishmaniose).

Pour le diagnostic de la leishmaniose cutanée, les prélèvements sont réalisés au niveau des lésions cutanées, des muqueuses (grattage) ou une biopsie. Le prélèvement ponction-aspiration s'effectue sur le bord de la plaie après injection d'eau physiologique à l'aide d'une aiguille montée sur la seringue. Les frottis confectionnés sont fixés au méthanol, puis colorés au Giemsa.

### **Examen**

Le diagnostic différentiel de l'*O. volvulus* avec *Mansonella streptocerca* après coloration au MGG : *O. volvulus* et *M. streptocerca* sont identiques par leur taille (300 $\mu$ m x 8 $\mu$ m) et l'absence de gaine. Elles diffèrent par leur extrémité antérieure (espace céphalique long pour *O. volvulus*, court pour *M. streptocerca*) et leur extrémité postérieure (incurvée avec noyaux subterminaux pour *O. volvulus*, en « crosse » avec noyaux terminaux pour *M. streptocerca*).

**Les leishmanies** se présentent sous deux formes :

- Forme intracellulaire amastigote (dans les macrophages) chez l'homme et l'animal, de forme ovoïde de 2 à 6 $\mu$ m de diamètre; un noyau arrondi plus un kinétoplaste en bâtonnet. Des amastigotes peuvent être vues en phase extracellulaire après éclatement des macrophages ;
- Forme extracellulaire : promastigote chez le vecteur ou en culture *in vitro*, allongée, libre, de 10-25 $\mu$ m et très mobile grâce à un flagelle qui s'échappe à l'extrémité antérieure, avec un noyau central et en avant un kinétoplaste situé à la base du flagelle.

**Diagnostic de la gale.** La connaissance de la biologie du *Sarcoptes* est indispensable pour réaliser le diagnostic de la gale. Les sarcoptes s'accouplent sur leur hôte. La femelle fécondée s'enfonce dans la peau en creusant une galerie. Dans ce tunnel appelé sillon, elle avance de 1 à 2mm / jour en se nourrissant de la couche cornée et de l'exsudat de la peau. Après repérage d'un sillon, il faut disséquer avec un vaccinostyle et prélever le contenu du sillon. L'examen au microscope à l'objectif 10 X permet d'observer les œufs et l'acarien adulte femelle (globuleux, taille).

**Diagnostic de la pédiculose:** mise en évidence des parasites « peigne à pou », et/ou des lentes vivantes « examen visuel »

- Pédiculose du cuir chevelu, les lentes sont plus rapidement retrouvées que les poux.
- Pédiculose à *Pediculus humanus*, poux et lentes doivent être recherchés à la face interne des vêtements ou la literie.
- *Pthirose*, les parasites sont recherchés sur les poils du pubis parfois axillaires, de la barbe mais aussi des cils et sourcils; ils peuvent se déplacer assez rapidement pour tenter de fuir vers les parties les plus cachées. Leur mobilité aide à leur découverte.

## E. Examen parasitologique du Liquide céphalo-rachidien (LCR)

**Indications :** trypanosome ; *Loa loa* (complications neurologiques), *O. volvulus* (onchocercose généralisée), *Naegleria fowleri*.

**Examen du LCR :** la démarche diagnostique de l'examen des LCR est la suivante :

- Prélèvement stérile ;
- Etude cytologique du LCR : numération des cellules (utilisation de cellule de Malassez ou de cellule de Nageotte) ;
- Examen microscopique à l'état frais ;
- Examen après coloration du frottis (culot de centrifugation) au Giemsa ;
- Identification. La recherche des parasites mobiles, dans le liquide céphalo-rachidien à l'état frais : mouvement, forme, taille. L'examen du frottis étalé, fixé, coloré au Giemsa ou à l'hématoxyline permet d'identifier les parasites.

## F. Diagnostic parasitologique des prélèvements divers

**Le suc dermique, le pus, les biopsies et les prélèvements ganglionnaires**

*Indications et prélèvements:* leishmaniose (suc dermique, pus), trichinellose et leishmaniose (biopsie, pus), trypanosomose (ganglions), dracunculose (pus), onchocercose (suc dermique).

Pour les différents types de prélèvements mentionnés ci-dessus, il est important de noter l'aspect macroscopique et la présence de certaines cellules spéciales (étude cytologique). En général, les sucs dermiques, les biopsies et les prélèvements ganglionnaires sont examinés à

l'état frais dilués dans de l'eau physiologique; ensuite sont colorés au Giemsa ou par un autre colorant et examinés.

**Prélèvements uro-génitaux et vaginaux:** la récolte des sécrétions vaginales et génitales s'effectue par écouvillonnage ou raclage des muqueuses. L'examen direct est effectué immédiatement après le prélèvement pour observer les parasites mobiles. Une coloration éventuelle au Giemsa ou à l'hématoxyline permet d'identifier le parasite.

Indication : trichomonose uro – génitale.

**Examen des crachats et des produits de sécrétions broncho-alvéolaires**

Indications : paragonimoses, pneumocystose, toxoplasmose.

**Les prélèvements ganglionnaires et de moelle osseuse (myélogramme)** sont indiqués dans le diagnostic de la THA et de la leishmaniose viscérale. Le prélèvement est réalisé par une ponction sternale ou de la crête iliaque. Après observation du prélèvement à l'état frais, un frottis est confectionné et coloré au Giemsa. Pour la recherche des leishmanies, l'examen microscopique permet la recherche des formes amastigotes intracellulaires dans les macrophages sur un frottis.

**Recherche dans la cornée de l'œil:** la recherche des parasites du genre *Acanthamoeba* dans les infections oculaires est réalisée après un prélèvement de la cornée.

### III. Diagnostic immunologique en parasitologie

#### A. Introduction

Le diagnostic immunologique repose soit sur la mise en évidence directe d'éléments parasitaires: parasites en entier, fragments parasitaires, antigènes parasitaires (antigènes circulants, coproantigènes) à l'aide d'anticorps spécifiques disponibles, soit sur la mise en évidence indirecte, d'une réponse immunitaire à l'infestation par la recherche d'anticorps circulants. Les tests de dépistage reposent sur des méthodes classiques: techniques d'agglutination, d'immunofluorescence directe ou indirecte, ELISA. La mise en œuvre du diagnostic immunologique doit prendre en compte :

- **La spécificité des tests :** Les helminthes ou les protozoaires ont de nombreux antigènes communs, et le risque de réactions croisées entre helminthes ou entre protozoaires est important ;

- **La production des antigènes :** La production d'antigènes nécessaires à la réalisation de kits diagnostiques est le plus souvent difficile car beaucoup de parasites ne s'adaptent pas aux conditions de culture au laboratoire afin d'avoir une quantité suffisante d'antigènes pour la réalisation des kits. Cependant, des kits de dépistage existent vis-à-vis de certaines maladies parasitaires : paludisme, leishmaniose, toxoplasmose, giardiose, dirofilariose cardio-pulmonaire.

Le diagnostic immunologique est nécessaire et obligatoire pour certaines parasitoses, dans les cas où il est impossible de mettre le parasite en évidence :

- Au cours des phases de migration parasitaire : ankylostomes (40 jours), bilharzioses (60 jours), douves (90 jours) ;
- Parasites restant chez l'homme à l'état larvaire (kyste hydatique) ;
- Parasites strictement tissulaires (toxoplasme, trichine) ;
- Si le diagnostic est effectué à distance de la phase aiguë de la maladie. Ex : les IgG anti-toxoplasme persistent toute la vie et sont protectrices.

## **B. Méthodes immunologiques**

### **1. Exploration de l'immunité cellulaire**

L'exploration de l'immunité cellulaire s'effectue par des tests de prolifération cellulaire de réalisation assez délicate. Ces tests ne sont pas réalisés dans les laboratoires de diagnostic de routine, réservés pour les laboratoires de recherche.

### **2. Techniques sérologiques**

**Prélèvements** : sérum, LCR, biopsies (apposition), divers liquides biologiques.

**Techniques.** Les techniques sont regroupées en 3 types : méthodes à antigènes vivants, méthodes à antigènes fixés, méthodes utilisant les antigènes solubles.

#### **i. Méthodes à antigènes vivants :**

Principe : Il consiste à mettre en contact un stade évolutif du parasite et le sérum prélevé d'un patient supposé ayant des anticorps. L'exemple typique est le « Dye test » utilisé dans le diagnostic de la toxoplasmose.

#### **ii. Méthodes à antigènes fixés**

Les techniques sont basées sur l'immunofluorescence, l'agglutination et l'hémagglutination.

#### **Immunofluorescence**

*Principe* : Elle consiste à déposer une coupe de parasite sur une lame porte objet et d'ajouter le sérum du patient et un conjugué fluorescent. Il apparaît une fluorescence verte en cas de positivité et une coloration rouge en cas de négativité. La lecture s'effectue dans une chambre noire avec un microscope à fluorescence. L'immunofluorescence indirecte (IFI) est réalisée par des laboratoires d'analyses.

*Application* : amibiase, paludisme, toxoplasmose, bilharziose, giardiose, microsporidiose.



### **Agglutination directe.**

*Principe:* La technique consiste à placer des parasites libres ou constituants de parasite dans un puits et d'ajouter le sérum du patient. En cas de positivité, il apparaît un réseau blanchâtre (agglutinat).

*Application :* toxoplasmose, THA

Card Agglutination Test for Trypanosomiasis (CATT) est une application de test d'agglutination utilisée dans les campagnes de dépistage de la THA. Le sang total hépariné ou le sérum d'un sujet atteint de THA est mis en contact de trypanosomes fixés au formol ; puis coloré au bleu de Coomassie. On observe une agglutination visible à l'œil nu indiquant un test positif.

### **Hémagglutination**

*Principe :* Les antigènes parasitaires fixés sur des hématies inertes sont placés dans un puits dans lequel on ajoute le sérum du patient. Il y a agglutination en présence d'anticorps ; en absence d'anticorps, les globules rouges sédimentent au fond.

*Application :* toxoplasmose, hydatidose, bilharziose.

### **iii. Méthodes utilisant les antigènes solubles**

Les tests utilisés couramment sont la double diffusion en gélose et l'ELISA et les nouvelles techniques de diagnostic rapide (TDR). Des anticorps monoclonaux permettent la détection et l'identification des parasites. Ces anticorps détectent chez les patients les antigènes parasitaires et les produits du métabolisme et de la lyse des parasites. Ainsi, de nombreux tests de diagnostic rapide (TDR) sont actuellement mis au point pour le diagnostic des parasitoses (kits sur le marché): paludisme (Parasight, OptiMAL<sup>®</sup>, Paracheck<sup>®</sup>, SD Bioline<sup>®</sup>); filariose lymphatique.

L'**ELISA** est une technique immunoenzymatique qui est utilisée par certains laboratoires. De plus en plus, on trouve des kits commerciaux (WitNESS Leishmania). L'ELISA a une sensibilité très bonne, ce qui peut parfois en diminuer sa spécificité, ou rendre positifs des sujets qui ont été infectés mais qui sont guéris et présentent juste une "trace sérologique" d'infection. L'ELISA est beaucoup utilisée dans les laboratoires de recherche pour le diagnostic et le suivi sérologique des protozoaires sanguicoles.

## **IV. Diagnostic moléculaire en parasitologie**

Le diagnostic moléculaire en parasitologie n'est pas réalisé en général dans les laboratoires pour le diagnostic de routine. Cependant, certains laboratoires de référence utilisent des techniques moléculaires comme diagnostic de routine pour la confirmation ou comme diagnostic de certitude. Les méthodes moléculaires nécessitent des équipements et des locaux particuliers et des réactifs onéreux. Les nouvelles technologies telles que la Boucle Amplification Isotherme Facilitée (LAMP) et le Luminex vont révolutionner le diagnostic des maladies parasitaires.

## A. Approches basées sur les acides nucléiques

Les nombreuses limitations de la microscopie et des tests basés sur la sérologie ont influencé les parasitologues à l'utilisation des méthodes d'amplification de gènes avec l'avènement de la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR). En plus de la PCR classique, la PCR en temps réel (RT-PCR) pour la détection de plusieurs infections parasitaires a été mise au point. Les approches basées sur des molécules d'acides nucléiques offrent une plus grande sensibilité et une plus grande spécificité par rapport aux tests diagnostiques existants. Ils permettent la détection d'infections à partir d'échantillons faiblement parasités, y compris ceux provenant d'échantillons de patients asymptomatiques. La PCR multiplexée permet la détection simultanée de multiples séquences dans le même tube de réaction qui s'avèrent utiles dans le diagnostic de plusieurs infections parasitaires du même échantillon et en même temps.

## B. Réaction de polymérisation en chaîne et en temps réel (RT-PCR)

La RT-PCR, qui en plus de l'amplification comme dans le cas de la PCR conventionnelle, permet de quantifier (PCR quantitative ou qPCR) les nombres de copies représentant chacune un parasite dans l'échantillon analysé. La qPCR permet de réduire considérablement le risque de contamination et l'introduction de faux positifs. Lorsqu'elle est multiplexée, la RT-PCR permet l'analyse à haut débit de différentes séquences dans une seule réaction à tube fermé. Cette approche du multiplexe peut permettre par exemple, l'identification des quatre espèces de *Plasmodium* (*falciparum*, *vivax*, *malariae* et *ovale*) dans un seul tube de réaction même avec des parasitémies très faibles.

La technique de la qPCR est très longue et demande en amont une extraction d'ADN. L'avantage par rapport à la microscopie est sa sensibilité et sa spécificité élevées. De même, la RT-PCR multiplexée s'est révélée utile pour différencier les souches sensibles des souches résistantes aux médicaments contre le paludisme dans un même prélèvement. Ceci est important pour une prescription antipaludique appropriée.

Bien que les méthodes basées sur l'ADN aient montré une excellente sensibilité et spécificité, l'introduction de ces méthodes dans les pratiques quotidiennes de laboratoire est encore rare, en particulier dans les régions endémiques rurales. Il y a également un manque de standardisation de la PCR entre les laboratoires, notamment les méthodes d'extraction de l'ADN, les séquences d'amorces et différents protocoles d'amplification utilisés constituent des facteurs susceptibles de provoquer cette diversification des résultats. L'automatisation de l'extraction d'ADN améliorerait certainement les analyses par PCR du diagnostic des maladies parasitaires.

## C. Boucle Amplification isotherme Facilitée (LAMP)

La boucle d'amplification isotherme facilitée « Loop – mediated isothermal PCR » (LAMP) est une méthode d'amplification unique avec une spécificité et une sensibilité élevées pouvant discriminer les séquences d'acide nucléique qui varient par un seul nucléotide. Contrairement à la PCR conventionnelle, le LAMP permet d'amplifier une grande quantité d'acide nucléique (ADN ou ARN) à une température constante comprise entre 60 – 65°C. Récemment, les parasitologues ont adapté l'approche LAMP pour la détection de plusieurs parasites humains (*Entamoeba*, *Trypanosoma*, *Taenia*, *Plasmodium*, *Cryptosporidium*). La plupart de ces études ont mis en lumière les nombreux avantages de cette méthode par rapport à la technique de PCR classique.

## V. Autres méthodes de diagnostic des parasites

### A. Méthodes histologiques et anatomo-pathologiques en parasitologie

Les méthodes histologiques et anatomo-pathologiques présentent particulièrement un intérêt pour le diagnostic des parasites à localisation tissulaire ou des parasites pendant leur phase tissulaire au cours de leur cycle. Il faut noter aussi que certaines colorations classiquement utilisées en histologie sont aussi utilisées en parasitologie.

#### **Indications :**

Les réactions inflammatoires dues à la réaction de l'hôte parasité sont rencontrées au cours de nombreuses parasitoses :

- Parasitoses dues aux arthropodes (insectes ou acariens) : myiases, gale, puce, pentastomoses ;
- Flagellés sanguicoles et tissulaires : leishmanioses, trypanosomoses humaines africaines et américaines ;
- Rhizopodes : amébose entraînant amébobome ;
- Coccidies digestives : *Isospora*, *Cryptosporidium* ;
- Coccidies tissulaires : toxoplasme ;
- Trématodes : douve et schistosome (granulome bilharzien) ;
- Cestodes : hydatidose ;
- Nématodes à localisation digestives (trichocéphale, oxyure) à phase de migration larvaire : ascaris, ankylostome, anguillule ;
- Nématodes tissulaires : filarioses lymphatiques, onchocercose (nodule), loa loa, *Dracunculus*, dirofilarioses.

### **Techniques**

L'anatomie pathologique étudie les tissus pathologiques. La démarche diagnostique pour l'identification des parasites dans les tissus pathologiques est la suivante :

- Les différents types de prélèvements sont : les pièces opératoires à fixer rapidement, les biopsies, les prélèvements sur un cadavre à fixer le plus tôt possible après le décès ;
- Fixation : le formol à 4% est en général utilisé pour la fixation ;
- Etalement du frottis ou de la coupe sur une lame porte objet ;
- Coloration ;
- Examen microscopique et identification des lésions et des parasites. Les parasites sont reconnaissables par leurs morphologies.

### **Colorants en histologie et anatomo-pathologie**

Les colorants sont utilisés pour colorer les tissus et les parasites. Les colorants habituellement utilisés sont :

- Hématéine / Eosine / Safran (HES) utilisé en routine en histologie. L'hématéine colore les noyaux et l'éosine colore le cytoplasme ;
- May Grunwald Giemsa (MGG). Il est utilisé pour colorer les frottis sanguins, les ponctions de liquides inflammatoires et les coupes d'organe ;
- Bleu de toluidine ;
- Réactif de Schiff à l'acide périodique.

## **B. Culture des parasites**

La culture des parasites est réservée pour la recherche.

### **1. Culture des parasites du sang et des tissus**

**La culture du *Plasmodium*** a été réalisée pour la première fois par Trager et Jensen en 1976. La culture comporte des exigences : renouvellement du milieu tous les jours, ajout de globules rouges compatibles, atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> et 10% de sérum humain. Le milieu de culture de base est le milieu RPMI 1640. La culture peut se faire à partir du sang parasité ou de parasites cryoconservés.

*Indication* : préparation des antigènes pour la sérologie ou pour des essais de vaccins, test *in vitro* et *ex-vivo* pour l'étude de la chimio sensibilité des souches de *Plasmodium* aux antipaludiques.

**La culture des trypanosomes** présente quelques difficultés : la culture nécessite 10 – 30 jours ; un milieu de culture à base de sang non commercialisé; elle peut être négative même en présence de trypanosomes.

*Indication* : Diagnostic et isolement sur le terrain des trypanosomes humains et animaux.

La culture des leishmanies est réalisée avec succès en utilisant le milieu Novy Mac Neal, modifié avec Nicolle appelé milieu NNN. C'est une gélose salée additionnée de sang de lapin. Ensemencer au bec Bunsen le prélèvement (sang citraté, moelle, suc ganglionnaire). Incuber à 22<sup>o</sup> Celsius pour les leishmanies et à 37<sup>o</sup> Celsius pour les trypanosomes. Pour les leishmanies après le 8<sup>ème</sup> jour, on examine au microscope entre lame et lamelle toutes les semaines pendant au moins 1 mois. Les parasites se multiplient sous forme promastigote, mobiles, d'environ 20 microns de taille ; un frottis confectionné, est bien coloré au May Grunwald Giemsa.

**Toxoplasma gondii** peut être reproduit par culture cellulaire. La meilleure méthode d'isolement du parasite est la culture sur fibroblastes humains (souche M.R.C.5) à partir de placentas humains. La culture est positive dans les 72 heures.

## 2. Culture des parasites fécaux (coprologie parasitaire).

### **Protozoologie**

#### **Intérêt**

- permet la multiplication de rares amibes et flagellés observés à l'examen direct et dont le diagnostic n'a pas été établi avec certitude ;
- permet la détection de certains flagellés sans kystes (*Trichomonas*) ou à kystes rares.

**Ensemencement.** Prélever 0.5g de selles à divers endroits ; ensemercer dans le milieu de culture et incuber à l'étuve 37 degrés.

#### **Culture des amibes**

##### **Culture polyxénique de *Entamoeba histolytica* :**

La croissance de l'amibe exige la présence de germes microbiens associés et de grains d'amidon. Le milieu utilisé à cet effet est le milieu de Dobell constitué de phase solide (sérum de cheval stérilisé) et de phase liquide saline. L'amidon de riz stérilisé est ajouté au cours de l'ensemencement.

Entretien des cultures : L'isolement des amibes à partir des selles se fait en mettant 1 gramme de selles dans un tube de milieu ; puis contrôler la croissance tous les jours. Dès que les amibes apparaissent, procéder au repiquage dans un tube de milieu neuf. Le rythme de repiquage est de 2 fois par semaine.

##### **Culture axénique de *Entamoeba histolytica* :**

Cette culture consiste à faire la multiplication des trophozoïtes en l'absence de tout germe associé et de substances particulières (amidon) qui gênent le développement des amibes. Elle a l'avantage d'obtenir des amibes à l'état pur pour la préparation des antigènes solubles ou figurés, pour l'analyse des isoenzymes et du pouvoir pathogène des amibes. Cette méthode suit les indications données par Diamond (1968). Le milieu utilisé est un milieu complexe appelé TYI-S-33 Complet (Diamond) constitué de Bouillon TYI (complexe de sels +

caséine + extrait de levure + acide ascorbique) + mélange vitamines-Tween 80 + sérum bovin + antibiotiques.

Entretien des cultures : Le repiquage est nécessaire tous les 3 ou 4 jours.

**Milieux de culture pour les flagellés intestinaux et assimilés.** Le milieu TYI-S-33 de Diamond supplémenté en bile, sans vitamines (Keister 1983) est utilisé pour la culture de *Giardia* avec un repiquage tous les 3 ou 4 jours. La culture de *T. vaginalis* est aussi possible dans un milieu similaire.

### **Lecture**

Les tubes sont examinés tous les jours pendant 3 jours pour les flagellés dans le liquide et pour les amibes à la surface du sérum coagulé en raclant légèrement.

### **Helminthologie**

La coproculture parasitaire est réalisée pour le diagnostic différentiel des larves d'anguillule et d'ankylostomes au cours des enquêtes épidémiologiques. Il existe trois techniques de culture : culture sur buvard en boîte de Pétri, culture sur buvard en tube en essai, culture sur charbon. Dans tous les cas, l'incubation a lieu dans une étuve à 25°C. La lecture s'effectue à J2 (larves rhabditoides), à J3 (larves strongyloides et les stades stercoraux mâles et femelles). NB : il est nécessaire de prendre des précautions pour éviter la contamination transcutanée par les larves.

## **C. Inoculation à l'animal**

L'inoculation à l'animal n'est pas effectuée en diagnostic de routine. C'est une méthode réservée pour la recherche dans certaines parasitoses : trypanosomose, leishmaniose.

Intérêt

Confirmer des diagnostics douteux par les techniques classiques de diagnostic.

### **Trypanosomose**

L'inoculation de sang, de LCR ou du prélèvement ganglionnaire est possible aux animaux de laboratoire : rat, cobaye, souris blanche. Deux (2 ml) ml de sang sont inoculés pour les cobayes et hamsters ou 0.5ml de sang pour les souris. Les animaux sont surveillés 2 fois par semaine, par examen microscopique entre lame et lamelle d'un prélèvement sanguin à la queue ou à l'oreille. Les animaux sont sacrifiés et disséqués après le développement des parasites dans leurs organismes.

Bon résultat pour *T. b. rhodesiense*, et médiocre pour *T. b. gambiense*.

### **Leishmanioses**

Les divers prélèvements d'un malade suspect peuvent être inoculés à un animal (hamster) par voie intra péritonéales. Les animaux sont sacrifiés après 2 - 4 mois ; puis les leishmanies sont recherchées dans les appositions de foie, de rate, colorées au MGG. Vu la lenteur de l'isolement, cette méthode est peu utilisée.

## **Conclusion**

Le diagnostic de certitude des parasitoses reste toujours parasitologique pour la majorité des affections parasitaires. Le diagnostic immunologique est réalisé comme diagnostic de certitude dans les parasitoses pendant leur phase tissulaire (toxoplasmose, hydatidose, cysticercose, amibiase). Les méthodes moléculaires, dans l'avenir, vont améliorer (sensibilité et spécificité) la détection des parasites. Ces méthodes permettront de différencier les infections anciennes, des infections latentes, des infections aiguës et des infections réactivées. L'inoculation à l'animal et la culture des parasites sont réservées pour la recherche.

## Bibliographie

ANOFEL: Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Association Française des Enseignants de Parasitologie; 3eme édition. Octobre 2013

BAILENGER. Coprologie parasitaire humaine. E. Drouillard ed. Bordeaux 1958

DELUOL Anne-Marie. Atlas de Parasitologie. Guide pratique du diagnostic microscopique. Tome II. Flagellés, Infusoires et coccidies. Editions Varia, 3, rue de l'Abbe-Grégoire 75006 Paris,

DIAMOND LS. (1968). Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica* – like amoebae. *Journal of Parasitology*, 54, 1047 – 1056.

DIEZ M, FAVALORO L, BERTOLOTTI et al. « Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas » disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. *American Journal of Transplantation*, vol. 7, no6, pp 1633-1640, 2007.

GENTILINI M. Médecine tropicale. Flammarion – Sciences. 1993.

KEISTER DB. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-33 medium supplemented with bile, *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 77, 487-488.

MARKELL EK, VOGEL M, JOHN DT. *Medical Parasitology*. W. B. Saunders Company. 7<sup>th</sup> Edition, 1992.

MOMAR NDAO. *Diagnosis of Parasitic Diseases: Old and New Approaches*. Academic Editor: Herbert B. Tanowitz, 2009. National Reference Centre for Parasitology, McGill University Centre for Tropical Diseases, Montreal General Hospital, 1650 Cedar Avenue R3-137, Montreal, QC, Canada H3G 1A4.

MULDREW KL. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Current Opinion in Pediatrics*, vol. 21, no 1, pp. 102 – 111, 2009.

OMS. Rapport sur le paludisme dans le monde, 2016

OMS. Géo helminthiases. Aide-mémoire N 366. Janvier 2017.

PAPPAS MG. Recent applications of the Dot-ELISA in immunoparasitology, vol. 29, no, 2-3, pp. 105.-129, 1988.

PARIDA MM, SANNARANGAIAH S, DASH PK, RAO PVL, MORITA K. "Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Review in Medical Virology*, vol 18, no 6, pp 407 – 421, 2008.

PARIS DH. IMWONG M, FAIZ AM et al. "Loop – mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*, vol, 77 no 5, pp 972 – 976, 2007

PETITHORY J.C & ARDOIN – GUIDON. Parasites sanguins. *Diagnostic Biologique. Cahier de formation. Biologie médicale*. N0 23. Décembre 2001.

ROUSSET J.J. Copro - parasitologie pratique, Intérêt et méthodologie, Notions sur les parasites du tube digestif. Editions ESTEM, 1993



*Généralités sur le diagnostic biologique en parasitologie*

WERY M. Protozoologie médicale. De Boeck & Larcier. S.A., 1995.

WHO, Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis (GELF)

Method in Malaria Research 6<sup>e</sup> Ed.

## **2 MODIFICATIONS HÉMATOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES AU COURS DES PARASITOSSES.**

---

*Rédigé par Pr Tine Roger (Sénégal), Relu par Pr Guinguemdé Robert (Burkina Faso) et Pr Ndiaye Mouhamadou (Sénégal)*

## **Introduction**

Les modifications hématologiques et biochimiques constituent des éléments d'orientation biologique au diagnostic des parasitoses.

Les modifications hématologiques peuvent concerner l'hémoglobine et les lignées cellulaires. On peut ainsi observer des perturbations concernant :

- L'hémoglobine à type de syndrome anémique.
- Les leucocytes :
  - Hyperéosinophilie,
  - Leucopénie,
  - Syndrome mononucléosique
- Les plaquettes à type de thrombopénie.

Les modifications biochimiques sont fonction de la localisation de l'infection : modifications biochimiques dues à des atteintes systémiques, modifications biochimiques dues à des atteintes locales.

## **I. Modifications hématologiques au cours des parasitoses**

### **A. Eosinophilie parasitaire**

L'hyper-éosinophilie sanguine est une augmentation au niveau de la numération de la formule sanguine du taux de polynucléaires éosinophiles supérieurs à 500 / mm<sup>3</sup>. Une hyper-éosinophilie est considérée comme :

- Modérée : lorsque le taux de polynucléaires est  $> 500/\text{mm}^3 < 1500/\text{mm}^3$ , soit 4-10% ;
- Forte : si le taux de polynucléaire est  $> 1500/\text{mm}^3 < 3000 \text{mm}^3$ , soit 10-30% ;
- Massive : lorsque le taux de polynucléaire est  $> 3000/\text{mm}^3$ , soit plus de 30%.

### **1. Pathogénie de l'hyperéosinophilie parasitaire**

Les polynucléaires éosinophiles sont des facteurs antihistaminiques ; leur rôle est de phagocyter les mastocytes et de neutraliser l'histamine que ceux-ci libèrent.

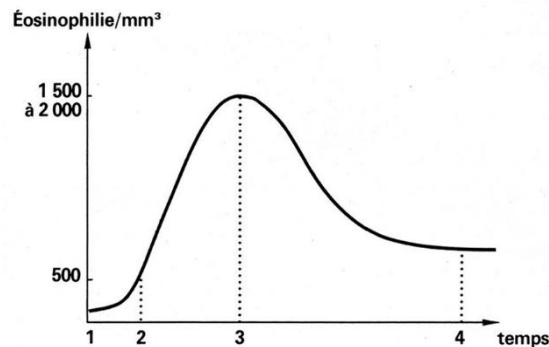
Au cours de leur infection, certains parasites diffusent des substances toxiques voisines de l'histamine. Dans un premier temps, ces substances étrangères du parasite provoquent l'hyperplasie du système mastocytaire, en réaction de défense; ce système capture puis libère l'histamine. Dans un second temps, se produit l'hyper éosinophilie en vue de neutraliser la toxicité de l'histamine.

## 2. Caractères généraux d'une éosinophilie parasitaire

L'éosinophilie parasitaire est un phénomène dynamique variant en fonction du temps, du parasite mais aussi selon l'hôte.

- *En fonction du temps* : Après un temps de latence d'une à trois semaines, la quantité d'éosinophiles augmente très rapidement dans le sang circulant pour atteindre un maximum, suivi d'une chute rapide puis lente décrivant la courbe de Lavier (Figure 2. 1).

Après déparasitage complet, l'éosinophilie revient rapidement à la normale et peut constituer un bon test d'efficacité thérapeutique.



1. Infestation - 2. Apparition de l'éosinophilie après une phase de latence - 3. Maximum de la courbe - 4. Emission des œufs dans les selles par les vers adultes.

Figure 2. 1 : Courbe d'évolution de l'éosinophilie sanguine au cours de parasitoses (Courbe de Lavier)

- *Selon l'espèce parasitaire en cause* :

Il existe une variabilité dans la présentation des éosinophilies qui tient compte du mode évolutif de l'infection parasitaire.

- Lorsque la parasitose évolue d'une seule tenue, l'éosinophilie sanguine suit la courbe de Lavier.
- Lorsqu'il existe des poussées aiguës, avec des phénomènes allergiques, chaque poussée correspond à une remontée de l'éosinophilie avec une succession en clochers.
- En cas de phénomène d'auto-infestation, les poussées d'éosinophilie sont fréquentes et persistantes et l'amortissement est interminable.

- *Selon la localisation du parasite*

La localisation du parasite joue également un rôle important dans l'évolution de l'éosinophilie.

- Pour les parasites intestinaux avec cycle larvaire dans les tissus, l'éosinophilie augmente durant la phase de migration larvaire puis diminue plus ou moins vite lorsque le parasite devient adulte dans le tube digestif.

- Lorsque tout le cycle se passe dans les tissus, l'hyper-éosinophilie est importante et l'amortissement est très lent. Mais lorsque le parasite bien qu'intra-tissulaire est entouré d'une coque imperméable, il n'y a pas d'hyper-éosinophilie.
- Lorsque le parasite est en impasse chez l'homme du fait de sa non spécificité, l'éosinophilie est très élevée et durable.

- *Selon la réaction de l'hôte :*

Des facteurs tels que l'hyperactivité corticosurrénalienne, la sécrétion d'oestrogènes stimulent l'éosinophilie.

### **3. Aspects évolutifs de l'éosinophilie parasitaire**

En fonction de l'espèce parasitaire en cause, on peut retrouver certaines particularités au cours des éosinophilies.

- **Anguillulose** : l'éosinophilie croît progressivement dans le premier mois qui suit la primo-infestation pour atteindre son maximum vers le 40<sup>ème</sup> jour. Le sommet de la courbe est élevé souvent supérieur à 50%. L'auto-infestation par cycle direct et la migration sous-cutanée des larves infestantes, est responsable d'une hyper-éosinophilie élevée, supérieure à 20% et surtout persistante pendant plusieurs dizaines d'années en l'absence de toute ré-infestation exogène s'accompagnant cliniquement de poussées diarrhéiques. Les valeurs d'éosinophilie sanguine présentent souvent des oscillations dans le temps correspondant aux phases d'auto-infestation.
- **Ankylostomose** : le cycle de développement du parasite dans l'organisme amène la larve successivement après sa pénétration transcutanée dans les alvéoles pulmonaires, les bronches, le carrefour aéro-digestif et enfin le duodénum. L'éosinophilie sanguine commence sa croissance environ trois semaines après l'infestation et atteint un maximum autour de 50% vers le 3<sup>ème</sup> mois, avant l'élimination des œufs dans les selles.
- **Ascariidose** : la larve d'*Ascaris* après éclosion dans le duodénum entreprend aussi un cycle complexe l'amenant comme l'ankylostome dans les poumons où elle séjourne avant de remonter les bronches et d'être déglutie. L'éosinophilie sanguine apparaît à la fin de la première semaine en même temps que les opacités pulmonaires de type Löeffler et atteint son maximum autour de 50% dès la fin de la 3<sup>ème</sup> semaine puis décroît lentement étant à un taux plus faible lorsque les œufs sont trouvés dans les matières fécales.
- **Distomatose hépatique** : la migration sur le péritoine puis dans le foie, de la jeune douve avant qu'elle n'atteigne un canal biliaire intra-hépatique, explique que l'éosinophilie sanguine croît précocement dès la première ou la deuxième semaine qui suit le repas infestant, atteint son maximum souvent supérieur à 50% vers le 3<sup>ème</sup> ou le 4<sup>ème</sup> mois et persiste à un taux plus faible pendant plusieurs années.
- **Hydatidose** : lors des fissurations du kyste avec passage d'un peu de liquide hydatique dans la circulation, on peut observer de brusques et courtes augmentations (avec

poussées urticariennes) des éosinophiles au niveau du sang. Ces poussées transitoires d'éosinophilie sanguine ont une bonne valeur diagnostique.

- **Filarioses lymphatiques** : les poussées de lymphangite ou d'adénite aiguë s'accompagnent habituellement d'une montée de l'éosinophilie sanguine qui sera normale le plus souvent à la phase d'éléphantiasis.
- **Onchocercose** : elle s'accompagne d'une hyper-éosinophilie sanguine pouvant atteindre 30%, mais l'évolution de la courbe d'éosinophilie après la primo-infestation n'est pas connue.
- **Bilharzioses** : l'éosinophilie est maximale à la phase d'invasion, quelques semaines après la pénétration cercarienne ; souvent supérieure à 50%, elle va ensuite diminuer et sera modérée à la phase d'état de localisation urogénitale ou hépatosplénique.
- **Teaniasis** : l'éosinophilie sanguine est maximale dans les premiers mois qui suivent le repas infestant, ce qui correspond à la phase de croissance du ver avec métabolisme intense libérant dans la lumière entérique des allergènes parasitaires. Cette éosinophilie sanguine précédant l'apparition des anneaux, reste le plus souvent modérée.
- **Trichinose** : dans la phase d'invasion l'éosinophilie sanguine est élevée et continue à augmenter lors de l'apparition des oedèmes en particuliers palpébraux et des myalgies. Cette éosinophilie s'atténue ensuite, mais peut persister pendant plusieurs années parfois, tant que les larves restent vivantes dans les muscles.
- **Toxocarose** : l'éosinophilie sanguine augmente rapidement après l'ingestion des œufs embryonnés de *Toxocara sp* et persiste à des taux supérieurs à 20% durant deux à trois ans jusqu'à la mort spontanée des larves.
- **Trichocéphalose et oxyurose** : l'hyperéosinophilie sanguine est peu élevée, rarement supérieure à 10%.

*Remarques* : les protozooses ne s'accompagnent généralement pas d'une augmentation des éosinophiles tissulaires ou circulants. Cependant, au cours :

- de la primo-infection toxoplasmique, on peut observer une augmentation modérée et transitoire des éosinophiles au niveau du sang ;
- l'entérite aiguë due à *Cystoisospora belli* avec une augmentation des éosinophiles est également observée.

## 4. Diagnostic étiologique d'une éosinophilie parasitaire

Tableau 2. 1 : Tableau synthétique des principales étiologies d'éosinophilie parasitaire

Signes cliniques associés		Type d'éosinophilie	Etiologie
Signes cutanés	Prurit anal	Modérée	Oxyurose
	Prurit fessier	Elevée	Anguillulose
	Poussées diarrhéiques fugace		
	Prurit localisé transitoire	Elevée	Loaose
	Œdème transitoire, fugace du dos de la main		
	Prurit généralisé	Elevée	Onchocercose
	Syndrome kystique		
	Troubles visuels associés		
	Prurit isolé		Distomatose
	Œdème palpébral	Elevée	Trichinose
Myalgies			
Atteintes lymphatiques et ganglionnaires	Lymphangite aigue rétrograde febrile	Elevée	Filariose à <i>W. bancrofti</i> , <i>B. malayi</i>
	Adénite régionale		
Signes digestifs	Diarrhée fébrile, épidémies de type familial	Modérée à élevée	Trichinose
	Syndrome dysentérique non febrile		Bilharziose
	Nausées, Vomissement, Alternance diarrhée constipation		Ascariose, Anguillulose, Ankylostomose
Atteintes viscérales	Hépatomégalie	Elevée	Distomatose hépatique
			Bilharziose intestinale
			Bilharziose hépatosplénique
	Ascariose		
Atteinte pulmonaire à type de toux persistante, syndrome de Löeffler			
Crachats hémoptoïques, Opacités nodulaires infiltratives, Excavations parenchymateuse		Paragonimose	

Signes uro-génitaux	Cystite, Pollakiurie	Elevée	Bilharziose uro-génitale
	Chylurie, Hydrocèle, Epidydimite, Endométrite		Filariose lymphatique
Signes neuro-méningés	Hypertension intracrânienne	Modérée	Neurocysticercose, Cénurose, Paragonimose cérébrale
	Epilepsie secondaire		
	Syndrome méningé		

## 5 Diagnostic différentiel avec l'hyperéosinophilie non parasitaire en zone d'endémie

Un certain nombre d'états pathologiques non parasitaires s'accompagnent d'une hyperéosinophilie. Ce sont :

- les états allergiques (asthme, rhinite) ;
- les affections cutanées (eczéma, urticaire) ;
- les maladies collagéniques (lupus érythémateux, périartérite noueuse) ;
- les hémopathies (leucémies, maladie de Hodgkin);
- les cancers (digestifs, foie, poumons, ovaire, métastases);
- certaines thérapeutiques (antibiotiques, sulfamides, bêtalactamines, antiépileptiques, produits iodés).

## B. Anémies au cours des parasitoses

### 1. Caractères généraux

L'anémie (taux d'hémoglobine inférieur 11g/dl) constitue une affection fréquente en zone tropicale. En milieu tropical, les causes d'anémie sont multiples, habituellement en rapport avec les maladies infectieuses (dont les affections parasitaires), les désordres génétiques du globule rouge et des troubles nutritionnels. Les parasitoses peuvent contribuer à la survenue d'une anémie de plusieurs manières :

- Perturbation de l'absorption et du métabolisme du fer et des autres micronutriments (acide folique, vitamine B12) ;
- Carences martiales induites par des saignements à type d'hématurie ou de diarrhée ;
- Destruction massive des hématies ;



## *Modifications hématologiques et biochimiques au cours des parasitoses*

- Envahissement de la moelle osseuse ;
- Inflammation chronique induisant une anémie inflammatoire.

Selon le mécanisme de survenue, on peut observer plusieurs type d'anémie d'étiologies diverses ; c'est ainsi qu'on distingue globalement les anémies hypochromes et microcytaires, les anémies normochromes normocytaires.

### **Anémies hypochromes microcytaires**

- Arégénératives, hyposidérémiques
  - Il peut s'agir d'anémie ferriprive en relation avec : hémorragies chroniques (Ankylostomoses), trouble d'absorption, carence nutritionnelle.
  - Parfois, ces anémies sont en relation avec une atteinte inflammatoire.
- Régénératives, hypersidérémiques.

### **Anémies normochromes normocytaires**

- Régénératives  
Elles peuvent être liées :
  - à une hémorragie aiguë ;
  - à des hémolyses extra-corporelles : paludisme.
- Arégénératives
  - Il peut s'agir d'anémie macrocytaire : carence en vitamine B12 ou en acide folique (vitamine B9).
  - Parfois, on peut observer des anémies arégénératives en rapport avec un envahissement de la moelle : leishmaniose viscérale.

## **2. Principales étiologies parasitaires au cours des anémies**

*a. Etiologies parasitaires des anémies par carence en fer. Ces situations peuvent être en rapport avec :*

- Un syndrome de malabsorption au cours d'une diarrhée parasitaire aiguë induite par Giardia.
- Une ascariose, une anguillulose, une oxyurose du fait de l'hypochlorhydrie transitoire induite par ces parasites.
- Hémorragies prolongées, en particulier les saignements d'origine digestive ou génitale :
  - Ankylostomose
  - Bilharziose urinaire

La biologie (NFS) objective habituellement une anémie hypochrome, microcytaire ; le taux de réticulocytes est bas et la sidérémie est effondrée, on note une augmentation de la capacité de fixation de la sidérophiline.

*b. Etiologies parasitaires des anémies par carence en acide folique et vitamine B12 :*

Les anémies par carence en acide folique (vitamine B9) et vitamine B12 relèvent de plusieurs mécanismes :

- Une carence d'absorption complique diverses affections gastro-intestinales tels les syndromes de malabsorption induits par les diarrhées parasitaires chroniques au cours de la giardiose, l'isosporose, la cryptosporidiose ;
- La prise de médicaments antiparasitaires tels que la pyriméthamine à forte dose peut parfois être la cause ;
- La principale étiologie parasitaire des anémies par carence en vitamine B12 reste dominée par la botriocéphalose.

A la NFS, on note une anémie profonde, macrocytaire arégénérative, avec mégaloblastose médullaire.

**c. Etiologies parasitaires des anémies hémolytiques :**

La lyse des hématies parasitées par le *Plasmodium* au cours de la schizogonie érythrocytaire, va induire une hémolyse. Toutefois, des hématies non parasitées surtout dans les infections à *P. falciparum*, ayant à leur surface un antigène plasmodial (RESA), peuvent également être détruites par un mécanisme immunologique.

Ces anémies peuvent également être rencontrées au cours de la fièvre bilieuse hémoglobulinurique, accident immuno-allergique secondaire à la prise de quinine.

Les signes biologiques sont à type d'anémie normochrome, normocytaire, régénérative.

**d. Anémies inflammatoires**

Ces anémies inflammatoires peuvent être observées au cours d'une trypanosomiase humaine africaine notamment lors de la phase lymphatico-sanguine. L'anémie résulte de la séquestration du fer au niveau des macrophages.

Habituellement, on retrouve une anémie hypochrome, microcytaire arégénérative hyposidérémique.

**e. Anémies par aplasie médullaire**

Au cours d'une leishmaniose viscérale, l'envahissement de la moelle osseuse par les formes amastigotes induit une dysérythropoïèse aboutissant à une anémie normochrome, normocytaire, arégénérative.

## **C. Autres modifications hématologiques**

### **1. Hyperleucocytose**

Une hyperleucocytose avec monocytose et surtout plasmocytose est souvent observée au cours de la trypanosomiase humaine africaine lors de la phase lymphatico-sanguine. Par ailleurs, certains plasmocytes se transforment en cellules plus volumineuses bourrées de vacuoles muriformes : les cellules de Mott. Ces cellules seront également retrouvées au niveau du liquide céphalo-rachidien (phase de polarisation cérébrale).

L'abcès amibien du foie s'accompagne habituellement d'une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles avec hépatomégalie douloureuse fébrile.

## **2. Leucopénie**

Une neutropénie modérée peut être observée au cours d'une leishmaniose viscérale. Toutefois, dans les formes évoluées toutes les lignées cellulaires sont effondrées réalisant une pancytopénie.

## **3. Thrombopénie**

La thrombopénie constitue une modification hématologique fréquente au cours du paludisme mais aussi au cours d'une leishmaniose viscérale.

## **4. Syndrome mononucléosique**

La toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent peut induire un syndrome mononucléosique sanguin (sans hyperleucocytose), avec lymphocytose et cellules mononuclées à cytoplasme hyperbasophile en petit nombre.

## **5. Augmentation de la vitesse de sédimentation**

L'augmentation de la VS est observée au cours de la phase inflammatoire des parasitoses et lorsqu'il y a une inversion du rapport albumine/globulines, notamment dans :

- l'amibiase viscérale ;
- la phase lymphatico-sanguine de la THA ;
- les leishmanioses ;
- la toxoplasmose ;
- la phase de migration larvaire des helminthiases.

## **II. Modifications biochimiques au cours des parasitoses**

### **A. Modifications biochimiques dues à des atteintes systémiques**

Ces modifications peuvent être à type de :

- Modification du protidogramme : hypergammaglobulinémie avec augmentation des IgM puis des IgG;
- Accélération de la vitesse de sédimentation 100 à 150mm à la première heure ;
- Augmentation du taux sérique de la protéine C-Réactive ;
- Les autres modifications peuvent être à type de circulation d'anticorps anti-nucléaires, présence de facteur rhumatoïde, de cryoglobuline, ou de complexes immuns le plus souvent en rapport une hypergammaglobulinémie.

Ces situations peuvent être en relation avec des pathologies parasitaires comme : le paludisme viscéral évolutif, la trypanosomiase humaine africaine, la leishmaniose viscérale.

## **B. Modifications biochimiques dues à des atteintes localisées**

### **1. Au niveau digestif**

Certaines affections parasitaires peuvent induire un syndrome de malabsorption se traduisant biologiquement par :

- une stéatorrhée témoins des troubles de l'absorption des graisses ;
- une créatorrhée en rapport avec les troubles de l'absorption des protéides ;
- un test au D-xylose positif en relation avec la perturbation de l'absorption des hydrates de carbone.

Ces perturbations biochimiques au cours des syndromes de malabsorption, peuvent être dues à des parasitoses comme la giardiose, la cryptosporidiose, l'isosporose, la cyclospore.

### **2. Au niveau hépatique**

Certains parasites à localisation hépatique peuvent induire un syndrome de cholestase hépatique se traduisant du point de vue biologique par :

- une augmentation des gamma-glutamyl transpeptidases (Gamma GT) ;
- une augmentation des phosphatases alcalines (PAL) ;
- une augmentation des acides biliaires et du cholestérol total ;
- une hyper-bilirubinémie conjuguée.

Ces modifications peuvent être observées au cours de l'opisthorchiose, de la facioloïse, de l'hydatidose, de l'échinococcose alvéolaire. Le plus souvent les transaminases restent normales du fait de l'absence d'envahissement parenchymateuse par ces parasites.

### **3. Au niveau du système nerveux central**

Les localisations cérébrales des parasitoses se traduisent souvent par des méningo-encéphalites à liquide clair. L'examen du liquide céphalo-rachidien peut montrer une hyperalbuminorachie, une hyperprotéinorachie, une hypoglucorachie associées à une pléiocytose de 50 à 500 éléments par microlitre comprenant, des lymphocytes avec quelques éosinophiles.

Les étiologies parasitaires sont habituellement dominées par la cysticercose, la cénurose cérébrale, la trypanosomiase humaine africaine à la phase de polarisation cérébrale (on retrouve en plus des cellules de MOTT au niveau du LCR).

### **III. Cas particulier du paludisme grave**

Au cours du paludisme grave, plusieurs désordres biologiques peuvent être retrouvés ; c'est ainsi qu'on peut noter :

- acidose métabolique avec des bicarbonates plasmatiques  $< 15\text{mmol/L}$ ;
- une hypoglycémie : glycémie  $< 0,4\text{g/L}$ ;
- une insuffisance rénale : diurèse  $< 12\text{ml/kg/24h}$ , créatinémie  $> 265\mu\text{mol/L}$  chez l'adulte ;
- une hyperlactatémie ( $> 5\text{ mmol/L}$ );
- une hémoglobinurie massive ;
- une anémie sévère : taux d'hémoglobine  $< 5\text{g/dL}$ .

Ces modifications biochimiques et hématologiques observées au cours du paludisme grave font partie des critères OMS de classification du paludisme grave.

**Bibliographie**

E. Pilly, *Maladies Infectieuses et Tropicales – Colléges des Universitaires de Maladies Infectieuses* : 25<sup>ème</sup> édition 2016.

Gentilini M, Caumes E, Danis M, Lenoble D.R, Bégué P, Touze J.E, Kerouédan D : *Médecine tropicale* 6<sup>ème</sup> édition, Médecine Sciences Publications, 2012 Lavoisier, Paris. ISBN 978-2-257-20396-0.

Moulinier C. *Parasitologie et mycologie médicales : élément de morphologie et de biologie*. Editions Médicales Internationales. ISBN : 2-7430-0488-6.

Nozais JP, Datry A, Danis M. *Traité de parasitologie médicale* : Editions pradel, ISBN : 2-907516-64-7.

## **3 DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DES PARASITOSES**

---

*Rédigé par Pr Bamba Sanata (Burkina Faso), Relu par Pr Menan Hervé (Côte d'Ivoire), Pr Badiane Aïda Sadikh (Sénégal), Pr Eboumbou Moukoko Carole (Cameroun) et Pr Ndiaye Mouhamadou (Sénégal)*

## Introduction

Les techniques sérologiques sont des méthodes indispensables dans le diagnostic des maladies infectieuses lorsqu'il est impossible de mettre en évidence l'agent pathogène [1 ; 2]. De façon générale, le diagnostic parasitaire se fait par **la recherche directe du parasite dans le sang, les selles, l'urine, la peau, etc [3]**. Cependant, dans bien des situations, une telle approche n'est pas possible ou pas suffisante. C'est le cas, par exemple, **lorsque le parasite n'est présent que dans les tissus, se trouve dans une impasse dans le cycle de développement ou à un long cycle de migration**. Dans ces cas, seulement **la détection d'anticorps est une aide réelle au diagnostic [4]**.

Le complexe antigène - anticorps est décelable par plusieurs techniques en particulier la **technique ELISA** (: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) **et les techniques de type immunoblot [1-5]**.

Les réactions immunologiques, surtout sérologiques à la recherche d'anticorps, doivent être idéalement:

- **spécifiques d'espèce et si possible de stade** (réactions de précipitation, analyse immuno- électrophorétique, co-électrosynérèse) [6] ;
- **sensibles et quantitatives** (réaction d'immunofluorescence indirecte : IFI, méthode ELISA, réactions d'agglutination directe ou de lyse, d'agglutination passive de particules « latex », d'hémagglutination passive, de déviation ou fixation du complément) **pour détecter précocement, suivre l'évolution post-thérapeutique, dépister d'éventuelles rechutes, différencier une infection précoce d'une ancienne ou tardive** (toxoplasmose) [6-8].

Il est souvent nécessaire d'associer différentes techniques aux qualités complémentaires.

## I. Généralités

Le diagnostic biologique des maladies infectieuses, en particulier les infections parasitaires fait appel à deux grands types de techniques [3 ; 4]. :

- **des techniques directes** qui permettent de rechercher l'agent pathogène en cause ou un de ses composants (antigène, génome) ;
- **des techniques indirectes**, qui mettent en évidence la réponse de l'hôte à l'infection **par la détection d'anticorps spécifiques ou diagnostic sérologique**.

Le diagnostic sérologique des parasitoses regroupe un ensemble de techniques ayant pour but la mise en **évidence indirecte d'un parasite**, en recherchant les témoins de l'infection appelés **anticorps spécifiques, ou la mise en évidence directe du parasite ou de ses constituants qui sont des antigènes**.



## II. Indications du diagnostic sérologique en parasitologie [3;4]

Ce diagnostic est **nécessaire** lorsque la découverte du parasite par **examen direct** est **impossible ou difficile**. Il s'agit d'un **test indirect** qui ne doit pas se substituer à l'examen direct, seul capable d'apporter une certitude diagnostique en visualisant l'agent pathogène. Ses indications sont très précises :

- dans les **phases tissulaires de migration larvaire dans les helminthoses**, lorsque le parasite est immature et incapable d'émettre des œufs ou des larves (ex : fasciolose, schistosomiase) ;
- dans les **impasses parasitaires** où l'Homme est infesté par une forme larvaire d'un parasite d'animal qui n'atteindra jamais le stade adulte (ex : toxocarose) ;
- dans les **localisations tissulaires profondes** où le parasite est difficilement accessible (ex : amibiase hépatique, hydatidose, cysticerose) ;
- dans les **stades chroniques de certaines parasitoses** ayant évolué vers une «séquestration» des parasites (ex : trichinellose, maladie de Chagas ou trypanosomose américaine, toxoplasmose) ;
- dans les **infections à charge parasitaire faible ou intermittente**, en dehors des pics parasitémiques (ex : paludisme, trypanosomose africaine, filarioses) ;
- dans les **helminthiases en phase d'état avec ponte intermittente des œufs** (périodes coprologiquement muettes) (ex : fasciolose, schistosomiase) ;
- dans le **diagnostic rétrospectif après un traitement spécifique** entrepris sans preuve parasitologique (ex : paludisme, amibiase) ;
- dans les **surveillances post-thérapeutiques et les recherches d'éventuelles rechutes** (ex: hydatidose, fasciolose,...) ;
- dans les **études épidémiologiques de masse** pour apprécier la prévalence d'une parasitose dans une population.

Ces indications s'appliquent aux diagnostics de protozooses et d'helminthiases. Comme **protozooses**, on peut citer : l'amibiase, la leishmaniose, le paludisme, la toxoplasmose, la trypanosomose africaine et la trypanosomiase américaine.

Parmi les **helminthiases**, on peut noter : la cysticerose, la distomatose, la filariose, l'hydatidose (kyste hydatique ou échinococcose alvéolaire), la schistosomiase, la toxocarose et la trichinellose.

Toutefois, les méthodes de diagnostic direct ou indirect sont complémentaires. Actuellement, des techniques d'exécution rapide sur membranes sont utilisées pour le diagnostic sérologique en urgence : **ce sont les tests rapides d'orientation diagnostique** (TROD ou TDR) utilisés de façon large dans les pays en développement du fait du faible équipement nécessaire pour les réaliser.

### III. Antigènes parasitaires [2;5]

Ce chapitre très important devrait être **développé davantage** pour traiter de :

- les différentes sources d'antigènes parasitaires : antigènes homologues, antigènes hétérologues, les communautés antigéniques ;
- les différents types d'antigènes : antigènes naturels (figurés, solubles), antigènes synthétisés ;
- les antigènes (Ag) parasitaires dominent toute l'immunologie parasitaire. Ils conditionnent la réalisation pratique des techniques et la valeur des résultats. Ces **antigènes sont généralement rares, d'obtention difficile, ils sont complexes et présentent de nombreuses fractions non spécifiques**. Ils correspondent enfin à des différents types définis par une terminologie précise. Plusieurs types d'Ag parasitaires sont utilisés.

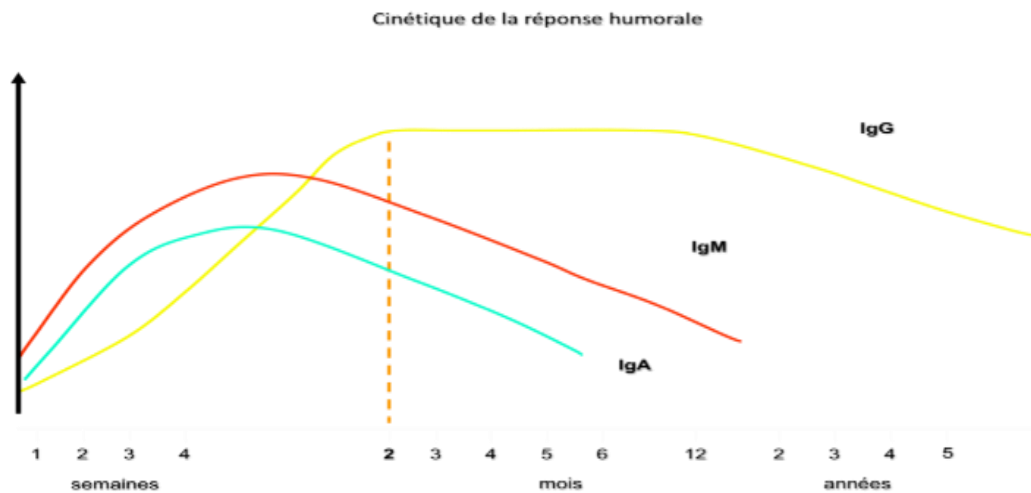
### IV. Anticorps anti-parasitaires

Rien ne distingue fondamentalement les anticorps (Ac) décelables au cours des parasitoses de ceux qui peuvent être mis en évidence dans d'autres maladies transmissibles. Bien évidemment, **ces Ac ne sont pratiquement présents que dans les parasitoses profondes, tissulaires, les seules où le contact hôte – parasite est suffisamment intense pour induire une réponse immunologique aisément décelable**.

Sur le plan qualitatif, ces Ac appartiennent aux diverses classes d'Immunoglobulines (Ig). En effet, ce sont **les Ac IgG qui sont le plus souvent mis en évidence**, car ils sont de loin les plus abondants. Par rapport à l'infestation, ils n'apparaissent qu'après un certain délai (latence), puis leur évolution passe successivement par **une phase d'augmentation rapide, une phase de concentration stable « en plateau » et une phase de diminution progressive**. Ils persistent souvent pendant de très longues périodes (variables selon la technique sérologique utilisée pour leur détection) et, sont alors témoins d'une infestation ancienne (Figure 3. 1). Ces Ac enfin traversent aisément le placenta (anticorps transmis). Au contraire, **les Ac IgM** sont arrêtés par une barrière placentaire normale. Ces derniers apparaissent très précocement après l'infestation, ils constituent **« la réponse sérologique primaire »**. Dans certaines parasitoses (trypanosomiase africaine essentiellement), ces Ac IgM persistent pendant de longues périodes. En fait, leur présence correspond alors à la sélection de différentes variantes antigéniques dont l'apparition successive entraîne la formation des Ac IgM correspondants (Figure 3. 1).

Les anticorps IgE anti-parasitaires, sont retrouvés dans diverses affections et particulièrement dans les nématodoses à des titres souvent élevés.

En revanche, les anticorps spécifiques appartenant à la classe des IgA ou à celles des IgD sont encore pratiquement inconnus en parasitologie, au moins leur détection ne connaît encore aucune application pratique.



(Source : Hugues-Jones NC et al., 1963)

Figure 3. 1 : Cinétique de la réponse humorale [9]

## V. Méthodes sérologiques

### A. Principes du diagnostic sérologique [2 ; 3-8]

Les méthodes sérologiques sont basées sur l'utilisation :

- **d'antigènes figurés** (antigènes complets ou coupes de parasites) dans la réaction d'immunofluorescence (IFI) ;
- **ou d'antigènes solubles** dans les réactions d'hémagglutination (HAI), d'électrosynérèse (EIS), d'analyse immunoélectrophorétique (AEI), d'ELISA ou d'immunoblot (dont le Western blot). AIE et Western blot sont des tests de confirmation, les autres méthodes étant des tests de dépistage.

### B. Prélèvements étudiés [1]

Etymologiquement, les réactions sérologiques visent à mettre en évidence les seuls anticorps présents dans le sérum. En pratique, elles s'appliquent à d'autres types de prélèvements : éluât de sang total ou liquide céphalo – rachidien par exemple. Les prélèvements doivent être obtenus dans les conditions d'asepsie aussi rigoureuses que possible.

### C. Différentes méthodes sérologiques [1-13]

En fonction du type d'antigène utilisé, on distingue :

- **Les méthodes à antigènes figurés** où le réactif antigénique est constitué par le parasite lui-même (dans le cas des métazoaires, par un fragment parasitaire) ;
- **Les méthodes à antigènes solubles**, pratiquées à partir d'extraits parasitaires.

## 1. Méthodes à antigènes figurés

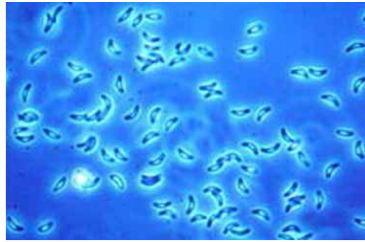
Elles ont une importance particulière en parasitologie car, elles permettent dans l'ensemble d'économiser le matériel parasitaire, d'exploiter les antigènes de surface et de rendre inutiles toutes les opérations d'extraction et de purification indispensables pour l'obtention d'antigènes solubles. Certaines de ces **méthodes sont propres à une application particulière**. Au contraire, **l'immunofluorescence indirecte est parfaitement polyvalente**.

### a. Méthodes limitées à une ou deux applications

Elles sont variées, mais elles appartiennent, dans l'ensemble, à un certain nombre de catégories correspondant à des phénomènes relativement limités. Il s'agit par exemple de :

- **Réactions d'immobilisation** (immobilisation des miracidiums pour le sérodiagnostic des schistosomiasés, immobilisation des trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* dans le sérodiagnostic de l'amibiase) ;
- **Réaction de précipitation circum - ovulaire** pour les schistosomiasés (test d'Oliver - Gonzalez) [10];
- **Tests de précipitation circum - parasitaire** (test de Vogel - Minning de membrane cercarienne) [11];
- **Réaction d'agglutination de parasites entiers** (agglutination directe de toxoplasmes ou test de Fulton, agglutination des suspensions d'hématies parasitées par des plasmodiums, agglutination des suspensions de *Candida*) [12].

**Test de lyse des toxoplasmes de Sabin et Feldman ou Dye test** (réaction particulière) [13 ; 14]. Son principe est basé sur la réalisation des dilutions de sérum à tester qui sont incubées avec des toxoplasmes vivants. Après incubation, la lecture se fait directement au microscope à contraste de phase. La réaction est positive si 50% des parasites sont lysés par les Ac. **Les toxoplasmes morts apparaissent grisâtres alors que les parasites vivants apparaissent bien brillants (Figure 3. 2).**



(Source : Sabin AB et al., 1948)

Figure 3. 2 : Réaction de lyse des toxoplasmes (Dye test) [13]

D'une façon générale, ces réactions à Ag figurés bénéficient d'une relative simplicité, au moins dans leur principe. En pratique, ces techniques sont presque toujours difficilement applicables sur une vaste échelle. Leur reproductibilité est, pour diverses raisons, assez peu satisfaisante. Il s'agit tout de même de la technique de référence pour le sérodiagnostic des toxoplasmes. **Son seuil de positivité est de 2 Unité internationale (UI)**. Elles permettent de détecter **les IgM et les IgG de surface**. Enfin, elles entraînent plusieurs servitudes principalement liées à l'utilisation soit de suspensions très riches en éléments parasitaires (méthodes d'agglutination), soit de parasites vivants dont l'obtention régulière est contraignante, voire éventuellement dangereuse (toxoplasme, furcocercaires de *Schistosoma mansoni*).

## b. Méthode polyvalente : Immunofluorescence indirecte [5]

- **Principe**

Contrairement aux précédentes, cette méthode est applicable à toutes les maladies parasitaires. Maintenant très classique, son principe consiste à faire réagir les sérums étudiés (préalablement, portés à différentes dilutions) sur des antigènes figurés déposés sur lames et constitués soit par suspensions de parasites, soit par des coupes à congélation. Après incubation et lavage, les éventuels anticorps spécifiques sont relevés par des anti-globulines conjuguées à une substance fluorescente (isothiocyanate de fluorescéine). Pour masquer les fluorescences non spécifiques ou la teinte verdâtre de certains antigènes parasitaires, on utilise un contre colorant, **le bleu d'Evans**.

Le test est lu au microscope à lumière ultraviolette. **Une réaction positive se traduit par une fluorescence jaune - verdâtre** prédominante habituellement à la périphérie des parasites ; **au contraire, ces parasites sont plus ou moins colorés en rouge en cas de résultat négatif**. Cette méthode présente plusieurs avantages pratiques et théoriques :

- elle permet tout d'abord une considérable économie du matériel parasitaire : quelques gouttes de sang parasité par des plasmodiums suffisent au sérodiagnostic du paludisme ;

- au prix d'un minimum de précautions, ces antigènes sont toujours identiques à eux-mêmes, ce qui assure au départ à la technique une reproductibilité élevée ;
- les résultats étant lus au microscope, il est possible d'apprécier la fluorescence aussi bien au niveau des antigènes de surface que sur les sites antigéniques intra parasitaires ;
- enfin, cette technique est aisément applicable à la détection d'anticorps spécifiques appartenant à diverses classes d'immunoglobulines : IgG ou IgM (sérodiagnostic de la toxoplasmose).

**Dans des domaines autres que l'immunologie parasitaire, cette technique est remplacée par une plus récente : ELISA.**

L'immunofluorescence présente des inconvénients :

- difficulté de réaliser des séries de réaction ;
- nécessité d'un appareillage spécial, parfois onéreux ;
- difficultés de lectures des taux limites avec des risques d'évaluations subjectives (il faut dans ce cas, d'autres méthodes quantitatives).

- **Technique**

Les antigènes sont constitués par des étalements sur lame de suspensions parasitaires ou par des coupes à la congélation. Les lames peuvent être conservées pour de longues périodes à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou de préférence  $-70^{\circ}\text{C}$ .

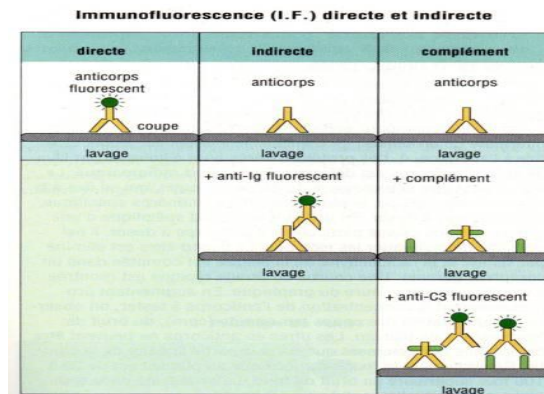
- Au moment de la réaction, les préparations antigéniques sont plongées dans un bain d'acétone pure pour analyse (pour la fixation et la délipidation des Ag parasitaires) ;
- Les sérums étudiés (ou les éluats plasmatiques) sont dilués dans du tampon (PBS à pH 7,2). Les dilutions étudiées sont 1/ 20, 1/ 40, etc. Chacune de ces dilutions est déposée sur un étalement ou sur une coupe antigénique. On laisse réagir une demi-heure à  $37^{\circ}\text{C}$  en chambre humide ;
- Un lavage (deux fois dans du bain PBS à 7,2) élimine les anticorps non fixés ;
- Après séchage complet (ventilation), les lames sont recouvertes d'une goutte de conjugué fluorescent (anti - IgG ou anti - IgM suivant les cas) porté à sa dilution optimale (déterminée exceptionnellement par des titrages préalables face à des sérums connus) ;
- Après une seconde incubation (30 min à  $37^{\circ}\text{C}$  en chambre humide), les lames sont lavées comme précédemment puis soigneusement séchées.

Les préparations sont alors recouvertes d'une lamelle montée sur une goutte de glycérine tamponnée ou de liquide de montage spécial pour immunofluorescence.

Chaque série d'examen doit impérativement comporter plusieurs réactions : des réactions – témoins réalisées avec des sérums positifs de titres connus, des sérums négatifs et des préparations soumises avec des sérums positifs de titres connus, des sérums négatifs et de préparations soumises uniquement à l'action des conjugués fluorescents : ce sont des anti immunoglobulines totales anti-IgG ou anti-IgM (témoins « conjugués seul »).

Les résultats sont lus au microscope à fluorescence (éviter toute éblouissance de la préparation).

Le résultat est normalement exprimé en titre final, correspondant à la plus forte dilution du sérum donnant une réaction positive. Dans la plupart des cas, ces seuils se situent aux dilutions de 1 / 20 ou 1 / 40.



(Source: Coons AH et al., 1950)

Figure 3. 3 : Réaction d'immunofluorescence directe et indirecte [5]

## 2. Techniques à antigènes solubles [6 ; 9]

Ces réactions font intervenir différents types d'Ag extraits des corps parasitaires (antigènes somatiques) ou, dans quelques cas, produits par des parasites vivants (antigènes métaboliques) ou « excrétés – sécrétés ». **L'antigène doit être extrait de tissus frais, vivants, n'ayant subi aucune modification pouvant altérer la structure antigénique.**

- Pour les **antigènes des helminthes**, les parasites sont immédiatement après leur récolte, lavés à trois reprises dans du sérum physiologique puis congelés dans de l'eau distillée et lyophilisés. Le broyat obtenu par trituration mécanique à basse température, constitue l'antigène brut qui est délipidé de façon à augmenter la spécificité. La technique la plus efficace consiste généralement à faire agir l'alcool absolu qui précipite les substances de nature protéique sans les dénaturer.
- Pour les **antigènes extraits de protozoaires**, l'extraction a généralement lieu après éclatement des parasites, **soit par succession de congélation- décongélation, soit par différentes méthodes (chromatographie)**. Leur conservation est réalisée **sous forme lyophilisée ou après congélation à basse température (-20 à -70 °C)**.

Actuellement, trois méthodes ou groupes de méthodes dominant la sérologie parasitaire avec des antigènes solubles :

- **hémagglutination indirecte,**
- **électrosynérèse ;**
- **immunodiffusion (test d'Ouchterlony, immunoélectrophorèse, ELISA).**

## a. Hémagglutination indirecte (HAI) [9]

**Son principe** consiste à mettre en présence **diverses dilutions des sérums étudiés et des hématies jouant le rôle de particule inerte à la surface de laquelle ont été fixés les antigènes parasitaires solubles**. En pratique, plusieurs types d'hématies ont été utilisés (hématies humaines du groupe O ou hématies du mouton). **Cette pratique présente plusieurs avantages :**

- sa grande spécificité fait qu'on peut utiliser de faibles quantités d'Ag et la détection de titre très élevés d'anticorps (1/ 64 000, 1 / 128 000 parfois) ;
- elle est simple, rapide et n'exige aucun matériel spécifique.

**Parmi ses inconvénients**, l'hémagglutination indirecte présente **un léger manque de reproductibilité et de difficulté** qu'il y a parfois à déterminer des résultats « limites ».

- **Technique**

Dans la plupart des cas, le test est appliqué dans les plaques de microtiltration à fond rond.

- On répartit dans la plaque un même volume (50µL) des diverses dilutions du sérum étudié (1/32, 1/ 64, etc.) ;
- Après avoir été remise en suspension et homogénéisée, la suspension d'hématies sensibilisées est ajoutée dans chaque cupule, sous un volume égal au précédent ;
- On agite mécaniquement pendant 5 min, puis on laisse incuber 6 à 8 heures à la température du laboratoire, en couvrant les plaques pour éviter la dessiccation ;
- La lecture se fait sur fond blanc ou sur un miroir concave.

**Une réaction positive se traduit par un voile homogène d'hématies tapissant le fond de la cupule sur plus de la moitié de son diamètre.**

Au contraire, une **réaction négative correspond la sédimentation des hématies au fond de la cupule, en anneaux ou en « bouton central »** (Figure 3. 4).

Comme pour l'immunofluorescence indirecte, **le titre correspond à la plus forte dilution du sérum étudié donnant une réaction encore positive.**

Dans chaque série de tests, on réalise des réactions – témoins avec des sérums positifs de titres connus, des sérums négatifs et des « témoins – réactifs » comprenant uniquement des suspensions d'hématies sensibilisées mises en présence de tampon.

L'interprétation des résultats se fait par rapport à la limite de spécificité, évidemment variables selon les cas. Dans l'ensemble, c'est la dilution de 1/ 64 à 1/ 128 qui correspond à ce seuil liminaire pour la plupart des applications.

La méthode permet par **ailleurs la détection des anticorps spécifiques IgM**. Pour cela, on répète les titrages avant et après action d'une substance dénaturant les molécules d'IgM, **le 2 – Mercapto – Ethanol (2- ME)**.



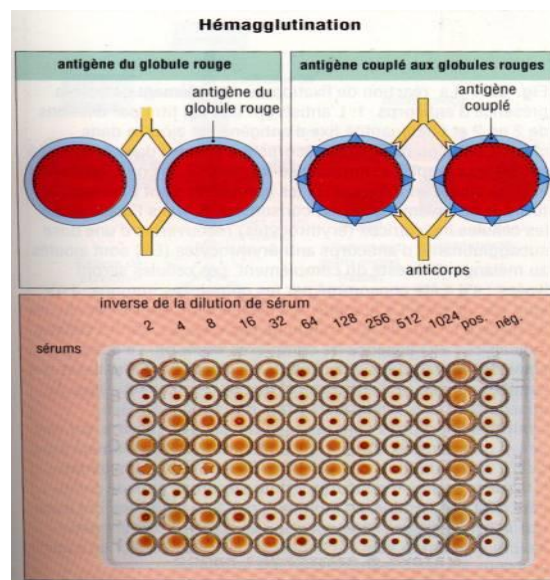
- **Technique de dilution des anticorps IgM**

Les sérums à étudier sont répartis en 2 volumes identiques. Une partie est portée à diverses dilutions (1 / 64, 1 / 128, etc.), l'autre partie est traitée par le 2 - ME.

Pour cela, on mélange, dans un tube à hémolyse, 1 volume de sérum (0, 2mL par exemple) à 1 volume équivalent d'une solution 0,2 M de 2 – ME dans du tampon phosphate pH 7,2.

- Après incubation (une heure au bain - marie à 37°C), les mélanges sont utilisés pour préparer une gamme de dilution identique à celle des sérums non traités.
- Les tests d'hémagglutination indirecte sont effectués comme dans la technique précédente, mais en répétant, pour chaque sérum, les titrages à partir d'échantillons traités ou non par le 2 - ME.

La présence d'anticorps IgM se traduit par une diminution des titres après action du 2 – ME. Pour être significative, cette diminution doit porter sur plus de 2 degrés de la gamme de dilution : par exemple : 1/ 2 048 pour un sérum non traité et 1 / 512 pour le même sérum après action du 2 - ME.



(Source: Hugues-Jones NC et al., 1963)

Figure 3. 4 : Plaque d'hémagglutination indirecte Source [9]

## b. Electrosynérèse [6]

Encore appelée contre – immunoélectrophorèse, cette technique correspond à un principe très élégant.

- Déposées sur un support approprié et dans des conditions précises de force ionique et de pH, les protéines antigéniques d'une part et les immunoglobulines sériques d'autre part, migrent en sens inverse sous l'action de courants d'endosmose et d'une différence de potentiel ;

- Cette migration amène très rapidement en contact les antigènes et les anticorps. Une réaction **positive se traduit, au niveau du point de rencontre, par des lignes de précipités qui sont visibles à l'état frais ou mieux, après coloration** (Figure 3. 5).

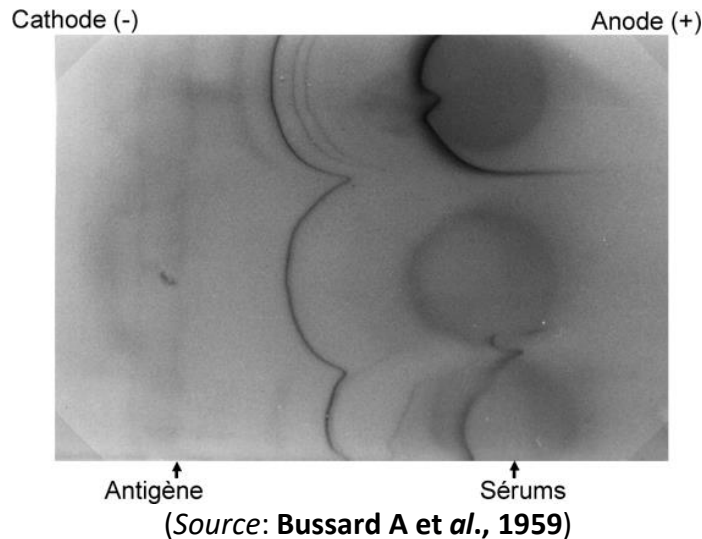


Figure 3. 5 : Gel d'agarose d'électrosynérèse [6]

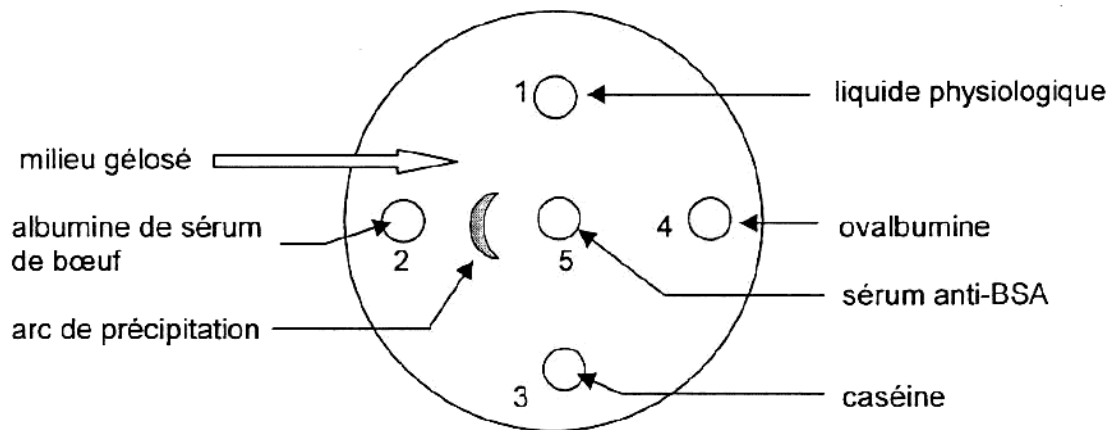
## c. Immunodiffusion

### *Immunodiffusion double (méthode d'Ouchterlony)*

L'immunodiffusion double (IDD) a été développée par Ouchterlony, et on y réfère souvent dans la littérature en la nommant d'après son inventeur. L'immunoprécipitation est fondée sur la diffusion d'antigènes et d'anticorps en milieu solide (en général, un gel d'agarose) à partir de puits placés en vis-à-vis. Elle consiste à placer dans un puits formé dans un gel d'agarose un antigène (ou un mélange susceptible de le contenir) et un anticorps correspondant (ou un mélange susceptible de le contenir) dans un autre puits. En pratique, on utilise des dispositions de puits permettant de faire les analyses voulues. La configuration la plus courante est celle où un puits central est entouré de 6 ou 8 puits périphériques disposés autour de façon à former les coins d'un hexagone ou d'un octogone régulier.

Après le dépôt, on laisse les protéines diffuser. Après diffusion (en atmosphère humide pendant 48 heures à + 4°C), apparaissent **en cas de réaction positive des traits de précipités** entre le puits central et les puits périphériques.

S'il y a un même antigène dans des puits périphériques contigus, les lignes de précipité auront évidemment tendance à fusionner. D'après la forme de cette fusion, on pourra évaluer la similitude entre les antigènes du puits périphérique. S'il y a fusion complète, on pourra conclure à l'identité des protéines des deux puits.



(Source: Bussard A et al., 1959)

Figure 3. 6 : Résultat du test d'Ouchterlony, 24 heures après les dépôts [6]

### **Immunoélectrophorèse [15]**

Dans son principe, cette réaction réalise d'abord **une séparation électrophorétique des diverses protéines antigéniques**. En effet, les antigènes parasitaires sont habituellement complexes et comprennent de nombreuses fractions qui, sous l'action d'une différence de potentiel (20V), présentent des mobilités très variables. L'électrophorèse permet donc de les séparer.

Dans un deuxième temps, on réalise dans une direction perpendiculaire à celle de la migration (1 heure et demie) électrophorétique **une diffusion des globulines sériques** (sur gélose) suivant des modalités finalement très comparables à celles du test d'Ouchterlony.

**Comme dans toutes les techniques d'immunoprécipitation, les résultats positifs se traduisent par l'apparition d'arcs de précipitations plus ou moins nombreux.** La position et la forme de ces arcs interviennent également dans l'interprétation des résultats avec, des conditions techniques très précises, la caractérisation d'arcs dits spécifiques.

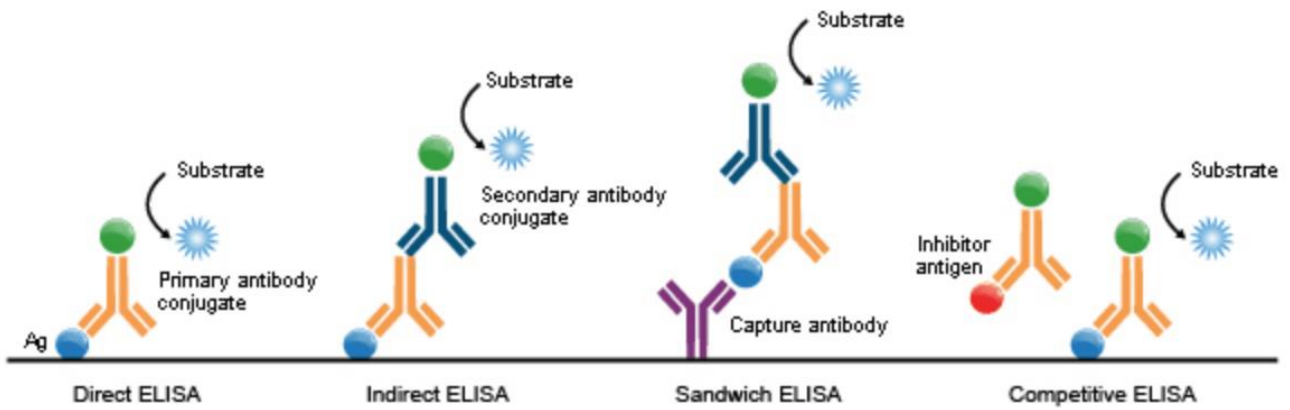
En outre, pour certaines applications (mycoses), il est possible de mettre des activités enzymatiques particulières au niveau de certains arcs.

L'électrophorèse permet la séparation de molécules chargées : protéines, peptides, acides aminés, acides nucléiques et nucléotides. Elle permet dans certaines conditions (emploi de micelles de détergents ioniques) de séparer des molécules non ioniques, comme des hormones stéroïdes par exemple.

### **Réaction immunoenzymatique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) [7 ; 8]**

On décrit deux techniques ELISA :

- **ELISA indirecte** « classique » dans laquelle le sérum à étudier est incubé directement avec un Ag immobilisé ;
- **ELISA inverse** « immunocapture » dans laquelle une immunocapture de l'isotype que l'on souhaite étudier est d'abord réalisée avant l'incubation avec l'Ag.



(Source: Magniez F et al., 2008)

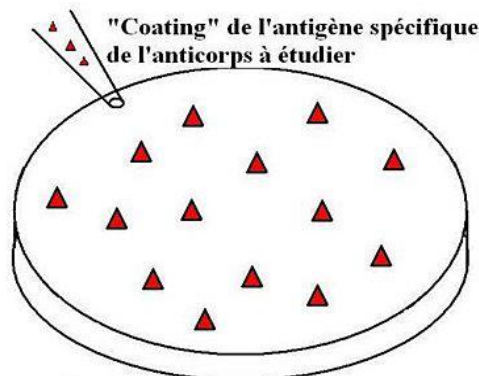
Figure 3. 7 : Différentes techniques ELISA [16]

❖ ELISA indirecte «classique»: recherche et titrage IgG

**Principe**

**1<sup>ère</sup> étape appelée « Coating de l'antigène :**

- Incuber l'Ag dans les puits de la plaque en polystyrène de 96 puits à fond plat.



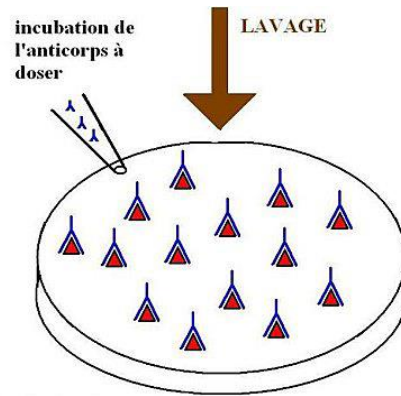
(Source: Magniez F et al., 2008)

Figure 3. 8 : Coating de l'antigène spécifique [16]

- Etape du « **Surcoating** » ou étape de saturation complémentaire : une autre solution protéique évitant les faux positifs (lait, gélatine, albumine).

**La 2<sup>ème</sup> étape : fixation de l'Ac à doser:**

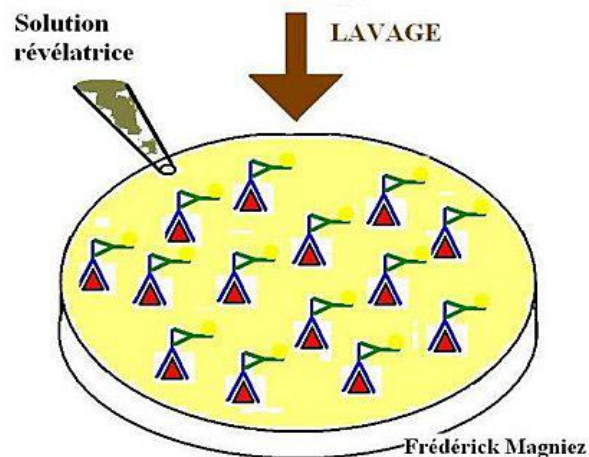
- Sérum est testé à une seule dilution.
- Incubation à 37°C (30 mn à 2 H).
- Les Ac se fixent spécifiquement sur l'Ag immobilisé.



(Source: Magniez F et al., 2008)

Figure 3. 9 : Fixation de l'antigène à doser [16]

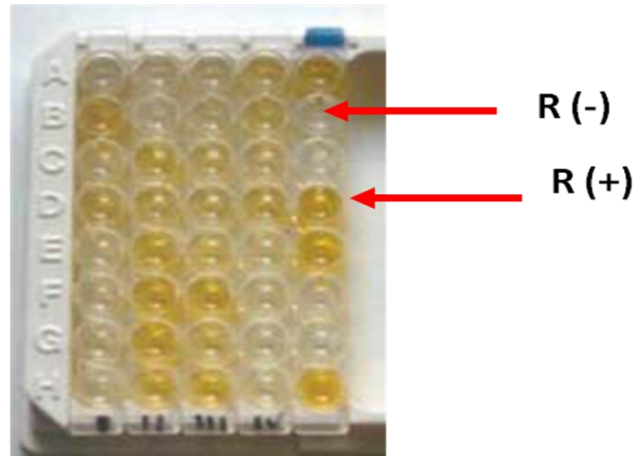
**La 3<sup>ème</sup> étape** : fixation du conjugué suivie de l'incubation à 37°C du conjugué anti-IgG couplé à la peroxydase (30 mn à 2 H). Le conjugué est fixé spécifiquement sur les Ac à doser.



(Source: Magniez F et al., 2008)

Figure 3. 10 : Fixation du conjugué [16]

- La réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout de l'acide sulfurique ;
- La réaction colorimétrique est mesurée au spectrophotomètre ;
- Le résultat obtenu est une densité optique (DO) qui peut être convertie en UI par comparaison avec une courbe étalon établie avec une série de sérums titrés.



(Source: Magniez F et al., 2008)

Figure 3. 11 : **Plaquette de réaction ELISA [16]**

Les puits fortement colorés correspondent à des sérums positifs pour la réaction ELISA.

❖ **ELISA inverse ou sandwich « dite immunocapture » recherche des anticorps IgM et IgA**

**Etape 1 : Immunocapture**

- Le fond des plaques est sensibilisé ;
- Ac anti-IgM (pour les ELISA IgM) ou anti-IgA (pour les ELISA IgA).

**Etape 2**

Le sérum du patient est ajouté ;

Les Ac des isotypes correspondants sont captés sur le support ;

Toutes les IgA ou IgM du sérum du patient s'accrochent sur les anti-IgA ou anti-IgM respectivement.

**Etape 3 et 4 :**

Après lavage, l'Ag parasitaire est ajouté, celui-ci peut être marqué à une enzyme.

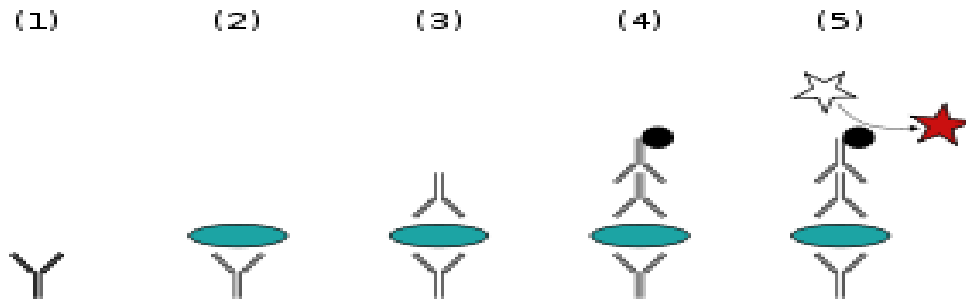
En cas de présence des Ac IgM ou IgA anti parasitaire (Toxoplasme) dans le sérum à tester, ils vont reconnaître l'Ag et le fixer.

**Etape 5**

Le substrat de l'enzyme est ajouté donnant **une réaction colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'Ac spécifiques retenue dans les cupules**

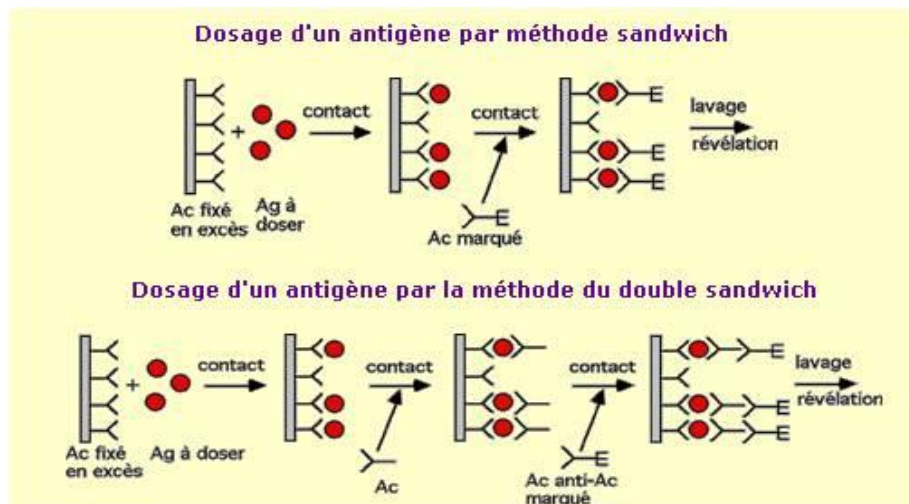
Le test est positif, si le sérum testé contient des IgA ou des IgM spécifiques de l'Ag conjugué.

Les résultats sont exprimés en ELISA IgA, IgM : Test positif (+) ou négatif (-) ou limite.



(Source: Magniez F et al., 2008)

Figure 3. 12 : *Etapes d'une réaction ELISA inverse ou sandwich « dite immunocapture »* [16]



(Source: Engvall E et al., 1971)

Figure 3. 13 : *Dosage d'un antigène par la méthode du double sandwich* [7]

### 3. Techniques de confirmation

#### a. Western Blot [17]

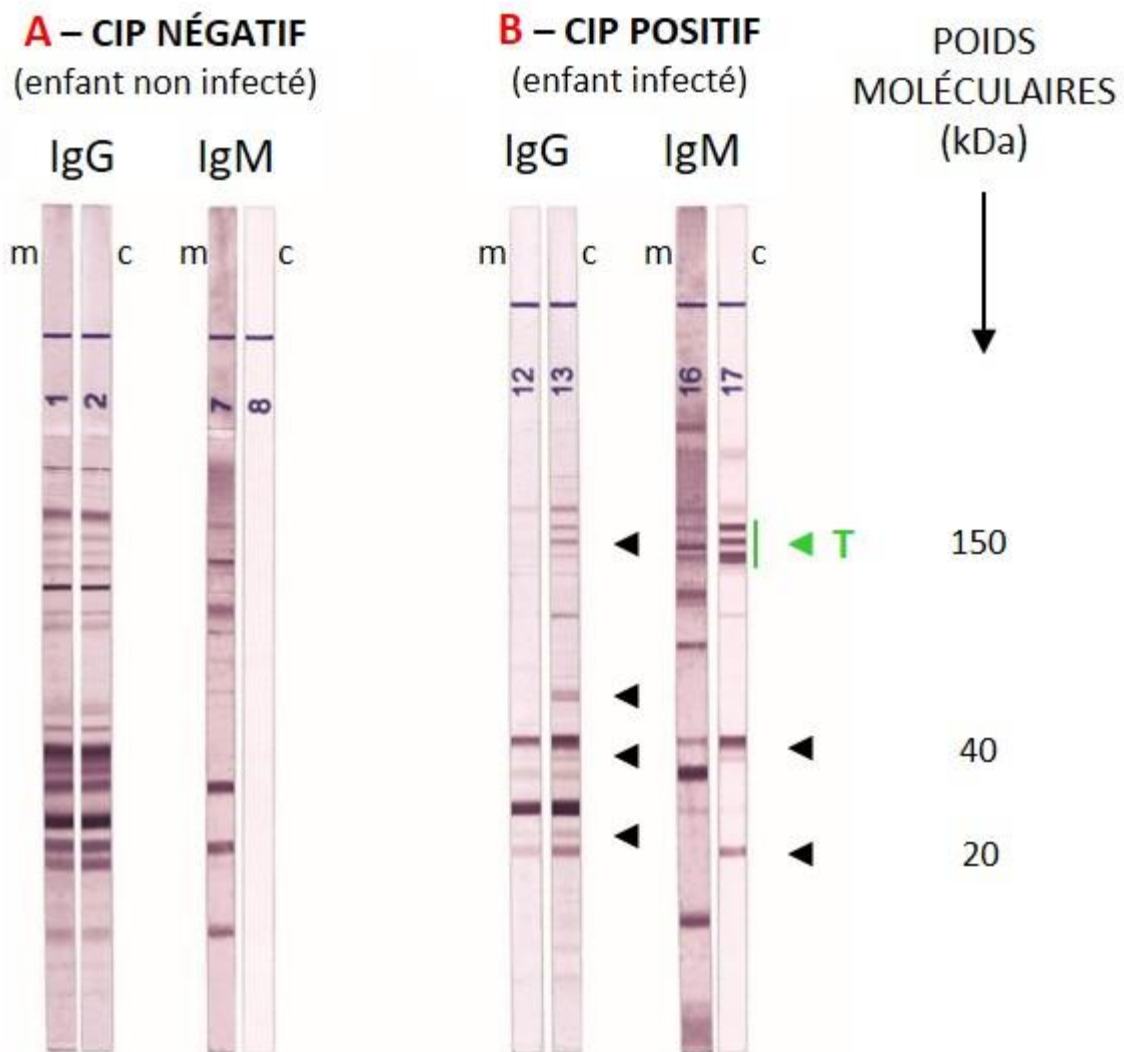
Le **Western Blot** (aussi appelé immunotransfert ou **transfert de protéines** ou **buvardage de western** ou encore **technique des immuno-empreintes**) est une technique employée pour analyser des protéines individuelles dans un mélange protéique (par ex., un lysat de cellules).

Dans le cadre du Western blot (immunotransfert), le mélange protéique est soumis à une électrophorèse sur gel dans une matrice porteuse (SDS-PAGE, PAGE native, focalisation



isoélectrique, électrophorèse sur gel bidimensionnelle, etc.) afin de trier les protéines par **taille, charge**, ou toute autre différence au sein des bandes individuelles de protéines. Les bandes de protéines séparées sont ensuite transférées vers une membrane porteuse (par ex., nitrocellulose, nylon ou PVDF). Ce procédé porte le nom de **transfert**. Les protéines adhèrent à la membrane de la même manière qu'elles ont été séparées en raison des interactions entre les charges. Les protéines de cet immunotransfert peuvent ensuite être utilisées pour être liées à l'anticorps en vue de la détermination.

On utilise des anticorps pour détecter des protéines cibles sur le Western blot (immunotransfert). Les anticorps sont conjugués à des marqueurs **fluorescents** ou **radioactifs** ou encore à des **enzymes** pour provoquer une réaction suite à l'ajout d'un réactif, entraînant une coloration ou une émission de lumière qui favorise la détection. **En fin de réaction**, une bande colorée apparaît lorsque le sérum testé contient des anticorps reconnaissant l'antigène adsorbé à cet endroit-là sur la bandelette.



(Source : Robert-Gagneux F et al., 1999)

Figure 3. 14 : **Western Blot (WB) : cas de toxoplasmose congénitale et néonatale [17]**

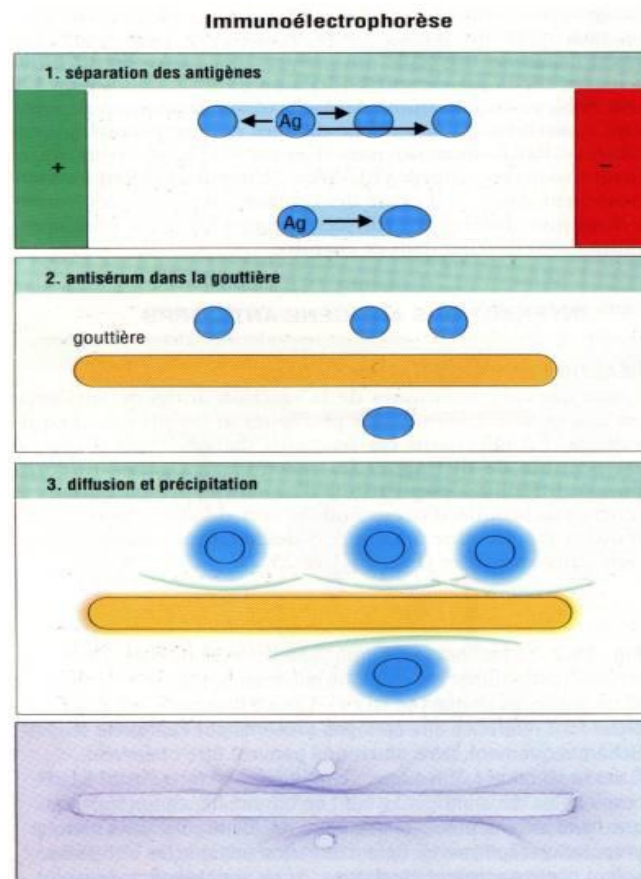


## b. Immuno-électrophorèse

C'est une méthode de laboratoire qui, en couplant **une électrophorèse** avec une solution contenant des **anticorps spécifiques**, va séparer les molécules composants le sérum ou l'urine en formant un précipité qui sera spécifique de chaque immunoglobuline.

La séparation des molécules se fait par **électrophorèse**. La détection se fait par **réaction immunologique** par formation de lignes de précipitation entre des **antigènes et des anticorps**. Les précipités peuvent être facilement visualisés sur un gel.

L'immunoélectrophorèse permet de différencier les différents arcs de précipitation et la recherche de **l'arc spécifique 5** pour le diagnostic de certitude d'échinococcose à *Echinococcus granulosus*. Cet arc 5 peut se voir dans **la cysticercose** ou dans **l'échinococcose alvéolaire** mais permet de poser le diagnostic dans plus de 90 % des **hydatidoses hépatiques** et **65% des hydatidoses pulmonaires**. L'inconvénient majeur de cette technique est la nécessité d'une grande quantité de sérum (au moins 1ml).



(Source: Grabar et al., 1953)

Figure 3. 15 : Résultats de réaction d'immunoélectrophorèse [15]

## D. Autres méthodes : Tests de diagnostic rapides (TDR)

Les tests de diagnostic rapides (TDR) ou tests rapides à orientation diagnostique (TROD) permettent d'obtenir dans un délai bref le diagnostic d'une maladie infectieuse, en l'occurrence une parasitose ; ces tests ont rendu rapide (quelques minutes à quelques heures), simple, fiable (en termes de sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives et négatives), et peu coûteux le diagnostic biologique des maladies infectieuses en zones tropicales.

Ces techniques d'exécution rapide sur membranes sont utilisées pour le sérodiagnostic en urgence.

### 1. Principe du diagnostic biologique rapide

Initialement, les TDR ont été mis au point sur le principe des réactions d'agglutination ou d'immunofiltration. Actuellement, ces tests sont réalisés par des **«méthodes biochimiques, immunochromatographiques (ICT) ou immuno-enzymatiques»**. Ces TDR permettent la **détection d'anticorps** ou d'antigènes par la technique d'immunocapture ou immunochromatographie sur membrane.

Les TDR basés sur le principe **de l'immunochromatographie sont actuellement les plus utilisés à cause de leur simplicité de réalisation et aussi à cause de la présence de contrôles négatifs et positifs fournis dans le test même**. Toutefois, dans le souci d'interpréter correctement les résultats, il est indispensable de connaître pour chacun de ces tests leur sensibilité, leur spécificité, leur valeur prédictive positive et négative.

Un résultat négatif n'exclut pas la présence de l'agent pathogène lié à la variabilité interindividuelle, à la possibilité de précocité d'exécution. Il est impératif de prendre en compte le type d'échantillon biologique préconisé par le test qui est le sérum en principe.

Le principe de la détection rapide d'anticorps par immunochromatographie sur bandelette est identique et impose une centrifugation préalable des tubes de sang. Il est préférable de travailler sur du sérum que sur du sang total.

## 2. Technique du diagnostic biologique rapide par immuno-chromatographie appliquée aux maladies parasitaires

### a. TDR du paludisme

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande de fonder la prise en charge des cas de paludisme sur le diagnostic parasitologique. Le recours à des tests de diagnostic rapide détectant des antigènes est un élément essentiel de cette stratégie et le pilier de l'extension de l'accès au diagnostic du paludisme, car ils permettent un diagnostic parasitologique dans des zones où il est impossible d'entretenir de bons services de microscopie [18]. Les TDR du paludisme détectent des antigènes spécifiques (des protéines) produits par les plasmodium présents dans le sang des sujets infectés.

Le principal objectif du diagnostic biologique du paludisme par le TDR est de disposer d'un outil rapide, fiable, réalisable et accessible à tous les niveaux.

- **Le principe du TDR**

Il existe des variations entre les quelques 200 produits de TDR disponibles sur le marché. Cependant, les principes des tests restent similaires. Le principe du TDR repose sur une technique immunochromatographique révélant la réaction antigène – anticorps. Le sang est habituellement prélevé par une piqûre au doigt, et les résultats sont disponibles en 15 à 30 minutes.

- **Différentes protéines cibles des TDR**

Trois types de protéines spécifiques de *Plasmodium*, à savoir HRP2 (« Histidine Rich Protein»), la lactate déshydrogénase et l'aldolase, sont actuellement détectées par les tests de diagnostic rapide commercialisés.

**HRP2** : la protéine riche en histidine HRP2 est une protéine soluble dans l'eau, spécifique de *P. falciparum*, et produite abondamment par les stades asexués et les gamétocytes. HRP2 possède un seuil de détection d'approximativement 100 parasites/ $\mu$ L. Elle est donc la protéine permettant la détection la plus sensible de tout l'arsenal de tests de diagnostic rapide avec 95% de sensibilité à *P. falciparum* [19]. Cette sensibilité augmente avec la densité parasitaire [20]. Le test à PfHRP2 est donc présenté comme une alternative fiable à la microscopie en zone d'endémie à haute transmission et constitue le type de TDR le plus largement utilisé à l'heure actuelle pour *P. falciparum* [21].

Le TDR utilisant HRP2 est celui recommandé par le programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) du Burkina Faso en conformité avec les directives de l'OMS. Il est également indiqué dans le diagnostic du paludisme placentaire, chez la femme enceinte. Lors de la grossesse, le parasite demeure séquestré dans les tissus placentaires et il est alors difficile de le détecter par microscopie. Dans ce contexte, une étude en Ouganda a démontré

que la sensibilité et la spécificité des TDR, cependant inférieures à la microscopie, rendaient cet outil intéressant dans la détection du paludisme chez la femme enceinte [21].

- **La Lactate Déshydrogénase (LDH)**

Il s'agit d'une enzyme retrouvée dans la voie de la glycolyse au cours des stades sexués et asexués de *Plasmodium* [22]. Le gène *pldh* présente à la fois un motif commun à toutes les espèces de *Plasmodium*, mais également des motifs spécifiques d'espèces. De fait, les TDR basés sur la pLDH peuvent détecter spécifiquement, selon les anticorps mis au point, *P. falciparum* (pf-pLDH), *P. vivax* (pvpLDH) mais également de façon non spécifique (ou pan spécifique : pan-pLDH) le genre *Plasmodium* [23]. Ces TDR possèdent un seuil de détection d'approximativement 200 parasites/ $\mu$ L. Des études ont montré que les parasites devaient être vivants dans le sang du patient afin qu'il y ait une production de pLDH [24]. Ces tests peuvent également être utilisés dans la détection du paludisme placentaire chez la femme enceinte [21].

Les TDR basés sur pLDH possèdent des avantages sur les TDR à HRP2, comme la clairance rapide de pLDH après un traitement réussi (environ 10 jours) : ils permettent d'évaluer la réponse au traitement antipaludique chez un patient et de prédire les échecs thérapeutiques [25]. En outre, les TDR à pLDH ne présentent pas d'effet prozone (faux négatifs par excès d'anticorps dans le cas de forte parasitémie) [26].

**L'aldolase** : il s'agit d'une enzyme glycolytique retrouvée dans de nombreux tissus de l'hôte humain, où Les anticorps de détection de l'aldolase permettent de détecter spécifiquement *P. falciparum* et *P. vivax* mais aussi les deux espèces ensemble de façon pan-spécifique [27]. La qualité de détection de l'antigène diminuerait en dessous de 500 parasites/ $\mu$ L (Ashton et al., 2010). L'antigène persiste moins de 10 jours dans le sang et pourrait donc potentiellement permettre le suivi thérapeutique de l'infection [27].

- **Les limites des TDR dans le diagnostic du paludisme**

**Limites de HRP2**

La protéine HRP2 persiste dans le sang jusqu'à deux semaines après le traitement antipaludique. Elle induit alors un taux de faux positifs important chez les patients guéris, ayant contracté une pathologie aux symptômes fébriles semblables au paludisme. Il n'est donc pas possible de surveiller la clairance parasitaire et de détecter précocement l'efficacité du traitement. Cela, peut compromettre le rapport coût/efficacité de ces tests [20].

**Limites du TDR spécifique de la LDH**


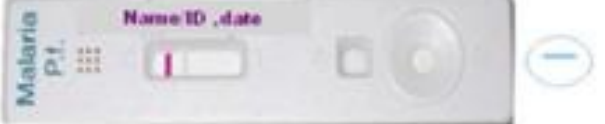
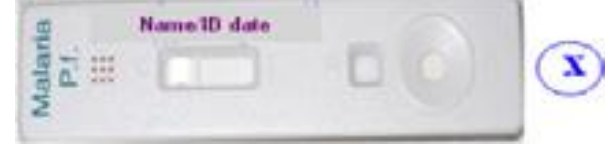
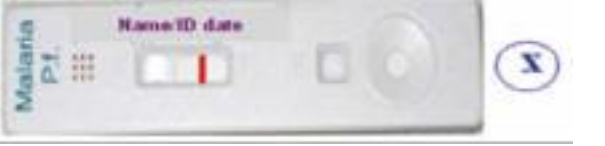
Le seuil de détection des TDR à pLDH (200 parasites/ $\mu$ L) restreint cependant leur utilisation optimale aux cas de fortes parasitémies avec une sensibilité de 93,2% pour *P. falciparum* [19]. Ils apparaissent donc moins performants que ceux à HRP2 dans les zones de faible transmission [24].

Les TDR actuels ciblant *P. vivax* présentent des anticorps contre Pv-pLDH. Toutefois, leur seuil de détection reste plus faible que pour *P. falciparum* [24]. De plus, il n'existe pas de détection spécifique des autres espèces de *Plasmodium* (*P. ovale*, *P. vivax*, *P. knowlesi* ... )

En outre, la pLDH est également produite par les stades gamétocytes du parasite, qui ne sont pas éliminés par les traitements utilisant des Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) conventionnels. Cette observation peut faire craindre une incapacité de ce type de TDR à détecter l'élimination progressive des parasites, ou la clairance parasitaire, et donc à conclure à l'efficacité du traitement [28]. Cependant, les gamétocytes résiduels sont peu nombreux après traitement et leur densité se situe alors sous le seuil de détection des TDR [29].

#### Limites de l'aldolase

Peu d'études comparatives ont été menées sur des TDR à aldolase par rapport à ceux à base de la HRP2 et la LDH. La sensibilité générale de ces TDR reste assez basse par rapport aux autres protéines cibles, entre 48 et 80% pour *P. falciparum* et entre 15 et 83% pour *P. vivax* [30]. Cela peut être dû au fait que l'aldolase est produite en faible quantité par le parasite et que sa détection est donc dépendante de la parasitémie du patient. En outre, cela peut être consécutif au faible nombre d'épitopes par parasite (non répétés comme pour HRP2). Enfin, un événement de polymorphisme sur un seul nucléotide (SNP) a été découvert sur des isolats coréens de *P. vivax*, mettant en difficulté la spécificité des tests dans ce pays [19].

Interprétations des Résultats pour TDR HRP2	Illustrations
Le <b>résultat du test est positif</b> , si les deux bandes apparaissent (test et contrôle)	 <p style="text-align: center;"><b>Figure 3. 16a</b></p>
Le <b>résultat est négatif</b> si une seule bande apparaît sur la ligne contrôle (C)	 <p style="text-align: center;"><b>Figure 3. 16b</b></p>
Le <b>résultat du test est invalide</b> , si aucune bande n'apparaît au bout de 15 minutes	 <p style="text-align: center;"><b>Figure 3. 16c</b></p>
Le <b>résultat du test est invalide</b> , si aucune bande n'apparaît dans la case contrôle	 <p style="text-align: center;"><b>Figure 3. 16d</b></p>

(Source: WHO., 2013)

Figure 3. 16 : Interprétation des résultats de TDR à HRP2 [18]

## **b. TDR de la Maladie de Chagas [31 ; 32]**

Les TDR détectent les anticorps de *Trypanozoma cruzi* dans le plasma, le sang total ou le sérum. Leur sensibilité est supérieure à 80%, ce qui les rend utilisables au niveau des soins de santé primaire ou pour les études épidémiologiques.

Chez les populations difficiles à atteindre ou les migrants dans les zones non endémiques qui ont une faible prévalence, ces TDR sont indiqués pour le diagnostic de la maladie de Chagas.

## **c. TDR de la leishmaniose viscérale [33]**

Les tests immunochromatographiques utilisent des bandelettes sensibilisées par l'antigène recombinant K39. Ils sont réalisés sur du plasma, du sérum ou du sang total. Ils sont indiqués en première intention devant des tableaux cliniques évocateurs de leishmaniose viscérale en zones d'endémie du sous-continent du Brésil, indien et d'Afrique de l'Est, où leur sensibilité se situe entre 40 et 90%.

Un TDR, l'IgG1 K-Set, est utilisé dans le diagnostic de rechute de la leishmaniose viscérale. Sa sensibilité et sa spécificité ont été respectivement de 83-100% et 80% dans la détection des rechutes de LV chez les sujets symptomatiques.

## **d. TDR de l'échinococcose kystique humaine ou hydatidose humaine [34]**

Si l'échographie est indispensable pour le diagnostic, dans la détermination du stade et la prise en charge de l'hydatidose chez l'Homme, la sérologie est un complément à l'imagerie. Dans les zones rurales, où la maîtrise de l'échographie est faible et la sérologie non disponible, les TDR peuvent être utiles. Cependant, leur sensibilité et leur spécificité ne sont pas satisfaisantes.

# **VI. Particularités des sérologies dans les parasitoses**

## **A. Amibiase (amoébose) viscérale [3 ; 4]**

Dans le contexte clinique viscéral, il est particulièrement difficile de mettre en évidence la présence du parasite, même dans une ponction d'abcès hépatique et les résultats de l'analyse de selles sont souvent négatifs. Seule l'immunologie confirme le diagnostic dans les amibiases viscérales (foie, poumons). Dans ce cas, la sérologie constitue le test de dépistage de choix. En cas d'abcès hépatique, la sensibilité du test est pratiquement de 100%, avec une excellente spécificité.

Au cours du suivi thérapeutique, on note une chute rapide des Ac au cours des 3 premiers mois avec une négativation en moins d'un an.

Il est recommandé de toujours utiliser deux techniques complémentaires, l'une utilisant les antigènes solubles (HAI, ELISA), l'autre utilisant les antigènes figurés (IFI). Les tests de confirmation utilisent les techniques d'immunoélectrophorèse.

La sérologie pourrait permettre de différencier le portage d'*E.histolytica* (sérologie positive) d'*E. dispar* (sérologie négative).

## B. Amibiase intestinale [35]

En cas de dysenterie amibienne, la sérologie est souvent négative ou faiblement positive. En région d'endémie, la sérologie est ininterprétable (persistance des anticorps) En dehors des régions d'endémie, un titre élevé est un bon indicateur d'une infection par *E. histolytica*.

## C. Anisakiase [36]

Le patient s'infecte en consommant du poisson (hareng, sushi). Dans certains cas, les signes cliniques peuvent évoquer une maladie de Crohn. La sérologie est la seule analyse de dépistage. Le traitement de ces infections dépend du contexte clinique.

## D. Anguillulose [37]

La recherche directe des larves du parasite dans les selles manque cruellement de sensibilité (elle ne dépasse pas 50% pour l'examen standard de trois selles). Elle est bien meilleure pour la sérologie (test ELISA) avec une bonne sensibilité (environ 95%). Toutefois, des réactions croisées avec les autres nématodes sont notées.

Seule la combinaison des deux approches diagnostiques permet un dépistage adéquat chez les personnes provenant des régions d'endémie et qui sont susceptibles de suivre un traitement au long cours aux corticoïdes ou immunosuppresseurs.

## E. Cysticercose [38 ; 39]

Le diagnostic direct ne peut être réalisé qu'à partir de l'examen de la tumeur suspecte. La sérologie est nécessaire pour un test de dépistage et pour un test de confirmation (Western blot modifié). La recherche d'anticorps se fait dans le sérum ou mieux, dans le LCR.

Le dépistage doit être réalisé par au moins 2 techniques différentes. Les différents tests de dépistage sont : **ELISA, IFI, agglutination...**

Les tests de confirmation reposent sur **l'immunoélectrophorèse, le Western blot**. La sensibilité est de 50-80% toutes formes confondues (jusqu'à 90% dans les formes actives).

Malgré ses très bonnes sensibilités et spécificités, la sérologie doit être interprétée avec l'ensemble des résultats cliniques. Il y a en effet possibilité de réactions croisées avec d'autres helminthiases : l'interprétation doit donc tenir compte des données épidémiocliniques. Le Western blot permet d'éliminer certaines réactions croisées.

## F. Distomatoses à *Fasciola hepatica* et à *F. gigantica* [40]

**En phase d'invasion** (phase où il n'y a pas d'émission d'œufs dans les selles et la migration parasitaire dure environ 3 mois), la sérologie est la seule analyse de laboratoire de dépistage. La sérologie présente aussi un intérêt pendant la phase d'état, car les œufs sont émis en faible quantité (risque de faux négatif du diagnostic direct).

**En phase d'état**, la recherche directe et la sérologie doivent être demandées ensemble. En effet, l'infestation est généralement due à petit nombre de douves, qui n'arrivent pas toujours à une maturité sexuelle complète. Ainsi, le nombre d'œufs dans les selles est souvent très faible.

Le dépistage doit être réalisé par au moins 2 techniques différentes:

- **Tests de dépistage** : IFI, agglutination, ELISA et **HAI**,
- **Tests de confirmation** : Immunoélectrophorèse avec un arc spécifique, Western blot.

Il existe des réactions croisées avec d'autres helminthiases (échinococcose, paragonimose). La sensibilité est supérieure à 90% en phase d'invasion à la 3<sup>ème</sup> semaine. Les titres augmentent lors du traitement (x 6 à x 8) puis diminuent 5-6 semaines après, et se deviennent négatif environ 7-12 mois après guérison.

## G. Échinococcose alvéolaire [41]

Le diagnostic direct n'est possible qu'à partir d'une pièce opératoire. Le diagnostic sérologique de l'échinococcose alvéolaire doit comprendre 2 techniques dont une au moins avec un antigène de l'espèce *E. multilocularis*.

Les tests de dépistage reposent sur **IFI, ELISA et test d'agglutination**. Cependant, la confirmation du diagnostic utilise les tests d'immunoélectrophorèse, le Western blot. Seules certaines techniques ELISA et le Western blot permettent de faire la différence entre échinococcose alvéolaire et hydatidose. Un résultat positif est fortement présomptif d'une échinococcose alvéolaire.

## H. Hydatidose [42]

Le diagnostic direct ne se fait qu'à partir de pièces opératoires voire après ponction du kyste (uniquement par une équipe spécialisée nécessitant un geste délicat, un traitement préalable ...).

La sérologie repose sur des **méthodes qualitatives** (immunoélectrophorèse, immunosynérèse) et **quantitatives** (HIA, IFI, ELISA). La sensibilité est moins bonne



chez l'enfant de moins de 15 ans et en cas de localisations pulmonaires, cérébrales, osseuses.

Les tests de confirmation reposent sur le Western blot, l'immunoélectrophorèse et l'électrosynérèse. Le Western blot présente des profils de bandes spécifiques de chaque espèce (*E. granulosus* et *E. multilocularis*).

L'élévation du taux sérologique est très fréquente dans les suites immédiates du traitement chirurgical (4-6 semaines), avant de régresser en plusieurs mois. Après guérison, la négativation des Ac est généralement obtenue après 15-24 mois. La sérologie doit être réalisée 1, 6, 12 et 24 mois après l'intervention.

## I. Leishmaniose viscérale [43]

**La sérologie est utile dans les formes viscérales** (Kala-azar). Elle est peu utile dans les formes cutanées (bouton d'Orient). Le sérodiagnostic est toujours positif dans la leishmaniose viscérale, mais il existe des difficultés d'interprétation chez les sujets VIH positifs, nécessitant un Western blot qui montre des bandes spécifiques. Les techniques **de dépistage reposent sur : IFI, ELISA.**

Cependant, **la technique de confirmation utilise le Western blot.** Un taux d'Ac très élevé est très en faveur d'un diagnostic de leishmaniose viscérale. Un taux d'Ac modéré doit être impérativement confirmé par un Western blot et doit faire répéter les examens parasitologiques pour poser le diagnostic.

Après traitement, les anticorps diminuent au cours des 2 premiers mois, un taux résiduel peut persister plus d'un an. Des réactions croisées sont possibles avec les trypanosomes et les plasmodies.

## J. Paludisme [44]

Le diagnostic d'un accès palustre repose sur le frottis sanguin et/ou la goutte épaisse ou bien sur les tests de diagnostic rapide réalisés en urgence. **La sérologie doit être utilisée uniquement à visée épidémiologique, dans le dépistage des donneurs de sang** infectés mais asymptomatiques, le **diagnostic rétrospectif d'une fièvre tropicale** auto traitée ou non et chez les sujets revenant d'une zone tropicale et présentant une splénomégalie, une hépatomégalie, une anémie ou une fièvre au long cours d'étiologie indéterminée. Elle présente un intérêt dans le diagnostic du paludisme viscéral évolutif.

Elle ne doit en aucun cas être utilisée dans le cadre du diagnostic d'un accès palustre.

Les techniques analytiques utilisées reposent **sur IFI.**

## K. Schistosomiasis [45 ; 46]

Le diagnostic est basé sur la mise en évidence des œufs dans les selles et les urines (éliminés environ deux mois après l'infection, soit la durée du cycle parasitaire). La recherche directe et la sérologie sont les deux analyses disponibles.

La **sérologie est nécessaire en phase d'invasion dans les bilharzioses**, mais elle se positive tardivement (en moyenne 46 jours après le bain contaminant). Elle repose sur la détection des anticorps de **type IgM ou IgG** par les réactions **d'HAI, d'IFI ou ELISA**. Il y a des réactions croisées avec la cysticercose, la *Larva migrans* viscérale et les filarioses.

La détection d'anticorps contre la schistosomiase peut confirmer davantage le soupçon clinique. Cependant, ces anticorps peuvent persister pour plusieurs années, même après un traitement efficace rendant le diagnostic d'une réinfection ou le diagnostic d'un traitement inefficace très embarrassant. Les anticorps peuvent également être absents dans certains cas d'infection active chronique.

Les tests de confirmation reposent **sur l'immunoélectrophorèse** (Arc 4 commun à toutes les bilharzioses, arc 8 spécifique de *S. mansoni* (sensibilité: 80%)) et le **Western Blot** (ne permet pas de différencier chaque espèce).

Il existe de nombreuses réactions croisées avec les autres helminthiases. Une augmentation du titre d'anticorps est possible entre 3-4 semaines après traitement. La négativation de la sérologie est observée plus de 12-15 mois après guérison.

## L. Toxocarose [47]

Il s'agit d'un **parasite d'animaux, non adapté à l'Homme**. L'infection évolue vers une **impasse parasitaire**. **La sérologie est la seule analyse de dépistage**.

La technique de référence est **l'ELISA**. Le diagnostic est très souvent positif chez l'adulte en raison de la fréquence des contacts avec les chiens. Il doit être confirmé par un Western blot.

La séroprévalence est importante dans la population générale. On note la présence de nombreuses réactions croisées avec d'autres helminthiases. Des taux très élevés sont évocateurs d'une toxocarose.

## M. Toxoplasmose [14]

Différents tests utilisés pour la **détection des anticorps anti-Toxoplasma** (Dye-test, agglutination directe sensibilisée (ADS), IFI, ELISA, l'Immuno-Sorbent Agglutination Assay (ou ISAGA)) permettent le diagnostic de la toxoplasmose et la surveillance de la femme enceinte et du nouveau-né.

Le **diagnostic de la toxoplasmose aiguë** repose sur la présence d'IgM et l'ascension significative du titre des IgG en 3 à 4 semaines d'intervalle. Lorsque la réponse d'IgG atteint

la phase en plateau, il est impossible de dater précisément le début de l'infection par les techniques sérologiques.

Les **tests d'avidité des IgG par méthode immunoenzymatique** : elle est utilisée pour distinguer une toxoplasmose récente d'une toxoplasmose chronique, dans le cas où les techniques de première intention ne permettent pas de trancher (en présence d'IgM ou quand les IgG sont présentes à un titre élevé > 150 UI/ml). Cette distinction est possible car l'avidité des IgG pour les antigènes augmente au cours d'une infection et **permet la datation des séroconversions**. Une forte avidité permet l'exclusion d'une infection récente (datant de moins de quatre mois). Ces tests sont particulièrement utiles chez la femme enceinte.

Chez l'immunodéprimé, **si le dosage des IgG est peu sensible pour poser le diagnostic d'une toxoplasmose évolutive, le dosage des IgM par la méthode ELISA est efficace pour différencier une toxoplasmose infection d'une toxoplasmose active**.

Une étude récente a montré l'intérêt du dosage des IgE dans le diagnostic d'une toxoplasmose évolutive.

## **N. Trichinose [48 ; 49]**

Le diagnostic direct se fait sur des prélèvements invasifs (biopsie) et présente une faible sensibilité.

Parasite tissulaire, le sérodiagnostic de la trichine est la seule analyse de dépistage. Elle est basée sur **l'ELISA, l'IFI et le Western Blot**. La sensibilité du sérodiagnostic est d'environ 85%. On note la présence de réactions croisées avec les autres helminthes (généralement à des titres faibles). La négativité d'un examen sérologique précoce ne doit pas faire éliminer le diagnostic qui doit être renouvelé après quinze jours.

## **O. Trypanosomiase humaine africaine [50]**

Le diagnostic clinique de la trypanosomiase africaine demande des méthodes de diagnostic direct et sérologiques. Les méthodes directes (microscopie et diagnostic moléculaire) sont ensuite utilisées pour analyser les liquides biologiques (sang, LCR).

La sérologie est l'analyse de dépistage. Elle utilise la **méthode d'immunofluorescence indirecte (IFI)**. Elle se fait sur un frottis de trypanosomes. Elle est assez spécifique et est surtout utilisée dans les enquêtes épidémiologiques.

Les campagnes de dépistage sont effectuées avec un test simple d'agglutination, le **CATT** (test d'agglutination des trypanosomes fixés sur carte) ou la réaction d'agglutination sur carte (Test-tryp-CATT). La technique utilise du sang total. On utilise **une carte plastifiée blanche, rigide**, lisse sur laquelle sont dessinés 10 cercles correspondant à 10 zones de réaction à l'intérieur desquelles seront déposées les gouttes d'antigène et de sang ou de sérum. En **présence d'anticorps**, les trypanosomes fixés au bleu de **Comassie sont agglutinés et forment des grumeaux bleus visibles à l'œil nu**.

Il s'agit d'une technique de dépistage de masse en Afrique, applicable sur le terrain, simple, rapide, de bonnes performances avec une sensibilité autour de 87-98%, une spécificité de 93-95%.

Les autres techniques sérologiques telles que **HAI et ELISA** sont réalisables sur du sérum, le LCR, la salive et l'éluât de sang sur du papier filtre.

La réaction sérologique se positive 3 semaines après la contamination et jusqu'à 3 ans après le traitement. Toute positivité doit systématiquement être confirmée par la recherche directe.

## **P. Trypanosomiase américaine ou Maladie de Chagas**

La recherche d'anticorps est réalisée par **hémagglutination indirecte, ELISA, IFI**. Etant donné la complexité des situations cliniques et des modes de transmission, tout résultat positif demande des investigations cliniques approfondies.

## **Q. Autres parasites uniquement intestinaux**

Le diagnostic se fait par méthode directe. La sérologie n'a aucun intérêt diagnostique.

### **Conclusion**

La sérologie des infections parasitaires est utile lorsque le parasite ne peut être documenté par un examen direct (parasites tissulaires) ou difficilement. Aussi, une sérologie de dépistage est utile en cas d'éosinophilie inexplicée. Ces cas démontrent le rôle important de la sérologie qui doit être évaluée de concert avec l'histoire du patient, les observations cliniques, les valeurs d'hématologie et de biochimie et en appui aux méthodes de détection directe des infections parasitaires.

Un résultat de test sérologique doit être interprété de concert avec l'histoire du patient, la clinique et les examens complémentaires.

Toutefois, les sérologies parasitaires ne sont pas toujours utiles pour le suivi du traitement.

## Bibliographie

1. Crowle AJ. Immunodiffusion (2e édition) Academic Press, New York, 1973.
2. Gwenola Burgot, Jean-Louis Burgot. **Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications**. Lavoisier, 3<sup>e</sup> édition, 2011
3. Bourée P, Botterel F, Resende P. **Sérologies parasitaires en pratique courante : intérêt et limites**. Revue Française des Laboratoires. 2004 ; 366 : 51 -59
4. Kramme S, Marti H, Genzon B, Hatz C. **Comment la sérologie parasitaire peut-elle aider à l'établissement du diagnostic des parasites ?** Rev Med Suisse. 2010; 7: 995-9.
5. Coons AH et Kaplan MH « **Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody** ». The Journal of Experimental Medicine. 91 (1), 1950 : 1–13
6. Bussard A. **Description d'une technique combinant simultanément l'électrophorèse et la précipitation immunologique dans un gel : électrosynérèse**. Biochim. Biophys. Acta. 1959 ; 34 : 258-260
7. Engvall E et Perlman P « **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G** » *Immunochemistry*. 1971; 8 : 871-874
8. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA et Kuby J. « **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay** » *in Immunology*, 5<sup>e</sup> edition, 2003: 148-150.
9. Hugues-Jones NC. **Nature of the reaction between antigen and antibody**. Med Bull. 1963
10. Oliver-Gonzalez J. **Anti-egg precipitins in the serum of humans infected with *Schistosoma mansoni***. J. Inf. Dis. 1954 : 95, 86
11. Vogel H und Minning W. **Hüllenbildung bei Bilharzia-Cercarien im serum Bilharzia-infizierter Tiere und Menschen**. Centralbl. f. Bakteriol. 1949 : 153, 91
12. Fulton JD. **Micro-agglutination test for toxoplasma antibodies**. Immunology. 1965; 9(5): 491–495
13. Sabin AB et Feldman HA. **Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomem affecting a protozoon parasite (toxoplasma)**. *Science*. 1948;108 : 660.
14. Robert-Gangneux F, Dardé ML. **Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis**. Clin Microbiol Rev; 2012; 25(2):264-96.
15. Grabar P, Williams C. **Application of immunoelectrophoresis to the separation of proteins**. Biochim. Biophys. Acta. 1953; 10:193-4
16. Magniez F. **Différentes techniques ELISA : Biotechnological site for the future**. 2008
17. Robert-Gangneux F, Commere V, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J. **Performance of a Western Blot assay to compare mother and newborn anti- *Toxoplasma* antibodies for the early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis**. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999 ; 18 : 648-54.

18. World Health Organization, FIND, CDC. **Malaria Rapid Diagnostic Test Performance-Results of WHO product testing of malaria RDTs : Round 5.** 2013: 1–144.
19. Abba K, Deeks JJ, Olliaro P, and Naing CM. **Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries.** The Cochrane database of systematic reviews. 2011; (7), CD008122. doi:10.1002/14651858.CD008122.pub2
20. Abeku TA, Kristan M, Jones C, Beard J, Mueller DH, Okia M, et al. **Determinants of the accuracy of rapid diagnostic tests in malaria case management: evidence from low and moderate transmission settings in the East African highlands.** Malaria Journal. 2008;7 : 202.
21. Kyabayinze DJ, Tibenderana JK, Nassali M, Tumwine LK, Riches C, Montague, M et al. setting **Placental *Plasmodium falciparum* malaria infection: operational accuracy of HRP2 rapid diagnostic tests in a malaria endemic.** Malaria Journal. 2011;10: 306.
22. Talman AM, Duval L, Legrand E, Hubert V, Yen S, Bell D et al. **Evaluation of the intra- and inter-specific genetic variability of *Plasmodium lactate dehydrogenase*.** Malaria Journal. 2007; 6, 140.
23. Piper RC, Buchanan I, Choi YH, and Makler MT. **Opportunities for improving pLDHbased malaria diagnostic tests.** Malaria Journal. 2011; 10: 213.
24. Makler MT, and Piper RC. **Rapid Malaria Tests: Where Do We Go After 20 Years?** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2009; 81: 921–926.
25. Gerstl S, Dunkley S, Mukhtar A, De Smet M, Baker S, and Maikere J. **Assessment of two malaria rapid diagnostic tests in children under five years of age, with follow-up of false-positive pLDH test results, in a hyperendemic falciparum malaria area, Sierra Leone.** Malaria Journal. 2010; 9, 28.
26. Gillet P, Scheirlinck A, Stokx J, De Weggheleire A, Chaúque HS, Canhanga OD, et al. **Prozone in malaria rapid diagnostics tests: how many cases are missed?** Malaria Journal. 2011; 10:166.
27. Dzakah EE, Kang K, Ni C, Wang H, Wu P, Tang S, et al. ***Plasmodium vivax* aldolase-specific monoclonal antibodies and its application in clinical diagnosis of malaria infections in China.** Malaria Journal. 2013; 12: 199.
28. Mueller I, Betuela I, Ginny M, Reeder JC and Genton B. **The sensitivity of the OptiMAL rapid diagnostic test to the presence of *Plasmodium falciparum* gametocytes compromises its ability to monitor treatment outcomes in an area of Papua New Guinea in which malaria is endemic.** Journal of Clinical Microbiology. 2007; 45: 627–630.
29. Sowunmi A, Balogun ST, Gbotosho GO, and Happi CT. ***Plasmodium falciparum* gametocyte sex ratios in children with acute, symptomatic, uncomplicated infections treated with amodiaquine.** Malaria Journal. 2008; 7: 169.
30. Ashton RA, Kefyalew T, Tesfaye G, Counihan H, Yadeta D, Cundill B et al. **Performance of three multi-species rapid diagnostic tests for diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in Oromia Regional State, Ethiopia.** Malaria Journal. 2010; 9: 297
31. Pays JF. **Le diagnostic biologique de la maladie de Chagas.** Revue Francophone des Laboratoires. 2011 ; 430 : 47

32. Pan American Health Organization. **Guidelines for diagnosis and treatment of Chagas disease**. Washington, D.C. 2019.
33. Marty P, Delaunay P, C. Fissore C, LE Fichoux Y. **La leishmaniose méditerranéenne due à *leishmania infantum* : Mise au point - intérêts des tests de diagnostic rapide: it-leish®\*Et id-pagia leishmaniasis®\*** Med Trop 2007 ; 67 : 79-85
34. Gonzalez AE, Lorca M, Naquira C, Nieto A and Schantz PM. **Prevention and control of cystic echinococcosis**. Lancet Infectious Diseases. 2007; 7: 385-394.
35. Tanyuksel M, Petri WA. **Laboratory diagnosis of amebiasis**. Clin Microbiol Rev. 2003 ;16: 713-29
36. Chappuis F ; L. Loutan L. **Helminthiases humaines transmises par les poissons**. Rev Med Suisse 2006; 2: 31369
37. Siddiqui AA, Berk SL. **Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection**. Clin Inf Dis. 2001 ; 33 : 1040-7.
38. Paredes A, Sáenz P, Marzal MW, Orrego MA, Castillo Y, Rivera A, Mahanty S, Guerra-Giraldez C, García HH, Nash TE. **Cysticercosis Working Group in Peru. Anti-Taenia solium mono-clonal antibodies for the detection of parasite antigens in body fluids from patients with neurocysti-cercosis**. Exp Parasitol. 2016 Jul;166:37-43
39. Zammarchi L, Bonati M, Strohmeier M, Albonico M, Requena-Mendez A, Bisoffi Z, et al. **Screening, diagnosis and management of human cysticercosis and Taenia solium taeniasis: technical recommendations by the COHEMI project study group**. Trop Med Int Health. 2017;22(7):881-94
40. Sarkari B, Khabisi SA. **Immunodiagnosis of Human Fascioliasis: An Update of Concepts and Performances of the Serological Assays**. J Clin Diagn Res. 2017Jun;11(6):OE05-OE10. Review.
41. Bresson-Hadni S, Grenouillet F, Chauchetad A, Richouae C, Knappab J, Delabrousseaf E, et al. **Diagnostic de l'échinococcose alvéolaire** **Diagnosis of alveolar echinococcosis**. Revue Francophone des Laboratoires. 2014 ; 464 (1) : 77-8
42. Pierre Aubry P, Gaüzère BA . **Hydatidose ou kyste hydatique Actualités**. Med Trop. 2019
43. Gangneux JP, Belaz S, Robert-Gangneux F. **Mise au point et actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne**. Journal des Anti-infectieux. 2015;17(1):25–28
44. Chippaux JP, Du Saussay C, Akogbeto M. **Intérêt du dosage des anticorps palustres chez les sujets non immuns en zone holoendémique**. Médecine tropicale. 1989;9(4):409–13.
45. De Jesus AR, Silva A, Santana LB. **Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni**. J Infect Dis. 2002; 185
46. an Gool T, Vetter H, Vervoort T, Doenhoff MJ, Wetsteyn J, Overbosch D. **Serodiagnosis of imported schistosomiasis by a combination of a commercial indirect hemagglutination test with *Schistosoma mansoni* adult worm antigens and an enzyme-linked immunosorbent assay with *S. mansoni* egg antigens**. J Clin Microbiol. 2002;40(9):3432–37.
47. Magnaval JF, Toxocara (larves d'ascarididées). Encycl Med Biol. 2003 Elsevier Paris.
48. Dupouy-Camet J, Murrel KD. **Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis**. FAO/WHO/OIE 2007; p. 108

49. Dupouy-Camet J, Lacour S, Vallée I, Yera H, Boireau P. **Trichinelloses**. EMC -Maladies infectieuses 2015; 12 : 1-13.
50. Magnus E, Vervoort T, Van Meirvenne N. **A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. B. gambiense* trypanosomiasis**. Ann Soc Belg Med Trop 1978 ;58:169-76.



## **4 DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PARASITOSES**

---

*Rédigé par Pr Badiane Aïda Sadikh (Sénégal), Relu par Pr Ndiaye Daouda (Sénégal),  
Pr Yavo William (Côte d'Ivoire), Pr Eboumbou Moukoko Carole (Cameroun) et  
Pr Ndiaye Mouhamadou (Sénégal)*

## Introduction

Le diagnostic moléculaire des infections parasitaires consiste à rechercher les acides nucléiques des parasites dans divers prélèvements biologiques par les techniques de biologie moléculaire telles que la réaction d'amplification en chaîne (Polymerase Chain Reaction; PCR) qui est la technique de base. L'outil moléculaire n'est pas encore utilisé pour toutes les parasitoses. Parmi les maladies parasitaires, l'apport des outils moléculaires est largement utilisé pour le diagnostic de la **toxoplasmose**, de la **leishmaniose et du paludisme**.

Ce sont des méthodes, complexes et délicates, et restent pour l'instant l'apanage des Centres Hospitalo-Universitaires (C.H.U) et de quelques grands centres de diagnostic.

Ici, nous développerons les parasitoses pour lesquelles le diagnostic moléculaire est utile et courant.

C'est un domaine en plein essor, malheureusement il existe très peu de kits pour tous les parasites et qui sont commercialisés. En général chaque laboratoire a son protocole qui a été optimisé en interne, ce qui pose des problèmes d'interprétation et d'harmonisation.

Dans la plupart des cas, le diagnostic moléculaire est couplé au diagnostic parasitologique et/ou immunologique.

### **Intérêt :**

Le diagnostic de certitude des parasitoses est posé par la mise en évidence du parasite par les méthodes classiques comme la microscopie (diagnostic direct), l'immunologie (diagnostic indirect) et/ou la culture. Cependant, elles présentent des inconvénients et ne sont pas très adaptées à certaines parasitoses surtout celles tissulaires pour lesquelles le parasite est difficilement accessible. Ceci rend nécessaire l'utilisation d'autres méthodes pour améliorer le diagnostic.

### **Indications:**

Les indications du diagnostic moléculaire sont multiples et précises:

- (i) Il est d'un recours certain lorsque les techniques parasitologique et immunologique ne permettent pas de poser le diagnostic avec certitude, et dans les cas où la morphologie ne permet pas de différencier les espèces ;
- (ii) Il peut aussi être utilisé pour suivre l'efficacité du traitement et évaluer les échecs thérapeutiques en quantifiant l'agent pathogène avec la PCR quantitative (qPCR) à différents moments ;
- (iii) Il peut être utilisé pour le **diagnostic rétrospectif après un traitement spécifique** entrepris sans preuve parasitologique.

### **Avantages:**

Ils sont nombreux : la sensibilité, la spécificité, la facilité de conservation des échantillons biologiques avec l'utilisation de papier filtre qui sont gardés à température ambiante, l'élimination de la subjectivité liée à l'opérateur, la possibilité d'une quantification, l'automatisation et la fiabilité.

## I. Principe du diagnostic moléculaire des infections

Lors de leur développement dans l'organisme, les agents infectieux peuvent être détectés par la mise en évidence de leur matériel génétique (ADN ou ARN) dans les échantillons biologiques prélevés chez l'hôte. La séquence primaire des acides nucléiques des parasites et ceux de leur hôte étant différents, il est possible de rechercher spécifiquement ceux du parasite. Cette recherche va dépendre de la charge parasitaire dans l'organisme de l'hôte mais aussi du gène du pathogène qui est ciblé.

Ce diagnostic obéit à certaines règles : il faut que le parasite soit accessible et présent dans les sites de prélèvement mais également la région du gène recherché soit conservée chez le parasite responsable de l'infection. Il est possible de faire un diagnostic de groupe, de genre, d'espèce en choisissant bien les amorces qui vont servir à amplifier la région du gène cible.

La technique de base dans ce diagnostic moléculaire est la PCR qui a pour but de reconnaître grâce à des amorces une région spécifique de l'ADN, de l'amplifier par utilisation d'une enzyme; la Taq polymérase et des nucléotides pendant plusieurs cycles à des températures bien définies. Ce processus va aboutir à la formation de millions de copies qui seront ensuite mises en évidence par différentes méthodes.

Il existe plusieurs variantes de cette PCR classique dont, la PCR nichée, la PCR suivie d'une digestion enzymatique (PCR Restriction Fragment Length Polymorphism RFLP), la PCR en temps réel (rt-PCR), la PCR quantitative (qPCR) entre autres.

Cette PCR est également le point de départ d'autres techniques telles que le séquençage. Actuellement, il existe des variantes plus simplifiées, beaucoup facile d'utilisation et ne nécessitant pas un équipement lourd, telles que les techniques de PCR à température constante (exemple : Loop Mediated Isothermal Amplification; LAMP), ce qui simplifie l'équipement mais aussi ne nécessite pas une expertise avérée pour l'interprétation des résultats.

## II. Prélèvements

Ils sont divers et variés et dépendent de l'infection et de l'agent parasitaire en cause.

### A. Parasites sanguicoles

Ce sont des parasites qui se développent dans le sang de leur hôte soit dans les hématies (*Plasmodies*, *Babesia*), soit dans les leucocytes (*Toxoplasmes*, *Leishmanies*) et visibles après coloration ou mobiles à l'extérieur des cellules (Trypanosomes, Microfilaires sanguicoles).

***Dans ces cas, le prélèvement peut être du sang, mais il dépend du type d'affection et parfois du terrain.***

- **Plasmodies:** Le prélèvement est constitué de sang veineux recueilli sur anticoagulant et qui est très souvent l'EDTA ou de sang capillaire. Pour les études épidémiologiques de terrain, il se fait sur papier buvard ou sur confettis.
- **Toxoplasmes:** Chez l'immunodéprimé divers prélèvements sont possibles, la moelle osseuse est le meilleur prélèvement. Le sang veineux, le LCR ou LCS, les biopsies cérébrales, le liquide pleural peuvent être aussi utilisés. Pour le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale et la prise en charge des patientes contaminées par le toxoplasme au cours de la grossesse, la PCR se fera à partir du liquide amniotique. Quant au diagnostic néonatal, il peut être réalisé sur le placenta, le sang fœtal et le sang de cordon.
- **Leishmanies :** Le suc dermique, la moelle osseuse et/ou le sang sont les différents prélèvements sur lesquels se fait la PCR.
- **Trypanosomes :** La recherche du parasite se fait à partir du sang, du LCR, sang, urines, salive, lymphoganglionnaire.

## **B. Parasites cutanés et sous-cutanés**

Le prélèvement peut être des sérosités cutanées, mais aussi du sang veineux ou obtenu par scarification (Leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses).

## **C. Parasites intestinaux et génito-urinaires**

**Parasites intestinaux:** Le prélèvement est constitué par des selles recueillies dans un pot propre. Les prélèvements de selles peuvent être conservés dans une solution de 5% w/v potassium dichromate.

**Parasites génito-urinaires:** Les urines sont recueillies dans un pot propre. Dans les infections sexuellement transmissibles, ce sont les sécrétions vaginales qui sont recueillies chez la femme et les sécrétions urétrales ou les urines du premier jet chez l'homme.

## **III. Extraction de l'ADN parasitaire**

Une fois le prélèvement réalisé, il faut extraire l'ADN du parasite avant de procéder à son amplification. Cette extraction consiste à isoler l'ADN des cellules ou des tissus.

Différents protocoles expérimentaux et kits commerciaux avec approximativement le même principe :

- Désorganisation des cellules et tissus
- Lyse des membranes cellulaires
- Séparation des acides nucléiques (AN) du reste des composants : élimination des protéines, glucides et lipides ;
- Élimination d'un acide nucléique (AN) donné, à l'occurrence ici l'ARN ;
- Une concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool ;

- Purification puis Solubilisation ;
- Conservation à 4°C pour une utilisation immédiate ou à -20°C pour une utilisation ultérieure. L'ADN étant fragilisé lors des processus de congélation et décongélation, il est conseillé de faire des aliquotes d'ADN extraits à conserver.

Il existe de plus en plus de Kits commerciaux qui sont utilisés pour l'extraction de l'ADN et qui permettent de travailler avec du matériel génétique débarrassé des protéines qui dégradent l'ADN et donc permettent une conservation plus longue de l'ADN. Cette extraction peut être automatisée avec l'utilisation des robots d'extraction qui permettent de gagner beaucoup de temps.

## **IV. Techniques moléculaires les plus utilisées**

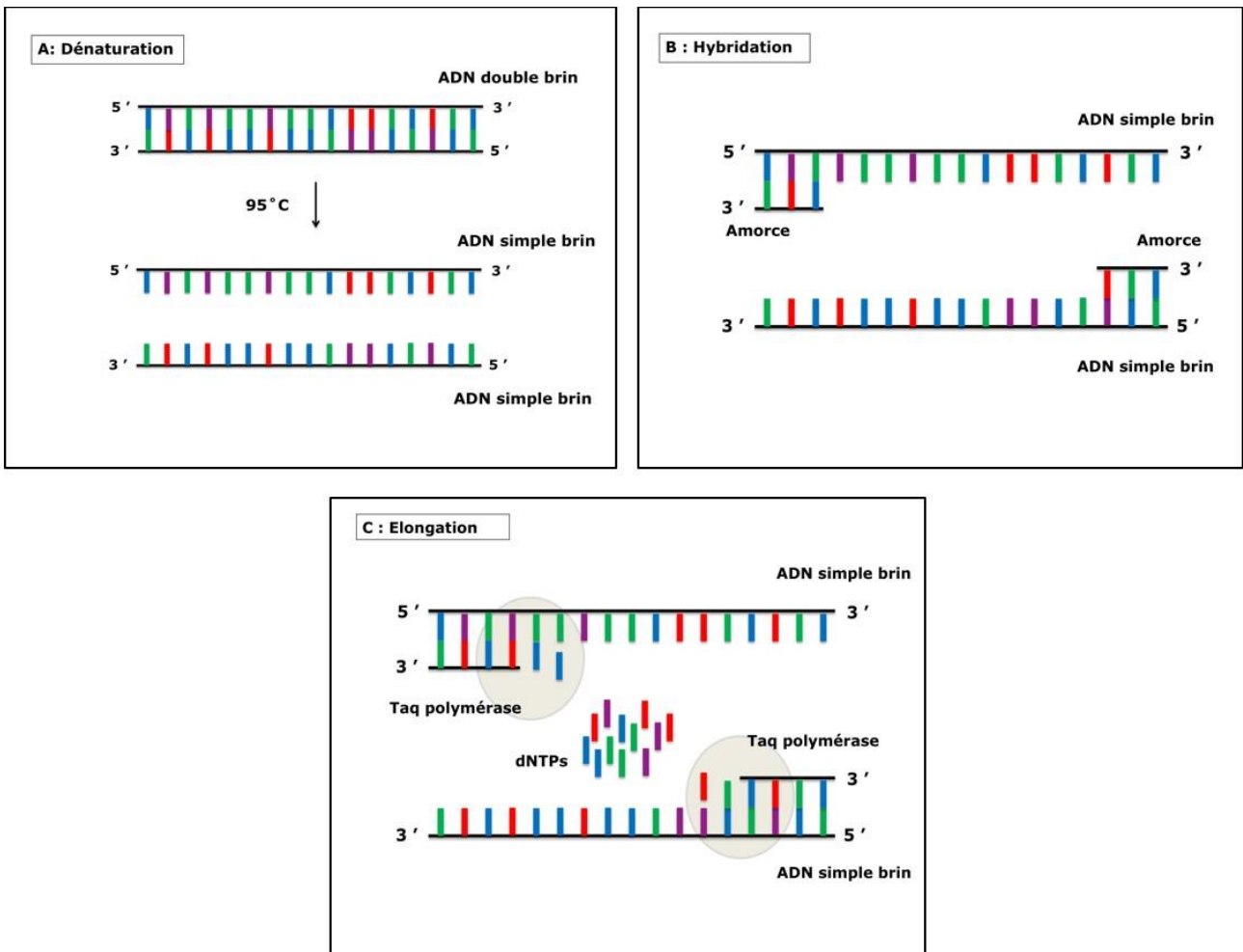
### **A. PCR classique**

Le but de la PCR est d'obtenir à partir d'une petite quantité d'ADN des millions de copies qui pourront facilement être mis en évidence. C'est la technique de base en biologie moléculaire. Il consiste à reconnaître et amplifier une partie bien précise de l'ADN. La réaction se fait en plusieurs cycles constitués de trois principales étapes :

- Une Dénaturation qui consiste à séparer les deux brins de l'ADN à température élevée (95°C) ;
- Une Hybridation des amorces à une température variable entre 50 et 60°C dépendant des amorces utilisées ;
- Une élongation qui consiste à synthétiser un brin complémentaire de l'ADN cible à une température de 68-72° C.

A la fin de la réaction, des millions de copies de la région de l'ADN sont obtenues. Il s'en suit une révélation par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium (qui est de moins en moins utilisé parce que cancérigène) ou de fluorochromes comme le Sybr Green I. La présence et la taille des bandes permettent de reconnaître le fragment d'ADN qui a été amplifié.

Il existe plusieurs variantes de cette PCR classique.



(Source : **Badiane 2017**)  
Figure 4. 1 : **Principe de la PCR**

## B. PCR nichée

Encore appelée PCR emboîtée ou en anglais Nested PCR, elle se fait en deux étapes successives. D'abord, une région plus grande de l'ADN cible est amplifiée par un couple d'amorces « externes ». Ensuite une seconde PCR amplifiant une région située dans le premier fragment d'ADN préalablement amplifiée est réalisée avec un deuxième couple d'amorces « internes ». C'est une technique qui est beaucoup plus spécifique (deux couples d'amorces) et beaucoup plus sensible (deux amplifications) que la PCR classique, mais il y a des risques de contamination lorsque plusieurs échantillons sont manipulés en même temps. La révélation se fait de la même manière que la PCR classique.

## **C. PCR RFLP ou Polymorphisme de longueur de fragment de restriction**

Après avoir réalisé une PCR classique, des enzymes sont utilisées pour reconnaître une région spécifique du fragment d'ADN et réaliser des coupures qui donnent différents fragments. Les enzymes utilisées sont encore appelées endonucléases de restriction qui sont d'origine bactérienne et permettent de couper spécifiquement l'ADN double brin. Ils reconnaissent des séquences palindromiques de 4 à 6 paires de base, et la coupure s'effectue au même endroit de la séquence sur les deux brins. La PCR RFLP est surtout utilisée dans le diagnostic pour différencier les espèces au sein des genres.

La révélation se fait de la même manière que la PCR classique.

## **D. PCR en temps réel (RT-PCR)**

C'est une PCR qui a l'avantage de suivre en temps réel la formation de l'ADN cible au cours de la réaction par utilisation de fluorochrome seul qui se fixe sur l'ADN double brin (Technique Sybrgreen) ou de fluorochrome combiné à une sonde et qui se fixe sur une séquence d'ADN précise (Techniques Taqman et Beacon). La fluorescence est obtenue lorsque l'ADN est sous forme double brin.

Elle a également l'avantage de quantifier l'ADN formé et dans ce cas, le terme utilisé est PCR quantitative. Elle est beaucoup plus spécifique et plus sensible que la PCR classique. Cette spécificité est augmentée par l'utilisation de sondes. L'analyse est faite par des logiciels ce qui réduit le caractère subjectif de l'analyse.

Ceci en fait la technique la plus utilisée dans le diagnostic des maladies infectieuses. Mais, elle est plus coûteuse que les techniques précédentes et nécessite plus d'expertise.

## **E. Techniques de PCR à température constante**

Ces dernières années des techniques de PCR à température constante sont développées et appliquées au diagnostic des maladies infectieuses. Elles ont l'avantage d'allier la sensibilité des techniques de biologie moléculaire classiques et la simplicité des techniques de base par un équipement moins lourd qui peut être juste un bain-marie. Parmi ces techniques qui ont des termes anglo-saxons figurent :

- Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP);
- Recombinase Polymerase Amplificase (RPA), NASBA;
- Helicase-dependent amplification (HDA);
- Nicking Enzyme Amplification Reaction (NEAR).

### **Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)**

C'est une PCR qui se fait à une température constante (entre 62 et 65°C) grâce à l'utilisation d'une enzyme appelée Bst ADN polymérase provenant de la bactérie *Bacillus stearothermophilus*. Plusieurs couples d'amorces qui reconnaissent différentes régions de l'ADN cible et d'autres amorces en boucle (loop primers) sont utilisées pour l'amplification.

Les produits d'amplification obtenus sont des séries de stem-loop DNA de longueurs différentes.

L'amplification de l'ADN cible va former en même temps du pyrophosphate de magnésium qui est un produit de la synthèse de l'ADN dont la quantité est proportionnelle à celle de l'ADN synthétisé. Ce pyrophosphate de magnésium peut être mis en évidence à la fin de la réaction par différentes méthodes, même à l'œil nu en observant la turbidimétrie. D'autres méthodes moins subjectives peuvent être utilisées telles que la lecture de la densité optique avec un spectrophotomètre ou la détermination de la fluorescence par utilisation de fluorochromes.

Cette amplification produit ~ 10<sup>9</sup> copies de l'ADN cible en moins d'1 heure (plus que la PCR conventionnelle).

## **V. Parasites sanguicoles et tissulaires**

### **A. Plasmodium**

Le diagnostic de certitude du paludisme en zone d'endémie est posé par la microscopie qui constitue toujours la méthode de référence, malgré que les techniques de biologie moléculaire soient plus sensibles. Ceci est certainement dû à l'équipement nécessaire, l'expertise, le manque de standardisation des protocoles, la lenteur de disponibilité des résultats.

Cependant, ces dernières années des techniques moléculaires plus simples, plus rapides et qui répondent aux exigences des critères de l'OMS en termes de diagnostic du paludisme ont été mis au point.

Le premier test moléculaire validé, commercialisé pour le diagnostic du paludisme repose sur la technique LAMP. Elle est brevetée et utilisée déjà en Europe et Asie sous le label Alesia malaria® par le laboratoire Meridian Biosciences. Ce test réalise un diagnostic de genre; la réaction cible une région bien conservée chez les 5 espèces de *Plasmodium* responsables de paludisme; *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. La limite de détection de cette technique est de 2.0 parasites/μl et 0.3 parasites/μl en fonction de la méthode d'extraction de l'ADN effectuée [1].

A côté de ce test qui est commercialisé, il existe de nombreux protocoles « maisons » qui présentent de très bonnes sensibilités et peuvent faire un diagnostic d'espèces, mais ils sont utilisés dans les pays développés et par les laboratoires de recherche dans les pays en voie de développement.



Les techniques les plus sensibles et spécifiques utilisent la PCR en temps réel [2-4]. Une région de l'ADN ribosomal 18 S est la cible de plusieurs protocoles, mais d'autres régions telles que le cytochrome B sont utilisées. Il est possible avec la PCR en temps réel de faire une quantification de l'ADN parasitaire.

## **B. *Toxoplasma gondii***

Chez l'immunodéprimé et chez le fœtus, la **toxoplasmose**, habituellement bénigne, peut avoir des conséquences dramatiques et le diagnostic repose sur la mise en évidence du parasite dans divers prélèvements. C'est une technique peu sensible, d'où le développement de techniques moléculaires ces dernières années.

La PCR peut être réalisée sur divers prélèvements pour poser le diagnostic. Elle est beaucoup plus sensible que les autres techniques dites classiques [5].

Actuellement le diagnostic repose sur une PCR en temps réel ciblant le gène Rep529 qui est répété 200-300 fois dans le génome de *T. gondii* [6-11]. D'autres gènes également sont utilisés pour le diagnostic notamment le gène B1 qui est répété 35 fois, le gène codant pour l'ADN ribosomal 18S qui lui est répété 110 fois.

Il existe beaucoup de protocoles « maisons » [12; 13], mais aussi des kits qui sont commercialisés. Elle est beaucoup plus sensible et spécifique que les méthodes conventionnelles.

## **C. *Leishmania***

Le diagnostic moléculaire est utilisé généralement en complément ou en remplacement des techniques d'examen direct et de culture. Le diagnostic moléculaire est utilisé pour les formes viscérales, cutanées et sous-cutanées.

Les gènes utilisés dans ce diagnostic sont le gène 18 S de l'ADN ribosomal 18S (rDNA), de l'ADN du Kinétoplaste [kDNA], ou celui du miniexon. La recherche à partir du sang, de la moelle osseuse ou du suc cutané ont des sensibilités comparables. Plusieurs techniques de PCR sont utilisables pour le diagnostic des leishmanioses [14-16].

Parmi ces techniques, la PCR en temps réel utilisant les sondes semble mieux indiquée pour le diagnostic. Cette PCR est le plus souvent suivi de séquençage pour faire l'identification de l'espèce en cause. Le principal problème pour les autres tests moléculaires appliqués au diagnostic des parasitoses est le manque de standardisation.

## **D. *Trypanosoma***

Le diagnostic doit être posé le plus rapidement possible pour éviter la progression vers la phase neurologique qui nécessite un traitement plus lourd et dangereux. Les techniques utilisées pour les autres parasitoses sont applicables. Le diagnostic moléculaire a été

proposé pour déterminer le stade de la maladie. Ce diagnostic se fait avec le sang, le LCR, la salive, les urines. Le gène 18 S de l'ADN ribosomal est la principale cible. Il existe des kits commercialisés mais uniquement destinés à la recherche. Des méthodes basées sur le LAMP ont été également développées et facilitent le diagnostic moléculaire sur le terrain [17-19].

## VI. Parasites intestinaux et génito-urinaires

La recherche des parasites intestinaux peut être réalisée par biologie moléculaire. Le prélèvement généralement constitué par les selles est un milieu complexe caractérisé non seulement par une densité des produits présents mais aussi une diversité des microorganismes, ce qui complique ce diagnostic moléculaire. Le manque de sensibilité des tests microscopiques, ainsi que l'utilisation de réactifs souvent toxiques dans les techniques de concentration font que ces dernières années des kits sont commercialisés pour le diagnostic moléculaire des protozoaires et des helminthes. Plusieurs types de PCR ciblant plusieurs gènes sont disponibles. Les gènes les plus utilisés sont : 18 S RNA ribosomal, segment A, SSU. Les kits commercialisés réalisent une PCR multiplex. Les kits commercialisés sous forme de PCR multiplex ciblent un groupe de parasites par exemple *Giardia*/ *E. histolytica*/ *Cryptosporidium* ou un groupe d'helminthes; *Necator americanus*, *Ancylostoma spp.*, *Ascaris spp.*, and *Trichuris trichiura*. Le problème étant qu'uniquement les parasites dont les amorces sont présentes dans la réaction seront recherchés.

Plusieurs types de PCR ont été utilisés pour le diagnostic moléculaire de la schistosomiase [20; 21] et comme pour les autres parasitoses, elles se sont avérées plus sensibles que les méthodes parasitologique et immunologique [22; 23].

Une PCR réalisée sur le sérum est très prometteur pour le diagnostic précoce des schistosomoses [22; 23].

### Conclusion

Un inconvénient de cette technique de biologie moléculaire, est qu'elle nécessite un équipement important rarement disponible dans les structures sanitaires et que son coût est plus élevé que les techniques plus conventionnelles (microscopie, ELISA et TDR).

Le problème principal des méthodes moléculaires appliquées au diagnostic des parasites est le manque de standardisation, mais également l'incapacité à distinguer les parasites vivants de ceux non vivants. En Afrique, où les ressources sont généralement limitées, l'inconvénient majeur est la nécessité de disposer d'un équipement et des réactifs coûteux dans les structures sanitaires.

Ces dernières années des PCR multiplex et des méthodes simplifiant l'équipement et ne nécessitant pas une expertise avérée en biologie moléculaire sont mis au point et pourraient révolutionner ce domaine avec une utilisation possible dans les laboratoires de diagnostic de routine des pays en voie de développement qui ont des ressources limitées et/ou les techniciens ne sont pas souvent formés en biologie moléculaire.

## Bibliographie

1. Lucchi NW, Marie Gaye, Mamadou Alpha Diallo, Ira F. Goldman, Dragan Ljolje, Awa Bineta Deme, Aida Badiane, Yaye Die Ndiaye, John W. Barnwell, Venkatachalam Udhayakumar<sup>1</sup> & Daouda Ndiaye. 2016. Evaluation of the Illumigene Malaria LAMP: A Robust Molecular Diagnostic Tool for Malaria Parasites. *Sci. Rep.* 6, 36808
2. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ (2009) Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and metaanalysis. *J Infect Dis* 200: 1509–1517.
3. Erdman LK, Kain KC (2008) Molecular diagnostic and surveillance tools for global malaria control. *Travel Med Infect Dis* 6: 82–99.
4. Lucchi NW, Narayanan J, Karell MA, Xayavong M, Kariuki S, et al. (2013) Molecular Diagnosis of Malaria by Photo-Induced Electron Transfer Fluorogenic Primers: PET-PCR. *PLoS ONE* 8(2): e56677.
5. Montoya JG, Liesenfeld O. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363:1965–1976
6. Cassaing S, et al. 2006. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44:720–724.
7. Edvinsson B, Lappalainen M, Evengård B. 2006. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 12:131–136.
8. 11. Hierl T, et al. 2004. Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. *J. Med. Microbiol.* 53:629–632.
9. Menotti J, et al. 2010. Evaluation of a new 5'-nuclease real-time PCR assay targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:363–368.
10. Reischl U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P, Costa JM. 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect. Dis.* 3:7
11. Sterkers Y, et al. 2010. Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of *Toxoplasma gondii* from simulated specimens. *J. Clin. Microbiol.* 48:3216–3222.
12. Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. 1994. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 331:695–699.
13. Sterkers Y, Pratlong F, Albaba S, Loubersac J, Picot MC, Pretet V, Issert E, Boulot P, Bastien P. 2012. Novel interpretation of molecular diagnosis of congenital toxoplasmosis according to gestational age at the time of maternal infection. *J Clin Microbiol* 50:3944–3951.
14. F. Foulet, F. Botterel, P. Buffet et al., "Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome b gene," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 7, pp. 2110–2115, 2007.
15. J. Marfurt, A. Nasereddin, I. Niederwieser, C. L. Jaffe, H.-P. Beck, and I. Felger, "Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 7, pp. 3147–3153, 2003.
16. J. Marfurt, I. Niederwieser, N. D. Makia, H.-P. Beck, and I. Felger, "Diagnostic genotyping of old and new world *Leishmania* species by PCR-RFLP," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 46, no. 2, pp. 115–124, 2003.

17. Z. K. Njiru, A. S. J. Mikosza, T. Armstrong, J. C. Enyaru, J. M. Ndung'u, and A. R. C. Thompson, "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 2, no. 2, article e147, 2008.
18. Z. K. Njiru, A. S. J. Mikosza, E. Matovu et al., "African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the subgenus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA," *International Journal for Parasitology*, vol. 38, no. 5, pp. 589–599, 2008.
19. E. Matovu, A. J. Kazibwe, C. M. Mugasa, J. M. Ndungu, and Z. K. Njiru, "Towards point-of-care diagnostic and staging tools for human African trypanosomiasis," *Journal of Tropical Medicine*, vol. 2012, Article ID340538, 9 pages, 2012.
20. Hamburger J, Xu YX, Ramzy RM, Jourdane J, Ruppel A. 1998. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59:468–473.
21. Hamburger J, He-Na, Abbasi I, Ramzy RM, Jourdane J, Ruppel A. 2001. Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence
22. Clerinx J, Bottieau E, Wichmann D, Tannich E, Van Esbroeck M. 2011. Acute schistosomiasis in a cluster of travelers from Rwanda: diagnostic contribution of schistosome DNA detection in serum compared to parasitology and serology. *J. Travel Med.* **18**:367–372.
23. Wichmann D, Poppert S, Von Thien H, Clerinx J, Dieckmann S, Jensenius M, Parola P, Richter J, Schunk M, Stich A, Zanger P, Burchard GD, Tannich E. 2013. Prospective European-wide multicenter study on a blood based real-time PCR for the diagnosis of acute schistosomiasis. *BMC Infect. Dis.* **13**:55.
24. Plowe C.V., Djimde A., Bouare M., Doumbo O. and Wellems T.E. Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: PCR methods for surveillance in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 52(6), 1995, pp. 565-568.
25. Djimde AA, Kirkman L, Kassambara L, Diallo M, Plowe CV, Wellems TE & Doumbo OK. Culture in vitro d'isolats de terrain de *Plasmodium falciparum* au Mali. *Bull Soc Pathol Exot*, 2007, 100, 1, 3-5.

## **5 EXAMENS PARASITOLOGIQUES DU SANG**

---

*Rédigé par Pr Yavo William (Côte d'Ivoire), Relu par Pr Traoré Boubacar (Mali) et  
Pr Ndiaye Mouhamadou (Sénégal)*

## Introduction

Plusieurs parasites assurent leur développement dans le sang. Ce sont des parasites sanguicoles.

Si dans la plupart des cas, l'examen parasitologique du sang est axé sur la recherche des plasmodies (diagnostic du paludisme), d'autres éléments parasitaires peuvent être observés dans le sang.

En effet, les parasites sanguicoles sont à l'origine d'affections qui constituent des problèmes de santé publique, mais dont la symptomatologie clinique n'est pas toujours spécifique. C'est le cas du paludisme qui, selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé, a été en 2016 à l'origine de 216 millions de nouveaux accès dont 445 000 cas de décès ; la plupart étant survenus en Afrique subsaharienne. La prise en charge du paludisme aujourd'hui ne peut se faire sur la base des seuls signes cliniques. Il est recommandé la confirmation parasitologique avant la mise en route du traitement antipaludique. Une étude réalisée à Abidjan a révélé que 70% des patients reçus dans des structures sanitaires, et chez qui l'on avait posé un diagnostic clinique de paludisme, étaient sans plasmodies.

Par ailleurs, la réduction des cas de décès liés à la trypanosomose humaine africaine nécessite un diagnostic précoce de la maladie. C'est dire toute l'importance de la maîtrise des examens parasitologiques du sang dans les stratégies de contrôle voire d'élimination des affections parasitaires concernées.

## I. Parasites à rechercher

### A. Dans les hématies

- Plasmodies à différents stades : trophozoïtes, schizontes, rosaces, gamétocytes;
- Babésia ou piroplasmies qui des hématozoaires des chiens, bovins retrouvés chez l'Homme notamment les sujets splénectomisés.

### B. Dans les leucocytes

- Leishmanies : *Leishmania donovani* ;
- Les toxoplasmes : *Toxoplasma gondii* ;
- Les champignons : *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*.

## C. Dans le plasma

- Les trypanosomes : *Trypanosoma brucei gambiense*, *T.b. rhodesiense*, *T. cruzi* ;
- Les microfilaires sanguicoles : *Loa loa*, *Wuchereriabancrofti*, *Brugiamalayi*, *Dipetalonema (Mansonella) perstans*, *M. ozzardi*.

De façon accidentelle ou après une prise de diéthylcarbamazine (Notézine<sup>®</sup>), on peut retrouver les microfilaires d'*Onchocerca volvulus* (microfilarie dermique) dans le sang. Idem pour *M. streptocerca*.

## II. Prélèvement

### A. Période

En règle générale, le prélèvement doit être effectué avant l'instauration de tout traitement spécifique.

Le moment le plus favorable sera fonction du parasite recherché. Ainsi donc, en cas de recherche de :

- plasmodies : clocher thermique (fièvre) ;
- microfilaires : en fonction de la périodicité (microfilaires périodiques ou apériodiques) :
  - *Loa loa* : microfilarémie diurne → prélèvement entre 10 h du matin et 16 h ;
  - *W. bancrofti* : microfilarémie nocturne → prélèvement entre 22 h et 4 h du matin ;
  - Par contre *B. malayi*, *D. perstans*, *W. bancrofti var pacifica*, *M. ozzardi* : microfilarémie apériodique → prélèvement à tout moment.

### B. Type de prélèvement

Le sang peut être recueilli par piqûre de la pulpe du doigt à l'aide d'un vaccinostyle (lancette) stérile (surtout pour la recherche des plasmodies) ou par ponction veineuse au pli du coude sur un anticoagulant.

Dans ce cas, le meilleur anticoagulant en parasitologie est le citrate de sodium à 3,8% (0,4ml pour 1,5ml de sang). Il permet, en effet, une meilleure conservation des éléments parasitaires. On peut aussi utiliser de l'EDTA (éthylène diamine tétracétique).

L'héparine est à proscrire, car elle provoque une agglutination des microfilaires.

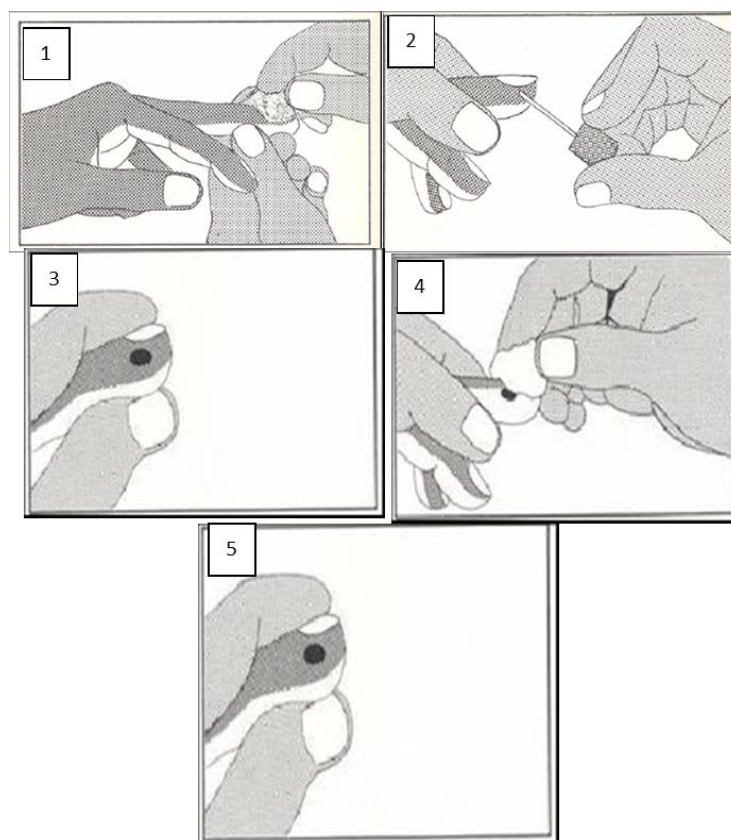


Source : OMS

Figure 5. 1 : Sites de prélèvement du sang capillaire

### Technique de prélèvement du sang capillaire

1. Nettoyer le site avec coton hydrophile ou de la compresse stérile imbibé d'éthanol à 60-70°
2. Enlever les traces d'alcool avec coton sec
3. Piquer franchement d'un coup sec et rapide avec une lancette stérile
4. Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec
5. Presser le doigt piqué et recueillir goutte de sang sur lame porte-objet propre et bien dégraissée



Source : OMS

Figure 5. 2 : Prélèvement de sang capillaire



### III. Techniques de recherche des parasites

Plusieurs techniques sont utilisées pour la recherche des parasites sanguicoles.

#### A. Méthodes directes

##### 1. Etat frais ou examen direct

Il consiste à observer une goutte de sang frais au microscope entre lame et lamelle.

Il permet de visualiser lorsqu'ils sont nombreux les parasites vivants extra-globulaires et mobiles tels que les trypanosomes et les microfilaires.

Cette technique ne permet pas de préciser l'espèce.

##### 2. Frottis sanguin (FS) mince

###### a. Technique

Sur une lame porte-objet propre et bien dégraissée par un mélange alcool-éther à parties égales, déposer une goutte de sang à l'une des extrémités.

Placer en avant de cette goutte une seconde lame, l'incliner à 45° et l'amener au contact du sang qui s'étend alors par capillarité.

D'un mouvement lent, régulier et ininterrompu tirer la 2<sup>ème</sup> lame vers l'avant de façon à étaler le sang.

Sécher rapidement par agitation pour éviter d'avoir des hématies crénelées.

**Remarques :** un bon frottis doit tenir sur toute la lame et avoir des franges. Il doit être mince, et les hématies ne doivent pas être superposées.

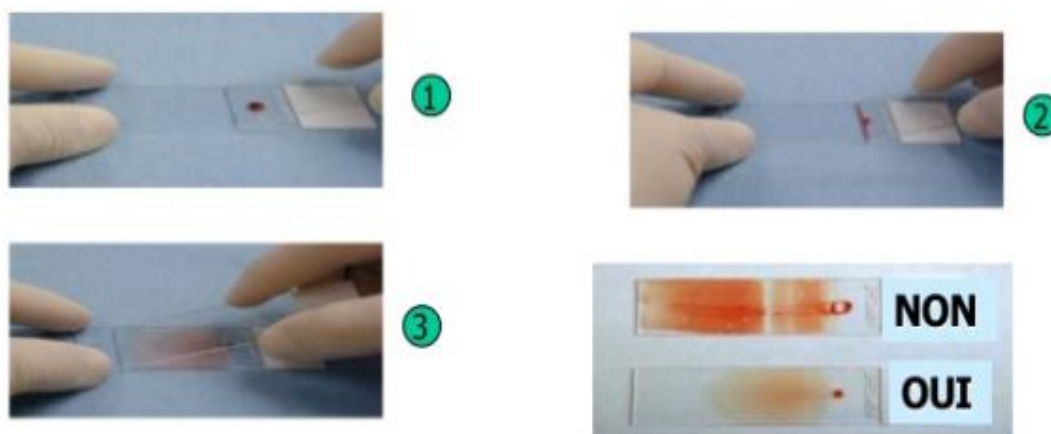
###### **Intérêts**

Le FS est la technique de référence qui permet de faire le diagnostic d'espèce des plasmodies. Il permet de voir de façon plus nette les microfilaires → diagnostic d'espèce des microfilaires.

###### **Inconvénient**

Faible sensibilité.

En effet, la plupart des études d'évaluation du FS par rapport à la GE donne une sensibilité de l'ordre de 70% à 83% avec un seuil de détection d'environ 100 parasites par microlitre de sang. (Gay et *et al.*, 1994 ; Gay et *al.*, 1996 ; Yavo et al, 2002).



(Source : Rason M-A, atelier paludisme 2009)

Figure 5. 3 : Confection du frottis sanguin

## b. Coloration du FS

Deux techniques de coloration du FS peuvent être utilisées.

### i) Coloration au May-Grunwald-Giemsa (MGG)

Elle comporte 2 étapes:

- Fixation du frottis au May-Grünwald (MG):

Le MG est une solution d'éosinate de bleu de méthylène dans l'alcool méthylique. Elle permet à la fois de fixer le frottis et d'entamer une coloration.

Il faudra au préalable, par précaution, filtrer la solution de MG à travers un papier filtre pour éliminer les dépôts de colorant.

On recouvre le FS de 15 à 20 gouttes de MG.

On laisse agir pendant 3 min.

Rejeter ensuite le fixateur et ajouter sur le FS 15 à 20 gouttes d'eau distillée tamponnée à (pH = 7).

Laisser agir pendant 1 min et rejeter cette eau.

- Coloration au Giemsa :

Elle se fait avec une solution diluée de Giemsa en raison de 3 gouttes de colorant dans 2ml d'eau distillée. Cette dilution doit se faire de façon extemporanée.

Recouvrir le frottis fixé avec 15 à 20 gouttes de la solution de Giemsa diluée.

Laisser agir pendant 12 à 20 minutes.

### ii) Technique de coloration au Giemsa seule (très utilisée en routine):

La fixation du FS ici se fait en le recouvrant avec une solution de méthanol pendant 5 min.

Pour la coloration, recouvrir le FS fixé d'une solution de Giemsa diluée au dixième (1 volume de Giemsa pour 9 volumes d'eau distillée).

Laisser au contact pendant 15 à 20 minutes.

Rejeter le colorant.

Rincer à l'eau puis laisser sécher à l'air.

Lire au microscope à immersion (objectif × 100).

En dehors de ces deux techniques, il existe des méthodes de coloration rapides du FS.

**iii) Coloration au RAL 555 :**

Le coffret RAL 555 comporte 3 solutions :

- une solution de méthanol (1): fixateur ;
- une solution d'éosine aqueuse RAL 555 (2): colorant acide ;
- une solution aqueuse de bleu de méthylène RAL 555 (3) : colorant basique.



Source : OMS

Figure 5. 4 : Kit de réactifs RAL555

La coloration avec le RAL 555 varie selon les parasites recherchés.

- Pour le diagnostic du paludisme :
  - Plonger lame 1 min. dans le fixateur (flacon 1),
  - Egoutter l'excédent sur papier filtre,
  - Plonger 2 fois 1 seconde lame dans l'éosine (flacon 2),
  - Rincer la lame à l'eau du robinet,
  - Egoutter l'excédent sur papier filtre,
  - Plonger la lame 2 fois 1 seconde dans le bleu (flacon 3),
  - Rincer en laissant la lame délicatement à l'eau,
  - Laisser sécher la lame à l'air.

**Intérêts** : technique très rapide, parfaitement adaptée aux urgences et aux enquêtes épidémiologiques.

**Inconvénients** : les parasites perdent rapidement leur coloration en 2 à 3 semaines.

- Pour la coloration des microfilaires :
  - Plonger lame 10 fois 1 seconde dans le fixateur (flacon 1),
  - Egoutter l'excédent sur papier filtre,
  - Plonger 10 fois 1 seconde lame dans l'éosine (flacon 2),
  - Rincer la lame à l'eau du robinet,
  - Egoutter l'excédent sur papier filtre,
  - Plonger la lame 10 à 20 fois 1 seconde dans le bleu (flacon 3),
  - Rincer en laissant la lame délicatement à l'eau,
  - Laisser sécher la lame à l'air.

**Intérêt** : les noyaux des microfilaires sont bien colorés ainsi que la gaine quand elle existe.

**Inconvénient** : idem pour coloration plasmodies.

**NB** : la coloration directe du FS peut se faire également par l'acridine orange.

Elle améliore la sensibilité du FS mais la lecture s'effectue à l'aide d'un microscope à fluorescence (Gay et al, 1996). De plus, les frottis colorés ne peuvent être conservés sur une longue période.

### 3. Goutte épaisse

C'est une microtechnique de concentration sur lame qui permet d'observer sur une petite surface beaucoup plus de sang que sur un FS.

La GE n'est pas une technique d'urgence pour rechercher les plasmodies.

a. Technique :

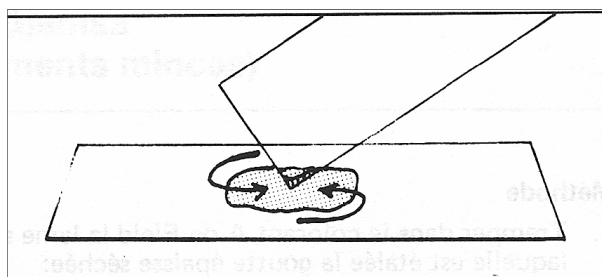
Au centre d'une lame porte-objet, propre et bien dégraissée, déposer une à deux gouttes de sang prélevé soit sur anticoagulant, soit au bout du doigt.

Etapes :

i) *Défibrination* :

Valable surtout lorsqu'il s'agit du sang prélevé au bout du doigt (pas sur du sang prélevé sur anticoagulant).

A l'aide du coin d'une deuxième lame, défibriner en tournant régulièrement pendant deux minutes dans la goutte. Le sang s'étale de façon homogène sur un diamètre de 1 à 1,5cm.



(OMS, 2014)

Figure 5. 5 : Confection de la goutte épaisse

ii) *Séchage* :

Laisser sécher à la température du laboratoire ou à l'aide d'un petit ventilateur (ou sèche-cheveux). La goutte doit être bien séchée pour avoir une bonne coloration.

iii) *Coloration* :

Elle comporte plusieurs phases :

- **phase de déshémogloblinisation** :

Recouvrir la GE séchée de quelques gouttes d'eau distillée à pH=7,

Laisser agir pendant 3 à 10 minutes,

On aura un éclatement des hématies qui vont ainsi libérer l'hémoglobine du fait de l'hypotonicité de l'eau distillée,

Rejeter l'eau,

Recouvrir à nouveau la goutte de sang de quelques gouttes d'eau distillée.

Laisser agir 3 à 10 min.

On recommence l'opération jusqu'à ce que la préparation soit claire (goutte blanchâtre).

- **phase de fixation (facultative)** : surtout utile dans la coloration des microfilaires.

Ajouter quelques gouttes de méthanol.

Laisser agir pendant 5 minutes ;

- **phase de coloration avec une solution de Giemsa diluée** :

Recouvrir la GE d'une solution de Giemsa diluée (3 gouttes de solution mère pour 2ml d'eau distillée à pH7) pendant 15 à 20 min.

Rejeter le liquide avec précaution pour ne pas décoller la pellicule.

- **rinçage et séchage puis lecture.**

A la lecture au microscope à immersion, on observe des GB et des parasites mais pas des GR.

Les plasmodies étant en dehors des GR, il sera difficile de faire un diagnostic d'espèce sur GE. En effet, ce diagnostic est établi à partir des caractères morphologiques des parasites et de l'aspect des hématies parasitées.

### **Avantages**

La GE est une microtechnique de concentration → bonne sensibilité : indispensable en cas de faible parasitémie.

Elle constitue avec le frottis sanguin les techniques de référence du diagnostic parasitologique direct du paludisme. Son seuil de détection des plasmodies est de l'ordre de 10 parasites par microlitre. (Gay *et al.*, 1994 ; Gay F *et al.*, 1996).

Elle permet d'établir la parasitémie (taux de parasites dans le sang).

La GE est utile dans les enquêtes épidémiologiques pour apprécier une endémie parasitaire dans une région donnée.

### **Inconvénients**

La lecture de la GE est difficile, notamment pour la recherche des plasmodies → faux positifs.

En général, elle ne permet pas de faire le diagnostic d'espèce des parasites qui reste difficile à réaliser ici.

### **Remarque**

En laboratoire de routine, l'on utilise souvent pour la coloration de la GE, la solution de Giemsa diluée au 1/10<sup>e</sup> dont on recouvre la goutte de sang séché pendant 15 à 20 min. Ici, les phases de déshémoglobination et de coloration sont confondues.

## 4. Frottis mixte : association GE/FS sur une même lame

La GE et le FS sont réalisés sur une même lame.

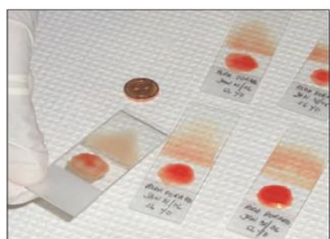
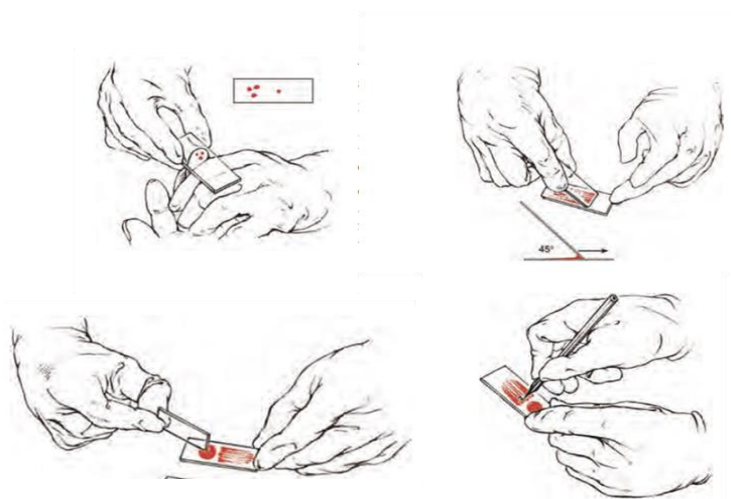
On fait d'abord le frottis et ensuite la GE sur l'autre bord de la lame.

Le FS est fixé au MG ou au méthanol.

Colorer ensuite l'ensemble au Giemsa dilué au 1/10<sup>ème</sup> pendant 15 à 20 min.

Rincer délicatement, sécher puis lire au microscope à immersion.

Intérêt : dans les enquêtes épidémiologiques, on commence par lire la GE. Si elle est positive, la lecture de FS permet de déterminer l'espèce.



(OMS, 2014)

Figure 5. 6 : Confection d'un frottis sanguin mixte

### ERREURS DE CONFECTION DE LA GOUTTE EPAISSE ET DU FROTTIS SANGUIN

i) Utilisation de lames non dégraissées : l'étalement de sang sera non-uniforme. Il présentera des vacuoles et des lignes transversales. Des lambeaux de la goutte épaisse se détacheront pendant la coloration.



(OMS, 2014)

Figure 5. 7 : **Frottis mixte sur lame grasseuse**

ii) Prélèvement d'une grande quantité de sang: la goutte épaisse aura un fond bleu foncé après coloration. Il y aura trop de globules blancs (leucocytes) par champ, ce qui empêchera de voir les parasites présents. L'étalement du frottis sanguin sera sous forme d'un rouleau, épais, sans queue. Il y aura un chevauchement des globules rouges, rendant impossible une observation claire des parasites.



(OMS, 2014)

Figure 5. 8 : **Frottis mixte confectionné avec « trop » de sang**

iii) Frottis confectionné avec « trop » peu de sang : il n'y aura pas suffisamment de leucocytes dans chaque champ de la goutte épaisse ou pas assez de sang pour un examen standard. En général, le frottis sera inutilisable pour diagnostiquer l'espèce.



(OMS, 2014)

Figure 5. 9 : **Frottis confectionné avec « trop » peu de sang**

iv) Utilisation d'une lame à bord ébréché pour l'étalement : le frottis est irrégulier, strié et frangé à l'extrémité. La goutte épaisse peut-être mal étalée.



(OMS, 2014)

Figure 5. 10 : **Frottis confectionné avec une lame d'étalement à bord ébréché**

v) Mauvais positionnement des étalements : l'examen pourra être impossible. Les bords des cuves de coloration, des rateliers pour le séchage ou des cavaliers de maintien de la préparation sur le microscope peuvent alors arracher des morceaux de la goutte épaisse. Sur cette lame, le frottis est trop grand, la goutte épaisse est mal positionnée et sera difficile à examiner à l'objectif à immersion.



(OMS, 2014)

Figure 5. 11 : **Mauvais positionnement du frottis mixte**

vi) Un frottis non séché immédiatement provoque la rétraction des globules rouges.



(OMS, 2014)

Figure 5. 12 : **Globules rouges d'un frottis sanguin non immédiatement séché par agitation**

vii) Une goutte épaisse non défibrinée ne pourra être lue.

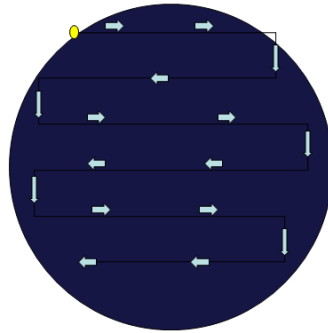
viii) Un étalement du sang avec une lame dont le bord est ébréché; le frottis est irrégulier, strié et frangé à l'extrémité : la goutte épaisse peut-être mal étalée.

### **EXAMEN DE LA GOUTTE EPAISSE**

Commencer le compte dans la partie supérieure gauche du film, se déplacer de manière transversale,

Continuer à compter dans les champs (environ cinq champs d'intervalle) avec ou sans GB et/ou parasites.





(OMS, 2014)

Figure 5. 13 : Sens d'observation d'une goutte épaisse au microscope

### NUMERATION DES PLASMODIES SUR GE ET FS

*Pourquoi estimer la charge parasitaire?*

- Pour déterminer la gravité de l'infection parasitaire du paludisme,
- Pour déterminer et surveiller la réponse parasitologique au traitement antipaludique donné (efficacité thérapeutique),
- Essais cliniques de médicaments,
- Pour valider les frottis sanguins et surveiller les compétences des microscopistes.

*Méthodes pour estimer la charge parasitaire,*

- Goutte épaisse - 2 méthodes:
  - Nombre de parasites par  $\mu\text{L}$  de sang (méthode recommandée par l'OMS)
  - Système Plus '+++' (non recommandé par l'OMS)
- Frottis sanguin mince
  - Requier beaucoup de temps
  - La détection de parasites dans le frottis mince a une sensibilité de seulement 1/10<sup>ème</sup> en comparaison avec la goutte épaisse
  - Comptage plus précis, ~ 30% plus élevé que le nombre compté dans la goutte épaisse.
- Méthode de numération sur goutte épaisse recommandée par l'OMS
  - Examiner 100 champs de vision (objectif x 100 sous huile à immersion) avant de déclarer 'Pas de parasites du paludisme trouvés',
  - Compter jusqu'à ~ 200 globules blancs - si l'on compte  $\geq 100$  parasites ( $\geq 4,000$  P/ $\mu\text{L}$ ) alors effectuer les calculs,
  - Si à 200 globules blancs, moins de 100 parasites ont été comptés ( $< 4000$  P/ $\mu\text{L}$ ), continuer à compter jusqu'à ~ 500 globules blancs, puis effectuer les calculs,
  - Dans le dernier champ de vision inclure dans le compte tous les globules blancs et les parasites visibles,
  - Multiplier le nombre (nb) de parasites comptés x nb de GB/ $\mu\text{L}$  de sang et diviser par le nb de GB comptés.

$$\text{Nombre de parasites}/\mu\text{L} = (\text{Nb parasites} \times \text{nb de GB}/\mu\text{L}) / \text{nb GB comptés}$$

NB : Si le nb de GB/ $\mu\text{L}$  n'est pas disponible (numération globulaire non réalisée), prendre la valeur moyenne de 8000 GB/ $\mu\text{L}$

**Exemple** :  $(77 \text{ parasites} \times 8000) / 505 = 1220$  formes asexuées /  $\text{mm}^3$  de sang.

- Numération sur frottis sanguin

La numération se fait dans la zone où les globules rouges ne se chevauchent pas. Deux méthodes peuvent être utilisées :

On détermine dans chaque champ microscopique le nombre d'hématies parasitées. Le comptage se fait sur 20 champs. En considérant qu'un champ renferme environ 250 hématies, on a donc le nombre d'hématies parasitées (B) pour 5000 (250 \* 20) GR.

On a donc :

B → 5000 GR

P → 5000000 GR / mm<sup>3</sup> = nombre standard de GR = Z.

$$P = (B \times Z) / 5000 = B \times 1000 \text{ hématies parasitées / mm}^3$$

\*\* La numération se fait dans la zone où les GR ne se chevauchent pas.

On compte sur 10 à 20 champs microscopiques à la fois les hématies saines (H) et les parasitées (GRP). Ensuite, l'on détermine le % d'hématies parasitées :

$$\% \text{ GRP} = [\text{GRP} / (\text{GRP} + \text{H})] * 100$$

## 5. Leucoconcentration

### Mode opératoire

Dans un tube à centrifuger à fond conique, l'on recueille 5ml de sang prélevé sur anticoagulant (citrate de sodium à 3,8%).

Ajouter 5ml de sérum physiologique puis mélanger par retournements. A ce mélange, ajouter quelques gouttes d'une solution de saponine à 2% (solution hémolysante) et agiter jusqu'à hémolyse complète du sang. Lorsque l'hémolyse est complète, le mélange prend un aspect rouge porto et l'on arrive à voir au travers du tube.

Centrifuger ensuite à 2000 tours / min. pendant 10 min.

Au bout de ce temps, rejeter le surnageant et récupérer le culot de centrifugation en prenant soin de nettoyer au préalable les parois internes du tube.

Lire le culot à l'état frais. Il renferme des leucocytes et éventuellement des parasites.

### Avantages

La leucoconcentration est une technique de concentration des microfilaires. Elle permet de conserver vivants ces parasites à l'état frais.

En cas de positivité du test, confectionner des frottis que l'on colore au MGG ou au Giemsa (diagnostic d'espèce).

## 6. Technique de Fullbörn à l'eau distillée

### Mode opératoire

A 4ml de sang recueilli sur anticoagulant, ajouter 4ml d'eau distillée.

Mélanger par retournements jusqu'à hémolyse complète puis centrifuger à 2000 tours / min pendant 10 min.

Rechercher les microfilaires dans le culot de centrifugation.

*Intérêt*

A l'instar de la leucoconcentration, cette technique permet de conserver vivantes les microfilaires.

## **7. La technique de Knott modifiée**

*Mode opératoire*

Dans un tube à centrifuger à fond conique, mettre 1ml de sang prélevé sur anticoagulant et 9ml d'eau formolée à 2%.

Laisser agir 5 min pour obtenir une hémolyse.

Centrifuger à 2500 tours / min pendant 10 min.

Rejeter le surnageant.

Nettoyer les parois internes du tube.

Récupérer le culot de centrifugation et en observer une goutte.

En cas de présence des microfilaires, faire un frottis et laisser sécher à l'air.

Fixer avec un mélange éthanol-éther (volume à volume). Laisser en contact 2 min puis colorer au Giemsa diluée.

*Intérêt*

Technique préconisée par l'OMS pour la recherche des microfilaires sanguicoles. Elle permet de bien colorer les noyaux et les gaines des microfilaires quand elles existent.

Inconvénient :

Les microfilaires ne sont pas vivantes.

## **8. Triple centrifugation**

*Mode opératoire*

On met dans un tube à centrifuger à fond conique 10ml de sang prélevé sur anticoagulant.

Centrifuger 10 min à 1000 tours par min. On obtient une couche inférieure de globules rouges, une fine phase leucocytaire et une phase plasmaticque.

Les 2 dernières phases constituent le surnageant que l'on récupère par aspiration à l'aide d'une pipette Pasteur munie d'une poire.

Centrifuger ce surnageant à 1500 tours / min pendant 10 min.

Récupérer le surnageant de cette centrifugation et le mettre dans autre tube à centrifuger pour une nouvelle centrifugation à 2000 tours / min pendant 20 min.

On examine les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> culots de centrifugation pour rechercher les parasites.

Si présence, faire des frottis et colorer au MGG ou au Giemsa.

*Intérêt* : technique de recherche des trypanosomes.

## 9. Centrifugation en tube à microhématocrite (technique du « buffycoat »)

*(buffycoat : couche pâteuse)*

*Principe* : les parasites (trypanosomes, microfilaires) ont une densité égale à celle des globules blancs et inférieure à celles des globules rouges. La centrifugation d'un tube capillaire contenant un anticoagulant rempli de sang parasité permettra la sédimentation des éléments : au fond, les globules rouges puis les globules blancs et les parasites, enfin le plasma.

*Mode opératoire* :

A l'aide d'un vaccinostyle stérile, piquer le bout du doigt du patient préalablement désinfecté.

Recueillir 2 gouttes de sang sur une lame porte-objet bien propre.

Ajouter à ces deux gouttes, une goutte de solution de citrate de sodium à 3,8%.

Mélanger. Remplir par capillarité un tube à microhématocrite aux  $\frac{3}{4}$  puis sceller soit à l'aide d'une pâte à obturer, soit en chauffant.

Centrifuger à 3000 tours min pendant 5 min en cas de recherche des trypanosomes et 2 min pour les microfilaires.

On obtient une phase de globules rouges, une fine phase de globules blancs (avec éventuellement des parasites) et une phase plasmatisque.

Trois possibilités pour la lecture :

- soit scotcher le tube sur une lame porte-objet et observer au microscope optique la phase leucocytaire pour rechercher les trypanosomes et/ou les microfilaires ;
- soit placer le tube dans une rigole creusée sur un support transparent et faire la lecture de la phase leucocytaire (méthode de Woo);
- soit casser le tube tout juste en dessous de la couche leucocytaire que l'on récupère sur une lame. Observer directement au microscope. Si présence de parasites, étaler légèrement la couche leucocytaire. Laisser sécher et colorer soit par la technique au MGG soit par celle au Giemsa pour l'identification précise du parasite.

## 10. La technique du QBC™ (Quantitative Buffy Coat)

*Principe*

C'est une technique de centrifugation différentielle à haute vitesse en tube capillaire basée sur la coloration de l'ADN par l'acridine orange.

*Technique*

Le tube de QBC est un tube à microhématocrite qui contient à une extrémité un mélange d'anticoagulants (EDTA+++ ) et à l'autre un colorant, l'acridine orange. Il est muni d'un flotteur et d'un obturateur.

Piquer à l'aide d'un hémostyle le bout du doigt préalablement désinfecté.

La technique peut être faite également sur un prélèvement veineux dans un tube EDTA

Nettoyer avec du coton sec les premières gouttes de sang et recueillir par capillarité environ 60µl de sang.

Mélanger délicatement de manière à homogénéiser le sang et le colorant.

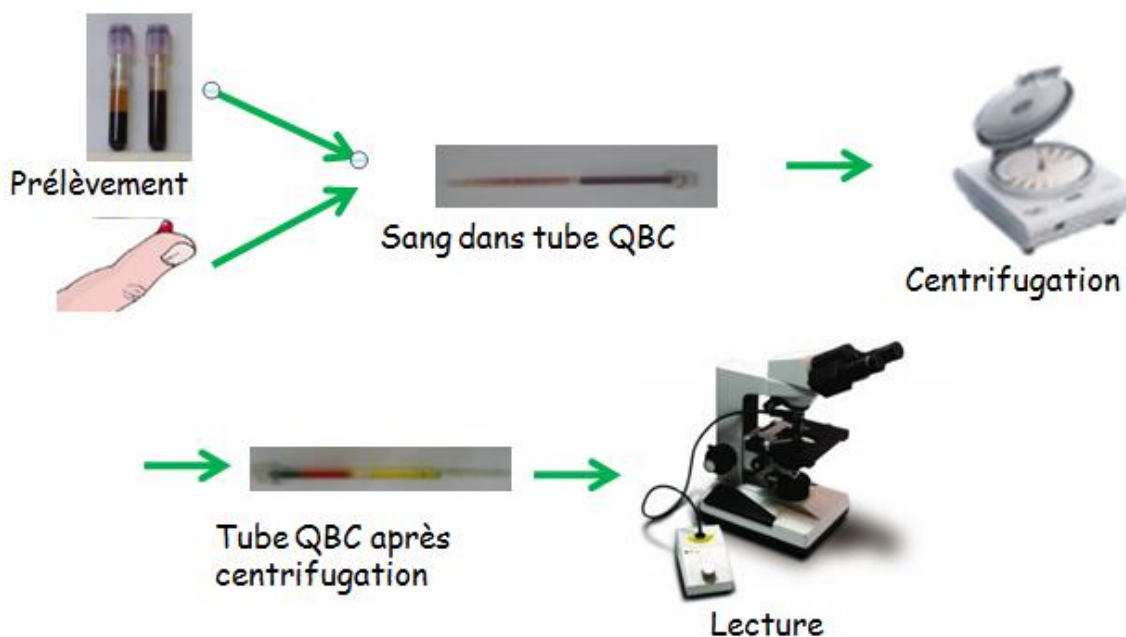
Boucher le tube à l'extrémité côté colorant à l'aide d'un obturateur.

Introduire à l'extrémité opposée le flotteur.

Centrifuger à 10000 tours / min pendant 5 min.

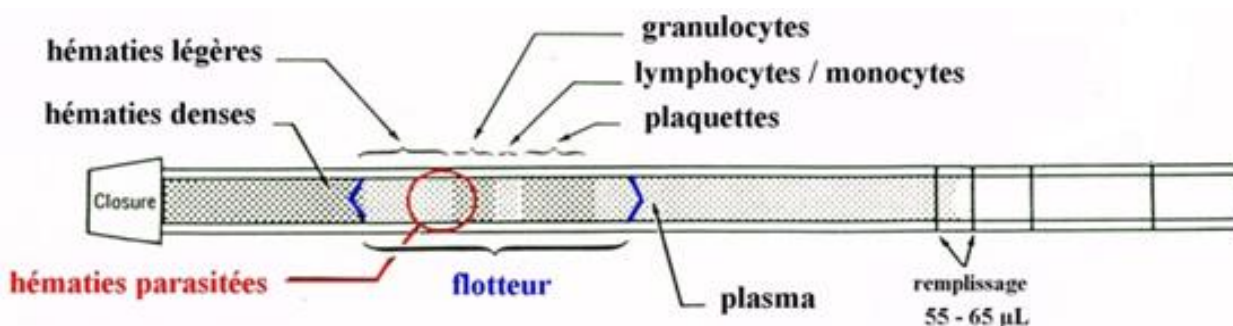
Après centrifugation, les hématies parasitées sont situées entre la couche des gamétocytes et celle des globules rouges sains.

Les hématies parasitées sont situées à l'interface entre la couche leucocytaire et la couche érythrocytaire (cf. figure 5. 14).



Source : Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, UFR SPB, Université FHB, Abidjan

Figure 5. 14 : **Technique du QBC™**



Source : QBC<sup>®</sup> Diagnostics

Figure 5. 15 : **Schéma d'un tube de QBC<sup>™</sup> après centrifugation**

#### Lecture

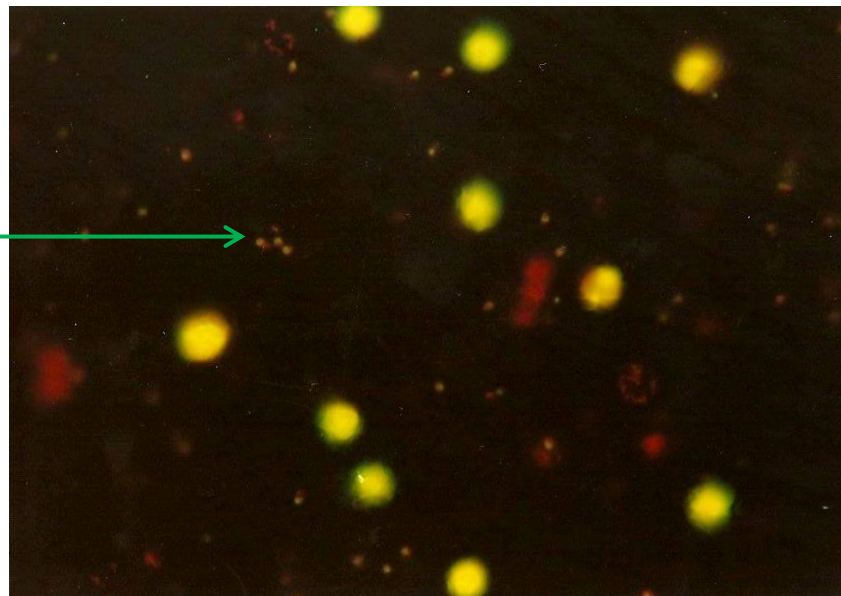
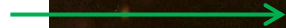
La lecture se fait au microscope à épifluorescence ultra violette à l'immersion (objectif × 60). Les éléments nucléés apparaissent vert-fluorescent.

On reconnaît les plasmodies par leur noyau qui sont sous forme d'un point vert-fluorescent intense avec un cytoplasme vert-orange. La vacuole nutritive n'est pas fluorescente.

Le QBC est une méthode semi-quantitative. En effet, la parasitémie est évaluée sous forme de croix :

- + : < 1 parasite / champ ;
- ++ : 1 à 10 parasites / champ ;
- +++ : 11 à 100 parasites / champ ;
- ++++ : > 100 parasites / champ.

Trophozoïtes



Source : Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, UFR SPB, Université FHB, Abidjan

Figure 5. 16 : **Trophozoïtes de *Plasmodium* au QBC<sup>™</sup>**

#### Intérêts

Le QBC est une technique rapide et très sensible (0,1 parasite /  $\mu$ l).

Elle est surtout utilisée dans le diagnostic biologique paludisme. La lecture est relativement aisée.

Elle peut être utilisée pour la recherche d'autres parasites sanguicoles : microfilaries, trypanosomes, babésies.

#### Inconvénients

- matériel coûteux → coût élevé des examens ;
- méthode semi-quantitative : manque de précision dans l'évaluation de la parasitémie ;
- le QBC ne permet pas d'identifier de façon précise l'espèce plasmodiale, sauf en cas de présence de gamétocytes en forme de banane caractéristiques de *Plasmodium falciparum*.

## 11. La technique d'élution du sang sur résine échangeuse d'ions (méthode de Lanham)

### Principe

Dans certaines conditions de pH et de force ionique, les éléments figurés du sang possèdent une charge électrique différente de celle des parasites.

Les résines échangeuses d'ions, réseau cellulosique en suspension dans une solution tamponnée, ont la capacité de retenir des cellules ayant une charge électrique bien précise. Les autres éléments de charge identique à celle du réseau seront donc élués avec le tampon.

### Technique

Une suspension de diéthylaminoéthyl cellulose (DEAE cellulose) dans un tampon PSG (phosphate sel glucose) de pH et force ionique connus ( $pH\ 7,95-8,05 \pm HCl\ 1\ N$ ) est placée dans une colonne.

Le sang citraté ou hépariné est versé avec précautions à la pipette sur la face supérieure de la colonne.

La surface des parasites (trypanosomes) et celle des fibres de cellulose sont chargées positivement tandis que les globules rouges et les autres éléments figurés du sang sont chargés négativement.

Lors du passage du sang contenant les trypanosomes sur cette colonne, les globules rouges et les autres éléments figurés du sang sont retenus et les parasites élués.

L'éluat sera récupéré dans un tube qui sera centrifugé à 1500 tours / min pendant 10 min. Examiner le culot.

On peut également filtrer l'éluat sur un filtre millipore (1-2 $\mu$  de diamètre de porosité) et examiner le résidu retenu sur la membrane.

### Intérêt

Très bonne sensibilité. Préconisée par l'OMS pour la recherche des trypanosomes (*Trypanosomabruceigambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. cruzi*).

### Inconvénient

Coût élevé des colonnes qui ne sont pas réutilisées.

## 12. Test de diagnostic rapide (TDR) du paludisme

Depuis, l'usage des Combinaisons Thérapeutiques à base de dérivés d'Artémisinine, recommandation est faite par l'OMS de ne traiter que les cas de paludisme confirmé biologiquement (en dehors des cas d'urgence chez les enfants de moins de 5 ans).

Dans un contexte où de nombreuses structures sanitaires des zones d'endémie palustre ne disposent pas de laboratoire d'analyses pouvant réaliser les examens microscopiques, les TDR constituent une bonne alternative pour le diagnostic biologique du paludisme.

### Principe

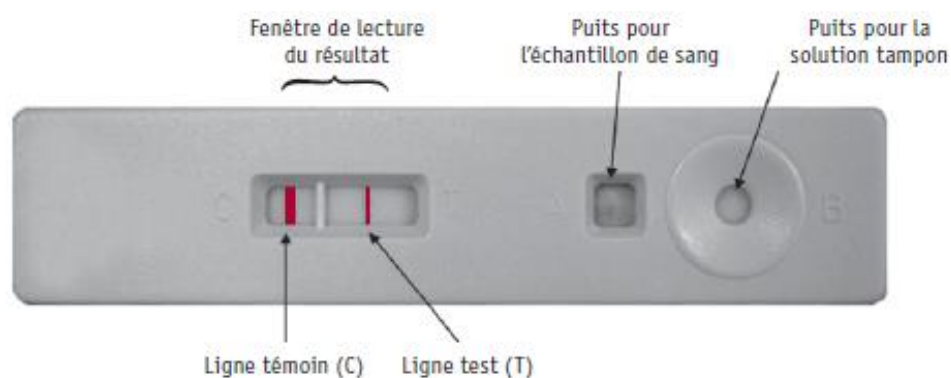
Les tests de diagnostic rapide du paludisme, parfois appelés "bandelettes réactives" ou "système de diagnostic rapide", sont des tests immunochromatographiques qui détectent les antigènes spécifiques (protéines) produits par les parasites du paludisme. Ces antigènes sont présents dans le sang des personnes infectées, que l'infection soit récente ou non. Le test de diagnostic rapide signale leur présence par un changement de couleur sur une bandelette de nitrocellulose.

### Types de tests

La plupart des tests dans le commerce comportent des anticorps dirigés contre les antigènes suivants :

- la protéine HRP II (*Histidin-richprotein II*), spécifique de *P. falciparum* ;
- la pLDH (*Plasmodium* Lactate Déshydrogénase), utilisée actuellement dans les tests qui incluent des anticorps anti-pLDH spécifiques de *P. falciparum*, anti-pLDH spécifiques de *P. vivax* et anti-pLDH commune à toutes les espèces de *Plasmodium* (pan spécifique) ;
- l'Aldolase (pan spécifique).

Les TDR se présentent sous forme de bandelettes ou de cassettes.



(OMS, 2012)

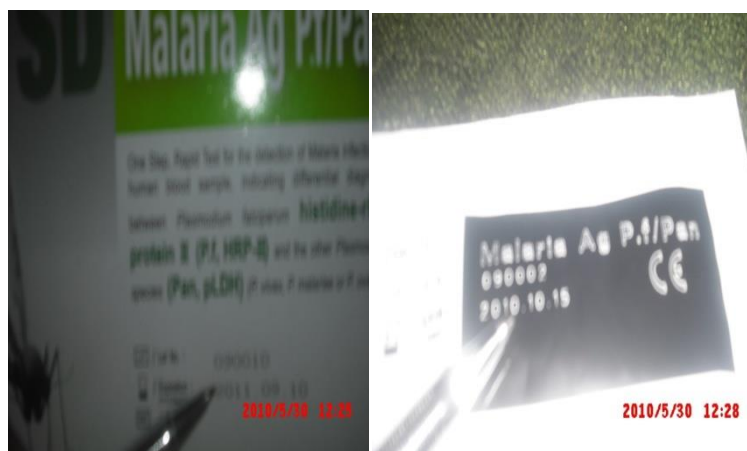
Figure 5. 17 : Représentation schématique d'une cassette de TDR

### Mode opératoire



Il est fonction du type de test utilisé. Il convient donc de lire attentivement les instructions du fabricant présentes dans la notice.

- Vérifier la date de péremption sur le kit et sur l'emballage ;



- Retirer de l'emballage la cassette test, l'applicateur et le sachet contenant le silicagel ;
- Vérifier la couleur du silicagel. Elle doit être bleue, si ce n'est pas le cas, écarter l'emballage et prendre un autre ;



- Dès que l'emballage est ouvert, le test doit être **utilisé immédiatement** ;
- Perforer le flacon contenant le tampon éclaircissant.



- Porter une paire des gants ;

### Examens parasitologiques du sang

- Placer la cassette sur une surface plane ;
- Marquer le numéro d'enregistrement sur la cassette à l'aide du marqueur indélébile ;



- Désinfecter la pulpe de l'annulaire (gros orteil ou talon chez les nourrissons) avec le tampon approprié du kit ;
- Laisser **évaporer complètement** le désinfectant ;
- Piquer d'un coup sec, à l'aide d'une lancette ;

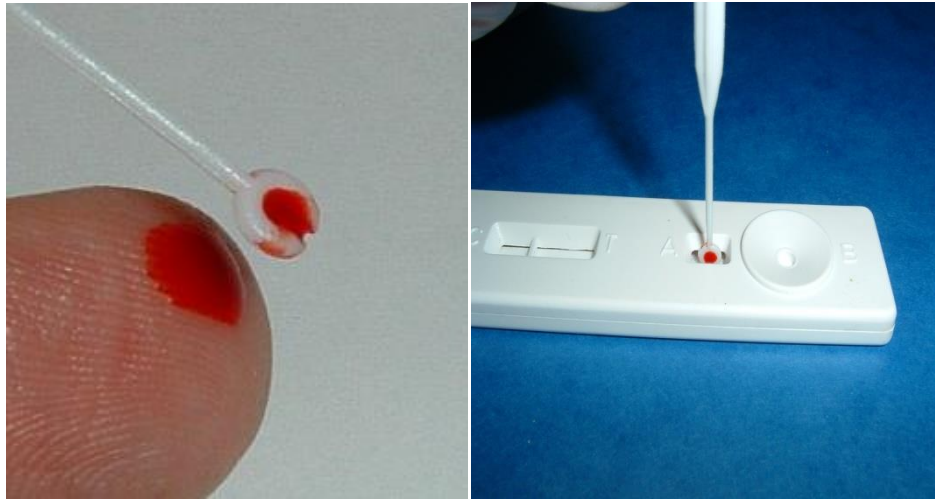
### Examens parasitologiques du sang



- Presser doucement le doigt pour faire sortir le sang ;
- Appliquer fermement l'applicateur sur la goutte de sang ;



- S'assurer que la boucle est remplie (équivalent de 5 $\mu$ l de sang) ;
- Immédiatement après, avant que le sang ne coagule, appliquer fermement l'applicateur (par sa boucle) dans le cercle;



- S'assurer que tout le sang est absorbé ;
- En mettant verticalement le flacon du tampon au dessus du carré, déposer autant de gouttes du tampon éclaircissant que le fabricant recommande;



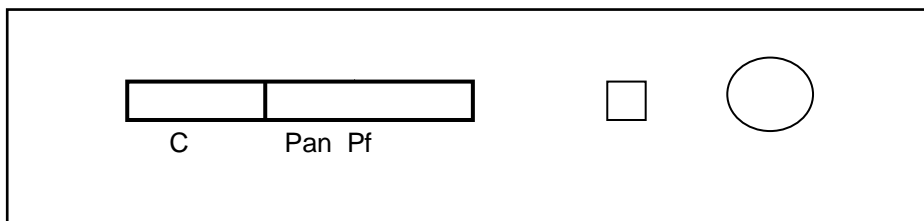
- Laisser agir pendant le temps recommandé par le fabricant (en réglant la minuterie);
- Lire le résultat exactement après les minutes recommandées par le fabricant, dans **un endroit bien éclairé.**

#### Lecture du résultat

- Test **INVALIDE.**

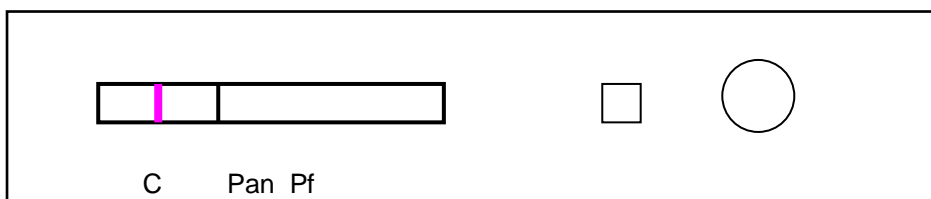
Aucune bande colorée rose n'apparaît sur le trait de contrôle « C » :

Dans ce cas, le test doit être répété. Le rôle du contrôle est de voir si le test est correct et que les procédures (bonne quantité de solution tampon, bonne luminosité pour lire etc.) sont respectées.



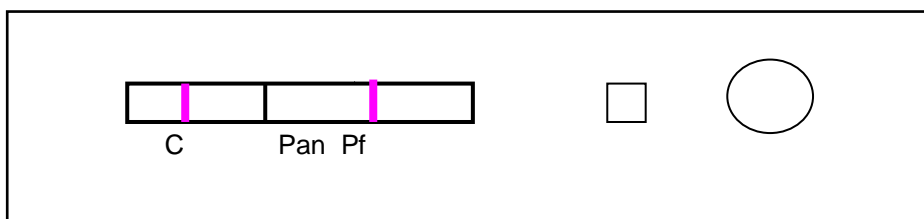
- Test **NEGATIF**

Une seule bande colorée rose apparaît sur le trait de contrôle "C":

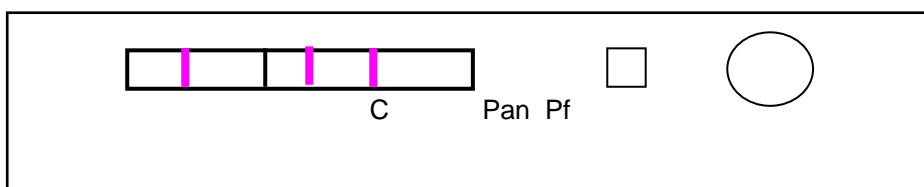


- Test **POSITIF**

Une bande colorée rose apparaît sur le trait de contrôle "C" et une bande distincte colorée rose apparaît également sur le trait Pf : **Test POSITIF pour *P. falciparum***.

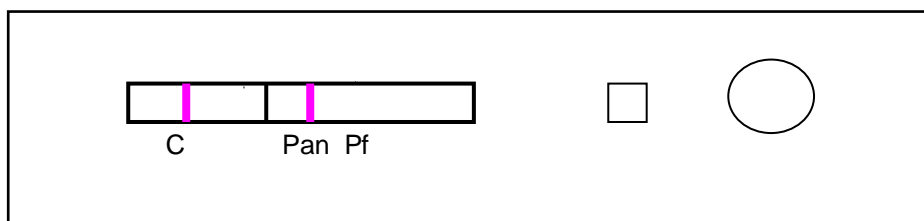


Une bande colorée rose apparaît sur le trait de contrôle "C" et une bande distincte colorée rose apparaît également sur le trait Pan et une autre sur le trait Pf : Test **POSITIF pour *P. falciparum* et/ou Pan spécifique**.



Une bande colorée rose apparaît sur le trait de contrôle "C" et une bande distincte colorée rose apparaît également sur le trait Pan :

Test **POSITIF** pour les espèces **non *P. falciparum***.



**N.B. :**

- Ne jamais lire le résultat avant ou après le temps recommandé.
- **Transcrire le résultat sur la cassette (pos pour un résultat positif ou neg pour un résultat négatif, inv pour un résultat invalide)**

*Avantages :*

Les TDR du paludisme sont :

- faciles à réaliser, rapides ;
- utilisables en zone dépourvue d'électricité et pour des enquêtes épidémiologiques.

*Inconvénients :*

Les inconvénients des TDR sont :

- coût relativement élevé par rapport à GE/FS ;
- présence de faux positifs surtout avec les TDR qui détectent l'antigène HRPII qui peut persister (antigénémie résiduelle) 7 à 21 j après la guérison du patient ;
- faux négatifs si pauci-infestation;
- pas de détermination densité parasitaire.

## 13. Le test de PCR (Polymerase Chain Reaction)

*Principe général*

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) est une technique basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, un segment d'acide nucléique doit s'y associer afin de servir d'amorce. Cette amorce (ou primer), de séquence complémentaire à celle du brin à amplifier, est un oligonucléotide synthétique. Son association à l'ADN cible est suivie de son élongation par la polymérase, aboutissant ainsi à la synthèse d'un ADN double brin.

Les différentes techniques moléculaires utilisées pour le diagnostic du paludisme sont les suivantes :

- **la PCR conventionnelle** qui permet de dupliquer en grand nombre une séquence d'ADN ou d'ARN connue à partir d'une faible quantité d'acide nucléique (AN) et d'amorces spécifiques constitués d'oligonucléotides de synthèse ;



- **La PCR nichée (Nested PCR)** est une PCR en deux étapes successives, avec deux couples d'amorce différents, le second liant des séquences situées à l'intérieur du premier amplicon ;
- **l'approche PCR-RFLP** conduit à comparer la longueur des fragments de restriction d'une région choisie du génome et préalablement amplifiée par PCR, afin de déterminer le polymorphisme ;
- **La PCR quantitative (qPCR) et/ou (RT-PCR)** est une PCR quantitative : elle est révolutionnaire dans l'utilisation de la PCR. Cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent ;
- **la technique LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)** permet de détecter l'ADN parasitaire mitochondrial non codant de 214 pb. Elle repose sur une méthode de PCR grâce à un appareillage utilisable sur le terrain à temps réel et contrairement aux autres techniques moléculaires. Elle ne nécessite aucune expertise ni de thermocycleur et le résultat est immédiat (en moins d'une heure).

Mode opératoire : cette partie sera développée dans la leçon portant sur le diagnostic moléculaire des parasitoses.

*Avantages:*

- très sensible;
- très spécifique.

*Inconvénients:*

- coût élevé de la PCR;
- utilisée surtout dans les laboratoires spécialisés et les laboratoires de recherche.

## 14. Les tests de culture

- **Culture *in vitro*/ *ex vivo***

La culture *in vitro* de parasites sanguicoles peut être réalisée sur divers milieux tels que:

- le milieu RPMI 1640 tamponné par du HEPES et du bicarbonate de sodium et supplémenté par du sérum humain ou du BSA (*bovine serumalbumin*) pour la culture de *Plasmodium falciparum*;
- le milieu de Novy Nicolle et MacNeal (NNN) pour la culture des leishmanies et des trypanosomes.

*Intérêt*

Les méthodes de culture *in vitro*/ *ex vivo* sont des techniques très sensibles. Elles peuvent être utilisées pour l'étude de la sensibilité *in vitro*/ *ex vivo* des parasites (ex. : *P. falciparum*) à diverses molécules.

*Inconvénients*

Ce sont des techniques de réalisation délicate devant se faire dans des conditions de stérilité par un personnel qualifié et expérimenté. De plus, elles sont coûteuses (matériel et réactifs chers). Elles sont utilisées dans le cadre de la recherche.

### ***Culture in vivo***

Il s'agit de l'inoculation des parasites sanguicoles (*Plasmodium*, trypanosomes, toxoplasme etc.) à des animaux de laboratoire tels que la souris blanche et le cobaye.

## **II-2 Les méthodes indirectes**

Les méthodes de diagnostic indirect sont des techniques qui utilisent la réaction antigène-anticorps pour révéler la présence d'un anticorps spécifique dans le sérum du patient et dirigés contre un antigène d'un parasite donné.

Il existe différentes méthodes qui peuvent être utiles :

- au diagnostic rétrospectif d'une affection parasitaire ;
- au diagnostic positif d'affection parasitaire dont l'agent pathogène est relativement difficile à mettre en évidence (ex. toxoplasmose...) ;
- en cas de pauci-infestation (paludisme viscéral évolutif).

Toutefois, souvent la présence d'anticorps antiparasitaires ne permet pas d'établir la certitude diagnostique des parasitoses. Les résultats des tests sérologiques constituent dans ce dernier cas des arguments indirects de présomption.

Les méthodes indirectes qui sont utilisées en parasitologie sont :

- l'immunofluorescence indirecte ;
- la technique ELISA ;
- l'hémagglutination indirecte ;
- l'agglutination directe, etc.

Cette partie sera mieux développée dans la leçon relative au diagnostic sérologique des parasitoses.



## **Bibliographie**

Gay F, Traoré B, Zanoni J, Danis M, Gentilini M. Evaluation of the QBC system for the diagnosis of malaria. *Sante*, 1994, 4(4) : 289-297.

Gay F, Traoré B, Zanoni J, Danis M, Fribourg-Blanc A. Direct acridine orange fluorescence examination of blood slides compared to current techniques for malaria diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996, 90(5) :516-518.

Organisation mondiale de la Santé. Bonnes pratiques relatives au choix et à l'achat des tests de diagnostic rapide du paludisme. Genève : OMS, 2012, 105 p.

Organisation Mondiale de la Santé. Techniques de base pour le Diagnostic Microscopique du Paludisme. Partie 1. Guide du stagiaire. Genève: OMS, 2014, pp 1-81.

World Health Organization. World Malaria Report 2015. Geneva: Switzerland, 2016.

Wéry M. Protozoologie médicale. Bruxelles : De Boeck Université, 1995, pp 233-240.

Yavo W, Ackra KN, Menan EI, Barro-Kiki PC, Kassi RR, Adjetey TA, Bamba A, Kone M. Etude comparative de quatre techniques de diagnostic du paludisme utilisées en Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot*, 2002, 95(4):238-240.

## **6 EXAMENS PARASITOLOGIQUES DES SELLES**

---

*Rédigé par Pr Menan Hervé (Côte d'Ivoire), Relu par Pr Diallo Mouctar (Mali) et  
Pr Doumbo Niaré Safiatou (Mali)*

## Introduction

L'intestin et les voies biliaires constituent des habitats de prédilection pour certains parasites qui utilisent comme mode de sortie dans le milieu extérieur, l'émission des selles.

L'examen parasitologique des selles (EPS) permet donc la mise en évidence et l'identification de ces parasites qui peuvent être retrouvés sous différentes formes :

- Vers adultes : ascaris, oxyure, anneaux de *Taenia*, etc. ;
- Œufs : œufs d'helminthes ;
- Larves : larves rhabditoïdes d'anguillules et d'ankylostomes ;
- Formes végétatives ou trophozoïtes et formes kystiques de protozoaires,
- Oocystes de coccidies

Nous ne ferons pas mention, dans ce chapitre, des examens pour la recherche des champignons tels que les microsporidies (voir chapitre sur les microsporidies) et les levures (voir chapitre sur le diagnostic biologique des mycoses).

L'EPS est justifié devant l'apparition de troubles digestifs de type nausées, vomissements, douleurs abdominales ou diarrhée qui ne sont pas des signes obligatoires de parasitose.

Une démarche rigoureuse doit être observée dans la réalisation des EPS. Elle débute par le prélèvement des selles, ensuite viennent l'examen macroscopique, l'examen microscopique direct, les techniques de concentration et éventuellement les techniques spéciales.

## I. Conditions de prélèvement et de conservation des selles

Le prélèvement des selles constitue une étape très importante, car il contribue à garantir la qualité des examens et la fiabilité des résultats.

### A. Préparation du sujet

Si l'examen est programmé, il faut déconseiller aux malades, 2 ou 3 jours avant, un régime alimentaire riche en résidus. Il faudra éviter les fruits et légumes verts. Il faudra également interdire les produits tels que l'huile de paraffine, les mucilages, le charbon végétal, les sels de magnésium, les sels de bismuth, le kaolin, les huiles laxatives, la baryte, les suppositoires et autres substances rémanentes intestinales qui pourraient masquer les parasites. Si l'on veut faire un lavement baryté pour une radiographie, il doit être réalisé après l'EPS, car la baryte met 10 à 15 jours avant d'être totalement éliminée.

On pourra également, si possible, interrompre tout traitement par les antibiotiques intestinaux (ex. : sulfamides) qui sont susceptibles d'agir sur la flore intestinale et les protozoaires. D'une façon générale, toute prise d'antiparasitaire intestinal doit être signalée.

## B. Réactivation des selles

Elle consiste à provoquer une accélération du transit dans le but de faire apparaître dans les selles liquides ou molles les formes végétatives des protozoaires et parfois les larves rhabditoïdes d'anguillule.

Pour ce faire, la veille de l'examen, l'on administre au patient un laxatif léger : sulfate de magnésium (1 cuillère à café diluée dans un verre d'eau sucrée). Le lendemain matin, répéter la même dose et, au besoin, donner une 3<sup>ème</sup> dose.

Le malade aura alors la diarrhée, et l'on recueille la deuxième émission de selles pour y rechercher les formes végétatives de protozoaires.

## C. Recueil des selles

L'émission de formes parasitaires dans les selles n'est pas continue.

Un examen parasitologique des selles doit être réalisé sur au moins trois selles émises à quelques jours (2 jours si possible) d'intervalle (afin d'éviter les phases négatives d'émission).

Les selles doivent être recueillies dans les boîtes en verre ou en plastique transparent pour pouvoir observer tout le spécimen biologique. Il doit s'agir d'un récipient d'ouverture suffisamment large avec un couvercle.



*Pot pour recueil des selles*

Les malades doivent déféquer directement dans le récipient en émettant une quantité suffisante de selles.

Les boîtes d'allumettes ou les pots en carton sont à proscrire.

## D. Délai entre la défécation et l'examen parasitologique

L'échantillon de selles doit parvenir très rapidement au laboratoire c'est-à-dire dans la demi-heure qui suit son émission, car les formes végétatives de protozoaires vont se décomposer ou se modifier assez rapidement après l'émission de la selle et ne seront plus reconnaissables. De même, si l'examen est trop retardé, des œufs d'oxyure ou d'ankylostomes peuvent éclore et donner des larves qu'il faudra pouvoir reconnaître.

## E. Conservation des selles

*En cas de conservation provisoire :*

Les flacons de selles hermétiquement fermés seront mis à la température de +4°C. Ceci permet de conserver pendant quelques jours voire une semaine les œufs et larves d'helminthes ainsi que les kystes de protozoaires.

*En cas conservation plus longue :*

L'eau formolée à 10% permet la conservation des kystes de protozoaires, des œufs et à un degré moindre les larves d'helminthes.

Pour se faire, l'on mélange 1 volume de matières fécales à 3 volumes de la solution de formol jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Filtrer et conserver le filtrat dans un flacon.

Des flacons prêts à l'emploi commerciaux sont disponibles dans le commerce et contiennent le SAF (Sodium Acetate Formalin ou Formol d'acétate de sodium).

Les selles peuvent être également conservées dans une solution de MIF (Merthiolate Iode Fomol). C'est la technique de MIF conservation ou de MIF stockage ou MIF coloration. Le protocole est le suivant:

- Verser 2,35ml de la solution Merthiolate Formol dans 0,15ml d'une solution iodo-iodurée ;
- Ajouter un petit pois de selles ;
- Laisser sédimenter 20 à 30 min;
- Prélever 1 à 2 gouttes au dessus du sédiment à l'aide d'une pipette Pasteur ;
- Observer au microscope entre lame et lamelle.

Les flacons de selles colorées seront mis à l'abri de la lumière. La méthode de MIF conservation permet une bonne conservation des éléments copro-parasitaires sur plusieurs mois ou années. Elle permet également l'identification des formes végétatives et kystiques de protozoaires par la mise en évidence de leur structure interne.

Pour la conservation longue, on peut également réaliser un frottis de selles coloré à l'hématoxyline ferrique (bonne coloration des noyaux des formes végétatives de protozoaires). C'est la méthode de coloration de référence pour l'identification des protozoaires intestinaux. Elle est onéreuse et peu utilisée dans les laboratoires africains.

Il est aussi possible de colorer le frottis de selles par la technique de Ziehl-Neelsen (bonne coloration des oocystes de cryptosporidies).

On peut aussi faire appel à la technique de lutage qui permet de conserver les parasites pendant des mois. On dépose du vernis à ongle transparent autour de la lamelle sur une lame. Cette méthode est valable surtout pour les œufs d'helminthes. Les kystes de protozoaires et les larves d'helminthes ne résistent pas longtemps.

## II. Examens des selles

### A. Examens directs

#### 1. Examen macroscopique

Il constitue une étape indispensable et renseigne sur:

- la consistance des selles (molle, moulée, liquide, ...);
- la couleur des selles (jaunâtre, verdâtre, brun, noirâtre, ...);
- la présence éventuelle de glaire, de sang, de pus, de mucus;
- la présence éventuelle de parasites adultes visibles à l'œil nu (ascaris, oxyure, des anneaux de ténia). On pourra également observer de faux parasites (débris végétaux ...);
- l'odeur (fade, fécaloïde, fétide).

Les selles diarrhéiques ou glairo-sanguinolentes orientent vers la recherche de formes végétatives de protozoaires.

Les selles dures ou moulées font suspecter la présence d'œufs d'helminthes et de kystes de protozoaires.

#### 2. Examen microscopique direct

C'est une étape **incontournable** et majeure de l'EPS.

L'examen microscopique direct permet de dépister les œufs et les larves d'helminthes, les kystes et les formes végétatives d'amibes et de flagellés, les oocystes de coccidies et les spores de microsporidies.

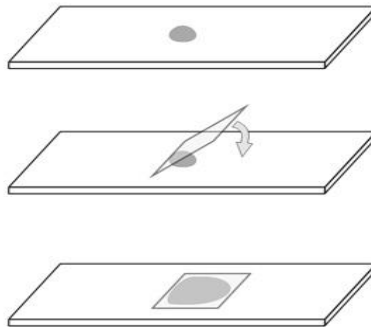
Il permet en particulier d'observer vivantes les formes végétatives de protozoaires et les larves d'helminthes. On peut ainsi apprécier leurs caractères de mobilité. Il permet aussi de retrouver les parasites qui se concentrent mal par les techniques standards de concentration (œufs non fécondés d'*Ascaris lumbricoides*, embryophores de *Taenia sp*). Cette technique permet aussi d'apprécier l'état digestif du patient.

*Mode opératoire :*

- S'il s'agit d'une selle de consistance ferme :
  - prélever un fragment en piquant à l'aide d'un pique à cheveux ou d'une baguette de verre à plusieurs endroits;
  - délayer une petite portion de la selle dans une goutte de sérum physiologique déposée sur une lame porte-objet propre et bien dégraissée;
  - recouvrir d'une lamelle de sorte que la suspension s'étale de façon homogène en dessous. La suspension doit être mince et transparente;

## Examens parasitologiques des selles

- examiner au microscope à l'objectif x 10 puis x 40 si l'on a repéré un élément suspect.



Différentes étapes de la préparation de la lame à observer lors de l'examen direct. En cas de présence de kystes de protozoaires, l'on peut déposer à un bord de la lamelle, une goutte d'une solution de lugol à 1% qui diffusera par capillarité. La composition du lugol à 1% est la suivante :

- iode 1g.
- iodure de potassium 2g.
- eau distillée 100ml.

Le lugol colore en jaune-brun les membranes externes des kystes ainsi que leur contenu cytoplasmique et nucléaire, ce qui permet de bien les identifier.

- Si la selle est diarrhéique, on procède de la même manière que précédemment sauf qu'ici l'on peut se passer du sérum physiologique.
- Si la selle est dysentérique, le prélèvement se fera de préférence sur les zones glairo-sanguinolentes pour rechercher les formes végétatives d'*Entamoeba histolytica histolytica* mais aussi les œufs de *Schistosoma mansoni*.

*Inconvénient* : du fait de la faible quantité de selles, l'on peut avoir un résultat faussement négatif.

## B. Méthodes de concentration parasitaire

### Principe général :

Les techniques de concentration parasitologique sont des méthodes par lesquelles l'on essaie, à partir d'une grande quantité de matières fécales, de rassembler dans un faible volume les parasites après élimination des résidus de la digestion. Pour ce faire, l'on joue sur les densités et affinités différentes de ces résidus et des parasites recherchés.

La technique idéale qui concentrerait tous les parasites n'existe pas. Il convient donc d'utiliser plusieurs techniques de concentration pour observer le maximum d'éléments coproparasitaires.

Quel que soit le résultat de l'examen microscopique direct, un bon laboratoire se doit d'effectuer plusieurs techniques de concentration. Parmi ces techniques, on doit utiliser :

- une technique standard de concentration qui, en règle générale, permet de concentrer la plupart des parasites ;
- une technique spéciale que l'on utilise dans des cas particuliers. Il s'agit d'une recherche orientée par le contexte clinique. Elle est déclenchée par le clinicien, qui doit préciser la parasitose suspectée.

Les techniques de concentrations parasitaires se répartissent en deux grands groupes :

- les méthodes physiques;
- les méthodes physico-chimiques ou diphasiques basées sur l'action combinée de la sédimentation et le pouvoir dissolvant de l'éther.

### **Etapes communes aux méthodes physiques et physico-chimiques**

#### *Dilution*

Quel que soit le liquide de dilution, les selles devront être triturées, à l'aide d'une baguette de verre, dans un verre à pied. On ajoute, au début, une très petite quantité de liquide pour obtenir une pâte. Ajouter au fur et à mesure le liquide, jusqu'à obtention d'une suspension homogène assez fluide. Le résultat sera un diluât correspondant à ce qui est recommandé pour la technique choisie.

#### *Filtration*

Pour éliminer les particules alimentaires non fragmentées (peaux de fruit ou de légume par exemple), le diluât obtenu est filtré à travers une passoire (tamis chinois) à mailles fines. Recueillir le filtrat dans un autre verre à pied.

Un peu de liquide propre permet de rincer la passoire et d'emporter les éventuels œufs restés dans les mailles.

La passoire après usage sera brossée et flambée (destruction d'œufs éventuellement restés accrochés dans les mailles).

#### *Brève sédimentation*

Laisser sédimenter, dans un verre à pied, le filtrat recueilli pendant 30 secondes à 1 mn. Cette sédimentation permet aux petits éléments lourds de tomber dans le fond du verre à pied.

## **1. Les méthodes physiques**

**Principe :** elles sont basées sur la différence de densité entre les débris gênants des selles et les éléments parasitaires.

On distingue :

- les techniques par sédimentation ;
- les techniques par flottation.



## a. Techniques par sédimentation

La dilution se fait dans un liquide de faible densité, ce qui permet aux éléments parasitaires de se déposer.

- **Technique par simple sédimentation multiple**

- Triturer 10 à 20g de selles dans de l'eau physiologique (à défaut utiliser l'eau distillée ou l'eau du robinet) ;
- Filtrer et recueillir le filtrat dans un grand verre à pied ;
- Ajouter 250 à 500ml d'eau ;
- Agiter et laisser sédimenter 1 heure ;
- Rejeter le surnageant et remettre à nouveau 250 à 500ml d'eau physiologique ;
- Recommencer l'opération jusqu'à ce que le surnageant soit clair ;
- Examiner le culot.

Il existe 2 méthodes d'examen du culot :

- Méthode des 3 prélèvements : faire un prélèvement en surface, au milieu et au fond du culot ;
- Méthode de prélèvement unique après avoir homogénéiser le culot.

**Remarque :** l'utilisation d'eau de robinet entraîne l'éclosion des œufs de schistosomes. On peut aussi y retrouver des larves rhabditoïdes d'helminthes.

### *Avantages*

Cette méthode est simple et peu coûteuse, car ne nécessite pas de produit chimique particulier.

De plus, elle n'utilise pas de solutions denses, par conséquent les éléments parasitaires sont isolés sans déformation.

*L'indication* la plus intéressante de la sédimentation est la recherche d'œufs lourds (ex : œufs de Trématodes, œufs atypiques d'ascaris) et de larves d'anguillule.











### *Inconvénients*

C'est une méthode longue.

Il existe beaucoup de débris fécaux (selles riches en féculent) qui sédimenter aussi vite que les parasites recherchés, et l'examen microscopique n'est pas toujours facile.

- **Sédimentation-centrifugation**

C'est une technique semblable à la précédente. Mais ici, au lieu de laisser sédimenter, on récupère une partie du filtrat et on centrifuge à 1500 tr/min pendant 1 min. On rejette le surnageant, on reprend le culot par l'eau physiologique, et on centrifuge jusqu'à ce que le surnageant soit clair.

									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Prélever l'échantillon	Ajouter de l'eau	Homogénéiser	Filtrer	Transvaser dans un tube à essai	Centrifuger	Rejeter le surnageant	Ajouter de l'eau	Centrifuger	Examiner le culot au microscope

### Avantages

Technique plus rapide que la précédente, moins de manipulations

### Inconvénients

On n'utilise pas les 10 à 20g de selles (puisqu'on utilise une partie des selles).

- **Sédimentation en eau glycinée (technique de Faust-Ingalls)**

Le liquide de dilution est l'eau glycinée à 5%.

### Mode opératoire

- Diluer 5 grammes de selles dans 300ml d'eau glycinée à 0,5% ;
- Pratiquer trois sédimentations successives en verre à pied d'une durée de 1 heure, 45 minutes puis 30 minutes ;
- Rejeter le dernier surnageant ;
- Effectuer des prélèvements à différents niveaux pour l'analyse.

### Avantages

Technique de terrain employée pour rechercher les œufs de *S. mansoni* mais permet aussi de trouver des œufs d'ascaris non fécondés et des larves d'anguillule.

### Inconvénients

Technique longue.

Ne concentre pas les autres parasites.

L'examen microscopique peut être rendu difficile par la présence de certains résidus.

## b. Techniques par flottation

*Principe* : les œufs ont une coque qui les protège pendant un certain temps, de la pénétration de liquide plus dense. Une dilution avec ces liquides aura tendance à les laisser flotter en surface tandis que les résidus plus lourds ou ceux qui s'imprègnent rapidement tombent dans le fond des récipients.

La manipulation doit être rapide car certains œufs peuvent s'imprégner de liquide et redescendre au fond du récipient. Avant les examens, il faut éviter les aliments gras et médicaments à base d'huile de paraffine.

- **Technique de Willis**

## Examens parasitologiques des selles

Le liquide de dilution est une solution aqueuse de chlorure de sodium saturée à 25% (25g e NaCl dans 100ml d'eau distillée environ ; densité = 1200).

### Mode opératoire

- Diluer les selles au dixième environ dans le liquide de dilution (1 à 2g de selles dans 20 ml) ;
- Filtrer rapidement ;
- Laisser reposer le filtrat pendant 30 secondes ;
- Remplir avec le surnageant du filtrat un tube jusqu'à la limite supérieure (léger bombement du liquide au dessus du bord) ;
- Placer délicatement une lamelle qui doit recouvrir tout le tube sans bulle d'air ;
- Laisser en contact pendant 15 mn ;
- Retirer la lamelle et la déposer sur une lame porte-objet ;
- Observer au microscope au grossissement x 10 puis x 40.

### Avantages

- Simplicité et rapidité d'exécution;
- Faible prix de revient;
- Concentre bien les œufs d'ankylostome et d'*Hymenolepis*.

### Inconvénient

La solution de chlorure de sodium pénètre assez facilement dans les œufs, et il ne faut pas dépasser le temps prescrit dans le déroulement de la technique.

### • Technique de Faust simplifiée

Liquide de dilution : solution saturée de sulfate de zinc à 33% ( $ZnSO_4$  : 331g, eau distillée qsp : 1000ml).

### Mode opératoire

- Diluer au dixième les selles dans une solution saturée de sulfate de zinc ;
- Tamiser et centrifuger pendant une minute à 2300 tours/minute ;
- Prélever à l'anse métallique une couche superficielle et déposer sur une lame pour examen.

### Intérêt

Méthode simplifiée qui se contente d'une seule centrifugation contrairement à la méthode originelle qui nécessite plusieurs sédimentations dans l'eau par centrifugation avant la flottation.

### Inconvénients

La densité du liquide de dilution (1,18) est proche de celle de la dilution de Willis et n'a pas l'avantage de la simplicité pour se procurer le sulfate de zinc. Cette méthode ne permet guère de trouver plus d'œufs que la méthode de Willis. Elle exige l'utilisation d'une centrifugeuse.

- **Technique de Janecko-Urbanyi**

Liquide de dilution : Solution iodomercurique

Biiodure de mercure 150g

Iodure de potassium 110g

Eau distillée 400ml

Dissoudre l'iodure de potassium dans un peu d'eau. Ajouter le biiodure de mercure en remuant. Après dissolution complète, ajouter le reste de l'eau.

Mode opératoire

- Délayer 3 à 5g de selles dans 20ml de la solution d'iodomercurate ;
- Tamiser et centrifuger le filtrat recueilli dans un tube à fond conique pendant 3-4 minutes à 2 500 tours ;
- Prélever immédiatement quelques gouttes de la couche superficielle à l'aide d'une anse ou d'une baguette de verre ou d'une pipette Pasteur ;
- Observer au microscope entre lame et lamelle.

Avantages

Cette méthode concentre bien les œufs de grande douve du foie, de schistosomes et d'ankylostomides ainsi que les larves d'anguillules.

Elle concentre assez bien les embryophores de ténia et les œufs de trichocéphales.

Inconvénients

La solution iodo-mercurique est coûteuse, toxique et très corrosive.

C'est une méthode inefficace pour trouver les kystes sauf ceux de giardia.

## 2. Les méthodes physico-chimiques ou méthodes diphasiques

### a. Principe

Ces méthodes consistent à mettre les selles en présence de 2 phases non miscibles : une aqueuse et une organique (éther).

En plus de l'action dissolvante de l'éther, la mise en jeu de 2 phases non miscibles réalise pour chaque élément fécal un coefficient de partage dont la valeur dépend de sa balance hydrophile / lipophile permettant ainsi de concentrer les éléments parasitaires dans le culot de centrifugation.

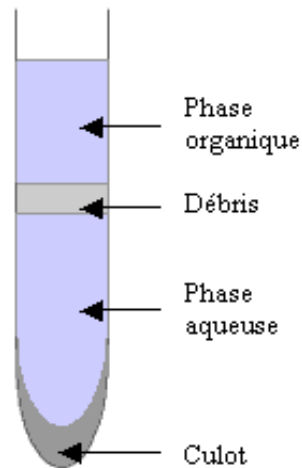
**Points communs**

- Les selles triturées (dilution au dixième environ) dans le liquide de dilution choisie (selon la méthode) sont tamisées à travers une passoire ;
- Après moins d'une minute de brève sédimentation, le filtrat est versé dans un tube à centrifuger à fond conique en le remplissant à moitié ou aux deux tiers ;

### Examens parasitologiques des selles

- On ajoute de l'éther (au 1/3 en général ou au 1/2) en laissant un espace vide de 1 cm au dessus de la couche étherée pour permettre une bonne agitation ;
- Le tube bouché avec le doigt est alors agité énergiquement pour obtenir une suspension homogène ;
- Centrifuger à 1500-2000 tours/ min. pendant 1 à 3 min.
- 

Résultats :



Après centrifugation, les constituants de la suspension sont répartis en quatre couches avec du haut vers le bas :

- Couche superficielle étherée colorée par les corps éthéro-solubles (graisses diverses) ;
- Couche épaisse et adhérent aux parois du tube, contenant les résidus lipophiles encore appelée le gâteau ;
- Couche de solution aqueuse de dilution colorée par les corps hydrosolubles ;
- Culot devant contenir les parasites et qui doit être aussi petit que possible voire presque indiscernable à l'œil nu.

Récupération du culot de centrifugation :

- Décoller la couche des résidus lipophiles (le gâteau) à l'aide d'une baguette de verre ;
- Retourner le tube au dessus de l'évier (en faisant couler de l'eau ;
- Essuyer les parois du tube avec un coton monté sur une pince en laissant toujours le tube avec l'ouverture dirigée vers le bas pour éviter de souiller le culot avec les résidus ;
- Retourner alors le tube et ajouter 1 à 2 gouttes de sérum physiologique pour remettre en suspension le culot ;
- Prélever le culot à l'aide d'une pipette Pasteur et observer au microscope entre lame et lamelle.

## b. Technique de Telemann-Rivas

Réactifs : solution aqueuse à 5% d'acide acétique cristallisable, éther éthylique.

### *Mode opératoire*

Dans cette technique, l'on met dans le tube à centrifuger **un volume égal de filtrat et d'éther**.

### *Avantages*

Simple, concentre bien les œufs de trichocéphale, d'ankylostomidés, les larves d'anguillules et les kystes de *Giardia intestinalis*. La coque des kystes d'*Entamoeba histolytica* se dédouble ce qui constitue un élément de diagnostic intéressant.

### *Inconvénients*

Les œufs d'ascaris, de grande douve, de schistosome sont souvent en défaut car restent dans la couche lipophile. Ils sont donc mal concentrés.

## c. Technique de Bailenger

Solution de dilution : Tampon acéto-acétique pH 5

Composition :

- Acétate de sodium cristallisé 15g
- Acide acétique 3,60ml
- Eau distillée qsp 1000ml

### *Mode opératoire*

- Délayer 2 à 3 g de selles avec 10 fois son volume en tampon ;
- Tamiser sur tamis métallique et recueillir dans 1 tube en verre à centrifuger ;
- Ajouter 1 volume égal d'éther et agiter vigoureusement ;
- Centrifuger à 2500 tours /min pendant 3 min ;
- Retirer couches supérieures et examiner le sédiment entre lame et lamelle.

### *Avantages :*

Cette méthode analogue à la méthode de Telemann-Rivas donne de meilleurs résultats.

Elle est beaucoup plus fiable dans la recherche des kystes et œufs se concentrant bien dans un pH aux environ de 5 (giardia, amibes, trichocéphales, ankylostomes).

NB : Pour rechercher les œufs de schistosomes ou d'ascaris, il est nécessaire de ramener le pH à 7.

### *Inconvénient*

Le culot est souvent épais.

## d. Technique de Ritchie simplifiée

Réactifs :

- Solution aqueuse à 10% de formol pur (formol pur = solution formaldéhyde officinale à 33%) ;
- Éther.

*Mode opératoire*

- Délayer 1 volume de selles dans 10 volumes d'eau formolée à 10% ;
- Tamiser sur tamis métallique, laisser sédimenter 30 sec ;
- Recueillir le filtrat dans un tube à centrifuger à fond conique ;
- Ajouter l'éther au 1/3;
- Agiter vigoureusement et émulsionner;
- Centrifuger à 1500 tours / min pendant 3 minutes ;
- Récupérer le culot en éliminant les couches supérieures. Examiner.

*Intérêts*

Technique standard de concentration utilisée en routine par beaucoup de laboratoires.

C'est une méthode pouvant être utilisée sur les selles formolées donc sur les selles collectées durant les enquêtes épidémiologiques.

Elle concentre bien les kystes et oocystes de protozoaires, la plupart des œufs et larves d'helminthes.

*Inconvénients*

Le culot souvent épais peut être difficile à lire.

NB : Dans la technique de Ritchie initiale, des phases de sédimentation-centrifugation sont réalisées au préalable, et l'ajout d'eau formolée, se fait sur le culot dont le surnageant est clair. C'est donc une technique plus longue, mais qui, au final, permet d'avoir un culot moins épais.

## e. Technique de Blagg ou de MIF concentration

Réactifs :

- Éther éthylique;
- Solution de Merthiolate Iode Formol (à préparer extemporanément).

La solution de MIF est préparée à partir d'une solution A de merthiolate-formol et d'une solution iodo-iodurée (lugol) à 5% dite B.

Ainsi, la solution de MIF sera préparée juste avant son utilisation en ajoutant dans un récipient contenant 11,75ml de A, 0,75ml de B.

*Mode opératoire*

- Diluer 1g de selles dans 10 ml du réactif de MIF ;

### *Examens parasitologiques des selles*

- Tamiser (attendre 10 min. pour éviter d'avoir un culot épais par la suite) ;
- Recueillir le filtrat dans un tube à centrifuger à fond conique ;
- Ajouter 1 volume d'éther pour 2 volumes de filtrat ;
- Emulsionner par agitation énergique;
- Laisser reposer 2 min.

Deux cas de figures peuvent se présenter :

- La suspension est homogène et stable (l'éther ne surnage pas). Dans ce cas, centrifuger à 1500-2000 tours / min. pendant 1 min ;
- La suspension est instable (l'éther forme une couche superficielle). Ajouter alors 1 ml d'eau distillée et recommencer l'agitation. Remettre de l'eau jusqu'à obtention d'une suspension stable après 2 min puis centrifuger.

La suite des manipulations est commune aux méthodes diphasiques.

#### *Avantages*

Cette méthode permet de concentrer les œufs de schistosome, d'ascaris, d'*Hymenolepis nana*. Les kystes de protozoaires et les formes végétatives sont bien concentrés et colorés et, ainsi facilement identifiables.

#### *Inconvénients*

Le culot obtenu est souvent important, et le réactif est très salissant.

Des kits prêts à l'emploi de cette méthode sont vendus dans le commerce. Exemple : Iodesine – Color FUMOUCZE®

## **f. Méthode de Thébault simplifiée par Valentin et Solle**

Réactif : solution d'acide trichloroacétique (ATA) formolée. Ether.

Mode opératoire

- Diluer 10 g de selles dans environ 100ml de solution d'acide trichloroacétique ;
- Tamiser et laisser sédimenter 1 min le filtrat ;
- Verser le filtrat dans une ampoule à décanter ;
- Ajouter une quantité égale d'éther;
- Agiter vigoureusement en faisant évacuer l'éther vaporisé par ouverture du robinet tenu en haut ;
- Laisser reposer 2 à 10 minutes avant de retirer le bouchon
- Recueillir la phase inférieure dans un tube à centrifuger à fond conique
- Centrifuger à 2000 tours / min. pendant 1 min.
- Rejeter le surnageant et examiner le culot.

NB : Dans la technique originelle, le culot est repris par une technique de flottation avec une solution bromurée (méthode combinée).



#### Avantages

Plus grande quantité de selles.

Cette technique concentre bien les kystes de petites amibes et en particulier les *Endolimax nana* dont les noyaux deviennent nets (grâce au formol du liquide de dilution). Bonne concentration aussi des kystes de *Pseudolimax butschlii*, *E. histolytica*.

#### Inconvénients

Cette méthode concentre mal les œufs d'helminthes.

Elle consomme beaucoup d'éther.

### 3. Méthodes combinées ou méthodes mixtes

Chaque méthode de concentration proposée présente l'inconvénient d'éliminer des parasites. Elle doit donc être choisie en fonction de ce que l'on recherche préférentiellement. Ainsi, pour avoir plus de chance de retrouver le maximum de parasites dans les selles, les méthodes combinées sont plus intéressantes.

#### a. Technique de Junod

##### Mode opératoire

Cette technique comprend 3 temps :

- Faire une MIF concentration ou une concentration par la méthode de Bailenger : obtention d'un culot de centrifugation épais ;
- Le culot (culot 1) issu de la première étape est repris par 4ml d'une solution de sulfate de zinc (Faust-Ingalls). Après homogénéisation, on centrifuge 1500 tours / min pendant 30 sec. Le surnageant est mis dans un tube à centrifuger. On le dilue au ¼ avec de l'eau distillée. Centrifuger à 1500-2000 tours / min. pendant 1 à 2 min. Examiner le culot.

Résultat : concentration des kystes de protozoaires, des larves d'anguillule, des œufs de trichocéphale, des œufs d'ankylostomides et d'ascaris ;

- Reprendre le culot 2 (obtenu après ajout de sulfate de zinc) dans une solution d'iodomercurate de potassium (Janeckso-Urbanyi).

Résultat : concentration des œufs de schistosomes, des œufs de *Fasciola hepatica* et les embryophores de ténia.

##### Inconvénients

C'est une technique longue avec de nombreuses manipulations. Inconvénients liés à l'utilisation d'une solution d'iodo-mercure.

## b. Technique de Junod modifiée

Réactifs :

Solution de formol diluée à 10%

Éther éthylique

Solution d'iodomercurate de potassium

*Mode opératoire*

- Diluer 2 à 3 noix de selles dans 50ml d'une solution diluée de formol à 10% ;
- Tamiser et transférer dans un tube à fond conique rempli aux  $\frac{3}{4}$  ;
- Rajouter l'éther jusqu'en haut et agiter vigoureusement pendant 30 sec ;
- Centrifuger à 2500 tours / min pendant 3 à 5 minutes ;
- Reprendre le culot par 10ml de solution d'iodomercurate de potassium ;
- Remettre en suspension et centrifuger 30 secondes à 2500 tours / min
- Verser délicatement le surnageant dans un autre tube conique, le remplir d'eau et centrifuger 3 minutes à 2500 tours / min ;
- Vider le surnageant. Examiner le culot.

*Avantages*

Excellente technique pour concentrer et retrouver la plupart des kystes, œufs, larves.

*Inconvénient*

Technique longue qui revient chère.

## C. Techniques spéciales

### 1. Le scotch-test anal de GRAHAM

*Mode opératoire*

- Appliquer un morceau de cellophane adhésive (scotch) au niveau de la marge anale le matin, avant défécation et avant toute toilette intime ;
- Appliquer le scotch sur une lame porte-objet ;
- Examiner au microscope avec peu de lumière.

*Intérêt*

Technique de référence pour la mise en évidence d'œufs d'*Enterobius vermicularis* (oxyure).

On peut rechercher aussi les embryophores de *Taenia saginata*.

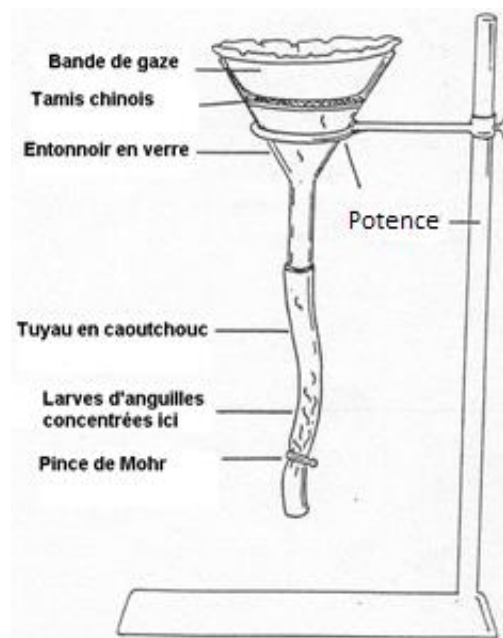
## 2. Méthode de Baermann

### Principe

Les larves d'anguillule ont un thermotropisme et un hygrotropisme positifs. En mettant en contact des selles contenant des larves avec de l'eau chaude, celles-ci seront attirées vers l'eau, où elles seront facilement repérées.

### Mode opératoire

- Disposer 1 carré de gaze double dans 1 passoire à fond conique (type chinois) ;
- Y déposer une noix de selle et la recouvrir ;
- Poser la passoire dans un entonnoir muni d'un robinet. On pourra aussi employer un entonnoir ordinaire se terminant par un tuyau de caoutchouc fermé d'une pince de Mohr ;
- Y mettre de l'eau tiède (40°C) jusqu'à immerger le fond de la passoire. L'eau doit effleurer la selle ;
- Laisser en contact pendant 3 h (24h au maximum). Les larves quittent la selle pour se retrouver dans l'eau tiède ;
- Ouvrir le robinet ou la pince de Mohr pour recueillir le liquide dans un tube à centrifuger à fond conique ;
- Centrifuger à 1500 tr/min pendant 5 min ;
- Examiner le culot entre lame et lamelle.



Source : Melissa B, *The Plants heath*, 2008  
(traduit en français par Menan)

Schéma de la technique de Baermann

*Intérêt*

C'est une technique de recherche des larves d'anguillules et éventuellement les larves d'ankylostomidés (si examen différencié).

Cette technique a été modifiée par l'équipe de parasitologie de l'UFR Sciences Pharmaceutiques d'Abidjan (Kiki-Barro et al., 2017). L'entonnoir en verre et la potence en fer ou en bois ont été remplacés par une petite bouteille d'eau minérale vidée de son contenu. La bouteille est coupée en 2 de façon horizontale au niveau du 1/3 supérieur. La partie inférieure de la bouteille remplace la potence et sert de support tandis que la partie supérieure de la bouteille sert d'entonnoir. C'est une modification qui a été validée après plusieurs tests de concordance et qui donne les mêmes résultats que la méthode originale de Baermann. Cette méthode modifiée présente l'avantage d'un coût extrêmement réduit, et surtout de sa réalisation aisée même dans les campagnes de masse.



Baermann modifié



Baermann classique

### 3. Coproculture

#### a. Coproculture des helminthes

La coproculture des helminthes s'applique à des vers capables d'avoir une évolution larvaire dans le milieu extérieur.

L'indication principale est le diagnostic différentiel des larves d'ankylostomidés : *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichostrongylus sp.*

Elle permet également d'obtenir en grande quantité des larves infestantes pour des essais thérapeutiques.

Elle peut également favoriser le diagnostic biologique de l'anguillulose en cas de paucifestation donnant un test de Baermann négatif.

*Modes opératoires*

Il existe 3 techniques de coproculture des helminthes :

• **Culture sur charbon en boîte de Pétri**

- Mélanger dans un verre à pied une même quantité de selles et de poudre de charbon ;
- Ajouter progressivement un peu d'eau stérile pour former une pâte molle ;
- Verser cette pâte dans une boîte de Pétri en respectant les bords de la boîte et en faisant au centre un petit monticule qui touche le couvercle de la boîte ;
- Mettre à l'étuve 25°C pendant 48h.

La lecture peut se faire selon deux modalités :

- Retourner le couvercle et examiner à la loupe les gouttelettes de liquide présentes sur le couvercle ;
- Ajouter 1 à 2ml d'eau distillée stérile. Prélever le liquide. Centrifuger à 2500 tours / min pendant 5 min. Examiner le culot.

• **Culture sur papier buvard en boîte de Pétri**

- Envelopper 3 lames porte-objets dans 1 papier buvard ou papier filtre sur plusieurs épaisseurs ;
- Déposer ce dispositif dans une boîte de Pétri ;
- Etaler en couche mince 1 à 2g de selles sur la face supérieure du papier ;
- Ajouter 10ml d'eau distillée stérile dans la boîte de Pétri sans noyer la selle ;
- Recouvrir la boîte et la mettre à l'étuve à 25°C pendant 48 h.
- Lecture : 2 modes
  - Enlever le couvercle et rechercher à l'aide d'une loupe les larves dans l'eau.
  - Pipeter le liquide et le mettre dans un tube à fond conique. Centrifuger à 2500 tours / min pendant 5 min. Remettre le surnageant dans la boîte de Pétri et la porter à l'étuve. Lire le culot au microscope.

• **Culture sur papier buvard en tube à essai**

- Découper des languettes de papier buvard de sorte à les faire entrer aisément dans un tube à essai ;
- Étaler une fine couche de selles 1-2g sur toute la longueur du papier sauf aux extrémités (laisser 2-3cm sur chaque extrémité) ;
- Introduire ce papier dans un tube à essai contenant 5ml d'eau distillée stérile sans noyer la selle ;
- Mettre à l'étuve à 25°C en prenant soin de fermer le tube pour éviter la dessiccation ;
- Lecture au bout de 48 h :
  - .retirer le papier buvard;
  - .verser la totalité du liquide dans un tube à fond conique ;
  - .centrifuger et examiner le culot.

**Résultats des coprocultures des helminthes :**

Au 2<sup>ème</sup> jour (48h), on peut retrouver :

- des larves rhabditoïdes d'ankylostomidés;

- des larves strongyloïdes infestantes d'anguillule (cycle externe direct ou cycle court).

Aux 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jours, on recherchera :

- les larves strongyloïdes d'ankylostomidés;
- les larves strongyloïdes d'anguillule (cycle court) ;
- des adultes mâles et femelles d'anguillule (cycle externe indirect).

Du 6<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> jour, l'on peut retrouver :

- les larves strongyloïdes infestantes (enkystées) d'ankylostomidés ;
- les larves rhabditoïdes d'anguillule (2<sup>ème</sup> génération) ;
- les larves strongyloïdes infestantes d'anguillule (2<sup>ème</sup> génération) ;
- les adultes stercoraires d'anguillules.

Tableau 6. 1 : **Avantages et inconvénients des différentes techniques de coproculture des helminthes**

		Avantages	Inconvénients
<b>Boîte de Pétri</b>	<b>Buvard</b>	Liquide clair	Risque d'assèchement
		Grande quantité de selles	Risque d'assèchement
	<b>Charbon</b>	Lecture rapide	Lecture gênée par le charbon : larves « sales »
<b>Tube à essai</b>		Larves propres	Faire plusieurs tubes pour examiner une quantité notable de selles
		Liquide propre	
		Faible risque de séchage	

## b. Coproculture des protozoaires

La culture des protozoaires permet de déceler les parasitoses discrètes et aussi d'identifier de façon plus sûre les parasites intestinaux. Cette technique de culture est mise en œuvre chaque fois que l'examen direct pourra déceler les formes végétatives ou trophozoïtes difficiles à identifier.

La culture des protozoaires nécessite un milieu diphasique de l'institut Pasteur qui est le milieu LAMY.

Ce milieu comporte deux phases :

- un support solide, qui est constitué du sérum de cheval coagulé en position incliné dans un tube à essai ;
- la phase liquide, qui est constituée d'une ampoule contenant du sérum de cheval liquide avec une solution de Ringer et de l'amidon de riz.

*Mode opératoire*

- Au moment de l'emploi, verser dans des conditions de stérilité le contenu de l'ampoule dans le tube de sérum coagulé et réchauffer à 37°C ;
- Ensemencer, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, le fond du tube avec une petite parcelle de matières fécales ;
- Fermer le tube et mettre à l'étuve à 37°C ;
- La lecture se fait au bout de 24 à 48 h.

On recueille quelques grains d'amidon et du liquide que l'on examine entre lame et lamelle au microscope.

En cas de culture négative, prélever quelques gouttes pour ensemencer un nouveau milieu (subculture).

## **4. Recherche d'oocystes de cryptosporidies**

Ce sont des protozoaires que l'on retrouve chez l'homme et chez les animaux. Ils sont responsables de cryptosporidiose qui se manifeste par la diarrhée avec plusieurs selles par jour (selles liquides, pâteuses). L'élimination des oocystes de cryptosporidies se fait par intermittence.

La recherche de ces oocystes se fait après la mise en œuvre de techniques de coloration, notamment la technique de ZIEHL-NEELSEN modifiée par HENRIKSEN et POHLENZ.

### *Mode opératoire*

- Faire un frottis de selles (liquide) ou à partir du culot de Ritchie sur une lame ;
- Sécher à l'air ;
- Fixer au méthanol pendant 5 min ;
- Sécher à l'air ;
- Recouvrir le frottis fixé par la fuschine phéniquée de Ziehl 1h ;
- Rincer à l'eau ;
- Différencier par une solution d'acide sulfurique à 2% : 15-20 secondes ;
- Rincer à l'eau ;
- Recouvrir le frottis par une solution de vert de malachite à 5% pendant 5 min ;
- Rincer à l'eau ;
- Sécher à l'air ;
- Lire au microscope à l'objectif à immersion.

### Résultat

Les oocystes de *Cryptosporidium* sont ronds ou ovoïdes et apparaissent bien colorés en rouge vif sur fond vert avec un cytoplasme granuleux.

Cette technique colore aussi en rouge les oocystes de *Cyclospora* et d'*Cystoisospora belli*.

## D. Technique de numération des œufs d'helminthes : technique de KATO-KATZ

C'est une technique d'examen coprologique décrite en 1954 par KATO et MIURA.

### 1. Principe

La méthode de KATO consiste en l'utilisation du pouvoir éclaircissant du papier cellophane imbibé de glycérine sur un étalement relativement épais de matières fécales.

### 2. Matériel

- spatule et plaques perforées en plastique,
- tamis en nylon,
- lames porte-objets,
- papiers cellophane découpés en rectangle de 25mm sur 30mm,
- papier buvard,
- pincette.

### 3. Réactifs

- glycérine ..... 100ml
- eau distillée ..... 100ml
- vert de malachite 3% .... 1ml

### 4. Mode opératoire

- Au moins 24 heures avant les analyses, des rectangles de cellophane de la dimension d'une grande lamelle de microscope sont immergés dans le mélange glyciné ;
- Prélever les selles et les passer à travers le tamis au moyen d'une spatule afin de séparer la matière fécale des gros débris ;
- Mettre la matière fécale tamisée dans la plaque perforée qui est posée à plat au milieu d'une lame. La partie évidée est entièrement remplie de matière fécale jusqu'à hauteur de la surface de la plaque. La plaque est entièrement retirée ;
- Sur la lame porte-objets, on aura ainsi déposé environ 50mg de selles que l'on recouvre de la lamelle de cellophane égouttée ;



- Après avoir amorcé l'étalement à l'aide d'une pincette, on retourne le tout contre un papier buvard disposé sur une surface plane ;
- A l'aide du pouce, on exerce une pression régulière jusqu'à ce que l'échantillon couvre une aire égale à la surface de la lamelle de cellophane ;
- Le papier buvard adsorbe le liquide d'éclaircissement en excès. On laisse reposer la préparation ;
- L'étalement fécal est alors opaque. Au bout d'un certain temps (15 à 20 min) la préparation a éclairci. Elle est lue au grossissement **x 10** et **x 40**;
- On compte le nombre d'œufs par espèce parasitaire contenu dans les 50mg de matière fécale. Par une règle de trois, on trouve le nombre d'œufs par gramme de selles.

*Remarque :* La méthode que nous venons de décrire est celle de KATO-KATZ qui est une méthode quantitative (technique de numération des œufs d'helminthes). Cependant avec la méthode de KATO, un examen qualitatif simple est possible. Dans ce dernier cas, on prélève une quantité indéterminée de selles (environ 30 à 75mg) qu'on dépose directement sur lame.

## **5. Intérêts**

C'est une technique de concentration et de numération des œufs d'helminthes. La numération des œufs d'helminthes permet de mesurer l'importance d'un portage parasitaire et partant d'apprécier son retentissement physiologique (ex : anémie due aux ankylostomes). Elle permet aussi d'évaluer l'efficacité d'un traitement anthelminthique.

Par sa simplicité de réalisation, son extrême sensibilité, son faible prix de revient, la technique de KATO convient parfaitement pour les enquêtes épidémiologiques.

## **6. Inconvénients**

Elle ne permet pas de voir les formes végétatives et kystiques de protozoaires et les larves d'helminthes. Cette technique n'est pas applicable sur des selles liquides.

## **Bibliographie**

Melissa B, The Plants health, 2008

Kiki-Barro PCM, Aka Hepkangjin J, Kassi FK, Henriette Vanga-Bosson H, Konaté A, Angora EK, Akoua Valérie Bedia-Tanoh AV, Djohan V, Kamagaté T, Sébastien Miezan, N'guessan NA, William Yavo W and Menan EIH. Comparative study between the Baermann conventional and a simplified Baermann devices for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis*. African Journal of Parasitology Research 2017; 4 (5): 219-226.

## **7 EXAMENS PARASITOLOGIQUES DIVERS**

**(Urines, LCR, LBA, expectorations, liquide de tubage duodéнал, produit de ponction de la moelle osseuse, produit de ponction ganglionnaire, biopsie de la muqueuse rectale)**

---

*Rédigé par Pr Boubacar Traoré (Mali), Relu par Pr Solange Isabele Andeme Afene NZENZE (Gabon), Pr Mouctá Diallo (mali)*

## **Introduction**

Les prélèvements parasitologiques divers (urines, LCR, LBA, expectorations, liquide de tubage duodéal, produit de ponction de la moelle osseuse, produit de ponction ganglionnaire, biopsie de la muqueuse rectale) sont réalisés dans des services spécialisés, parfois par le biologiste lui-même. Il est essentiel d'obtenir des prélèvements de qualité pour pouvoir poser au laboratoire un diagnostic adéquat.

Les prélèvements doivent être réalisés avant tout traitement et acheminés au laboratoire dans des conditions appropriées. En tous les cas, le transport est assuré dans des récipients stériles le plus souvent sans fixateur et à +4°C. Les informations cliniques nécessaires doivent accompagner le prélèvement pour mieux orienter le biologiste sur les batteries d'examens à réaliser prioritairement. En effet, un minimum de renseignements cliniques, (en particulier l'âge, la présomption diagnostique, les traitements antérieurement reçus par le malade), doit être transmis au laboratoire.

## **I. Type de prélèvements et préparation du produit biologique**

### **A. Liquide Céphalo-Rachidien (LCR)**

La ponction lombaire est réalisée avec une asepsie rigoureuse. La quantité moyenne de LCR suffisante pour la majorité des examens à réaliser est de 3ml, recueillie dans 3 tubes stériles numérotés 1, 2, 3 servants respectivement à l'examen biochimique, microbiologique et cytologique.

L'acheminement du LCR vers le laboratoire doit se faire sans délai (moins de 30 minutes) en raison de la lyse rapide des polynucléaires (jusqu'à 50% en 2 heures), et à l'abri du froid en raison de la fragilité de certaines germes.

### **B. Expectorations**

#### **1. Liquide de Lavage broncho-Alvéolaire (LBA) (Aspergilloses, Pneumocystose)**

Nous nous intéresserons aux prélèvements des crachats par des moyens naturels (toux et expectorations, crachat induit) mais aussi aux prélèvements invasifs (Lavage broncho-alvéolaire et aspiration bronchique) qui relèvent d'un pneumologue.

Le LBA se pratique à l'hôpital ou en clinique, en consultation ambulatoire ou dans le cadre d'une hospitalisation. Il est généralement réalisé par un pneumologue aguerri à l'aide d'un

fibroscope bronchique. L'examen consiste à introduire une fibre optique stérile dans les bronches du patient, par le nez ou par la bouche (fibroscopie bronchique) après une anesthésie locale, et à instiller du sérum physiologique tiède et stérile dans la bronche concernée. La durée de l'examen est d'environ 30 minutes. Il est le plus souvent bien toléré lorsque l'anesthésie a été correctement menée.

Le LBA est rapidement acheminé au laboratoire ou conservé à +4°C pendant 1 à 2 jours maximum.

## **2. Autres Expectorations**

Dans le cas où il n'existe pas de service spécialisé pour la réalisation du LBA, on peut recourir à l'aspiration bronchique au crachat profond ou au crachat induit.

### **L'Aspiration bronchique (AB)**

Cet examen est également réalisé dans un service de pneumologie à l'aide d'une sonde d'aspiration bronchique adaptée au patient (adulte ou enfant). On introduit délicatement la sonde par le nez à l'aide de compresses stériles, en choisissant la narine la plus perméable : horizontalement jusqu'à la butée des fosses nasales, puis on donne une légère poussée pour boucler un peu la sonde vers le haut et lui permettre de descendre dans le pharynx. La sonde arrive jusqu'au niveau du carrefour pharyngé. On remonte lentement la sonde en aspirant. Après rinçage de la sonde dans un flacon de sérum physiologique stérile ou eau stérile, on obtient un liquide d'aspiration bronchique. Ce liquide est immédiatement envoyé au laboratoire ou conservé à +4°C.

Le liquide d'aspiration bronchique permet d'obtenir des résultats de meilleures sensibilités par rapport au crachat profond mais, il est moins sensible que le LBA dans la recherche des agents fongiques.

## **3. Le crachat profond**

Le crachat profond ou induit est recueilli dans un pot ou un vase stérile après rinçage de la bouche par un antiseptique pour éviter les contaminations. Il est recommandé de pratiquer immédiatement l'examen et la mise en culture, ou en cas d'impossibilité, de conserver le prélèvement au froid.

## **C. Liquide de tubage duodéal**

Le tubage duodéal consiste à introduire une sonde duodénale par voie orale dans le duodénum. On recueille ainsi, le liquide duodéal qui est rapidement acheminé au laboratoire de parasitologie.

## **D. Produit de ponction de la moelle osseuse**

La ponction de la moelle osseuse se déroule sous anesthésie locale dans un service d'onco hématologie, et parfois par le biologiste. Elle se fait au niveau du sternum ou de la crête iliaque (os de la hanche). Chez l'enfant, le prélèvement s'effectue uniquement au niveau de la hanche et peut aussi se faire au niveau de la crête tibiale chez le nouveau-né ou le nourrisson. Ce prélèvement s'effectue avec un trocart muni d'un mandrin. Une fois le trocart en place, le mandrin est retiré et un peu de moelle est aspirée. Des frottis sont réalisés puis acheminés au laboratoire pour réaliser les différentes techniques en vue de l'observation au microscope optique.

## **E. Produit de ponction ganglionnaire**

Il s'agit dans la plupart des cas de ganglions cervicaux. Le biologiste, après avoir nettoyé le ganglion avec un tampon alcoolisé, saisit le ganglion entre le pouce et l'index pour l'immobiliser. L'aiguille tenue de la main droite, doit traverser la peau au centre du ganglion. Le ganglion est malaxé de la main gauche, le suc ganglionnaire monte par capillarité dans la seringue. Le suc ganglionnaire ainsi prélevé est acheminé au laboratoire.

## **F. Urine**

Le prélèvement est réalisé à l'aide d'un cathéter ou collecté après toilettage. On peut ainsi recueillir les urines de 24 heures ou les urines de la première miction du matin. La sensibilité de l'examen pourrait être augmentée par la réalisation d'un massage sous-pubien ou d'un effort physique (sautillements) permettant de décrocher les œufs de Schistosomes de la paroi vésicale. Dans ce cas, on recueille les urines en fin de miction.

Pour la mise en évidence de certaines mycoses urinaires (candidose), le prélèvement d'urines suit les mêmes règles que lors d'un Examen Cytobactériologique des Urines (ECBU).

## **H. Biopsie de la muqueuse rectale**

Le prélèvement est effectué au niveau d'une ulcération en « coupe d'ongles ». Par le tube de l'endoscope, le médecin va passer une fine pince coupante, qui permet de prélever des mini-fragments de muqueuse comportant la sous-muqueuse. Le geste n'est pas douloureux, juste un peu désagréable, et les saignements sont minimes. Le prélèvement est acheminé au laboratoire pour l'examiner au microscope.

## **II. Examen Direct et culture**

Dans la mesure du possible, on procède à la mise en évidence du parasite ou l'agent fongique à partir des prélèvements divers. Cet examen direct apporte dans la plupart des cas

le diagnostic de certitude et permettra d'instituer la mise en route d'un traitement spécifique en attendant les résultats de la culture et de l'identification des agents pathogènes recherchés.

On distingue essentiellement:

- L'examen direct à l'état frais,
- L'examen direct après coloration,
- Culture du champignon et ou du parasite.

## A. En Mycologie

### 1. LCR

- Indications du LCR

Les principales indications de l'examen du LCR dans les maladies fongiques sont :

- Cryptococcose neuro-méningée ;
- Recherche d'antigènes solubles dans la cryptococcose- neuroméningée, les candidoses et les aspergilloses disséminées.

- Description de l'analyse du LCR

Le tube de LCR destiné au laboratoire de microbiologie est analysé **en urgence**. Le tube est centrifugé à 1800 tours/minutes pendant 5 minutes.

Le culot est divisé en deux parties :

- Aspect : On note l'aspect macroscopique et la couleur du LCR (blanchâtre, eau de roche).
- Etat frais : Une goutte du culot est mise sur la lame plus une goutte d'encre de chine diluée au 1/3 dans l'eau distillée ou l'eau physiologique
- Coloration : Frottis coloré au Giemsa ou au May Grunwald Giemsa (MGG) ; numération de la formule leucocytaire en microbiologie.
- Une autre partie sert à ensemencer les milieux de cultures usuels en mycologie :

Gélose Sabouraud–Chloramphénicol-Gentamycine SCG (sans Actidione ou cycloheximide) : 30-37°C

Gélose Sabouraud–Chloramphénicol-Gentamycine- Actidione SCGA (tube témoin négatif) : 30-37°C

Le surnagent est utilisé pour la recherche des antigènes solubles (antigènes capsulaires de type, polysaccharidique). Il s'agit de test d'agglutination à l'aide de latex sensibilisé par des anticorps anti-cryptocoques.

Résultats

**Aspect** : LCR clair avec, en général, une formule mixte ou lymphocytaire (10 à 100/mm<sup>3</sup>) éléments ou Globules blancs avec hyperprotéinorachie et hypo glycorachie. Chez les patients

fortement immunodéprimés (patient au sidéen), la cellularité ainsi que la biochimie du LCR peuvent être normales.

**Etat frais** : présence de levures ovalaires ou plus souvent arrondies bourgeonnantes de 2 à 15µm de diamètre, entourées d'une épaisse capsule polysaccharidique caractéristique. Les levures sont non accolées les unes aux autres. Dans les conditions habituelles, on n'observe pas ni mycélium, ni pseudo mycélium.

**Examen dans une goutte d'encre de Chine** : permet de visualiser la capsule : présence d'une levure entourée d'une large auréole capsulaire (halo clair) de 5 à 10µm d'épaisseur. La capsule est non pénétrée par les particules de l'encre de chine.

**Coloration au Giemsa ou au MGG** : la capsule n'est pas colorée, présence de levures arrondies ou ovalaires bourgeonnantes de 2 à 15µm de diamètre

**Culture** :

La culture pousse facilement en 3 ou 4 jours sur milieu SCG. On observe des colonies blanchâtres qui deviennent rapidement ocre, bombées, lisses, et luisantes. Au bout d'une dizaine de jours ces colonies deviennent humides et coulantes.

## 2. Expectorations

- Indications des expectorations
  - Pneumocystose à *Pneumocystis jiroveci* (anciennement appelé *Pneumocystis carinii*) ;
  - *Aspergillose pulmonaires* ;
  - *Mucor mycoses pulmonaires*.

- Description de l'examen des expectorations

Les prélèvements analysés sont : les crachats profonds ou induits, les aspirations bronchiques (AB) et les lavages bronchio-alvéolaires. Ces prélèvements sont recueillis dans des tubes coniques ou des pots stériles sans fixateurs et acheminés rapidement au laboratoire. En cas de retard dans l'acheminement, le prélèvement peut rester quelques heures voire 24h/48h au réfrigérateur à +4°C.

Au laboratoire, les expectorations sont traitées par un fluidifiant, puis centrifugées à 1800 tours par minute pendant 10 minutes.

Le surnageant est utilisé pour la recherche des antigènes solubles tandis que le culot est divisé en deux parties : une partie est utilisée pour l'examen direct et l'autre partie pour la culture.

**Aspect** : clair, hémorragique ou jaunâtre

**Etat frais** : Une goutte du culot est observée entre lame et lamelle (grossissement 10 X 20 ; 10 X 40).



### Examens parasitologiques divers

*Aspergillus sp* : Il permet la mise en évidence de filaments mycéliens de "type aspergillaire", ils mesurent de 2 à 4 micromètres de diamètre, apparaissent hyalins, cloisonnés, et parfois ramifiés (dichotomie avec angles aigus à 45°).

*Pneumocystis jiroveci* (anciennement appelé *Pneumocystis carinii*) : On peut observer les formes végétatives contenues dans des amas spumeux. La mise en évidence des différents stades est faite après coloration (ce champignon ne se cultive pas).

*Candida sp*

*Mucor sp* (*mucor mycoses pulmonaires*) : présences de filaments non septés, clairs, larges de 15 à 20µm.

#### Coloration

*Aspergillus sp* : On observe des filaments (aspect idem état frais) colorés au Giemsa ou Musto.

*Pneumocystis jiroveci*

MGG : colore les trophozoïtes et les corps intra kystiques mais pas la paroi des kystes. La paroi apparait en négatif dans cette coloration.

Gomori-Grocott modifié ou coloration de Musto : Cette coloration permet de visualiser les kystes groupés en amas. Le kyste mature mûr, élément infectant, mesure 6-8µm.

**Complications** : pneumothorax ou pneumo médiastin (on peut retrouver du *Pneumocystis* dans l'épanchement pleural ou le liquide d'ascite).

**Culture** (Cf. leçons sur les Aspergilloses, candidoses et les mucor mycoses)

## 3. Liquide de tubage duodéal

- Indications du liquide de tubage duodéal

Les principales indications du liquide de tubage duodéal dans les mycoses sont :

- Cryptosporidioses,
- Microsporidioses.

- Descriptions de l'examen du liquide de tubage duodéal

Ce prélèvement est rarement techniqué pour rechercher des agents fongiques. Cependant, chez certains patients immunodéprimés (Sidéens), les biopsies duodénales, jéjunales et iléales permettent de mettre en évidence des oocystes de *Cryptosporidium sp* et des spores de microsporidies (*Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi*).

## 4. Produit de ponction de la moelle osseuse

- Indications de la ponction de la moelle osseuse

Les principales indications de la ponction de la moelle osseuse dans les mycoses sont :

- Histoplasmose,
- Candidose disséminée.

- Description de l'examen de la ponction de la moelle osseuse

L'examen du frottis de moelle coloré au MGG permet de mettre en évidence dans certaines mycoses disséminées les levures (phase levure du champignon dimorphique) de *Histoplasma capsulatum variété dubosii*. Après coloration au MGG, ces levures sont intracellulaires de 5 à 20µm de diamètre, colorées intensément et entourées d'un halo clair avec une base de bourgeonnement étroite.

On peut également observer les levures de *Candida* sp dans les candidoses disséminées.

## 5. Produit de ponction ganglionnaire

La principale indication de l'examen de la ponction ganglionnaire en mycologie est l'histoplasmosse.

L'examen à l'état frais et après coloration du suc ganglionnaire permet de mettre en évidence des levures (phase levure du champignon dimorphique) de *Histoplasma capsulatum variété dubosii*. Après coloration au MGG, ces levures sont intracellulaires de 5 à 20µm de diamètre, colorées intensément et entourées d'un halo clair avec une base de bourgeonnement étroite.

## 6. Urines

- Indications de l'examen des urines

Les principales indications de l'examen des urines dans les mycoses sont :

- Microsporidiose,
- Candidose.

- Description de l'examen d'urine

La recherche par examen direct ou sur culot d'urines centrifugées permet de mettre en évidence des spores de microsporidies (*Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi*) chez les patients VIH positif.

Les colorations spécifiques (Uvitex 2B, Weber) du culot urinaire permettent de mettre plus facilement en évidence les spores de microsporidies.

Dans les candidoses urinaires, on observe, à l'état frais entre lame et lamelle, la présence de levures voire de pseudo-mycélium.

## 7. Biopsie de la muqueuse rectale

Ce prélèvement ne présente pas d'intérêt pour rechercher des agents fongiques.

## B. Parasitologie

### 1. LCR

- Indications du LCR

Les principales indications du LCR dans les maladies parasitaires sont :

- Trypanosomoses humaine Africaine (T HA),
- Hydatidose et Cysticercose,
- Toxoplasmose,
- Amébooses dues aux amibes libres (*Naegleria fowleri*) ou tellurique (*Acanthamoeba sp*),
- Filarioses.

- Description de l'examen du LCR

L'examen du culot du LCR est indispensable. Il permet, dans certains cas, de préciser le stade évolutif de la maladie (Trypanosomoses) et de mettre en évidence le parasite. L'examen du LCR est indispensable pour suivre l'évolution de la maladie après le traitement.

**Aspect :** Clair, hypertendu (Trypanosomoses humaine Africaine, THA ou maladie du sommeil). Présence d'une hyperleucocytose.

Le protidogramme montre une hypoprotidémie avec une hypoalbuminémie et une hypergammaglobulinémie liée à une élévation des IgM sériques : 8 à 16 fois la normale essentiellement dans la THA (mais aussi dans la leishmaniose, le paludisme, schistosomoses).

**Etat frais :**

Les parasites suivants peuvent être observés plus accessoirement dans le culot de centrifugation du LCR. Il s'agit de:

- Trypanosomes sur le culot de centrifugation : formes mobiles promastigotes  
Présence de monocytes et de plasmocytes (cellules de MOTT) avec protoplasme contenant des vésicules hyalines ;
- Scolex et crochets en cas d'hydatidose et de cysticercose (rares) ;
- Trophozoïtes de *Toxoplasma* ;
- Amibes libres (*Naegleria fowleri*) ou telluriques (*Acanthamoeba sp*) : présence de formes végétatives, Trophozoïtes ;
- Microfilaires: plus exceptionnellement.

**Coloration :** Frottis coloré au Giemsa ou au May Grunwald Giemsa (MGG)

Les trypanosomes apparaissent allongés, fusiformes, toujours extra globulaires. Ils présentent un gros noyau arrondi, central ou subcentral avec un kinétoplaste subterminal, tous deux colorés en rouge. Un long flagelle part du kinétoplaste, relié dans sa partie initiale au corps du parasite par une membrane ondulante. Le flagelle est libre dans sa partie distale.

### Examens parasitologiques divers

En raison du polymorphisme, on peut observer des trypanosomes longs, 29 à 42µm, des formes intermédiaires et des formes courtes et trapues sans flagelle (12 à 18 µm).

#### Culture :

Les milieux à ensemercer dépendent des renseignements cliniques et du résultat de l'examen direct à l'état frais et après coloration. La culture est réalisée dans les laboratoires spécialisés.

Les milieux de culture sont :

- Milieu NNN (Novy - Nicole - Mac-Neal) ; milieu de Tobie et Brandt (Trypanosomes, leishmanies) Gélose au sang (leishmanies) ;
- Milieu RPMI, milieux liquides supplémentés d'acides aminés et de vitamines (amibes).

Les résultats sont décevants le plus souvent. Elle est lente et peut nécessiter deux à trois repiquages à une semaine d'intervalle avant de conclure à une négativité. En cas de positivité, on observe les formes végétatives des parasites.

## 2. Expectations

- Indications des expectations

Les principales indications des expectations dans les maladies parasitaires sont :

- Ascarioses et Ankylostomose (helminthiases) ;
- *Larva migrans* viscéral à *Toxocara canis* ;
- Toxoplasmose ; - Hydatidose.

- Description de l'examen des expectations

Les parasites suivants peuvent être observés dans les crachats ou dans les expectations obtenues sous bronchoscopie (AB, LBA)

Aspect : clair, hémorragiques ou jaunâtre

Dans le cadre de certaines helminthiases, on observe un syndrome de Loeffler avec des Infiltrats pulmonaires labiles, une hyper éosinophilie sanguine. Des cristaux de Charcot Leyden sont visibles à l'examen à l'état frais.

Les parasites suivants sont exceptionnellement observés dans les expectations :

- Larves d'*Ascaris lombricoides* (présence exceptionnelle de larves) ; passage pulmonaire des larves 6-10 jours après ingestion ;
- Œufs d'*Ascaris lombricoïdes* (possible impasse parasitaire) ;
- Larves d'*Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Schistosoma* sp- Traversée pulmonaire des larves ;
- *Larva migrans* viscéral à *Toxocara canis* (possible impasse) ;
- Trophozoïtes de *Toxoplasma gondii* : dans les atteintes pulmonaires chez les immunodéprimés ;

- Kyste hydatique : dans l'hydatidose pulmonaire, on peut observer la présence de kyste hydatique avec risque d'ouverture dans les bronches, responsable d'hémoptysie avec présence de débris parasitaires dans les crachats.

### 3. Liquide de tubage duodéal

- Indications du tubage duodéal

Les principales indications du tubage duodéal dans les maladies parasitaires sont :

- Giardiose,
- Distomatoses.

- Description de l'examen du tubage duodéal

L'examen de ce prélèvement permet de mettre en évidence les parasites suivants :

- Forme végétative de *Giardia intestinalis*,
- Œufs de *Fasciola hepatica* voire rarement des formes adultes.

### 4. Produit de ponction de la moelle osseuse

Le myélogramme présente essentiellement un intérêt dans la leishmaniose viscérale.

Cependant, certains parasites sanguicoles peuvent être présents dans la moelle osseuse :  
Trypanosomes ; *Plasmodium* sp.

### 5. Produit de ponction ganglionnaire

- Indications de la ponction ganglionnaire

Les principales indications de la ponction ganglionnaire dans les maladies parasitaires sont :

- Leishmanioses,
- Trypanosomoses.

- Description de l'examen de la ponction ganglionnaire

L'examen du liquide de ponction ganglionnaire entre lame et lamelle et/ou après coloration permet de mettre en évidence les parasites suivants :

- Leishmanies du kala-azar (ponction biopsie et mise en culture)
- Trypanosomiase en phase lymphatico-sanguine,
- *T. gambiense* ou *rhodesiense* dans le suc ganglionnaire,
- *T. cruzi* amastigote dans les ponctions biopsies ganglionnaires.

### 6. Urines

- Indications de l'examen des urines

Les principales indications des urines dans les maladies parasitaires sont :

- Schistosomoses,
  - Filarioses,
  - Trichomonoses.
- Description de l'examen des urines
- L'examen du culot urinaire entre lame et lamelle permet de mettre en évidence les parasites suivants :
- Œufs de *S. haematobium*;
  - Microfilaires de *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* ; *Loa loa*, *Onchocerca volvulus* ;
  - *Trichomonas vaginalis*.

## 7. Biopsie de la muqueuse rectale

L'examen de la muqueuse rectale entre lame et lamelle permet de mettre en évidence les œufs de tous les schistosomoses, y compris ceux de *Schistosoma haematobium*. Cet examen est très fidèle et permet d'obtenir des résultats supérieurs à ceux qu'apporte l'étude des excréta.

## III. Recherche d'antigènes solubles ou circulants

### A. Indications

Le diagnostic direct est souvent peu opérant dans les localisations profondes des mycoses, en particulier chez les patients immunodéprimés (sujets neutropéniques, sidéens, greffés). De plus, la défaillance du système immunitaire rend la recherche d'anticorps peu informative également. Dans ce contexte, la recherche d'antigènes solubles ou circulants devient particulièrement intéressante pour orienter le diagnostic. Dans certains cas, la recherche d'antigène soluble peut être un bon marqueur du suivi thérapeutique.

Les antigènes solubles seront recherchés préférentiellement dans les surnageants des prélèvements suivants :

- LCR (cryptococcose neuroméningée),
- LBA (cryptococcose, Aspergilloses),
- Urines (cryptococcose, Aspergillose).

### B. Techniques

**Principe** : les particules de latex sont sensibilisées par des anticorps monoclonaux dirigés contre un polysaccharide de la paroi fongique : Exemple : galactomanne (*Aspergillus sp*), mannane (*Candida sp*), glucuronoxylomannane et galactoxylomannane (*Cryptococcus*

### *Examens parasitologiques divers*

*neoformans*). Cette réaction antigènes (contenus dans les surnageants des prélèvements) - anticorps est matérialisée par la formation d'agglutinats visibles à l'œil nu.

**Interprétation des résultats :** En fonction des antigènes recherchés, plusieurs tests sont commercialisés avec de bonnes sensibilités et spécificités. Pour éviter des interférences avec le facteur rhumatoïde, les prélèvements sont préalablement chauffés au bain marie à 100°C pendant 10 minutes en présence de pronase. Les seuils de positivité varient en fonction de chaque fabricant.

### **Conclusion**

L'analyse des examens parasitologiques divers (urines, LCR, LBA, expectorations, liquide de tubage duodéal, produit de ponction de la moelle osseuse, produit de ponction ganglionnaire, biopsie de la muqueuse rectale), permet de poser le diagnostic de certitude dans certains cas :

LCR (cryptococcose neuroméningée), LBA (Aspergilloses broncho-pulmonaire), biopsie de la muqueuse rectale (Schistosomoses), ponction ganglionnaire (THA), liquide de tubage duodéal (Giadioses) et ponction de moelle osseuse (leishmanioses viscérales).

La recherche d'antigènes solubles ou d'antigènes circulants à partir des surnageants des urines, LCR et du LBA chez les patients immunodéprimés est intéressante dans certains cas pour orienter le diagnostic et assurer le suivi du traitement spécifique.

## Bibliographie

- Reyes G, Drouhet E.** Distribution des sérotypes de *Cryptococcus neoformans* chez les malades immunodéprimés (SIDA, corticothérapie, etc.) atteints de cryptococcose. *Bull Soc Fr Mycol Méd* 1984; 13: 323- 328.
- Momar Ndao.** Diagnosis of Parasitic Diseases: Old and New Approaches. Academic Editor: Herbert B. Tanowitz, 2009. National Reference Centre for Parasitology, McGill University Centre for Tropical Diseases, Montreal General Hospital, 1650 Cedar Avenue R3-137, Montreal, QC, Canada H3G 1A4
- MULDREW KL.** Molecular diagnostics of infectious diseases. *Current Opinion in Pediatrics*, vol. 21, no 1, pp. 102 – 111, 2009.
- Diagnostic immuno. Livre **Ambroise Thomas.**
- WHO,** Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis (GELF)?  
Method in Malaria Research 6<sup>e</sup> Ed.
- Petithory J.C & Ardoin – Guidon.** Parasites sanguins. Diagnostic Biologique. Cahier de formation. Biologie médicale. N0 23. Décembre 2001.
- Patrice Bourée :** Aide-mémoire de Parasitologie et de Parasitologie tropicale ; Editions Flammarion
- Claude Moulinier :** Parasitologie et mycologie médicale : éléments de morphologie et de biologie
- Kabasawa K, Itagaki H, Ikeda R, Shinoda T, Kagaya K, Fukazawa Y.** Evaluation of a new method for identification of *Cryptococcus neoformans* which uses serologic tests aided by selected biological tests. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2873-2876.



## **8 DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DES PARASITES SANGUICOLES**

---

*Rédigé par Pr Badiane Aïda Sadikh (Sénégal), Relu par Pr Dorkenoo Ameyo Monique (Togo)*

## Introduction

Les parasites sanguicoles se développent dans le sang durant une partie ou la totalité de leur cycle biologique. Ils sont soit intracellulaires, et dans ce groupe sont retrouvés les genres *Plasmodium*, *Babesia*, *Leishmania* et *Toxoplasma*, soit extracellulaires tels que *Trypanosoma*, *Wuchereira*, *Mansonella*, *Loa* et *Onchocerca* (microfilaires). Leur présence dans le sang détermine les techniques utilisées pour leur mise en évidence chez l'hôte.

## I. Plasmodium

### A. Description générale de *Plasmodium* :

Le parasite est intracellulaire chez son hôte vertébré. Il possède un ou des noyaux, un cytoplasme, une vacuole nutritive.

Chez l'hôte vertébré le parasite présente plusieurs stades de développement:

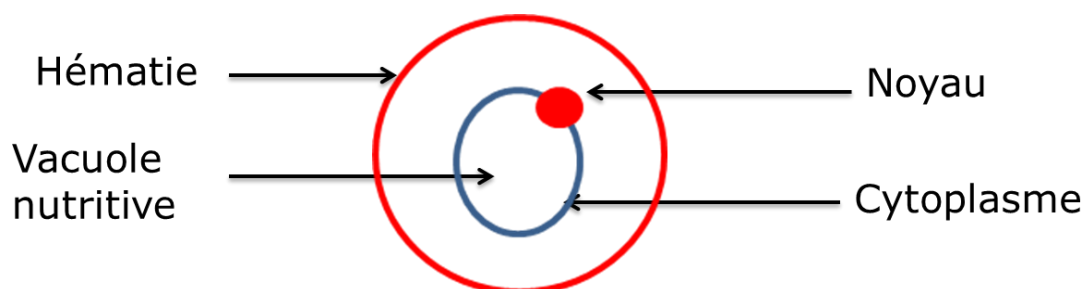
- Sporozoïte, qui est retrouvé dans le foie : c'est le stade infectant pour l'homme (Stade hépatique) ;
- Trophozoïte, Schizonte (encore appelé corps en rosace), Mérozoïtes, qui sont des formes asexuées et les Gamétocytes ; formes sexuées qui sont retrouvées dans le sang (stades érythrocytaires).

Avec la coloration au Giemsa, le noyau prend une teinte rouge et le cytoplasme une coloration bleue.

#### **Trophozoïte:**

Le trophozoïte est le premier stade intra-érythrocytaire de *Plasmodium*. Il présente un stade jeune, qui est annulaire et un stade âgé qui donne les caractéristiques permettant de différencier les espèces de *Plasmodium*.

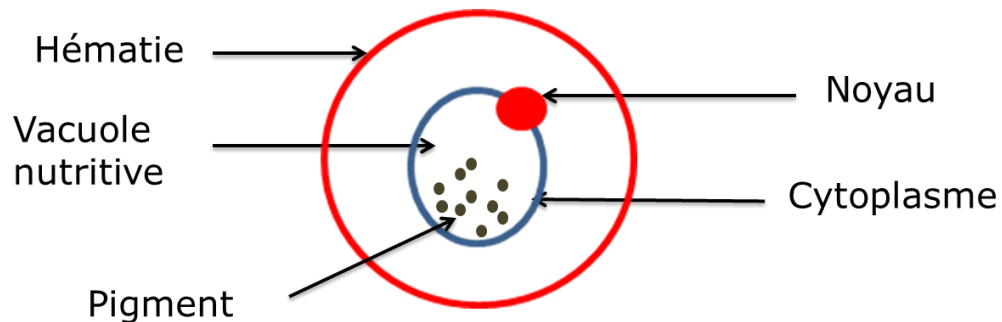
Le stade annulaire possède un noyau jeune, qui est périphérique et un cytoplasme, qui entoure la vacuole nutritive (Figure 8. 1).



(Source : Pr Badiane, laboratoire de parasitologie mycologie, UCAD de Dakar/Sénégal)

Figure 8. 1 : Schéma de Trophozoïte jeune ou stade annulaire de *Plasmodium*

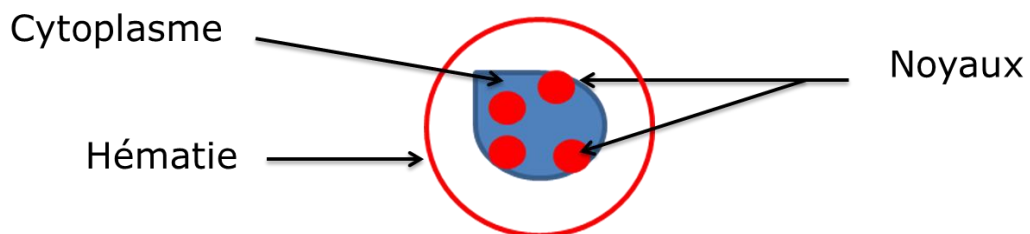
Le cytoplasme du trophozoïte âgé contient un pigment dont la couleur (brun foncé à noir), et la taille (fin à grossiers) dépend de l'espèce de *Plasmodium* (Figure 8. 2).



(Source : Pr Badiane, laboratoire de parasitologie mycologie, UCAD de Dakar/Sénégal)  
Figure 8. 2 : Schéma de Trophozoïte âgé de *Plasmodium*

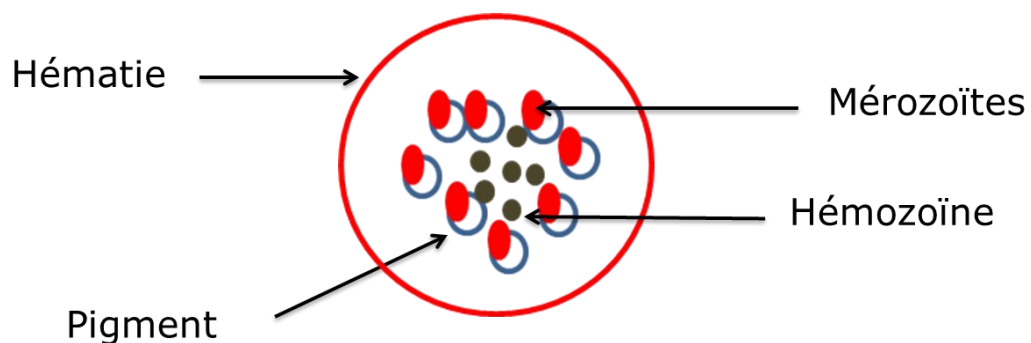
### Schizonte

Les schizontes, présentent des formes jeunes et des formes matures. Les schizontes jeunes possèdent une chromatine peu divisée et 2, 4 ou 6 noyaux d'assez grande taille (Figure 8. 3).



(Source : Pr Badiane, laboratoire de parasitologie mycologie, UCAD de Dakar/Sénégal)  
Figure 8. 3 : Schéma de Schizonte jeune ou immature

Le schizonte mûr est encore appelé « corps en rosace ». Il contient des mérozoïtes qui sont bien formés et dont le nombre et parfois la disposition (*P. malariae*) sont des critères d'identification des espèces de *Plasmodium*. Dans le cytoplasme, il est noté le produit de dégradation de l'hémoglobine ; l'hémozoïne (Figure 8. 4)



(Source : Pr Badiane, laboratoire de parasitologie mycologie, UCAD de Dakar/Sénégal)  
Figure 8. 4 : Schéma de Schizonte mûr de *Plasmodium*

Il faut noter qu'il existe également des trophozoïtes et des schizontes hépatiques présentant la même morphologie que ceux intra-érythrocytaires.

Ce sont les formes intra-érythrocytaires permettant de faire le diagnostic qui seront décrites dans ce chapitre.

Les *Plasmodium* sont des protozoaires dont la forme et les dimensions sont très variables, allant de 01 à 60 microns de diamètre, suivant les stades évolutifs. Certaines de ces formes sont multinucléées et constituent de véritables plasmodes, d'où dérive la dénomination du genre.

La morphologie des formes intra-érythrocytaires, seules utiles au diagnostic parasitologique, est différente selon l'espèce.

## **B. *Plasmodium falciparum***

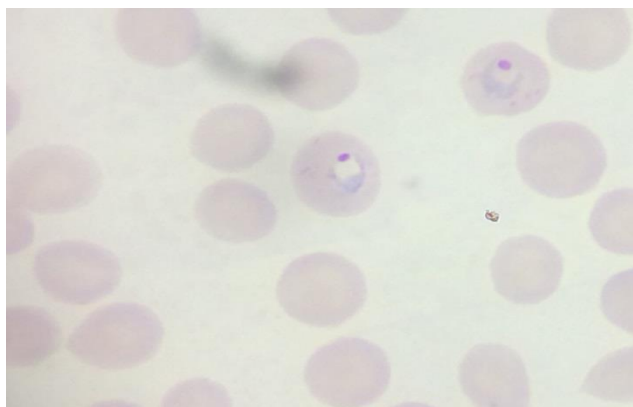
### **Trophozoïte**

Le Trophozoïte est petit, il représente environ 1/5 à 1/3 du diamètre de l'hématie et est souvent au stade d'anneau qui ressemble à une « bague à chaton » (Figure 8. 5).

Le cytoplasme est fin et régulier. Certains trophozoïtes ont un double grain de chromatine avec des noyaux diamétralement opposés ; ce sont des formes en haltère. Le trophozoïte peut être collé à la membrane de l'hématie ; et il est appelé forme marginale. Les hématies parasitées contiennent des taches de Maurer qui sont généralement peu visibles (Figure 8. 7).

Parmi les critères d'identification des espèces de *Plasmodium*, figurent la taille et la forme des hématies parasitées. Ces dernières, lorsqu'elles sont parasitées par *P. falciparum*, sont de taille et de forme normales.

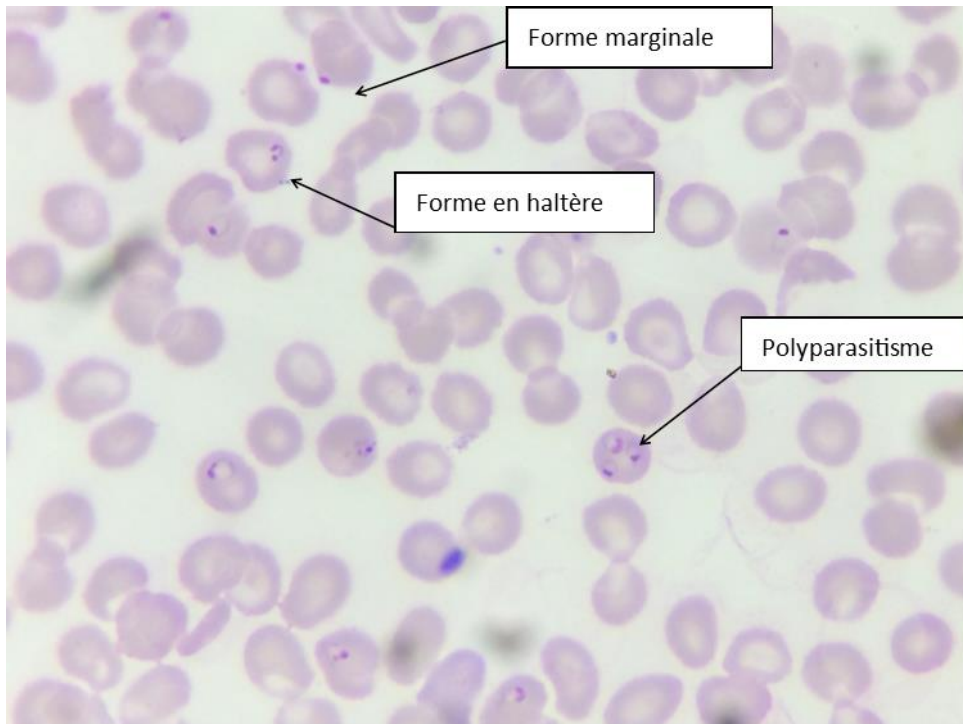
Le polyparasitisme est assez fréquent (plusieurs trophozoïtes parasitent une même hématie) (Figure 8. 6).



Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames

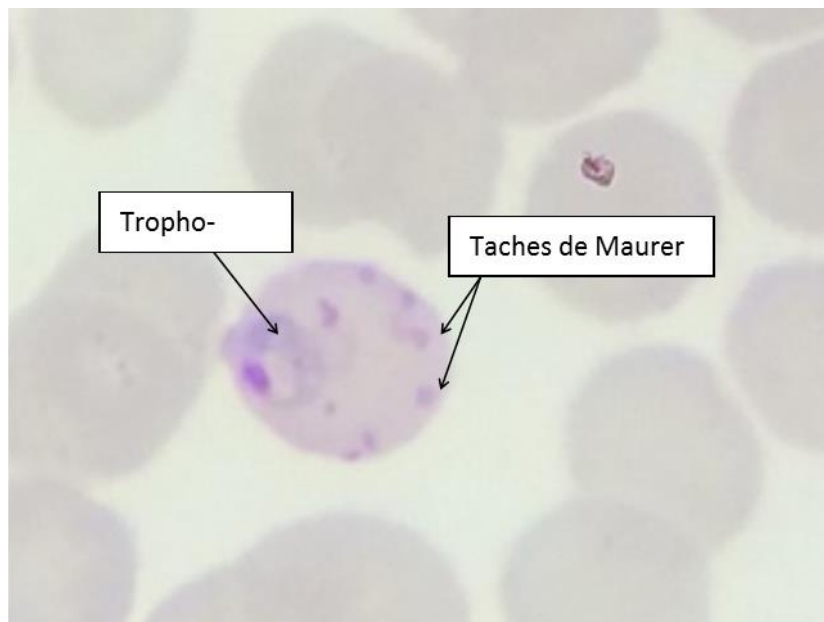
**Figure 8. 5 : Trophozoites de *P. falciparum***

*Description morphologique des parasites sanguicoles*



Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames

**Figure 8. 6 : Polyparasitisme et forme en haltère de *P. falciparum* (trois trophozoïtes dans une hématie)**



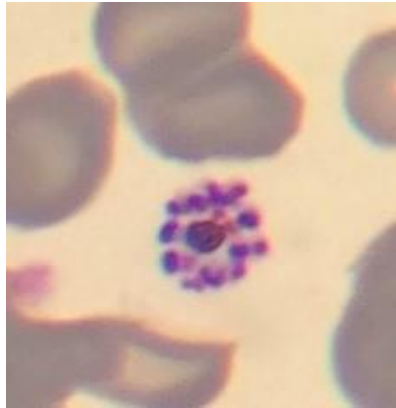
Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames

**Figure 8. 7 : Trophozoïte de *P. falciparum* avec des taches de Maurer**

### **Schizontes**

Ils sont petits et généralement ne remplissent pas tout le globule rouge. Les schizontes contiennent des mérozoïtes groupés dont le nombre varie entre 12 et 30 par schizonte et un pigment unique foncé (Figure 8. 8).

Les schizontes ne sont pas observés (sauf en cas de paludisme grave) dans le sang circulant puisque la schizogonie se déroule dans les capillaires profonds.



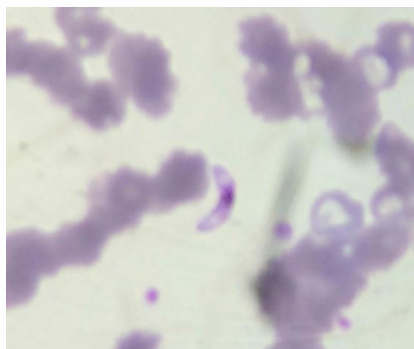
(Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames)

Figure 8. 8 : **Schizonte de *P. falciparum***

### **Gamétocytes**

L'hématie contenant le gamétocyte est déformée; les gamétocytes sont en forme de faux ou en banane (d'où la dénomination de l'espèce) et sont pathognomoniques de l'espèce. Le gamétocyte mâle et le gamétocyte femelle sont différenciables morphologiquement.

- **Le gamétocyte femelle**: il est petit, compact avec un point de chromatine central, avec la coloration de Giemsa. Il apparaît plus bleu et ceci est dû à la présence de matières nucléaires diffusées. Le pigment adhère de près à la chromatine (Figure 8. 9).
- **Le gamétocyte mâle**: il est plus large et plus court, en forme de saucisse. Sa couleur est plus rose avec la coloration au Giemsa, la chromatine est librement dispersée. Il est noté un pigment brun-doré dispersé dans la moitié centrale.



Source Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames

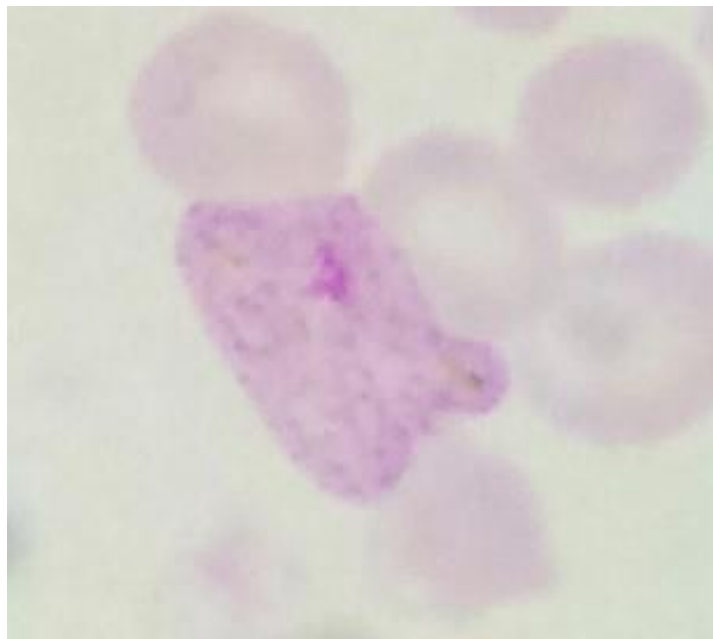
Figure 8. 9 : **Gamétocyte femelle de *P. falciparum***

## C. *Plasmodium vivax*

### Trophozoïte:

Il est plus grand et plus grossier que celui de *P. falciparum* ; il occupe 1/3 à 1/2 du diamètre de l'hématie. Il est retrouvé dans des hématies généralement élargies parfois déformées. Le grain de chromatine est de couleur rouge/magenta. Le cytoplasme est grand, irrégulier, amiboïde et souvent fragmenté. La présence de granulations de Schüffner est fréquemment notée (Figure 8. 10).

Le contour des cellules infectées est lisse, et ceci est un critère important de différenciation entre *P. vivax* et *P. ovale*.



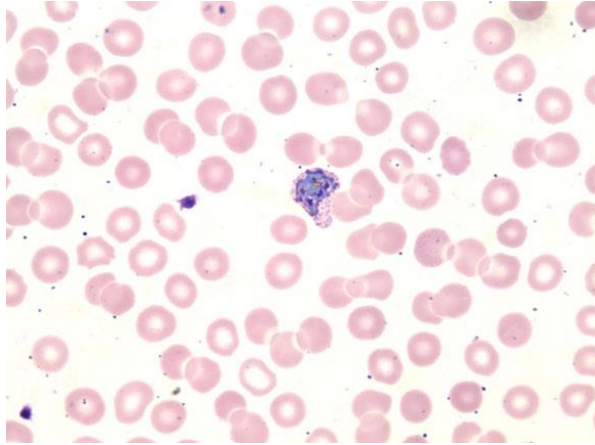
(Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames)

Figure 8. 10 : **Trophozoïte de *P. vivax*** (aspect amiboïde et GR large et déformé, granulations de Schüffner),

### Schizonte

Le schizonte est large et habituellement ; il remplit toute l'hématie qui est agrandie et déformée. Ils contiennent 12 à 24 mérozoïtes groupés irrégulièrement et un pigment éparpillé de couleur jaune-brun (Figure 8. 11).



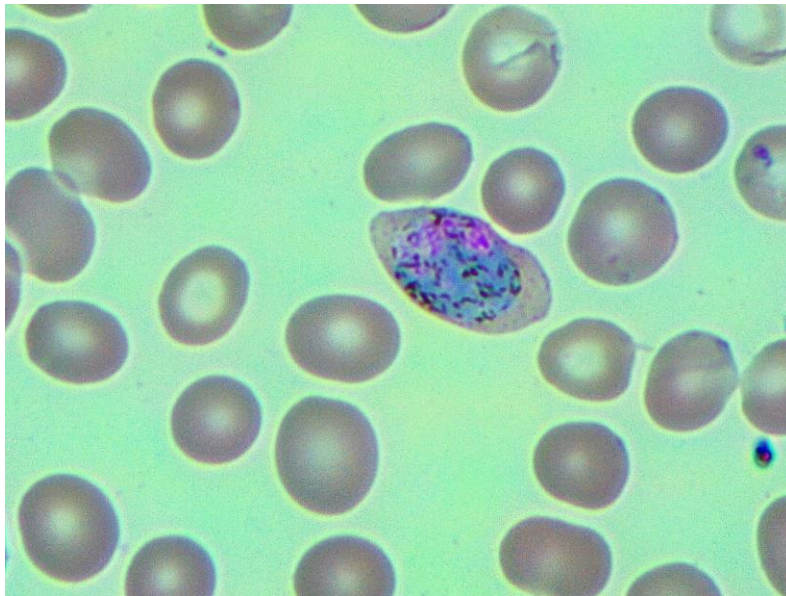


(Source : OMS cours version 3, 2009)

**Figure 8. 11 : Schizonte de *P. vivax***

### **Gamétocytes**

Ils sont de grande taille, de forme ronde ou ovale. Le noyau est généralement retrouvé à la périphérie de l'hématie parasitée, avec une forme souvent angulaire et une chromatine de couleur rouge / magenta. La chromatine est compacte dans le gamétocyte femelle et dispersée dans le gamétocyte mâle. Le pigment est foncé et dispersé donnant une apparence de taches sombres. L'hématie parasitée est de grande taille et parfois déformée (Figure 8. 12).



Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames

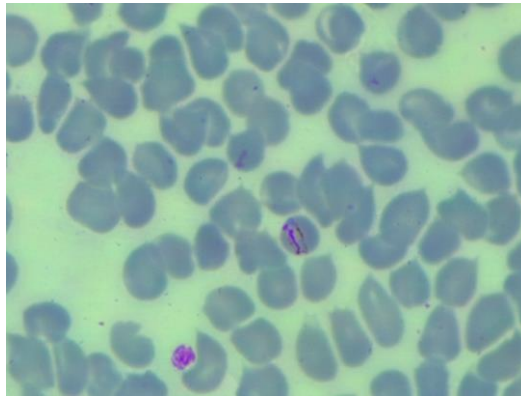
**Figure 8. 12 : Gamétocyte de *P. vivax***



## D. *Plasmodium malariae*

### Trophozoïte:

Il est petit, la forme jeune est annulaire ou arrondie. Ils sont compacts avec parfois la présence d'une vacuole en forme d'œil de poisson ou en forme de panier. Le pigment est dispersé et de couleur jaune-brun. Les trophozoïtes caractéristiques sont en forme de bande équatoriale ou forme quadrilatère (Figure 8. 13). Il existe des granulations de Ziemann qui ne sont pas généralement clairement visibles. Les hématies parasitées sont de taille normale ou apparaissent réduits (GR âgés).

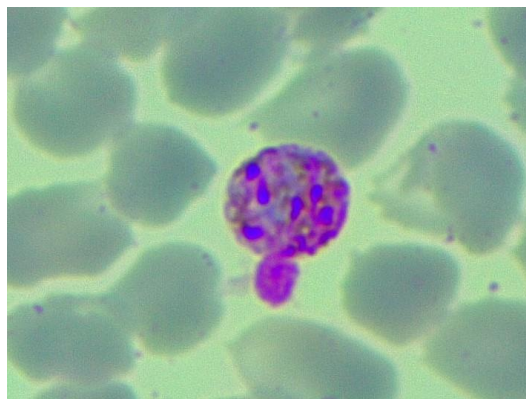


Source Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames

Figure 8. 13 : Trophozoïtes en forme de bande équatoriale de *P. malariae*

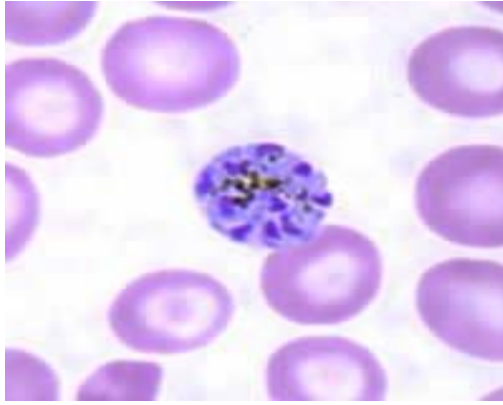
### Schizontes

Ils sont petits compacts et sombres ; ils contiennent 6 à 12 mérozoïtes (Figure 8. 14) pouvant être disposés dans une conformation en rosette ou radiale donnant des « corps en marguerite » (Figure 8. 15). Ils contiennent un pigment concentré au centre de couleur jaune-brun.



Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames

Figure 8. 14 : Schizonte de *P. malariae*



(Source : CDC; Wikimedia Commons)

Figure 8. 15 : **Schizonte de *P. malariae*, «forme en marguerite »**

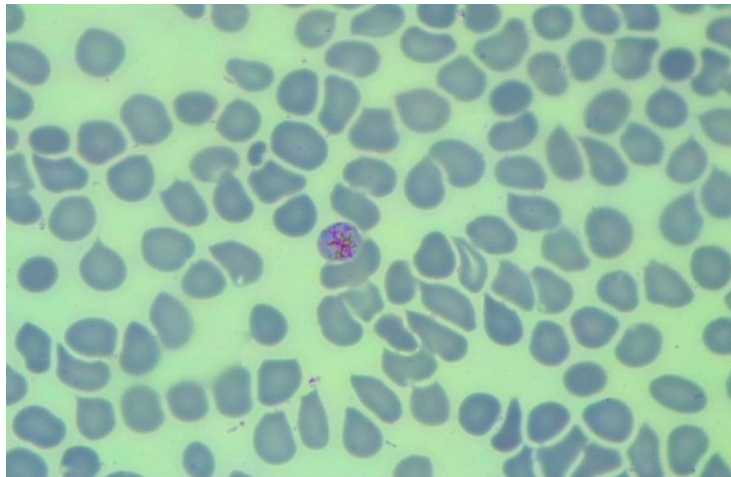
### **Gamétocytes**

Ils sont petits, ronds et compacts, contiennent un pigment grossier, dispersé. Les mâles et les femelles sont très similaires. Ils ressemblent à un trophozoïte mûr. Il existe de nombreuses formes érodées avec une chromatine à une extrémité, le cytoplasme de l'autre et une zone centrale pâle (Figures 8. 16 et 8. 17).



(Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie  
CHU LEDANTEC, Banque de lames)

Figure 8. 16 : **Gamétocyte de *P. malariae***



(Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames)

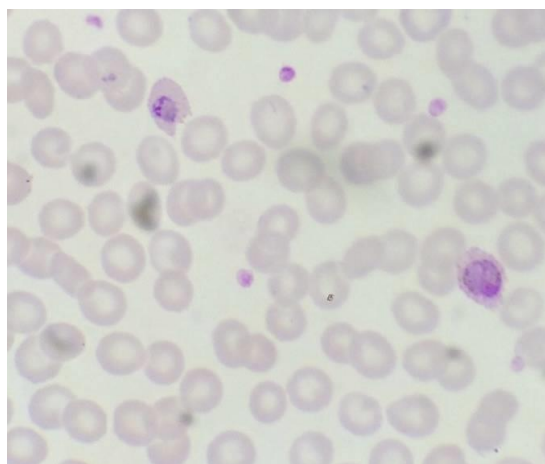
Figure 8. 17 : **Gamétocyte de *P. malariae***

## **E. *Plasmodium ovale***

L'hématie parasitée est agrandie, souvent déformée de forme ovale (ce qui est à l'origine de la dénomination de l'espèce), l'aspect est en comète avec des extrémités frangées. Elles contiennent des granulations de James qui sont plus grossières que celles de Schüffner avec lesquelles elles étaient confondues auparavant.

### **Trophozoïte :**

Il est de grande taille, avec un grain de chromatine volumineux et de couleur rouge/magenta. Le cytoplasme est rond, ovale parfois légèrement incurvé. La forme en anneau est ronde et compacte (Figure 8. 18).



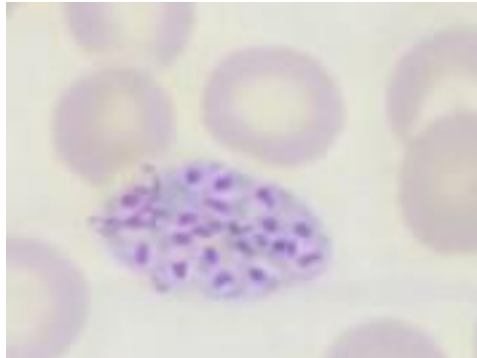
(Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames)

Figure 8. 18 : **Trophozoïtes de *P. ovale***

### **Schizontes**

### *Description morphologique des parasites sanguicoles*

Ils sont de forme ronde ou ovale avec un grain de chromatine grossier. Ils possèdent 4 à 12 mérozoïtes. Les hématies parasitées contiennent des granulations de James souvent visibles et un pigment brun foncé. Les schizontes jeunes sont amoeboïdes (Figure 8. 19).

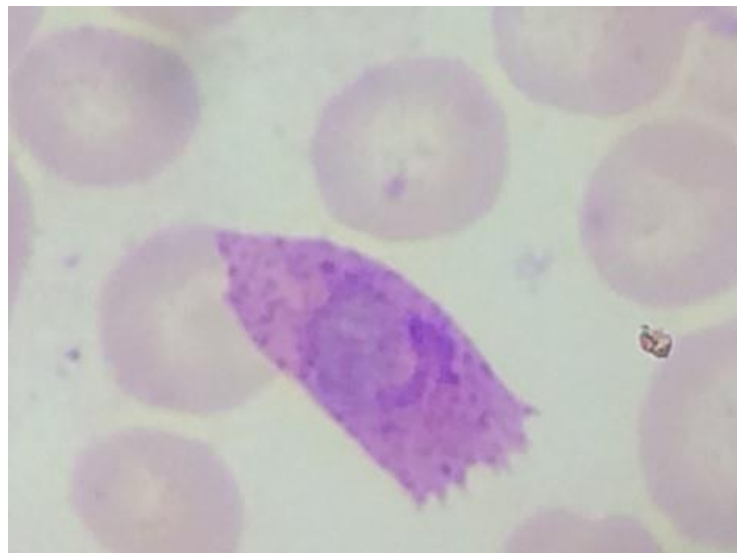


(Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames)

**Figure 8. 19 : Schizonte de *P. ovale***

### **Gamétocytes**

Ils sont arrondis ou ovalaires contenus dans des hématies souvent déformées en comète avec des extrémités frangées. Des granulations de James peuvent être observées avec une chromatine périphérique pour le gamétocyte femelle et plus diffuse pour le gamétocyte male. Le pigment est brun et dispersé (Figure 8. 20).



(Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames)

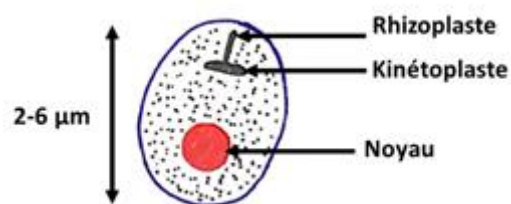
**Figure 8. 20 : Gamétocyte de *P. ovale* avec des bords frangés**

## II. Leishmanies

Les leishmanies sont des protozoaires transmis à l'homme par la piqûre d'un insecte hématophage, le phlébotome, et sont responsables de leishmanioses. Les leishmanies existent sous deux formes : une forme amastigote qui est intracellulaire et retrouvée chez le l'hôte vertébré et une forme promastigote chez le vecteur qui est le phlébotome.

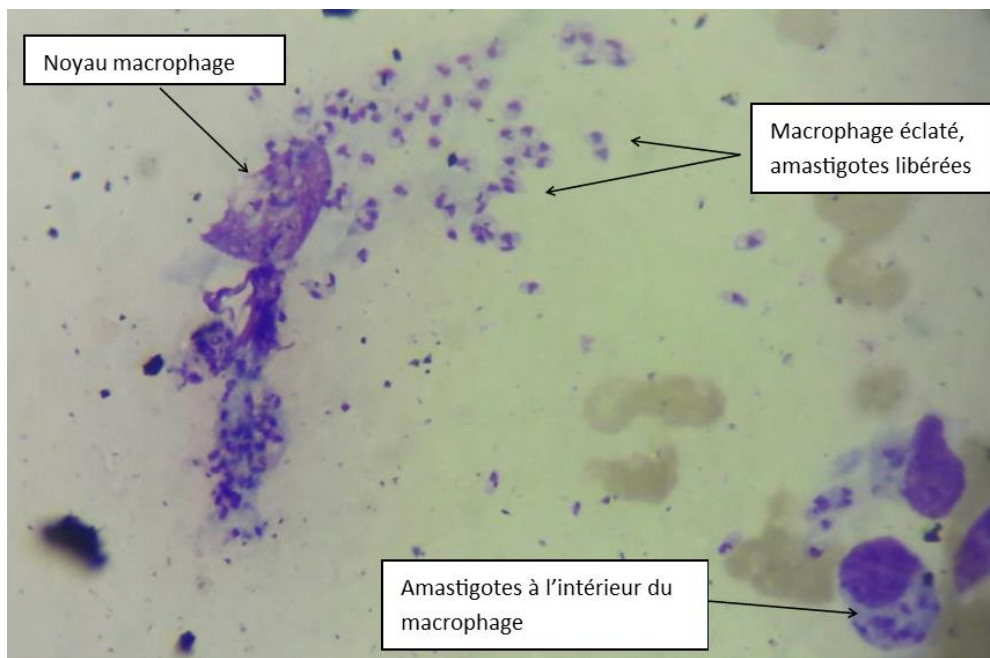
### Amastigote:

Il est ovoïde, mesure 2 à 6  $\mu\text{m}$  de diamètre. Il possède un gros noyau périphérique, un blépharoplaste en forme de bâtonnet, un flagelle interne appelé rhizoplaste (Figure 8. 21). La forme amastigote est intracellulaire et retrouvée dans les monocytes, les cellules du système phagocytaire mononuclée et les macrophages de la peau (Figure 8. 22).



Source: Vanga et Konaté, Laboratoire de parasitologie UFR SPB - Université FHB - Abidjan

Figure 8. 21 : Schéma de la forme amastigote de Leishmanie



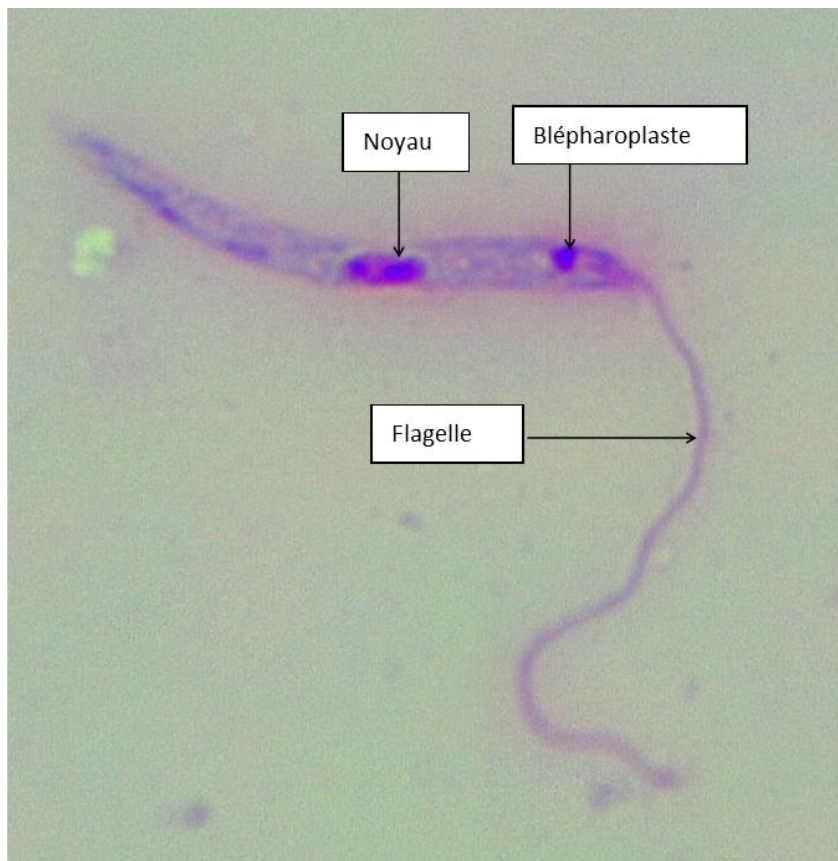
Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames

Figure 8. 22 : Forme amastigote de Leishmanie (provenant d'une forme cutanée)



**Promastigote:**

Elle est allongée mesure 10 à 25µm de long. La forme promastigote possède un noyau central, un blépharoplaste situé en avant du noyau, un flagelle antérieur libre qui assure la mobilité de cette forme (Figure 8. 23). Cette forme est retrouvée dans le tube digestif de l'insecte vecteur; le phlébotome. Elle est également retrouvée en culture dans le milieu de Novy, Nicolle et Mc Neal (NNN).



(Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames)

Figure 8. 23 : **Forme promastigote en culture sur milieu NNN**

### III. Trypanosomes

Les trypanosomes se présentent sous quatre formes:

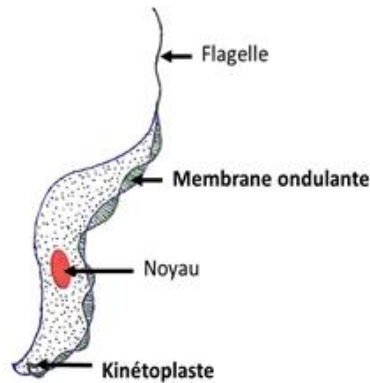
- Chez les vertébrés (l'homme ou animal), sont retrouvées les formes trypomastigote (*T. brucei* et *T. cruzi*) et amastigote (*T. cruzi*) ;
- Chez l'invertébré, le vecteur, les formes épimastigotes et trypomastigotes sont retrouvées pour *T. cruzi* et *T. brucei*.
- En milieu de culture sont retrouvées les formes promastigotes de *T. cruzi* et *T. brucei*.

**Forme Trypomastigote**

Elle est allongée et fusiforme, mesure 20 à 40µm de long / 2 à 3µm de large. La forme trypomastigote possède un noyau généralement en position centrale. Dans la partie postérieure, se trouve le kinétoplaste et le blépharoplaste sur lequel s'insère le flagelle. Le

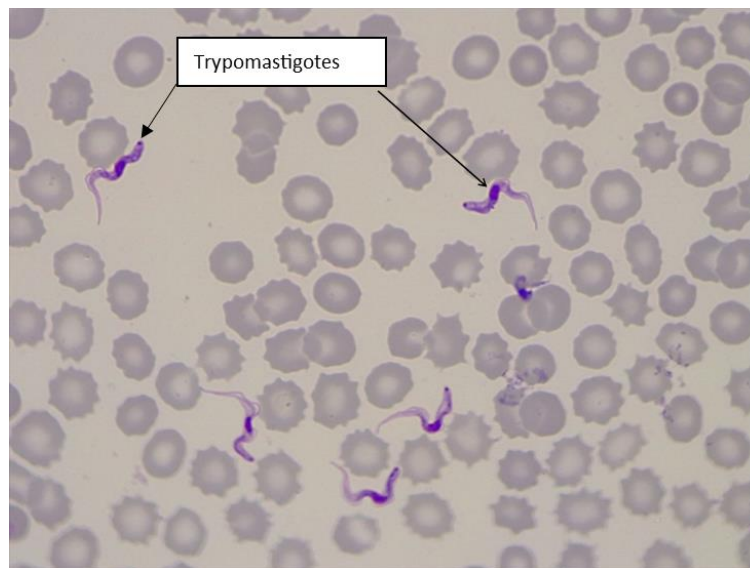
## Description morphologique des parasites sanguicoles

flagelle est dirigé vers l'extrémité antérieure et décrit une membrane ondulante sur tout le corps du parasite avant de devenir libre et former le flagelle proprement dit. Il existe des formes longues et minces qui mesurent 20 à 40µm, des formes courtes et trapues mesurant 10 à 20µm et des formes intermédiaires mesurant 20 à 30µm. La forme trypomastigote est très mobile. Elle est extracellulaire (Figures 8. 24 et 8. 25).



(Source : Vanga et Konaté, Laboratoire de parasitologie UFR SPB - Université FHB - Abidjan)

Figure 8. 24 : Schéma de la forme trypomastigote



(Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU LEDANTEC, Banque de lames)

Figure 8. 25 : Forme trypomastigote X40

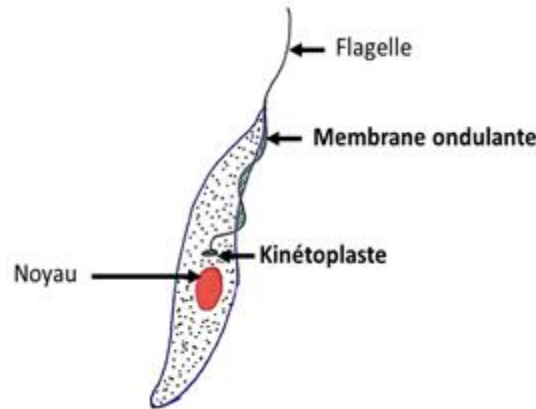
### Amastigote

Elle est ovale ou arrondie et mesure 2 à 5 µ de diamètre. Son noyau est gros, et il est souvent refoulé vers la périphérie. Son blépharoplaste a l'aspect d'un bâtonnet sur lequel s'insère une racine de flagelle intracytoplasmique qu'on appelle le rhizoplaste. Cette forme est immobile et souvent intracellulaire (voir Leishmanie).

Elle est retrouvée chez *T. cruzi* appelé *Schizotrypanum cruzi* qui présente deux sous genres : *T. C. cruzi* et *C. marinkellei*.

**Epimastigote:**

Elle est allongée et fusiforme, mesure 20 à 40µm de long sur 2 à 3µm de diamètre, possède un noyau central, un blépharoplaste situé au-dessus du noyau, de sorte que la membrane ondulante très réduite. Elle vit dans le tube digestif des insectes et est également très mobile (Figure 8. 26).



(Source : Vanga et Konaté, Laboratoire de parasitologie UFR SPB - Université FHB - Abidjan)

Figure 8. 26 : Schéma de la forme Epimastigote de *Trypanosoma*

## IV. Toxoplasmes

*Toxoplasma gondii* existe sous plusieurs formes : Tachyzoïte, bradyzoïtes, kyste et oocyste. Les trois premières formes permettent de poser le diagnostic chez l'immunodéprimé.

- **Une forme végétative appelée tachyzoïtes ou trophozoïte**

Elle a une forme d'arc ou de croissant et mesure 5 à 8 microns de long sur 3 à 4µm de large. Leur extrémité postérieure est arrondie, alors que l'extrémité antérieure est plus effilée (pôle apical) (Figure 8. 27).

Le tachyzoïte est intracellulaire et se localise dans les macrophages (Figures 8. 28 ; 8. 29). Il se multiplie par scissiparité ou par endodyogénie.

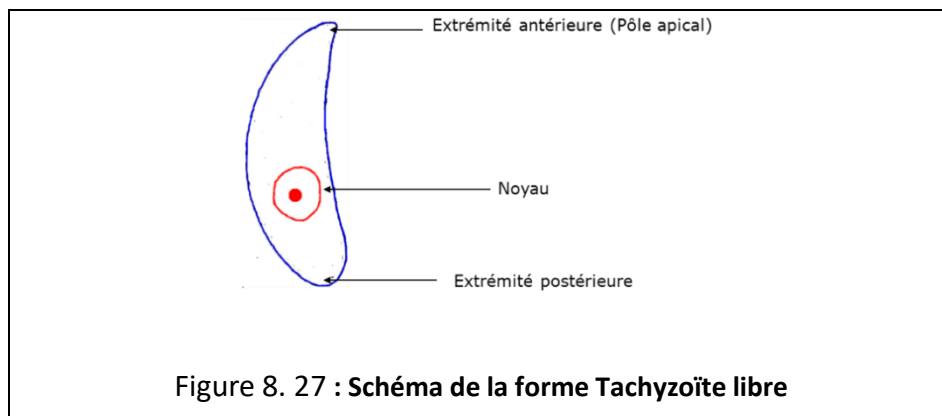
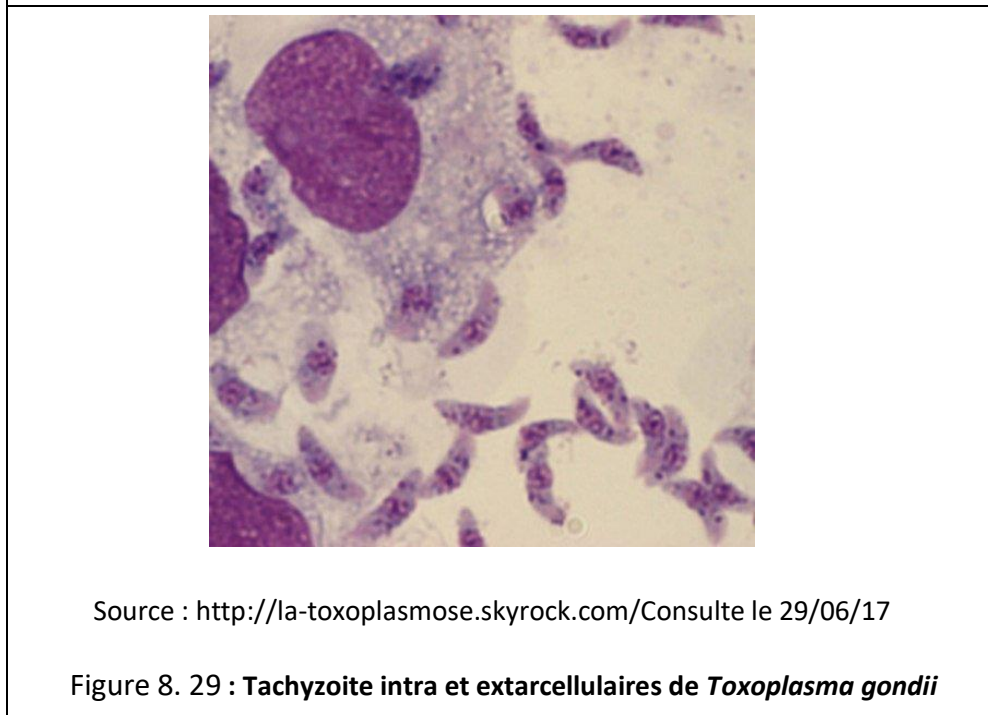
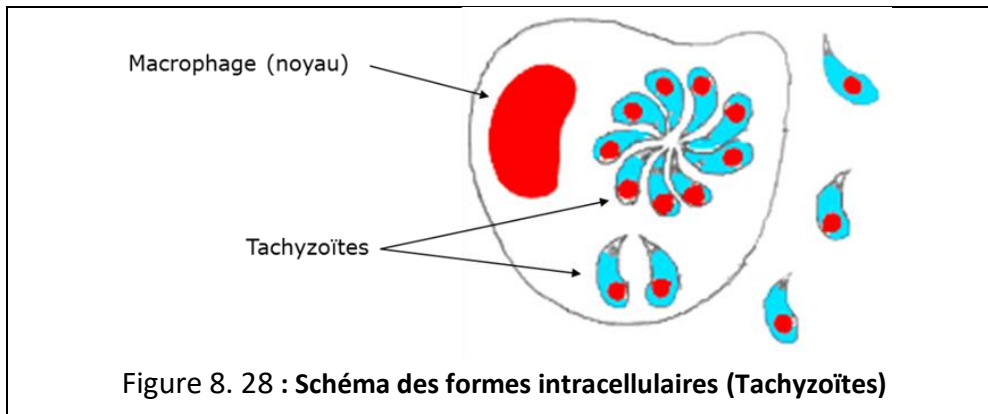


Figure 8. 27 : Schéma de la forme Tachyzoïte libre





#### - Les kystes tissulaires

Ils sont sphériques ou ovoïdes, entourés par une membrane épaisse et mesurent 100 à 200 microns, contiennent un gros noyau refoulé vers la périphérie. Ils contiennent 2000 à 3000 bradyzoïtes qui ont une structure voisine des tachyzoïtes (Figures 8. 30; Figure 8. 31).

Les kystes sont particulièrement abondants dans les tissus pauvres en anticorps, en particulier, dans le système nerveux, l'œil et les fibres musculaires (muscles squelettiques et myocarde). Ils mènent une vie ralentie et peuvent persister pendant de nombreuses années, et parfois toute la vie.

Description morphologique des parasites sanguicoles

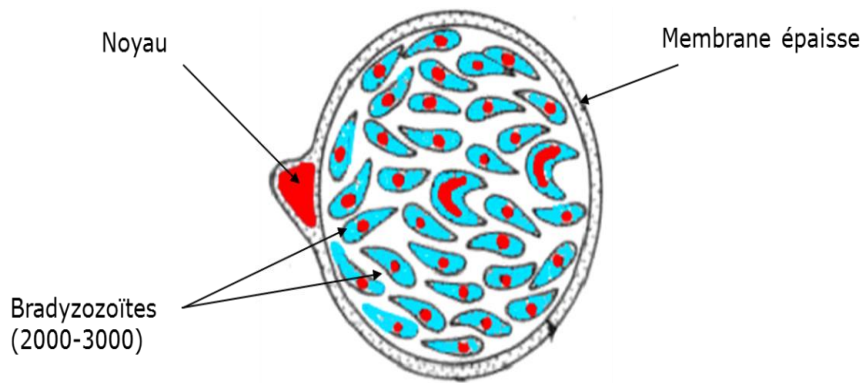
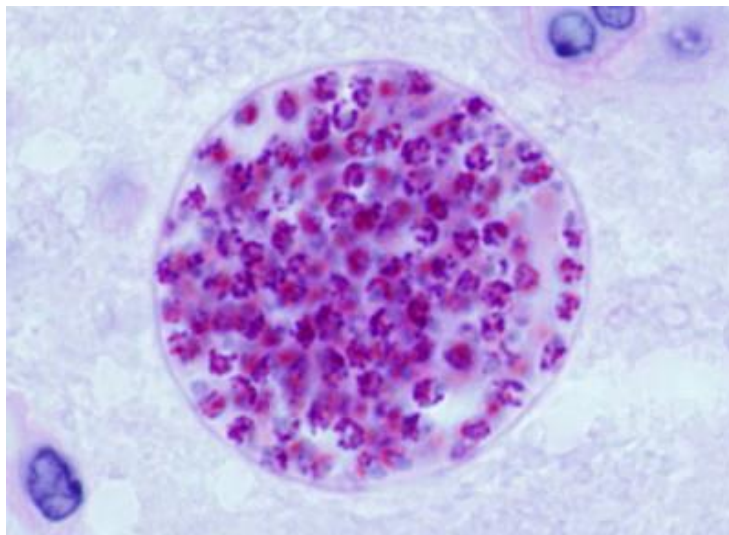


Figure 8. 30 : Schéma de kyste tissulaire



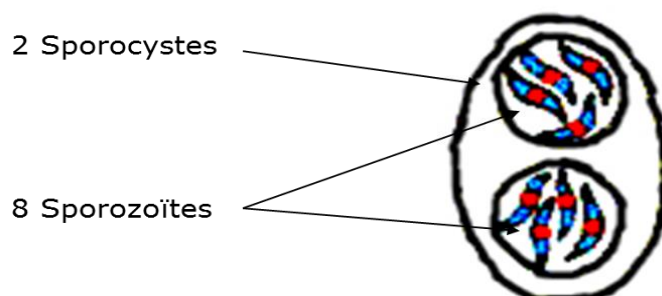
Jitinder P. Dubey

Figure 8. 31 : Kyste de *Toxoplasma gondii* dans le tissu cérébral d'une souris.

- L'oocyste

Il est arrondi ou ovalaire et mesure 5 à 20 microns de diamètre. A maturité, il contient 2 sporocystes renfermant chacun 4 sporozoïtes (Figure 8. 32).

Ils sont très résistants dans le sol et peuvent rester contaminants pendant plusieurs mois. Ils sont détruits par la cuisson de la viande à 65°C ou une congélation inférieure à -12°C pendant 3 jours au moins.



(Source : Pr Badiane, laboratoire de parasitologie mycologie, UCAD de Dakar/Sénégal)

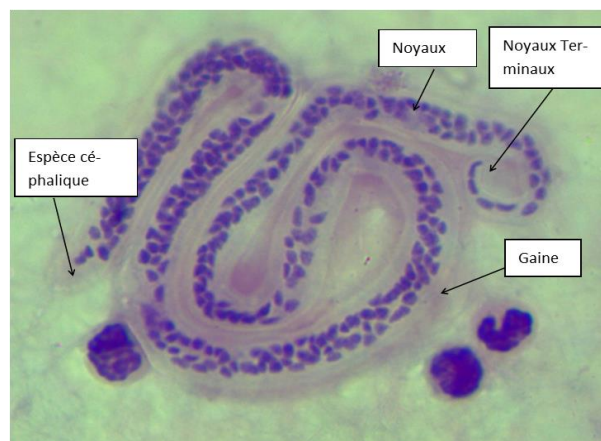
Figure 8. 32 : Schéma de la forme oocyste

## V. *Loa loa*

Les filaires adultes sont des vers filiformes cylindriques, blancs, opalins, à tégument lisse parsemé de petites bosses arrondies.

Les mâles mesurent 3cm de long et les femelles atteignent 6cm de long.

Les embryons ou microfaires mesurent 300µm de long sur 8µm de large. Ils sont pourvus de gaine qui est peu colorée par le Giemsa. L'espace céphalique est long, les noyaux somatiques sont gros et ovoïdes. Il possède un corps de Manson encore appelé corps interne qui est non coloré. L'extrémité postérieure est effilée et contient des noyaux terminaux (Figure 8. 33). La microfilaire a une périodicité diurne.



(Source : UCAD, Laboratoire de Parasitologie Mycologie, Dakar/Sénégal)

Figure 8. 33 : Microfilarie de *Loa loa* X100

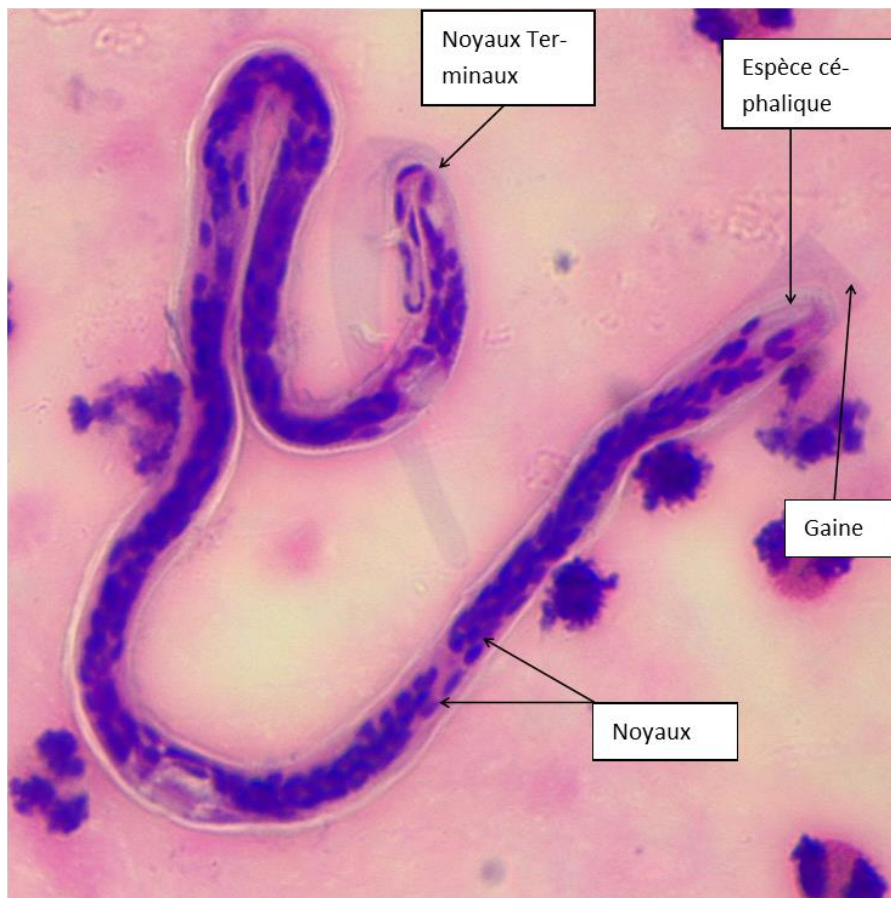
## VI. *Wuchereria bancrofti*

Ils présentent deux stades: adultes et microfaires ou larves

**Adultes:** Ils sont de petits vers blancs, translucides, ayant l'aspect de catguts fins. Le mâle mesure 4cm avec une extrémité postérieure enroulée, la femelle atteint 10cm, leur diamètre est le 1/400 de leur longueur.

**Microfaires ou larves:** Elles mesurent 300µm de long sur 8µm de diamètre ; l'espace céphalique est court et mesure 4µm, l'extrémité caudale est effilée sans renflements. La coloration au Giemsa du corps interne ou corps de Manson montre un vermillon unique. Les

noyaux somatiques sont petits et séparés. L'extrémité postérieure est effilée avec des noyaux subterminaux (Figure 8. 34). Ces microfaires ont une périodicité nocturne, c'est-à-dire qu'elles sont retrouvées dans le sang pendant la nuit.



(Source : UCAD, Laboratoire de Parasitologie Mycologie, Dakar/Sénégal)

Figure 8. 34 : **Microfilarie de *W. bancrofti* X100**

## **VII. *Brugia malayi***

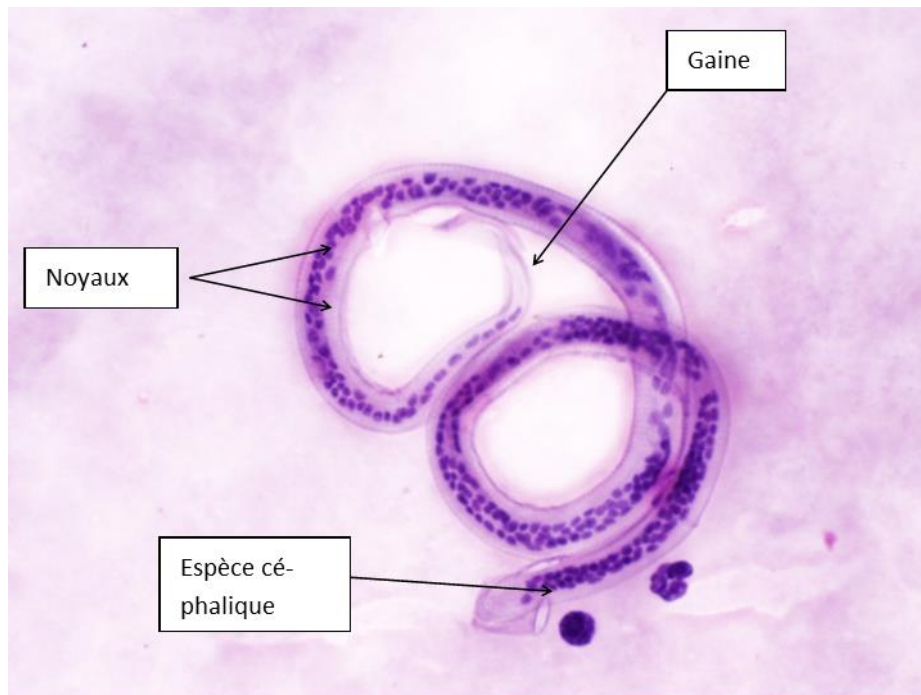
Ils présentent également deux stades ; adulte et microfaires ou larves ou encore embryons.

**Adultes:** Ils sont semblables à ceux de la filaire de bancroft.

**Microfaires ou larves ou embryons:** elles sont légèrement plus petites que celles de la filaire de bancroft; elles mesurent 200 à 240 $\mu$ m de longueur, sur une largeur de 6 à 8 $\mu$ m. Elles possèdent un espace céphalique un peu plus long (6 $\mu$ m) et deux renflements (sub-terminal et terminal) de l'extrémité caudale. Les noyaux somatiques sont petits, ovoïdes et serrés. Le corps de Manson est coloré au Giemsa et apparait divisé en 3 masses visibles.

### Description morphologique des parasites sanguicoles

L'extrémité postérieure possède deux renflements, et contient 1 noyau terminal, et un noyau subterminal (Figure 8. 35). Les microfilaires ont une périodicité nocturne.



Source: <http://parasitewonders.blogspot.sn/2010/08/case-of-week-129.html>  
Consulte le 29/06/17

Figure 8. 35 : Microfilaire de *Brugia malayi*

## VIII. *Onchocerca volvulus*

Ils présentent également deux stades ; adulte et microfilaires ou larves ou embryons.

### Vers adultes :

Ils sont encore appelés onchocerques et se présentent sous la forme d'un ver effilé blanc - opalin -, transparent. La cuticule est striée transversalement.

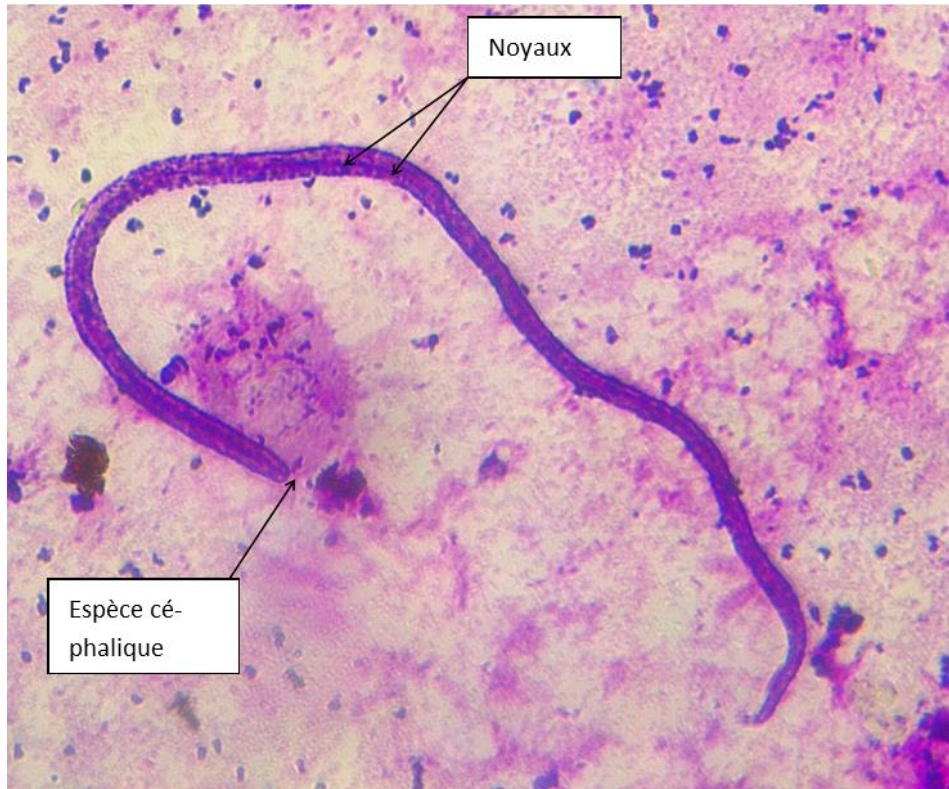
Le mâle mesure 3cm de long avec une extrémité postérieure enroulée. Il possède deux spicules inégaux.



La femelle est beaucoup plus longue, elle mesure 70cm de long.

### Microfilaires

Elle mesure 300 $\mu$ m de long / 8 $\mu$ m de large, dépourvue de gaine. Les noyaux somatiques sont gros et serrés, l'espace céphalique est long. Le corps de Manson est non coloré. L'extrémité postérieure possède des noyaux subterminaux (Figure 8. 36). Les microfilaires sont retrouvées dans le derme sans aucune périodicité.



(Source : UCAD, Laboratoire de Parasitologie Mycologie, Dakar/Sénégal)

Figure 8. 36 : Microfilarie d'*O. volvulus* X 40

## IX. *Mansonella*

Ils présentent également deux stades ; adulte et microfilaires ou larves ou embryons.

Leur pathogénicité n'est pas reconnue, mais il est important de savoir les identifier pour les différencier des autres filaires pathogènes. Il en existe plusieurs espèces.

Les microfilaires de *Mansonella* sont plus petites que celles des autres espèces de microfilaires pathogènes ; elles mesurent 200 $\mu$ m de long sur 5 $\mu$ m de diamètre. Elles ne

### Description morphologique des parasites sanguicoles

possèdent pas de gaine. L'espace céphalique est très court. Les noyaux somatiques sont petits et serrés pour *M. perstans* et *M. ozzardi* et gros et espacés pour *M. streptocerca* (Figure 8. 37).



(Source : UCAD, Laboratoire de Parasitologie Mycologie, Dakar/Sénégal)

Figure 8. 37 : Microfilarie de *M. perstans* X 100I

Tableau 8. 1: Caractères différentiels des microfilaires

	Micro filaire	Taille $\mu\text{m}$	Gaine	Espace Céphalique	Noyaux	Corps de Manson	Période	Extrémité postérieure
<b><i>B. malayi</i></b>	Sang	250-300/6-8	Oui	Long	Petits ovoïdes serrés	Visible, 3 masses	Nuit	2 renfl, 1 nyx terminal, 1 subterminal
<b><i>Loa Loa</i></b>	Sang	300 / 8	Oui peu coloré	Long	Gros, ovoïdes	Non coloré	Jour	Effilée nyx terminaux
<b><i>W. bancrofti</i></b>	Sang	300 / 8	Oui	Court	Petits, séparés	Visible unique	Nuit	Effilée, nyx subterminaux
<b><i>M. perstans</i></b>	Sang	200 / 5	Non	Très court	Petits, serrés	Non coloré	Sans	Doigt de gant, nyx terminaux
<b><i>M. ozzardi</i></b>	Sang / Derme	200 / 5	Non	Très court	Petits, serrés	Non coloré	Sans	Très effilée, nyx terminaux
<b><i>M. streptocerca</i></b>	Derme	200 / 5	Non	Très court	Gros, espacés	Non coloré	Sans	En crosse d'évêque, nyx terminaux
<b><i>O. volvulus</i></b>	Derme	250-300 / 10	Non	Long	Gros, serrés	Non coloré	Sans	Nyx subterminaux

### Conclusion

Les parasites sanguicoles sont très fréquents en zone tropicale et intertropicale. Leur mise en évidence dans le sang par les techniques parasitologiques nécessite une bonne connaissance de leur morphologie.



## **9 DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DES PARASITES INTESTINAUX ET URO-GÉNITAUX**

---

*Rédigé par Pr Tine Roger (Sénégal), Relu par Pr Badiane Aïda Sadikh (Sénégal),  
Pr Ndiaye Jean Louis Abdourahim (Sénégal) et Pr Dorkenoo Ameyo Monique (Togo)*

## Introduction

# I. Morphologie des parasites intestinaux

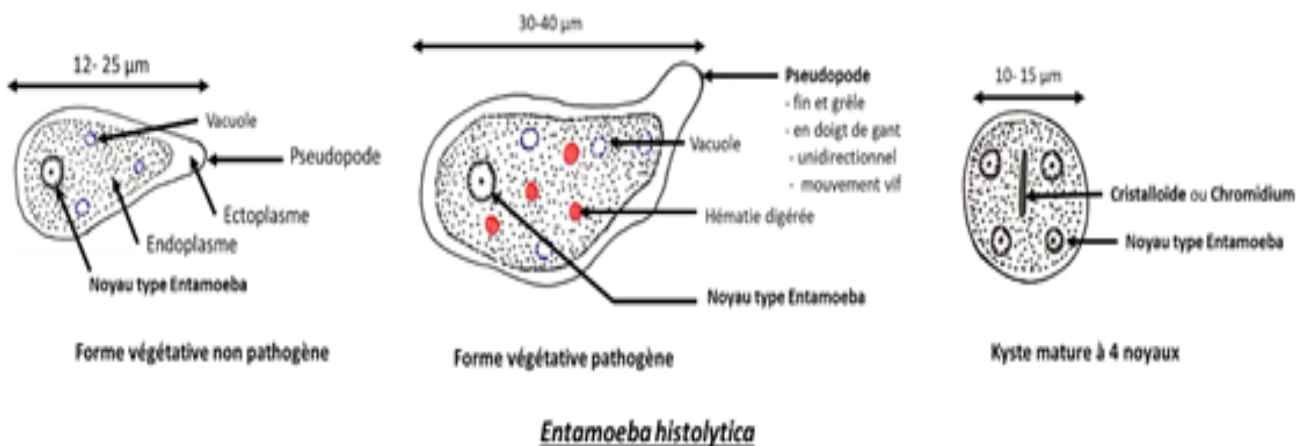
## A. Protozoaires intestinaux

### 1. Amibe pathogène

- *Entamoeba histolytica*

**Trophozoite :** Il s'agit d'une forme hématophage qui peut être mise en évidence dans les selles glairo-sanguinolantes au cours de la dysenterie amibienne. Elle mesure 20 à 40µm, et présente un cytoplasme avec une partie centrale granuleuse appelée endoplasme contenant des vacuoles digestives et des hématies et une partie périphérique hyaline, l'ectoplasme. Il est très mobile, la mobilité est assurée par l'émission de pseudopodes d'aspect hyalin et transparent avec une mobilité unidirectionnelle. Le noyau de la cellule peu visible à l'état frais comporte un caryosome central avec une couche de chromatine périphérique régulièrement répartie le long de la membrane nucléaire.

**La forme kystique :** Le kyste mesure 12 à 15µm de forme arrondi ou ovalaire, à contour net d'aspect réfringent avec un cytoplasme pouvant contenir 1, 2 ou 4 noyaux. A maturité, le kyste contient 4 noyaux et des corps sidérophyles à extrémités arrondies. Le kyste constitue la forme de résistance et de dissémination d'*Entamoeba histolytica / dispar / moshkovskii*.



(Source : Vanga et konaté, Laboratoire de Parasitologie et de mycologie, UFRSPB, UFHB, Abidjan)

Figure 9. 1 : *Entamoeba histolytica / dispar/moshkovskii*

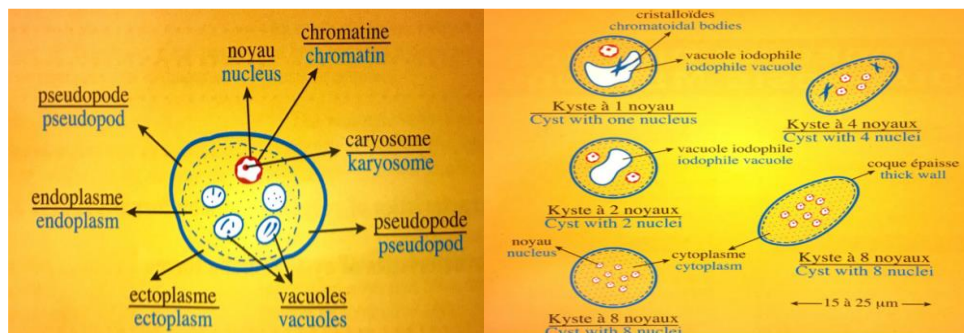
## 2. Amibes non pathogènes

- Genre *Entamoeba*

### *Entamoeba coli*

**La forme végétative** mesure 20 à 30µm et présente un cytoplasme avec un endoplasme granuleux comportant des vacuoles bourrées d'inclusions à type de bactéries et de levures. L'endoplasme et l'ectoplasme sont bien distincts. Le noyau est bien visible à l'état frais, mesurant 5 à 7µm avec une chromatine périphérique irrégulièrement répartie le long de la membrane nucléaire. Son caryosome est épais, excentré avec présence de granulations chromatiques autour du caryosome. Cette forme est peu mobile, la mobilité est assurée par l'émission de pseudopodes courts, transparents qui se forment lentement autour d'elle.

**Le kyste** mesure 15 à 25µm en moyenne, il est arrondi ou ovalaire avec une coque nette très réfringente à l'examen microscopique. A maturité, le kyste d'*E. coli* comporte 8 noyaux, bien visibles après coloration au lugol, avec une chromatine fine et un caryosome central, épais.



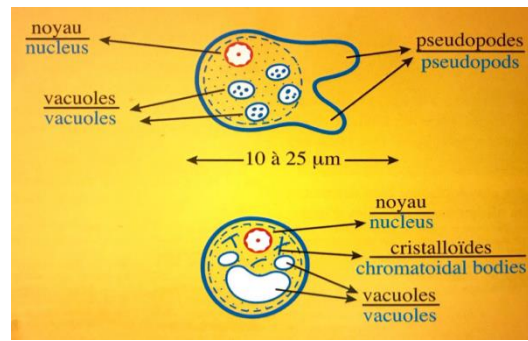
(Source : Deluol A.M, Atlas de Parasitologie)

Figure 9. 2 : *Entamoeba coli* – A : Forme végétative ; B : Kystes

### *Entamoeba polecki*

**La forme végétative** mesure entre 10 à 25µm et présente un cytoplasme comportant un endoplasme et un ectoplasme bien distincts. Dans l'endoplasme, se trouvent de grosses vacuoles alimentaires remplies d'inclusions. Le noyau est peu visible à l'état frais, mesurant 3 à 4µm. La chromatine est fine, périphérique et régulièrement répartie le long de la membrane nucléaire ; son caryosome est central, petit et compact.

**Le kyste** est arrondi ou ovalaire à contour net, réfringent avec une taille de 10 à 17µm. Dans le cytoplasme, se trouvent de nombreuses petites vacuoles. Il présente un noyau unique visible à l'état frais avec une chromatine périphérique régulièrement répartie le long de la membrane nucléaire et un caryosome central.



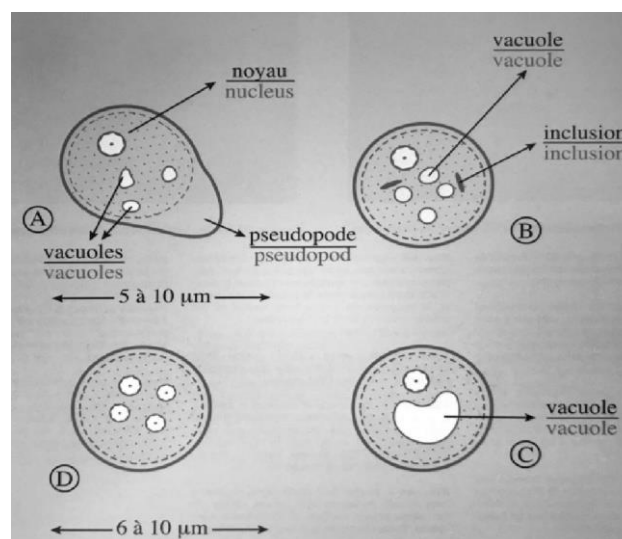
(Source : Deluol A.M, Atlas de Parasitologie)

Figure 9. 3 : **Formes végétative et kystique d'*E. polecki***

### ***Entamoeba hartmanni***

**La forme végétative** mesure 5 à 10µm. Son cytoplasme comporte de petites vacuoles avec peu d'inclusions. Le noyau est difficile à voir à l'état frais ; il comporte une chromatine périphérique épaisse, en amas, avec un caryosome central de grande taille.

**Le kyste** est arrondi, mesurant 6 à 10µm à contour net réfringent. Son cytoplasme contient de nombreuses petites vacuoles. A maturité, le kyste présente 4 noyaux peu visibles à l'examen microscopique.



(Source : Deluol A.M, Atlas de Parasitologie)

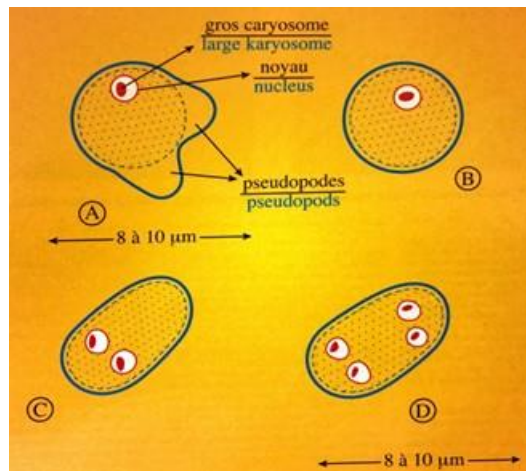
A) Forme végétative ; B) : pré-kyste ; C) Kyste à 1 noyau ; D) Kyste mature à 4 noyaux (Deluol A.M, Atlas de Parasitologie)

Figure 9. 4 : ***Entamoeba hartmanni***

- **Genre *Endolimax* : *Endolimax nanus***

**La forme végétative** mesure 8 à 10µm. Elle émet de nombreux pseudopodes, courts, arrondis, hyalins qui lui confèrent sa mobilité. Le cytoplasme, présente un endoplasme et un ectoplasme qui sont peu différenciés; il renferme de petites vacuoles. Le noyau est visible après coloration avec une membrane nucléaire fine, un caryosome de grande taille, ovale, excentré et qui occupe la presque totalité du noyau.

**Le kyste** est arrondi ou ovoïde, de 8 à 10µm à contour net, peu réfringent. Le cytoplasme est hyalin et sans vacuole. A maturité, on retrouve 4 noyaux de forme ovale groupés par 2 aux extrémités du kyste.



(Source : Deluol A.M, Atlas de Parasitologie)

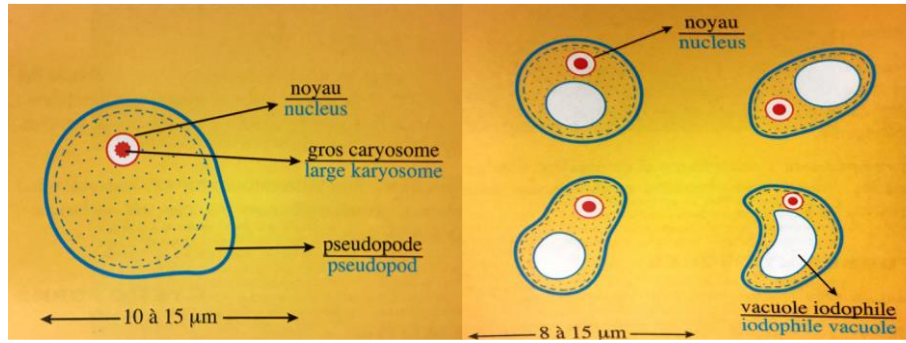
A) Forme végétative ; B) Kyste à un noyau ; C) Kyste 2 noyaux ; D) Kyste mature à 4 noyaux (Deluol A.M, Atlas de Parasitologie).

Figure 9. 5 : *Endolimax nanus*

- **Pseudolimax : *Pseudolimax butschlii***

**La forme végétative** mesure 10 à 15µm. Elle est très mobile grâce à l'émission d'un long pseudopode en doigt de gant, réfringent. L'endoplasme et l'ectoplasme sont peu différenciés; on note la présence de nombreuses vacuoles et des inclusions intracytoplasmiques (bactéries, levures).

**Le kyste** mesure 8 à 15µm ; il est arrondi ou ovale à contour épais et très réfringent. Le cytoplasme comporte une vacuole iodophile, un noyau unique de grande taille, bien visible à l'état frais avec un caryosome excentré, entouré d'un halo clair.



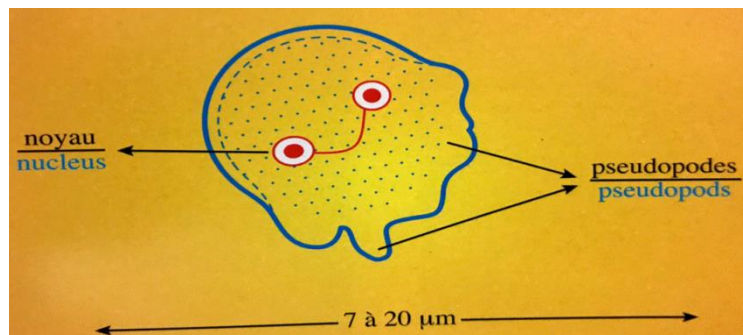
(Source : Deluol A.M, Atlas de Parasitologie)

Figure 9. 6 : Formes végétatives et kystique de *Pseudolimax butschlii*

- ***Dientamoeba fragilis***

La forme végétative a une taille de 7 à 20µm. Elle est mobile, grâce aux pseudopodes courts et nets en aspects de dentelle. Le cytoplasme comporte des vacuoles peu visibles, avec de nombreuses granulations et des inclusions cytoplasmiques. On y retrouve 2 noyaux bien visibles après coloration, avec une membrane nucléaire mince, un caryosome central formé de 4 à 5 granules chromatiques.

Il n'existe pas de forme kystique connue.



(Source : Deluol A.M, Atlas de Parasitologie)

Figure 9. 7 : Morphologie schématique de *Dientamoeba fragilis*



## B. Helminthes intestinaux

### 1. Nématodes

- *Ascaris lumbricoides*

#### Vers adultes

C'est un ver rond de grande taille qui est recouvert d'une épaisse cuticule striée de couleur blanc-rosé ou blanc nacré. Le mâle mesure 15 à 17cm de long sur 3mm de diamètre. Il présente une extrémité recourbée en crosse. La femelle mesure 20 à 25cm de long sur 5mm de diamètre avec une extrémité postérieure effilée.

La partie céphalique du ver adulte porte la bouche qui est entourée de 3 grosses lèvres portant chacune 2 papilles. En plus de la bouche, l'appareil digestif comporte un œsophage, un intestin et un anus. Il existe également un appareil génital.

#### Oeuf

L'œuf fécondé mesure entre 50 et 70µm de long sur 40 à 60µm de large. Il est ovoïde et est entouré de deux coques: une coque externe mamelonnée de couleur jaune brune et une coque interne qui est lisse épaisse et qui entoure une masse granuleuse non structurée.



(Source : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/>)

Figure 9. 8 : Vers adultes et oeufs d'*Ascaris lumbricoïdes* : A) œuf fécondé ; B) œuf non fécondé.

- *Enterobius vermicularis*

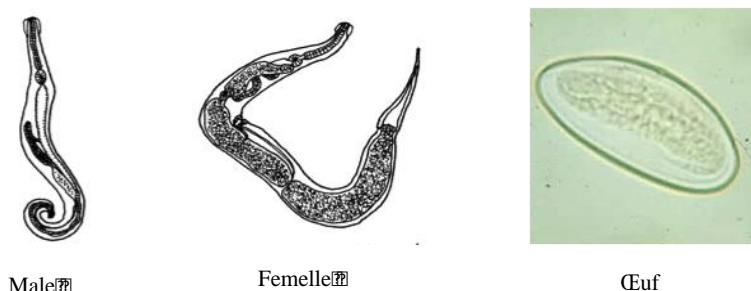
#### Vers adultes

C'est un ver rond, visible à l'œil nu, de couleur blanche. Le mâle mesure 2 à 5mm sur 0,1 à 0,2mm de diamètre. Son extrémité postérieure est recourbée et porte un spicule copulateur. La femelle mesure 9 à 13mm sur 0,3 à 0,5mm de diamètre. Son corps est droit ou légèrement arqué avec une partie médiane plus épaisse. L'extrémité postérieure est rectiligne, effilée et pointue. La partie céphalique porte la bouche qui est entourée de 3 lèvres rétractiles.

#### Œuf

## Description morphologique des parasites intestinaux et uro-génitaux

Il est ovalaire, asymétrique avec une face convexe et une face plane. Il mesure 50 à 60µm sur 30µm de large. Il a une coque lisse, transparente et réfringente. Il renferme un embryon avec un aspect vermiforme.



(Source : Moulinier et al., 2003)

Figure 9. 9 : Vers adultes et Œuf d'*Enterobius vermicularis*

### • *Trichuris trichiura*

#### Vers adultes

C'est un ver blanc rosé ou rougeâtre dont le corps est divisé en deux parties :

- une partie céphalique, filiforme comme un brin de cheveu, très fin, contenant une partie du tube digestif ;
- une partie postérieure, beaucoup plus large contenant la deuxième partie du tube digestif et l'appareil reproducteur. Le mâle mesure 30 à 35mm avec une partie postérieure enroulée en spirale. La femelle mesure 35 à 55mm et la partie postérieure est légèrement arquée.

#### Œuf

Il est ovalaire avec une épaisse coque brune présentant 2 bouchons muqueux saillants et clairs au niveau des deux pôles donnant un aspect en petit citron. L'œuf ne contient qu'une seule cellule centrale. Il mesure 50µm de long sur 10 à 15µm de large.



(Source : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/>)

Figure 9. 10 : Vers adultes et Œuf de *Trichuris trichiura*

### • Ankylostomes

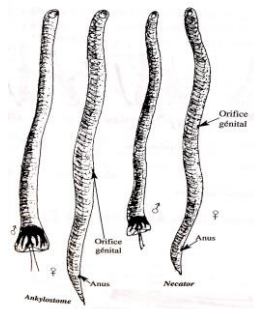
#### Vers adultes

Ce sont de petits vers cylindriques, d'aspect blanchâtre ou rouge brun. La femelle mesure 10



## Description morphologique des parasites intestinaux et uro-génitaux

à 18 mm sur 0,6mm. Le mâle mesure 8 à 11mm sur 0,5mm. L'extrémité antérieure est légèrement amincie avec un œsophage de type strongyloïde (à un renflement). La capsule buccale possède 4 crochets pour *Ancylostoma duodenale* tandis que pour *Necator americanus* présente 2 lames tranchantes. Deux paires de glandes qui secrètent un liquide hémolytique et anticoagulant sont également notées. L'extrémité postérieure du ver mâle d'*Ancylostoma duodenale* est élargie pour former une bourse copulatrice large. L'extrémité postérieure du ver femelle est terminée par une petite pointe. Pour *Necator americanus*, l'extrémité caudale a une bourse copulatoire plus haute que large. La femelle n'a pas de pointes à son extrémité caudale.



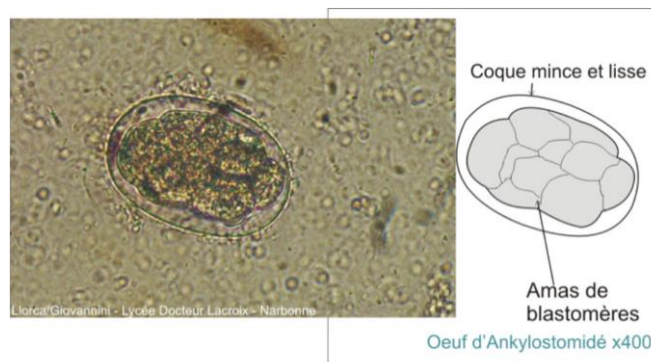
(Source : Moulinier et al., 2003)

Figure 9. 11 : Adultes male et femelle d'*Ancylostoma duodenale* et *Necator americanus*

### Les Œufs

Les oeufs sont clairs avec une coque mince et lisse, transparente. L'oeuf est segmenté en petites cellules appelées blastomères. Il faut noter que la segmentation des blastomères continue après la ponte et il devient impossible de différencier les deux espèces par le nombre de blastomères.

L'oeuf d'*Ancylostoma duodenale* contient 4 blastomères et mesure 60 microns / 40 microns. L'oeuf de *Necator americanus* contient 8 blastomères et mesure 70 microns / 40 microns.



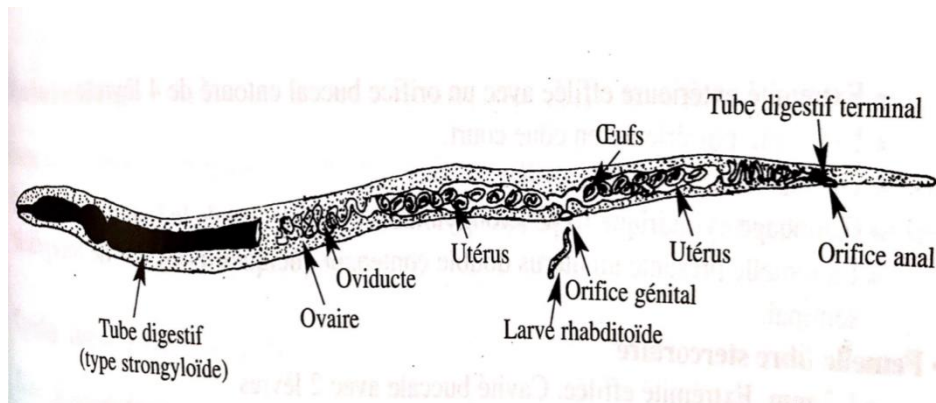
(Source : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/>)

Figure 9. 12 : Œuf d'Ankylostomes

• ***Strongyloides stercoralis***

**Les adultes**

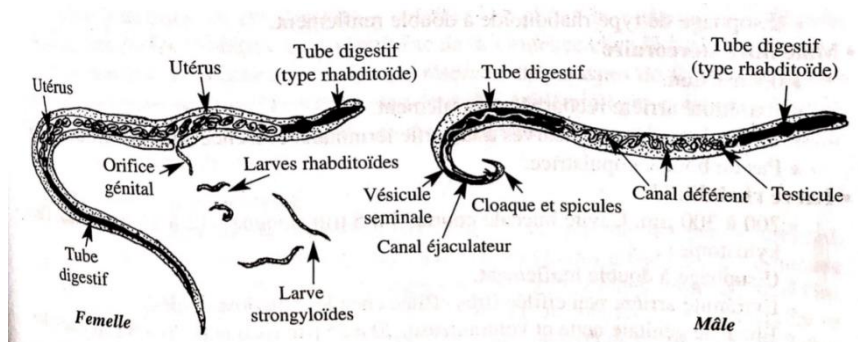
La femelle du parasite ou femelle parthénogénétique est un petit ver cylindrique, mince et transparent. Elle mesure 2,5mm de long sur 30µm de diamètre. La partie antérieure est arrondie et comporte un œsophage de type strongyloïde (à un seul renflement). La partie postérieure est courte et pointue.



(Source : Moulinier et al., 2003)

Figure 9. 13 : Femelle parasite de *Strongyloides stercoralis*

Les adultes libres : ils sont de type rhabditoïde (à deux renflements). La femelle mesure 1,5 mm de long. L'extrémité postérieure est longue et pointue. Le mâle mesure 1mm de long. Son extrémité postérieure est courte, large et pointue. On y retrouve des spicules.



(Source : Moulinier et al., 2003)

Figure 9. 14 : Adultes libres de *Strongyloides stercoralis*

**Les larves**

- Les larves rhabditoïdes : elles mesurent 250µm de long sur 17µm de diamètre. L'extrémité postérieure est effilée et conique. L'œsophage est de type rhabditoïde.
- Les larves strongyloïdes : elles sont filiformes, mesurent 400µm de long sur 10µm de diamètre. L'extrémité postérieure est étroite et terminée par 2 pointes. L'œsophage est de type strongyloïde.

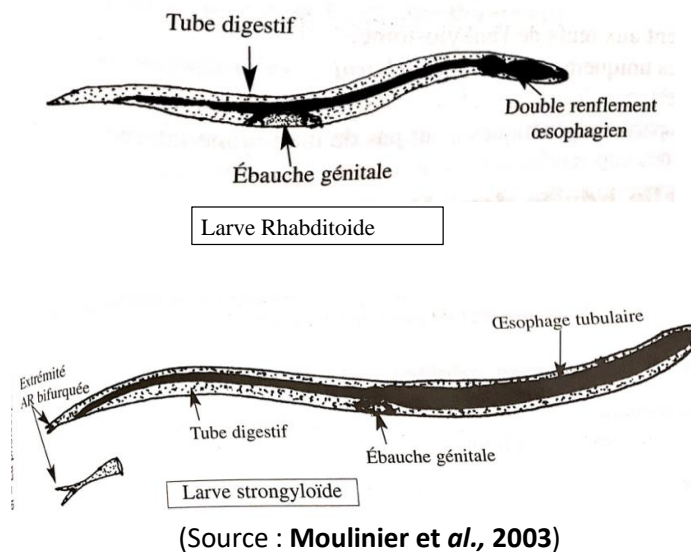


Figure 9. 15 : Larves de *Strongyloides stercoralis*

## 2. Cestodes

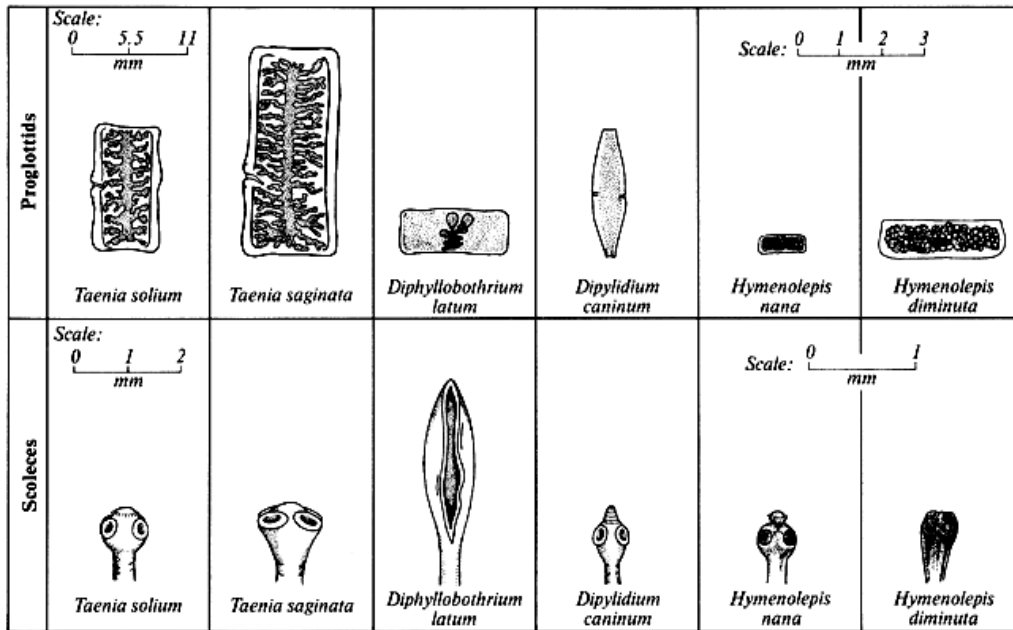
### *Teania saginata* - *Teania solium*

#### Vers adultes

Ils peuvent mesurer jusqu'à 10 mètres pour *T. saginata* et 8 mètres pour *T. solium*. Ce sont des vers plats, d'aspect blanchâtre, possédant un scolex, et un corps encore appelé strobile.

- Le scolex mesure 1 à 2mm et porte 4 ventouses pour *T. saginata*. Pour *T. solium*, le rostre présente 4 ventouses et est armé d'une double couronne de crochets (25 à 50 crochets) d'où le nom de « Teania armé » qu'on lui donne.
- Le corps (strobile) comporte 2000 anneaux pour *T. saginata* et 900 anneaux pour *T. solium*.
- Les anneaux mesurent 20mm sur 5 à 7mm. Pour *T. saginata*, ils se détachent isolément et franchissent activement le sphincter anal pour se retrouver à la surface des selles, dans le linge et les draps du sujet parasité. Pour *T. solium*, les anneaux se détachent par groupe de 5 à 10 et sont éliminés dans les selles.

Les anneaux comportent des pores génitaux qui sont irrégulièrement alternés pour *T. saginata* et régulièrement alternés chez *T. solium*.



(Source : Moulinier et al., 2003)

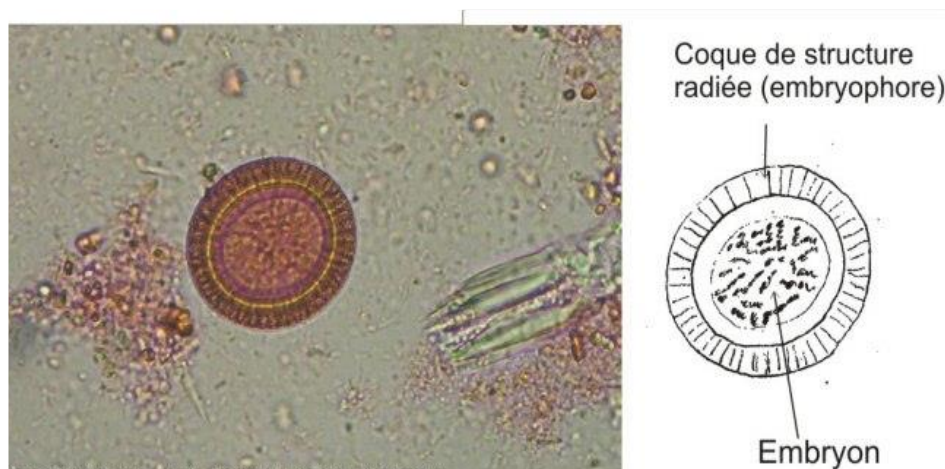
Figure 9. 16 : Anneaux et scolex des différents Teania

### Œufs

Il est pratiquement impossible par microscopie optique de différencier les œufs de *T. saginata* et *T. solium*. Ce sont des œufs arrondis de 50 à 60µm avec 2 coques : une coque externe mince incolore et une coque interne qui délimitent l'embryophore.

### Embryophore

Il mesure 30µm et présente une forme arrondie ou ovale, de couleur brune. La coque est lisse très épaisse striée sur sa largeur. Il contient un embryon hexacanthe avec 6 crochets.



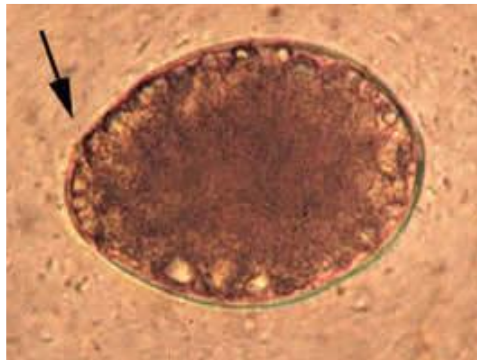
(Source : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/>)

Figure 9. 17 : Embryophore de Teania

***Diphyllobotrium latum***

**Le vers adulte** mesure 1 à 10 mètres. Il comporte un scolex allongé présentant des bothridies sous la forme de 2 ventouses allongées en forme de sillons.

**L'œuf** est ovoïde, mesure 70µm sur 45µm de couleur brune. La coque est lisse et mince, avec la présence d'un opercule peu visible, mais qui est souvent ouvert.



(Source : [www.alamyimages.fr](http://www.alamyimages.fr))

Figure 9. 18 : Œuf de Botriocephale

***Hymenolepis nana***

**Vers adultes :**

Les adultes mesurent 1 à 3cm de longueur. Le scolex comporte 4 ventouses, un rostre rétractile portant une couronne de 20 à 30 crochets. Les anneaux sont plus longs que larges.

**Œuf :**

Œuf transparent de forme elliptique mesurant 30 à 50µm sur 30 à 40µm avec une double coque : (i) coque externe mince, lisse et hyaline, (ii) une coque interne qui présente à chaque pôle, un mamelon d'où partent des filaments enchevêtrés, assez longs qui se rejoignent au milieu de la coque. L'œuf contient un embryon hexacanthé.



(Source : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/>)

Figure 9. 19 : Œuf d'*Hymenolepis nana*

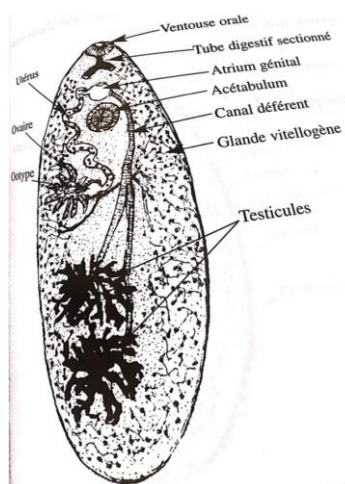
### 3. Trématodes

Ils sont hermaphrodites.

#### Douves intestinales

- ***Fasciolopsis buski***

**Adulte** : Encore appelé grande douve de l'intestin, mesure 3 à 7cm ; présente des testicules très lobés, postérieurs l'un derrière l'autre en arrière de l'ovaire très lobé.



(Source : Moulinier et al., 2003)

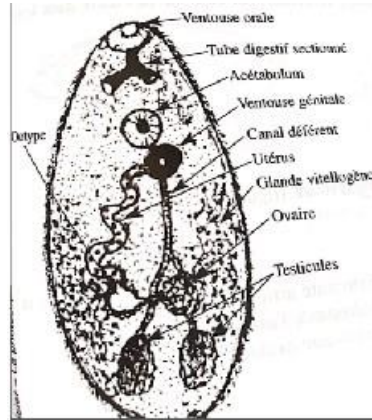
Figure 9. 20 : Morphologie de *Fasciolopsis buski*

**Œuf** : L'œuf est ovalaire, operculé mesurant 120 à 130µm sur 80 à 85µm, non embryonné à la ponte. La coque de l'œuf est lisse et transparente avec une cicatrice rugueuse au pôle opposé à l'opercule. L'œuf contient des cellules polyédriques de grande taille.

- ***Heterophyes heterophyes***

**Adulte** : Très petite douve de 1 à 2mm. L'extrémité postérieure est arrondie, il possède des testicules non lobulés en arrière de l'ovaire non lobulé.





(Source : Moulinier et al., 2003)

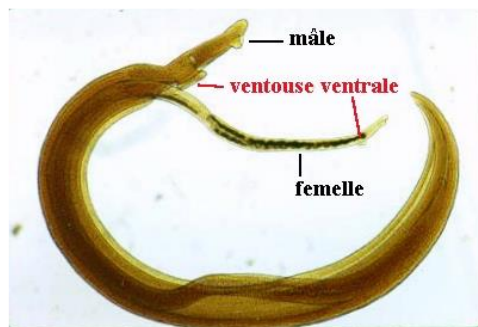
Figure 9. 21: Morphologie de *Heterophyes heterophyes*

**Œuf** : Il mesure 20 à 32µm sur 16 à 18µm, de couleur jaune claire à marron clair non embryonné à la ponte. Il comporte une coque épaisse, un opercule non saillant.

- ***Shistosoma mansoni***

**Adultes**: Ce sont des vers plats; le mâle mesure 10 à 15mm de longueur sur 1mm de largeur. Les bords du corps se replient pour former une gouttière (canal gynécophore) où vient se loger la femelle lors de l'accouplement.

La femelle est filiforme mesurant 15 à 25mm / 0,1 à 0,2mm.



(Source : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/>)

Figure 9. 22 : **Shistosomes adultes**

**Œufs** : Il s'agit d'un œuf ovoïde, incolore, mesurant 120 à 160µm sur 60 à 70µm avec un éperon latéral. La coque est épaisse ; l'œuf contient un embryon cilié appelé miracidium.



(Source : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/>)

Figure 9. 23 : Œuf de *Shistosoma mansoni*

## II. Morphologie des parasites uro-génitaux

### A. *Shistosoma heamatobium*

**Œuf** : L'œuf de *S. heamatobium* mesure 120 à 150µm sur 55 à 60µm. Il est ovoïde, incolore avec un éperon terminal. Il contient un embryon cilié qui porte le nom de miracidium.



(Source : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/>)

Figure 9. 24 : Œuf de *Shistosoma heamatobium*

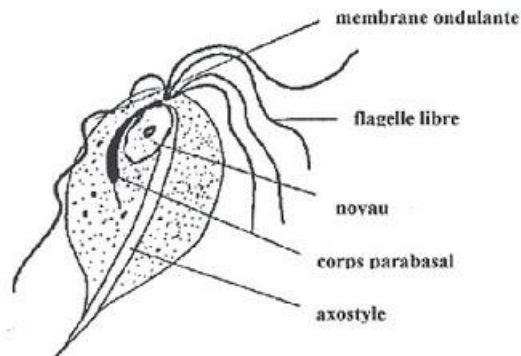
### B. *Trichomonas vaginalis*

Il n'existe que sous la forme trophozoïte, pas de kyste. Le parasite mesure entre 15 à 30µm de long sur 7 à 10µm de large de forme piriforme en amande parfois arrondie. Le cytoplasme présente un blépharoplaste entre le noyau et l'extrémité antérieure; du blépharoplaste partent 5 flagelles antérieurs (4 dirigés en avant et un 5<sup>ème</sup> flagelle est dirigé vers l'arrière). Il existe parfois un 6<sup>ème</sup> flagelle récurrent accolé au corps du parasite, soulevant une membrane ondulante plissée et longue qui se continue au delà de la partie terminale de la membrane en un flagelle postérieur court.



*Description morphologique des parasites intestinaux et uro-génitaux*

Un axostyle qui est un filament axial servant de soutien au corps. Il fait saillie à l'extrémité post du corps. Un appareil parabasal constitué du corps parabasal et du filament parabasal.



(Source : Moulinier et al., 2003)

Figure 9. 25 : Trophozoïte de *Trichomonas vaginalis*

**Bibliographie**

Deluol A.M, Atlas de Parasitologie, Volume 1 : les Amibes.

Gentilini M, Caumes E, Danis M, Lenoble D.R, Bégué P, Touze J.E, Kerouédan D : Médecine tropicale 6ème édition, Médecine Sciences Publications, 2012 Lavoisier, Paris. ISBN 978-2-257-20396-0.

Moulinier C. Parasitologie et mycologie médicales : élément de morphologie et de biologie. Editions Médicales Internationales. ISBN : 2-7430-0488-6.

Nozais JP, Datry A, Danis M. Traité de parasitologie médicale : Editions pradel, ISBN : 2-907516-64-7.

## **10 TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC MYCOLOGIQUE**

---

*Rédigé par Pr Bamba Sanata (Burkina Faso), Relu par Pr Dieng Thérèse (Sénégal),  
Pr Nzenze Solange (Gabon) et Pr Doumbo Niaré Safiatou (Mali)*

## Introduction

Le diagnostic mycologique d'une affection fongique a pour but de confirmer ou d'infirmer la suspicion clinique. Les données cliniques et épidémiologiques aident au choix des techniques à mettre en œuvre au cours de la démarche diagnostique en mycologie. Le succès de cette dernière et la qualité des résultats obtenus dépendent en grande partie des conditions dans lesquelles les prélèvements ont été effectués, mais aussi celles de leur transport et de leur conservation éventuelle avant examen.

Au cours de la démarche diagnostique classique d'une mycose au laboratoire, les techniques mycologiques ont pour objectif de déceler le micromycète sous sa forme parasitaire, de l'isoler en culture puis de l'identifier. Les différentes étapes de cette démarche diagnostique sont les suivantes : prélèvement, examen microscopique direct, mise en culture des prélèvements et identification du micromycète.

Les techniques histopathologiques, qui utilisent des colorations spéciales, ont également pour objectif de déceler la forme parasitaire du micromycète dans les tissus.

**Ces techniques utilisées seules ou combinées sont essentielles pour la confirmation biologique des suspicions cliniques des mycoses. Leurs réussites passent nécessairement par la réalisation des prélèvements mycologiques dans de bonne condition de collecte, de transport et de conservation.**

## I. Les prélèvements en mycologie

Le diagnostic d'une mycose dépend beaucoup de la façon dont la récolte du produit pathologique suspect est effectuée: **le prélèvement conditionne la réussite des examens.** Tous les produits pathologiques classiques peuvent contenir des champignons.

### A. Respect des règles

La fiabilité des résultats des examens mycologiques est conditionnée par le respect des règles suivantes :

- **L'interrogatoire** du patient dans le but d'orienter le diagnostic doit mentionner la date et les circonstances d'apparition des troubles, l'évolution des troubles, l'existence de cas semblables dans l'entourage, la présence d'animaux de compagnie (chat, chien...) ... ;
- **Le prélèvement** doit être effectué **en dehors de toute thérapie antifongique** ;
- **Le matériel de prélèvement** (pinces, écouvillons, vaccinostyles, écouvillons, pince...) et de recueil (boîtes de Pétri, compresse, tubes...) doit être **stérile** ;
- **Le prélèvement** doit être aussi riche que possible et doit contenir des champignons vivants. Ainsi, dans le cas de lésions cutanées, il faut faire le prélèvement en périphérie de lésion.

Le champignon ayant une croissance excentrique, il y aura plus de chance de collecter donc des mycètes jeunes en périphérie) ;

- Il faut tenir compte des conditions de conservation des champignons.

En matière de conservation des prélèvements, la règle de base consiste à examiner tout échantillon biologique dès réception ; cela permet d'éviter leur contamination par des saprophytes susceptibles de gêner la mise en évidence de l'agent fongique pathogène.

## **B. Modalités d'obtention des prélèvements en fonction de la localisation des lésions**

Le prélèvement est une étape importante dans le diagnostic d'une affection fongique. En effet, on ne peut prétendre à un diagnostic juste sur un produit pathologique mal prélevé ou prélevé au mauvais endroit, ou en quantité insuffisante. La nature du matériel biologique à prélever et son mode de prélèvement diffèrent en fonction de la localisation des lésions : superficielles (peau, phanères muqueuses) sous-cutanées et profondes (sang, LBA, LCR, autres liquides biologiques..., organes profonds). Les modalités d'obtention des prélèvements sont fonction de la localisation des lésions.

# 1. Prélèvements de la peau, des phanères et des muqueuses

Tableau 10. 1 : Prélèvements cutané-phanériens et muqueux : modalités de réalisation, d'acheminement et de conservation

Localisation	Prélèvement	Conditionnement	Délai maximal d'acheminement	Traitement différé et T° de conservation
<b>Peau et Phanères</b>				
. peau glabre et plis	.grattage à la curette ou au bistouri stérile (±écouvillonnage)	. recueil en boîte de Pétri stérile des squames	. non exigé	. Traitement différé possible, conservation à température ambiante ou à +4°C
. cuir chevelu, cheveux, poils	.grattage à la curette, pince à épiler ±écouvillon (kérion, folliculites)	. recueil en boîte de Pétri de squames cheveux, poils	. idem	. idem
. ongles	. carré de moquette .ciseaux, coupe ongles, grattoir,	. recueil en boîte de Pétri des ongles et débris sous unguéaux (hyperkératose)	. idem	. idem
<b>Les muqueuses</b>				
.buccales	. écouvillonnage	. Tubes stériles	.acheminement rapide (<24h, à 4°C)	. traitement immédiat
.génitales	. idem	. idem	.idem	. idem
.digestive	.récipient stérile (flacon)	. recueil de selles	. idem	. idem

## a. Les lésions de la peau glabre

La zone à privilégier lors du prélèvement d'une lésion d'épidermophytie circinée sera la périphérie de la lésion, là où la croissance du micromycète est active (zone en relief,

caractérisée par un bourrelet inflammatoire constitué de papulo-vésicules sur peau érythémato-squameuse).

La technique du « scotch test » est particulièrement indiquée dans les lésions évoquant un pityriasis versicolor (macules achromiques, hypopigmentées voire hyperpigmentées ± squameuses). Elle consiste à apposer un ruban de cellophane adhésive transparente sur la lésion, puis à l'appliquer ensuite sur une lame porte-objet, pour examen microscopique.

## **b. Les lésions de teignes et des régions pileuses**

Elles seront examinées au préalable en lumière de Wood à l'obscurité complète. La lésion est dite Wood-positive, lorsque elle donne une fluorescence verte, observée en cas de teignes tondantes microsporiques et de teignes faviques.

Les lésions sont grattées à l'aide d'une curette ou d'une lame de bistouri stérile, afin de recueillir les squames, croûtes ou fragments de cheveux. Les poils, duvets ou cheveux parasités sont prélevés à la pince à épiler. Dans les folliculites suppurées (kérion, sycosis), les pustules sont ouvertes et prélevées à l'aide d'un écouvillon stérile.

## **c. Les lésions des plis**

Le prélèvement est effectué par grattage à la lame de bistouri stérile ou à la curette :

- à la périphérie de la lésion (pour les grands plis) en cas de suspicion de dermatophytie ;
- au fond du pli, si la lésion évoque cliniquement une candidose (aspect plus suintant avec présence sur l'étendue de la lésion de papulo-pustules avec collerette desquamative) ;
- sur toute l'étendue de la lésion (fond et faces latérales), pour les petits plis.

## **d. Les Onyxis fongiques**

En fonction du type de lésions, la tablette unguéale sera coupée ou grattée, les débris sous-unguéraux (aspect poudreux) seront raclés.

- **dans les atteintes distales de type onychomycose sous unguéo-distale ou distolatéral**, la zone qui limite l'ongle malade de l'ongle sain (front d'attaque) doit être le lieu privilégié pour le prélèvement.
- **dans le cas de leuconychie**, la zone affectée sera grattée.
- si un examen histologique est nécessaire, des fragments d'ongles de 3mm de large seront acheminés au laboratoire d'anatomie pathologique.

## **e. Les lésions des muqueuses et orifices naturels**

Les muqueuses buccales (commissure des lèvres, face interne de la bouche, langue) génitales (vaginale, sillon balano-préputial et méat urétral) ainsi que les conduits naturels (anus, conduit auditif externe, narines...) seront prélevés à l'aide d'un écouvillon (humidifié si nécessaire) qui sera frotté sur les lésions visibles.

Les selles sont recueillies dans le cas de troubles digestifs évoquant une étiologie fongique. Des prélèvements superficiels, tels que les expectorations ou crachats, réalisés dans le cadre de pathologies des muqueuses respiratoires, nécessitent au préalable le rinçage de la bouche par un antiseptique.

## **2. Prélèvements sous-cutanés**

La recherche du micromycète à l'état parasitaire sous la peau nécessite des biopsies. Une partie du fragment biopsique sera recueilli dans un flacon stérile contenant un fixateur (Bouin) et destiné à l'examen anatomo-pathologique. L'autre partie du fragment biopsique sera déposée dans un récipient stérile (tube, flacon) sans fixateur et acheminé le plus rapidement possible au laboratoire de mycologie.

En cas de tumeur cutanée fistulisée (mycétome), avec présence de grains dans les fistules, on recueillera les grains dans un récipient stérile pour examen direct et culture. Dans le cas de lésions prolifératives cutanées (chromomycose), des prélèvements seront effectués par grattage et recueil dans une boîte de Pétri ou flacon stérile.

## **3. Prélèvements profonds**

Il s'agit de prélèvements de sang (cas de fongémie), de liquides biologiques (pleural, péritonéal, céphalo-rachidien, urines...) de lavage bronchiolo-alvéolaire et de produits d'aspiration bronchique.



Tableau 10. 2 : Prélèvements profonds

Localisation	Prélèvement	Conditionnement	Délai maximal d'acheminement	Traitement différé et T° de conservation
<b>Bronchopulmonaire</b>	. lavage bronchiolo-alvéolaire . Aspiration bronchique	. recueil en flacon stérile . idem	. 24h . idem	. +4°C . idem
<b>Cérébrale</b>	. Ponction lombaire	.recueil en flacon stérile	. 2 h	.Traitement immédiat
<b>Fongémie</b>	.sang** .cathéters centraux	. Hémoculture fongique . recueil en flacon stérile	. <24h . idem	.Traitement immédiat .Traitement immédiat
<b>Tissu profond</b>	. biopsie	Biopsie répartie dans 2 flacons . 1 flacon stérile pour la mycologie ; . 1 flacon stérile avec fixateur pour l'examen anatomopathologique		

\*\*Le sang sera prélevé directement sur un milieu de culture prêt à l'emploi. Le rendement est meilleur sur un milieu spécifique pour champignon.

Pour la sérologie et l'antigénémie, le sang sera prélevé sur tube sec sans anticoagulant.

## II. Les techniques de diagnostic mycologique

### A. Examen direct du produit pathologique

L'examen microscopique direct est une étape indispensable au diagnostic. En effet, l'observation à l'examen direct d'éléments parasitaires fongiques caractéristiques de certaines mycoses :

- cutanées comme les dermatophyties (teignes du cuir chevelu, épidermophytie circinée), le pityriasis versicolor ;
- sous-cutanées (chromomycose, mycétome) ;

- et profondes (cryptococcose), permet la mise en route d'une thérapeutique spécifique, sans attendre les résultats de la culture. Par ailleurs, il revêt un caractère capital dans les cas où l'agent étiologique n'est pas cultivable (*Pneumocystis jirovecii*).  
Sur le plan pratique, les méthodes seront adaptées à la nature du prélèvement biologique à analyser.

## 1. Les méthodes

Trois types de techniques d'examen direct sont envisagés :

- **Les préparations à l'état frais** par montage dans un liquide non coloré (eau physiologique, potasse, lactophénol) ou coloré (encre de Chine, noir chlorazole, rouge Congo, calcofluor, blankophor,) pour visualiser les structures fongiques ;
- **Les étalements sur lame, fixés puis colorés** (Gram, Giemsa, Gomori-grocott ou Musto) ;
- **L'utilisation d'anticorps monoclonaux marqués** (pneumocystose).

### a. Choix des méthodes en fonction des prélèvements

#### *i- Prélèvements kératinisés: cheveux, poils, squames, fragments d'ongles*

Lors de l'examen direct de ces prélèvements, l'utilisation d'un liquide éclaircissant est nécessaire, car ce dernier permet de lyser la kératine et de visualiser les structures fongiques afin d'en préciser l'organisation.

- **Cheveux et poils** : Presqu'exclusivement examinée à la recherche d'une affection dermatophytique, la méthode de choix consiste à éclaircir les prélèvements c'est-à-dire rendre visibles les éléments fongiques qui s'y trouvent. Pour ce faire 2 éclaircissants sont utilisés : la potasse diluée à 30% (KOH à 30%) et le chloral-lactophénol. La potasse à 30% entraîne un éclaircissement rapide mais ne permet pas la conservation des lames, car elle provoque une désorganisation totale des cheveux et des poils en quelques heures. Le lactophénol induit un éclaircissement lent, mais il a l'avantage de préserver plus longtemps les structures pilaires, ce qui peut être très utile pour un contrôle *a posteriori*.
- **Squames et débris d'ongles** : la potasse à 30% est également utilisée pour les squames et les ongles, à concentration variable (10% à 20%) selon le produit pathologique. A cette potasse, on peut ajouter du noir chlorazole ou du blanc de calcofluor, conjuguant ainsi l'éclaircissement et la coloration. Ces procédés facilitent la détection des éléments fongiques dans ces prélèvements kératinisés.
- **Dans le cas particulier des lésions de Pityriasis versicolor**, on pratiquera le test à la cellophane adhésive ou « Scotch test », méthode la plus utilisée pour le diagnostic de Pityriasis versicolor. Un morceau de ruban adhésif transparent est appliqué sur les lésions cutanées évocatrices de Pityriasis versicolor. Une fois l'empreinte de la lésion fixée sur le

scotch, ce dernier est retiré et appliqué sur une lame porte-objet (sur laquelle au préalable une goutte de noir chlorazole ou de bleu lactique peut être ou non déposé, ce qui colore les éléments fongiques et en facilite l'observation).

L'examen microscopique du scotch met en évidence dans les squames la présence d'amas de spores rondes à ovales, de petite taille, disposées en « grappe de raisin », et associées à des filaments mycéliens généralement courts, plus ou moins abondants et enchevêtrés. Cette image est pathognomonique du Pityriasis versicolor.

#### **ii- Prélèvements de muqueuses**

- **Digestives (oropharyngés, selles) et génitales** (vagin, méat urétral) bénéficient d'un examen direct à l'état frais en eau physiologique.
- **Les prélèvements du bord externe de la commissure des lèvres ou des lésions de balanite** pourront être éclaircis à la potasse diluée.

Par ailleurs, des frottis sur lame de prélèvements de la cavité buccale et vaginale peuvent être confectionnés puis colorés au Giemsa.

#### **iii- Prélèvements de mycoses sous-cutanées**

Ils peuvent être cutanés ou sous-cutanés en fonction de l'aspect clinique :

- **Les lésions cutanées de certaines mycoses** (chromomycose) peuvent être prélevées et examinées dans la potasse à 30% ;
- **Les grains issus des lésions cutanées et fistulisées de mycétome**, sont prélevés, lavés, écrasés entre lame et lamelle dans de la potasse à 30% puis examinés au microscope ;
- **A partir de fragment biopsique de lésions sous-cutanées**, des appositions sur lame sont réalisées et colorées par différentes techniques dont les plus classiques en mycologie sont la coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS) et l'imprégnation argentique.

#### **iv- Prélèvements profonds**

En général, pour *les prélèvements non biopsiques*, à l'exception du LBA et du LCR, des étalements ou appositions sur lame seront réalisés. Diverses colorations peuvent être utilisées, mais l'imprégnation argentique selon Gomori-Grocott qui colore intensément la paroi de tous les champignons en noir est préconisée.

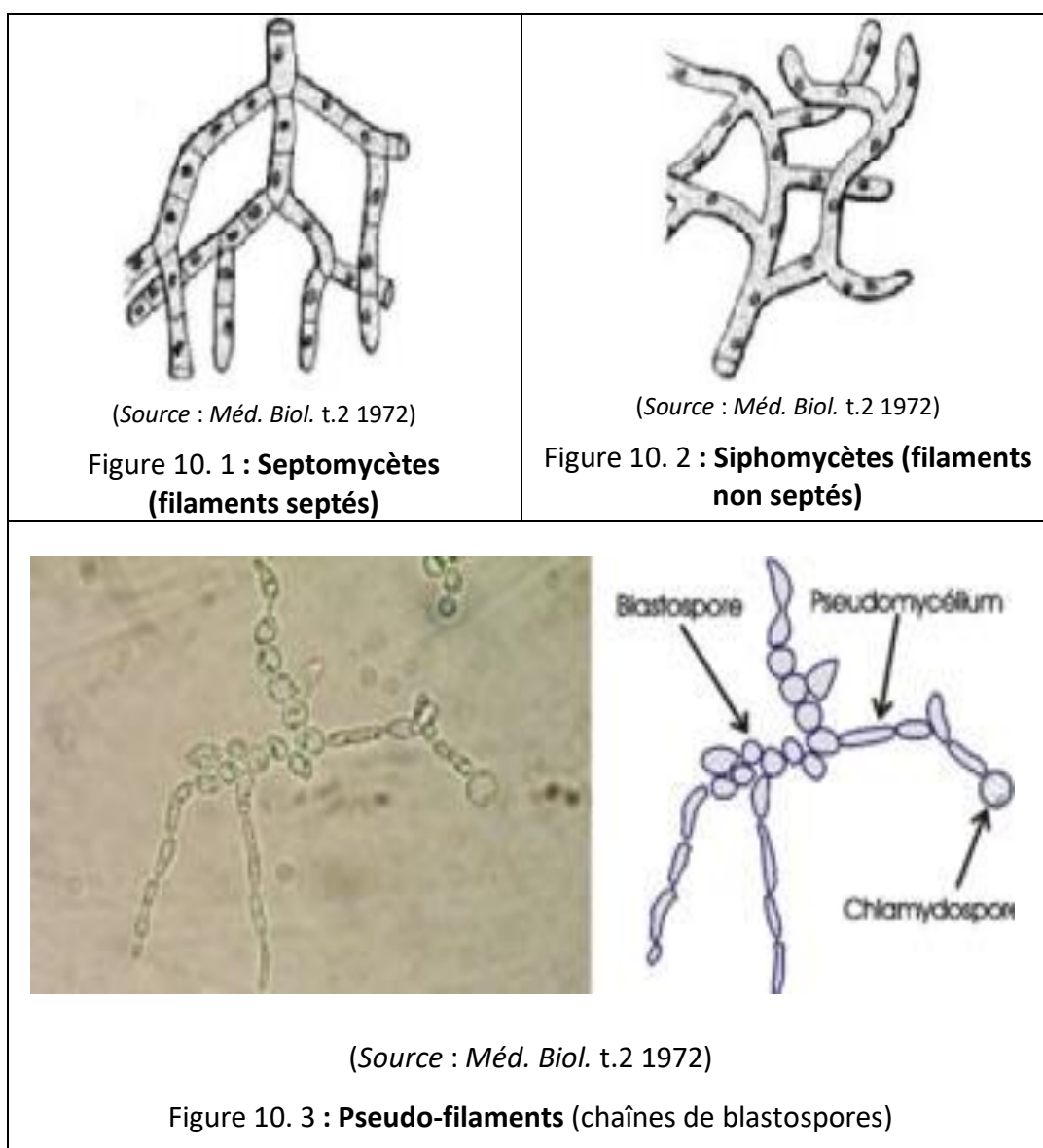
**Pour les LBA et LCR**, on procèdera à la centrifugation du liquide biologique, le surnageant sera réservé pour un éventuel examen immunologique (recherche d'antigène soluble). Dans les 2 cas, le culot sera récupéré pour ensemencement, mais également pour examen microscopique à frais pour le LBA), et à l'encre de Chine pour le LCR (il se n'agit non pas d'une coloration, mais de la visualisation en négatif de la capsule cryptococcique qui entoure la levure et apparaît en clair sur le fond noir de la préparation, on parle de test « à l'encre de Chine »).

**Pour les biopsies tissulaires**, elles seront divisées en 2 fragments. On effectuera des empreintes (ou appositions) sur 2 ou 4 lames, qui seront destinées pour les unes à la coloration et examen mycologique et pour les autres à l'examen histopathologique. Le 2<sup>ème</sup> fragment biopsique sera quant à lui réservé à la culture.

L'examen direct permet une orientation du diagnostic grâce aux éléments fongiques mis en évidence (conclure à la présence ou non d'éléments fongiques : les levures, le mycélium

septé ou non septé, le pseudo-mycélium, les spores). Il faudra veiller à bien distinguer des filaments (septé (Figure 10. 1), non septés (Figure 26b) de pseudo filaments, constitués de chaînes de blastospores (Figure 10. 3)) ou des grappes de levures rondes à paroi épaisse (2µm à 6µm de diamètre), associées à des filaments courts qui permettent de poser le diagnostic (Figure 10. 4).

Pour les champignons éventuellement commensaux comme les levures, on prendra garde à bien quantifier le nombre d'éléments observés à l'examen direct : la conclusion en dépend puisque les levures peuvent être commensales.





(Source : microbiologia.udea.ed.com)

Figure 10. 4 : *Malassezia furfur*, examen direct d'un test à la cellophane adhésive coloration au bleu lactique. ( $\times 100$ ).

## B. Mise en culture des prélèvements biologiques : Isolement et Numération

### 1. Milieux d'isolement et/ou d'identification

Dans la démarche mycologique classique, la mise en culture des prélèvements a pour but d'isoler le micromycète pathogène en vue de son identification.

On peut en pratique courante, distinguer 3 types de milieux de culture :

i. **Les milieux gélosés de Sabouraud additionnés d'antibiotiques et/ou non d'antifongiques.** Ces milieux doivent répondre à 3 impératifs essentiels :

- Permettre la **croissance de la plupart des champignons d'intérêt médical (levures et champignons filamenteux)**. Ce milieu est composé de Néopectone, Glucose, Agar, Eau distillée, et doit avoir un pH de 5-5,6;
- Inhiber la flore bactérienne associée (avec soit du chloramphénicol, soit de la gentamicine ou l'association des deux) ;
- Permettre l'inhibition par un antifongique (Cycloheximide) des moisissures gênant la mise en évidence, de pathogènes " classiques" à croissance lente comme les dermatophytes. Cet antifongique inhibe également la croissance de certaines levures (cryptocoque) et de certaines espèces du genre *Candida* autres que *C.albicans*.

ii. **Les milieux gélosés « spécifiques »**

Ce sont des milieux pour identification :

- **des Dermatophytes et d'autres filamenteux** : Il s'agit de milieux tels que le milieu de Borelli (qui favorise la sporulation de la plupart des dermatophytes et stimule la

pigmentation chez certaines espèces (*Trichophyton rubrum*, *Microsporum* (*M. canis*, et *M. audouinii*), le milieu au malt qui favorise la sporulation de nombreuses moisissures, le milieu de Czapek, spécialement indiqué pour l'identification des *Aspergillus* ;

- **des levures avec des milieux tels que les milieux fluorogéniques** ou chromogéniques qui permettent l'identification sélective de *Candida* (*C. albicans*), grâce à un substrat chromogénique ou fluorogénique d'une enzyme spécifique de cette espèce, ou d'autres espèces du genre, milieu qui, par ailleurs, détecte les associations de levures ;
- **Le milieu R.A.T (Riz-Agar-Tween) ou P.C.B (Pomme de terre, carotte, Bile)**, qui permet de mettre en évidence la formation de pseudomycélium (formation observée chez les levures du genre *Candida*) et de chlamydospores, organes caractéristiques de l'espèce *C. albicans* (mais également de *C. dubliniensis* et de *C. africana*, qui sont phénotypiquement indifférenciables de *C. albicans* ;
- **Le Milieu Dixon**, pour l'isolement des levures du genre *Malassezia*. L'addition d'un film d'huile d'olive à la surface du milieu Sabouraud-chloramphénicol permet d'isoler, en absence du milieu Dixon, les levures du genre *Malassezia* ;
- **Le Milieu aux graines de *Guizotia abyssinica*** pour la mise en évidence de *Cryptococcus neoformans*.

### iii. Les milieux pour hémoculture

En cas de suspicion de septicémie d'origine fongique (fongémie), il est recommandé d'utiliser un système basé sur la mesure en continu du CO<sub>2</sub> libéré au cours de la croissance fongique, comme le système BacT/ALERT®(bioMérieux) qui utilise un milieu de culture identique pour champignons et bactéries, ou le système Bactec®(Becton-Dickinson) qui utilise différents milieux de culture en fonction des microorganismes suspectés (Bactec MycosisIC/F pour la recherche de champignons). Le procédé Dupont-Isolator® (Oxoid), qui repose sur un principe différent de lyse-centrifugation, serait plus adapté au diagnostic des mycoses profondes à champignons dimorphiques. Cependant, la manipulation directe du sang, qui constitue un risque réel de contamination du personnel de laboratoire, rend cette technique difficilement utilisable en routine.

## 2. Numération des micromycètes dans les prélèvements biologiques

En pratique courante, le caractère abondant ou pas du ou des micromycète(s) isolé(s) en culture a une implication directe dans l'interprétation à donner sur le rôle pathogène de l'isolement en culture :

- de levures commensales issues de prélèvements superficiels muqueux (muqueuses vaginale et respiratoire, tractus gastro-intestinal) ;

- ou de champignons filamenteux saprophytes de l'environnement.

En revanche, dans les prélèvements profonds normalement stériles, la présence de levures ou d'autres champignons revêt un caractère anormal quel qu'en soit la quantité à l'isolement. Ainsi, en pratique courante, en dehors d'une standardisation estimant l'abondance à partir du nombre de colonies isolées, généralement la mise en évidence de plus de 10 colonies doit amener à l'identification du champignon en cause ou à la répétition des prélèvements chez un immunocompétent. La numération des levures en CFU/ml ou /g est appliquée, de manière systématique, dans les urines. Dans les rinçages buccaux, la numération des levures est préconisée surtout chez les patients VIH, pour apprécier particulièrement la flore candidosique présente dans la cavité buccale lors de traitements curatifs et prophylactiques par le Fluconazole et d'autres antifongiques. Dans les selles, chez les patients à haut risque de contamination digestive et pour l'évaluation de l'efficacité des antifongiques au cours d'études.

## **C. Choix du contenant des milieux, des conditions d'incubation et de surveillance des prélèvements ensemencés**

### **1. Choix du contenant : tubes ou boîtes**

Les milieux en boîte de Pétri comparativement à ceux coulés en tubes, présentent une surface d'isolement dix fois plus grande, donc une meilleure séparation des colonies en culture. Toutefois, la dessiccation plus rapide des milieux en boîtes de Pétri ne favorise pas la mise en évidence de micromycètes à croissance lente comme les Dermatophytes (3 à 4 semaines) ou le cryptocoque (1 à 3 semaines). En pratique courante, nous recommandons la mise en culture des prélèvements cutané-phanériens d'emblée sur 2 milieux : sur gélose Sabouraud chloramphénicol coulée en boîte de Pétri et sur gélose Sabouraud chloramphénicol cycloheximide (actidione®) coulé en tube. Les champignons étant des organismes aérobies, il est important que les bouchons des tubes soient dévissés pendant l'incubation.

## 2. Conditions d'incubation et de surveillance des prélèvements ensemencés

### a. Conditions d'incubation (Température et Humidité)

- Les prélèvements cutané-phanériens : ils sont incubés à une température de 25-27°C ;
- Les prélèvements profonds tels que le sang et le LCR et les prélèvements des muqueuses sont incubés à 37°C ;
- Pour les autres prélèvements, quelle que soit leur localisation, la température optimale pour la détection des champignons dans les échantillons biologiques se situe entre 30° et 35°C ;
- L'incubation d'échantillons à une température élevée (40-45°C) constitue un excellent moyen de détection sélective d'*Aspergillus fumigatus* ;
- Un environnement humide (40-50% d'humidité relative) est préférable, pour la culture fongique, à une atmosphère trop sèche.

### b. Conditions de surveillance des prélèvements ensemencés

- Les cultures des prélèvements cutané-phanériens (dermatophytes majoritairement mis en cause) doivent être examinés 2 fois par semaine et conservés 3 semaines ;
- Les cultures des prélèvements de muqueuses et des prélèvements profonds doivent être examinées quotidiennement ;
- Le rythme de lecture des hémocultures varie selon le système adopté.

## D. Identification des champignons

### 1. Identification des levures d'intérêt médical

Les principaux genres sont:


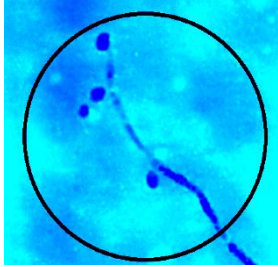
- Genre *Candida*,
- Genre *Cryptococcus*,
- Genre *Rhodotorula*,
- Genre *Trichosporon*,
- Genre *Malassezia*.

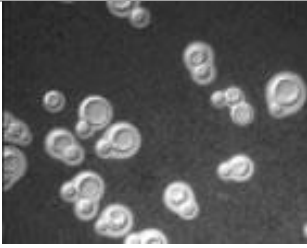

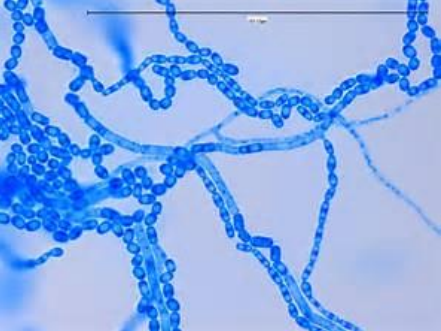
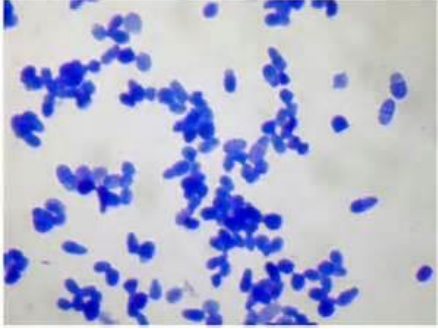


## a. Différenciation des genres

Le tableau 10. 3 résume les caractères morphologiques distinctifs des principaux genres de levures d'intérêt médical.

Tableau 10. 3 : Caractères morphologiques des principaux genres de levures d'intérêt médical

Genres	Morphologie (Figure 10. 5)	
<b>Candida</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Levures bourgeonnantes, ovales (3 x 6µm), non capsulées, à bourgeonnement multipolaire</li>   <li>• Filaments : pseudomycélium, eumycélium avec blastospores</li> <li>• (Figure 10. 5b)</li> </ul>	 <p>(Source : Méd. Biol. t.2 1972)</p>  <p>(Source : microbiologia.udea.ed.com)</p>

<p><b>Cryptococcus</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Levures rondes ou ovales</li> <li>• (4µm) à bourgeonnement multipolaire, <b>capsulées</b></li> <li>• Absence de mycélium</li> </ul>	 <p>(Source : Méd. Biol. t.2 1972)</p>
<p><b>Rhodotorula</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Levures rondes ou ovales à bourgeonnement multipolaire</li> <li>• Absence de mycélium et capsule</li> <li>• Production de <b>pigments caroténoïdes</b> qui donnent aux colonies une couleur rose à rouge</li> </ul>	 <p>(Source : microbiologia.udea.ed.com)</p>
<p><b>Trichosporon</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Levures ovalaires à bourgeonnement multipolaire, non capsulées</li> <li>• Filaments <b>arthrosporés</b></li> </ul>	 <p>(Source : <a href="http://thunderhouse4-yuri.blogspot.be/2014/08/trichosporon-species.html">http://thunderhouse4-yuri.blogspot.be/2014/08/trichosporon-species.html</a>)</p>
<p><b>Malassezia</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La culture est <b>rarement réalisée</b> en pratique courante. Elle peut se faire sur milieu de Dixon ou de Sabouraud additionné d'huile d'olive. Des tests plus spécialisés sont nécessaires pour le diagnostic d'espèce : Morphologie des levures)</li> </ul>	 <p>(Source : microbiologia.udea.ed.com)</p>

## b. Différenciation des espèces du genre *Candida*

### Identification de *Candida albicans*/*Candida dubliniensis*

*Candida dubliniensis* est une nouvelle espèce de levures, phylogénétiquement très proche de *Candida albicans* et identifiée spécifiquement par des techniques de biologie moléculaire ou un test d'agglutination (Bichro-dubli).

#### i) Test de blastèse ou test de filamentation en sérum

##### Principe

*Candida albicans* et *Candida dubliniensis* sont les seules espèces qui produisent des tubes germinatifs en 3 heures à 37°C, dans un milieu pour blastèse (Diagnostics Pasteur devenu Biorad) ou dans du sérum. Ces tubes ressemblent à un mycélium mais sans cloisonnement entre la levure et le filament.

Ces tubes germinatifs seraient représentatifs de la capacité invasive de *C. albicans*. Les autres levures ne le font pas.

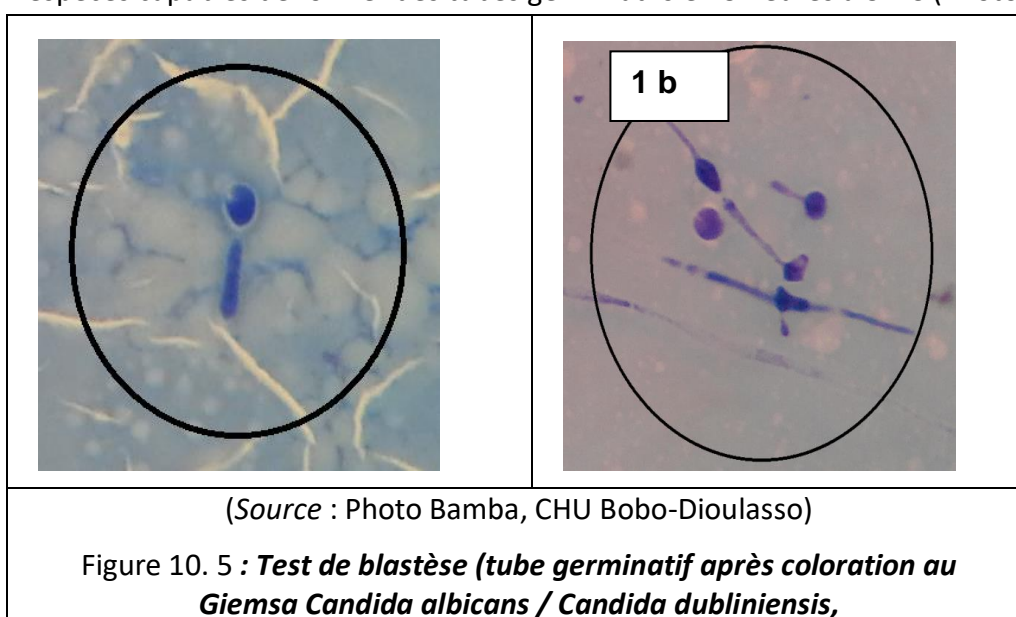
Seulement 2% des souches de *C.albicans*/ *C. dubliniensis* ne produisent pas de tubes germinatifs.

##### Technique

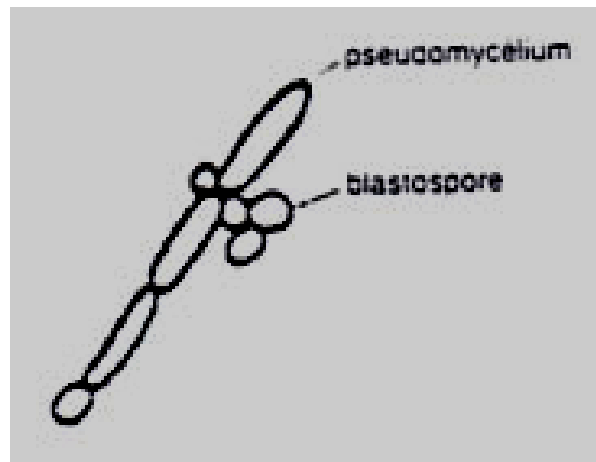
- Réaliser une suspension de levures d'opacité à peine visible dans 1mL de sérum frais, humain ou animal, ou dans 1mL de milieu pour blastèse ;
- Agiter ;
- Incuber 3 heures à 37°C (maximum 4 heures) ;
- Observer à l'état frais entre lame et lamelle.

##### Lecture et interprétation

- L'observation de tubes germinatifs : orientation vers *C.albicans* /*C. dubliniensis*, seules espèces capables de former des tubes germinatifs en 3 heures à 37°C (Photos 1a & 1b)



- L'observation de pseudomycélium ou pseudofilament (base étranglée) : orientation vers une espèce autre que *C. albicans* ou *Candida dubliniensis* (Figure 10. 6).



(Source : Méd. Biol. t.2 1972)

Figure 10. 6 : **Pseudofilament : *C. albicans* ou *Candida dubliniensis***

**Remarques : le tube germinatif présente une base non étranglée différent du pseudo mycélium présentant une base étranglée**

**ii) Test de chlamydo-sporulation sur milieu PCB (Pomme de terre, Carotte, Bile) ou RAT (Riz, Agar, Tween)**

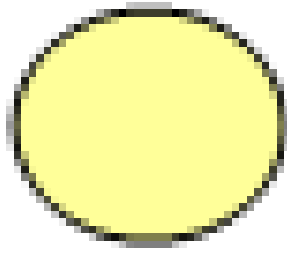
#### **Principe**

Ensemencées sur des milieux spéciaux riches en polysides et contenant des molécules créant des conditions peu favorables PCB (Pomme de Terre Carotte Bile, DIAGNOSTICS PASTEUR) ou RAT (Riz Agar Tween bioMérieux qui n'est plus commercialisé depuis 2001) et en semi-anaérobiose, *C. albicans* et *C. dubliniensis* sont les seules espèces du genre *Candida* à produire des **chlamydo-spores** en 24 à 48 heures, à température ambiante (ou à 28°C). Seulement 5% des souches de *C. albicans*/*C. dubliniensis* ne produisent pas de chlamydo-spores.

Les chlamydo-spores sont des spores rondes, généralement réfringentes, situées aux extrémités du pseudomycélium. Leur rôle est inconnu, car il n'est pas sûr qu'elles puissent redonner des levures.

#### **Technique**

- Sur un milieu coulé en boîte de Pétri (PCB ou RAT), faire un quadrillage à la surface de la gélose à l'aide d'une pipette chargée de suspension à tester ;
- Recouvrir d'une lamelle (Figure 10. 7) ;



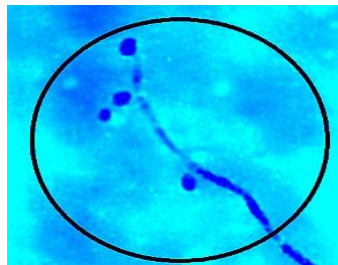
(Source : microbiologia.udea.ed.com)

**Figure 10. 7 : Gelose PCB ou RAT**

- Incuber 24 à 48 heures à la température ambiante (ou à 28°C) ;
- Examiner directement le milieu sous le microscope (objectif x40).

**Lecture et interprétation**

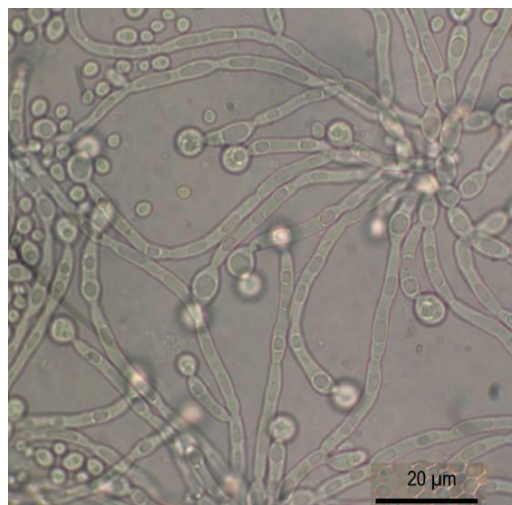
- Levures bourgeonnantes + pseudomycélium + blastospores : levures du genre *Candida*, orientation vers une espèce autre que *C. albicans*/*C.dublinsiensis* (Photos 2) ;



(Source : microbiologia.udea.ed.com)

**Figure 10. 8 : Levures bourgeonnantes + pseudomycélium + blastospores**

- Levures bourgeonnantes + pseudomycélium + blastospores + **chlamydo-spores** (spores de 6 à 12µm, rondes ou ovales, à double contour, très réfringentes) : *C. albicans*/ *C. dubliniensis*. (Figure 10. 9).



(Source : Méd. Biol. T.2 1972)

**Figure 10. 9 : Les chlamydo-spores (*Candida albicans*)**

**iii) Milieu chromogène : CAN2/SGC2 / ChromID Candida**

**Principe**

- Le milieu CAN2/SGC2 est composé de **2 milieux de culture** répartis dans une même boîte de Pétri ;
- Le milieu ChromID Candida contient un **substrat chromogène permettant la mise en évidence d'une hexosaminidase spécifique de *Candida albicans*** qui donnera des colonies bleues.

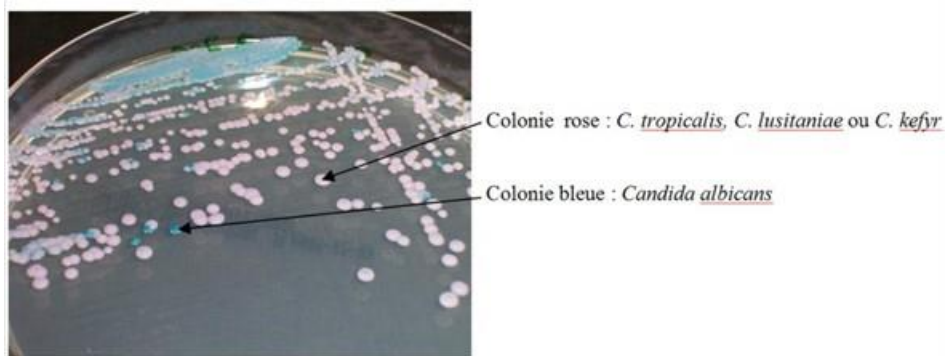
**Technique**

L'isolement peut être réalisé directement à partir du prélèvement.

**Lecture et interprétation**

**Milieu chromID Candida (Figure 10. 10) :**

- colonies bleues : avec une réaction hexosaminidase positive (+) : *Candida albicans*,
- colonies roses : *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* ou *C. kefyr*,
- colonies blanches : autres espèces.



(Source : microbiologia.udea.ed.com)

Figure 10. 10 : **Identification des espèces de *Candida* sur Milieu chromID Candida**

**iv) Test de coagglutination sur lame : Bichro-latex albicans Fumouze**

**Principe**

On utilise des particules de latex sensibilisées avec un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement un antigène pariétal (démasqué par un réactif dissociant contenant des enzymes) des *Candida* du groupe *C. albicans*/*C. dubliniensis*. Ces particules de latex sensibilisées, en présence de *C. albicans* ou *C. dubliniensis*, donneront une agglutination.

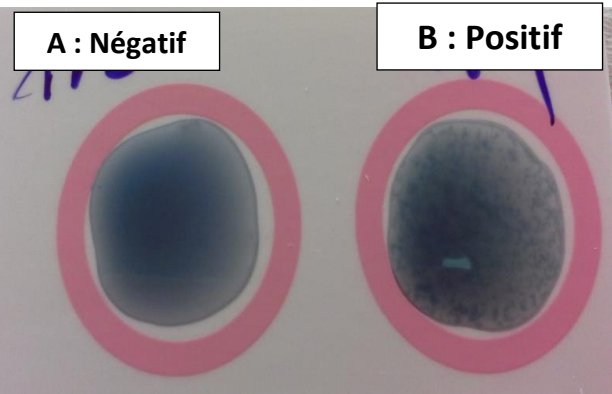

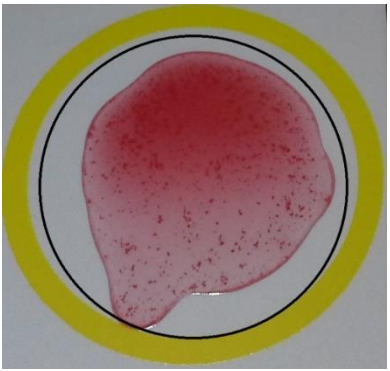

**Technique**

Le test d'agglutination est réalisé sur des lames à usage unique.

**Lecture et interprétation (Photo 4)**

L'agglutination : la souche testée est l'espèce recherchée par les particules de latex.



 <p><b>Photo 4a</b> Résultats du Test</p>	 <p><b>Photo 4b</b></p>
<p><b>Absence d'agglutination : la souche testée est une espèce différente de <i>C. albicans</i> et <i>C. dubliniensis</i></b> Remarque : il est possible de différencier ces deux espèces avec le test Bichro-Dubli Fumouze.</p>	<p><b>Réactif Color FUMOUCZE</b> <b><i>C. albicans</i> / <i>C. dubliniensis</i> FUMOUCZE (Latex)</b></p>
 <p><b>Test positif : <i>Candida krusei</i></b> <b>Photo 4c</b></p>	 <p><b>Réactif Color FUMOUCZE (Latex)</b> <b><i>Candida krusei</i> Photo 4d</b></p>
<p>Figure 10. 11 : Test d'agglutination au latex / Bamba CHU de Bobo-Dioulasso)</p>	

## c. Identification des autres espèces du genre *Candida*

### Tests biochimiques

Ces tests biochimiques sont utilisés après l'isolement du champignon. Ils ne concernent pratiquement que les levures. Ils étaient explorés à l'aide de tubes ou de boîtes. Aujourd'hui, de très nombreuses minigaleries permettent une approche beaucoup plus précise et beaucoup plus simple d'identification des différentes levures. Les différents tests utilisés sont:

#### i) Galerie classique

- **Zymogramme** : c'est l'étude des fermentations sucrées (glucose, galactose, maltose, saccharose, lactose, raffinose). Le zymogramme est la liste des glucides fermentés ou non par la levure ou le champignon.

- **Auxanogramme du carbone** : c'est l'utilisation des glucides en milieu aérobie comme unique source de carbone et d'énergie (assimilation des glucides) pour la croissance d'une molécule carbonée ajoutée à un milieu contenant les ions minéraux, les coenzymes (vitamines), les bases azotées et acides aminés indispensables à la croissance. Les molécules carbonées utilisées comme facteurs de croissance ne permettent pas une croissance visible. Elle peut être utilisée pour les bactéries et non seulement pour les Champignons (API20 NE, API32 GN).
- **Technique API Auxanogramme** : elle est similaire à celle de l'auxanogramme du carbone. Le milieu ensemencé est placé dans des cupules qui contiennent le substrat. On apprécie la culture ou non de la souche en référence à un témoin sans carbone suffisant pour assurer la culture.

### ii) Microgaleries

Les nouvelles galeries miniaturisées ajoutent :

- la recherche de nombreuses aminopeptidases (Proline aminopeptidase, His aminopeptidase) ;
- la recherche d'une phénoloxydase assez caractéristique des basidiomycètes (*Cryptococcus*) ;
- des enzymes de type ONPG hydrolase.

Les principales minigaleries commercialisées sont entre autres : la Galerie API Candida, la Galerie Auxacolor, la Galerie FungiScreen...

Tableau 10. 4 : Deux exemples de galeries minigaleries commercialisées

	Incubation	Tests
Api Candida	<b>18-24 heures à 37°C</b>	Fermentation des glucides et mise en évidence d'enzymes
Api 20C AUX	<b>48 -72 heures à 30°C</b>	Auxanogramme du carbone

### iii) Autres tests biochimiques

Des tests biochimiques classiques de la bactériologie peuvent être pratiqués. Par exemple:

- recherche de l'uréase obligatoire sur une levure isolée du LCR ;
- réduction du tétrazolium (TTC);
- sensibilité à l'actidione (cycloheximide) à 0,1 % (100 µg/mL) ;
- étude des besoins en facteurs de croissance (pour les filamenteux).

## d. Recherche de capsule de cryptococques (à l'encre de Chine (India ink))

### Principe



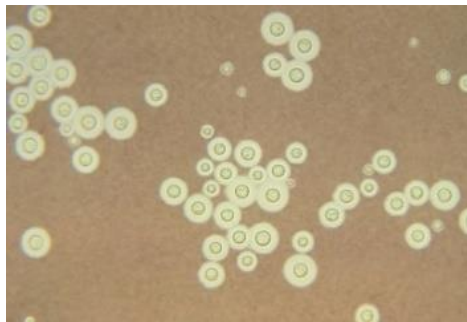
L'encre de Chine est utilisée principalement pour détecter les cryptococques ou d'autres champignons encapsulés dans une suspension cellulaire (p. ex. culot de LCR) à l'état frais. Le fond, et non le micro-organisme lui-même, est coloré, ce qui révèle la capsule sous forme d'un halo.

#### Technique

- A l'aide d'une pipette stérile, déposer une goutte d'échantillon sur une lame propre ;
- Déposer une goutte d'encre de Chine à côté de la goutte d'échantillon ;
- Placer une lamelle sur la lame de façon à recouvrir et étaler le liquide ;
- Examiner au microscope à l'objectif x100.

#### Lecture et interprétation

On observe des levures sphériques encapsulées de 4 à 8 $\mu$  entourées d'un halo clair (coloration à l'encre de Chine).



(Source : lookfordiagnosis.com)

Figure 10. 12 : *Cryptococcus neoformans* (*Filobasidiella neoformans*) à l'encre de Chine

## 2. Identification des champignons filamenteux

### a. Généralités

Elle est basée sur les **caractères macroscopiques et microscopiques** des champignons obtenus en culture pure.

- **Caractères macroscopiques**
  - Délai de culture;
  - Aspect de la colonie: plate ou surélevée..., plane, plissée ou cratériforme..., glabre, plâtreuse, poudreuse, granuleuse, duveteuse ou floconneuse... ;
  - Couleur du revers, existence de crêtes ou arborisations en profondeur de la gélose.
- **Caractères microscopiques:** examen des organes fongiques.

Noter la présence, l'abondance et la forme des filaments mycéliens, des arthrospores, des microspores (microconidies), des macrospores (macroconidies), des formations ornementales (vrilles, organes pectinés, organes nodulaires, chandeliers faviques).

## **b. Identification des dermatophytes**

### **Définition**

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux. Ce sont des parasites exclusifs de la kératine (peau, ongles, follicules pileux). Ils ne présentent aucune affinité pour les muqueuses et les tissus profonds. Ils sont sensibles à la griséofulvine.

### **Principaux genres**

On y range trois genres :


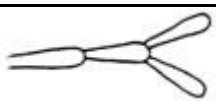
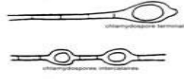
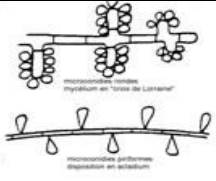
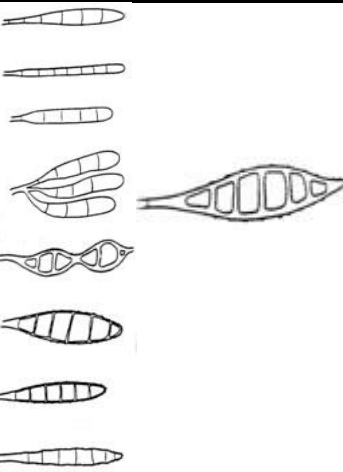
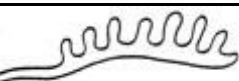

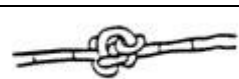
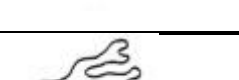

- Genre *Microsporum*,
- Genre *Epidermophyton*,
- Genre *Trichophyton*.

### **Caractères culturaux**

- **Aspect macroscopique** : sur Sabouraud + chloramphénicol (+cycloheximide), on décrira la surface et le revers :
  - Couleur des colonies au **recto et verso** ;
  - Forme des colonies : rondes, étoilées... ;
  - Relief des colonies : plates, plissées... ;
  - Caractéristiques de la surface : duveteuse, poudreuse, granuleuse, glabre... ;
  - Taille des colonies : réduite ou étendue ;
  - Pigment diffusant dans la gélose.

**Aspect microscopique** : les éléments caractéristiques des dermatophytes sont représentés dans le tableau 10. 5.

Tableau 10. 5 : Éléments caractéristiques des dermatophytes

Filaments mycéliens cloisonnés	En "bambou"		
	En "raquette"		
Chlamydospores			
Microconidies (unicellulaires) : rondes ou piriformes			
Macroconidies (pluricellulaires et cloisonnées transversalement)		 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Paroi lisse chez <i>Trichophyton</i> et <i>Epidermophyton</i></li> <li>• Paroi rugueuse chez <i>Microsporum</i></li> </ul>	<p>Macroconidies lisses (genres <i>Trichophyton</i> et <i>Epidermophyton</i>)</p> <p>Macroconidies échinulées (genre <i>Microsporum</i>)</p>
Ornementations	Organe pectiné (en forme de peigne)		
	Organe nodulaire (en forme de nœud)		Ex : <i>Trichophyton schoenleinii</i>
	Chandelier favique		Ex : <i>Trichophyton schoenleinii</i>
	Clou favique		Ex : <i>Trichophyton schoenleinii</i>
	vrille		Ex : <i>Microsporum persicolor</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i>

Différenciation des principaux genres et espèces de dermatophytes d'après les examens macroscopique et microscopique représentée dans le tableau 10. 6.

Tableau 10. 6 : Identification des dermatophytes

Dermato-phytes	Parasitisme pileaire	Vitesse de pousse	Aspect des colonies	Micro-conidies	Macro-conidies	Particularités
<i>E. floccosum</i> Attaque la peau, les ongles	Absent	Rapide (5-6j)	Poudreux, jaune-verdâtre (pléomorphisme rapidement)	Pas de micro-conidies	Nombreuses, lisses (parfois échinulées) en régime de banane	
<i>T. mentagrophytes</i>	Microïde (var. mentagrophytes)	Rapide (5-6j)	Poudreux, duveteux, blanc crème, verso incolore à brun rougeâtre	Nombreuses, arrondies, disposées en buisson	Plus rares, en massue, lisses, à parois minces	Vrilles, filaments articulés à angle droit
<i>T. tonsurans</i>	Endothrix	Lent (10-15j)	Poudreux ou velouté, de consistance cartonnée, blanches ou jaune soufre	Nombreuses, piriformes, à base large	Rares, lisses, allongées, à parois minces	Chlamydo-spores
<i>T. schoenleinii</i>	Favique	Très lent (15j)	Cireux, jaunâtre, évoquant une morille	Absentes	Absentes	Chlamydo-spores clous flaviques, chandeliers faviques
<i>T. violaceum</i>	Endothrix	Lent (10-15j)	Colonies petites, bombées, glabres, violettes (parfois blanches)	Absentes	Absentes	Filaments toruloïdes
<i>T. rubrum</i>	Très rare, endothrix ou	Rapide (6-7j)	Duveteux blanc-crème ou violacé,	Inconstantes, pyriformes, disposées	Souvent très rares, lisses, allongées, à parois	Organes triangulaires

Techniques de diagnostic mycologique

	endo-ectothrix		verso incolore ou brun	en acladium	minces	
<b><i>T. verrucosum</i></b>	Mégaspore	Très lent (3 sem)	Verruqueux, blanc-crème, verso brun	Absentes	Absentes	Chlamydospores, filaments toruloïdes
<b><i>T. soudanense</i></b>	Endothrix	Lent (10-15j)	Glabre et plissé, aspect étoilé, couleur abricot-sec	Exceptionnelles, pyriformes	Très rares, lisses	Filaments rétrogrades, fil de fer barbelé
<b><i>M. canis</i></b>	Microsporique	Rapide (5-6j)	Duveteux, couleur blanche (aspect étoilé), pigment jaune-orangé au verso	Inconstantes, pyriformes	En quenouille, échinulées, à parois et cloisons épaisses	Mycélium en raquette
<b><i>M. persicolor</i></b>	Absent	Rapide (5-6j)	Aspect de feutre, blanches à beiges puis rosées, verso rose lilas	Nombreuses, arrondies, en bout d'allumettes	Plus rares, lancéolées, finement échinulées, à parois minces	Vrilles, filaments articulés à angle droit
<b><i>M. langeronii</i></b>	Microsporique	Lent (8-10j)	Duveteux, blanches à grises, verso beige saumoné	Pyriformes	Rares, déformées, parois épaisses et échinulées	Chlamydospores mycélium en raquette, organes pectinés
<b><i>M. gypsum</i></b>	Favique ou endo-ectothrix	Rapide (5-6j)	Platreux, beige puis chamois	Rares, pyriformes	Nombreuses, en cocon, échinulées	

Remarques : les caractéristiques morphologiques font parfois défaut, surtout dans les primocultures, imposant le repiquage sur des milieux plus propices à la pigmentation des colonies et à la sporulation.

Le diagnostic *in fine* est le résultat de la confrontation des différents arguments, **morphologiques, épidémiologiques et cliniques**.

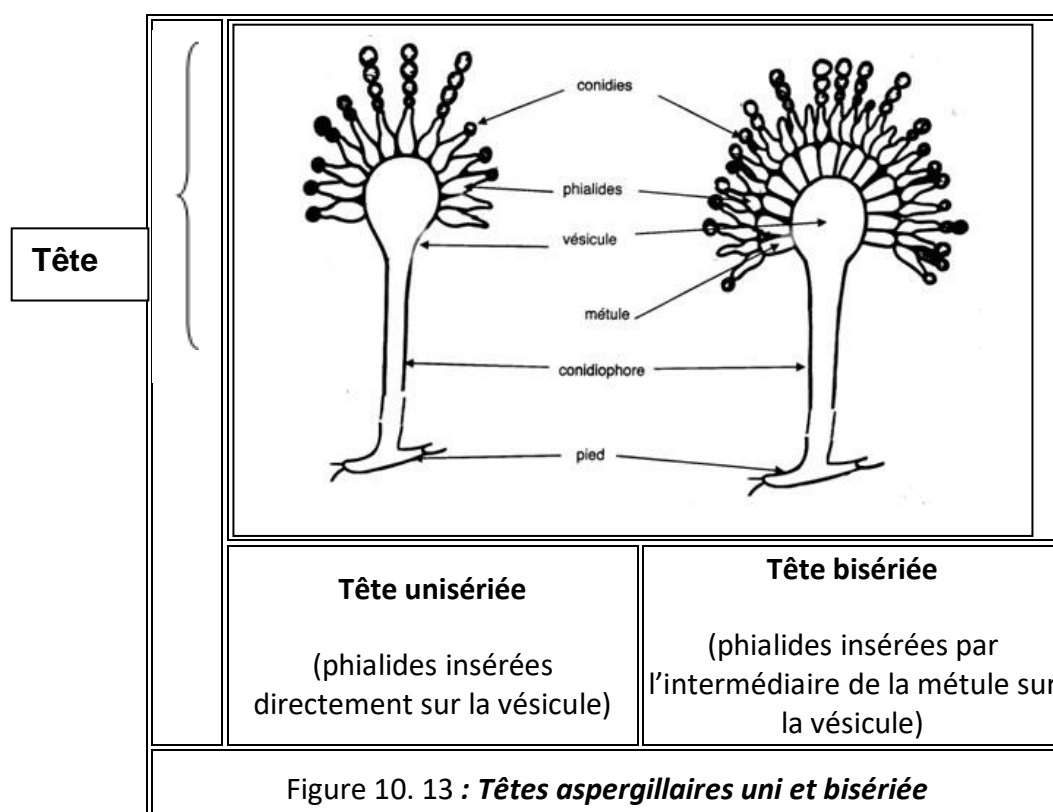
## c. Identification des *Aspergillus*

### • Aspect macroscopique

Il peut être réalisé sur milieu de Czapek qui favorise la croissance et la sporulation de la plupart des *Aspergillus* quand il est additionné de 1% de liqueur de macération de maïs, ou sur tout autre milieu permettant la culture d'*Aspergillus* (gélose Sabouraud, gélose Sabouraud + antibiotique) : on décrira la **surface et le revers**.

### • Aspect microscopique

Les espèces du genre *Aspergillus* sont reconnaissables à l'examen microscopique par les **filaments septés** portant des **têtes aspergillaires (spécifiques du genre *Aspergillus*)** qui sont des vésicules à l'extrémité de **conidiophores** qui donnent naissance à des spores externes allongées (**stérigmates ou phialides**) qui, à leur tour, donnent des **conidies** (**Figure 10. 13**).



- **Identification**

Elle se base sur la mise en évidence de la tête aspergillaire (vésicule (± métules) + phialides + conidies) caractéristique du genre *Aspergillus* (Photo 6).

**Le diagnostic d'espèce** prend en compte l'aspect des colonies à maturité, la taille et la forme de la vésicule, la disposition des phialides, l'aspect et la taille du conidiophore, la taille et forme des conidies (voir tableau 10. 7).

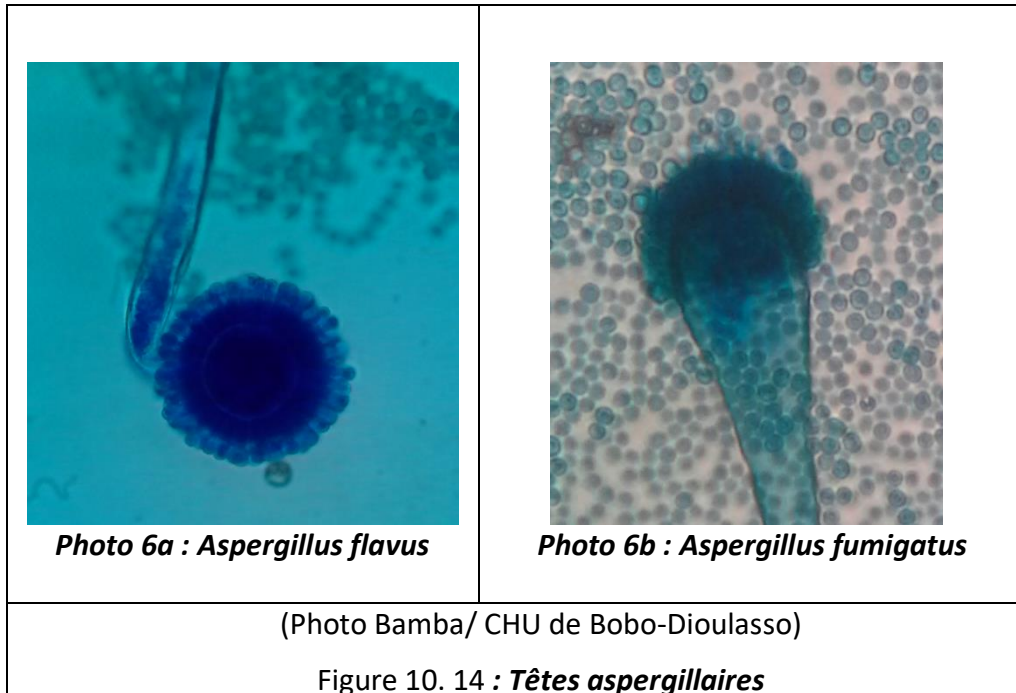






Tableau 10. 7 : Diagnostic d'espèce du genre *Aspergillus*

		<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<b>Croissance</b>	Délai culture	24 à 48 h à 37°C	2 à 3 jours	2 à 3 jours	3 à 5 jours	3 à 5 jours
	T° optimale	40-42°C (culture jusqu'à 57°C)	37°C	25-30°C (culture à 42°C)	25-30°C (culture à 37°C)	25-30°C (culture à 37°C)
<b>Aspect macroscopique</b>	Recto (surface)	Colonies blanches, puis bleu-vert, puis <b>vert foncé à gris noirâtre</b>	Colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaunes, puis <b>vert-jaune</b>	Colonies d'abord blanches, puis jaunes et enfin granuleuses noires	Colonies duveteuses à poudreuses, de teinte beige à <b>brun-noisette ou canelle</b>	Colonies duveteuses à poudreuses, en général <b>vert foncé</b> ou vert cresson, jaunâtres pour les souches productrices de cléistothèces
	Verso (revers)	Incolore, jaune, vert ou brun-rouge suivant les souches	Incolore, rosé ou brun-rouge foncé	Incolore à jaune pâle	Jaune à brun-orange	<b>Rougeâtre, pourpre</b>



Techniques de diagnostic mycologique

<b>Aspect microscopique</b>	Tête aspergillaire	<b>Unisériée, en colonne</b> compacte, assez grande (jusqu'à 100µm de long)	Unisériée ou bisériée, petite en colonne ou grande et radiée (300 à 400µm de long)	<b>Bisériée radiée, noire à maturité</b>	Bisériée, en <b>colonne</b> évasée (aspect d'éventail)	<b>Bisériée, en colonne</b> , courte et compacte
	Vésicule	hémisphérique (20 à 30µm)	sphérique (25 à 45µm)	globuleuse (45 à 75µm)	Globuleuse	sphérique
	Phialides	Directement portées par la vésicule, dressées	Directement portées par la vésicule (unisériée) ou portées par des métules (bisériées)	Insérées sur la vésicule par des métules (bisériée) disposées sur tout le pourtour de la vésicule	Portées par des métules insérées sur toute la partie supérieure de la vésicule	Portées par des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule
	Conidies	Globuleuses, vertes, échinulées, petites (2,5 à 3µm de diamètre)	Globuleuses à subglobuleuses, vert pâle, échinulées (3,5 à 4,5µm de diamètre)	Globuleuses, brunes, échinulées, souvent disposées en chaîne (3,5 à 5µm de diamètre)	Globuleuses à légèrement elliptiques, lisses, petites (6-7µm)	Rondes, vertes échinulées, souvent disposées en chaînes (3 à 3,5µm)
	Conidio phore	Court (300µm), lisse et incolore, <b>évasement progressif au sommet</b>	Long (1 à 2,5mm), hyalin, <b>verruqueux</b> avec des aspérités	Lisse, hyalin ou brunâtre dans sa moitié supérieure, très long (1,5 à 3mm)	Lisse, incolore (100 à 250µm de long)	<b>Brun</b> , lisse, sinueux, <b>très petit</b> (75 à 100µm)
	Schéma de la tête aspergillaire					

## d. Identification des champignons filamenteux opportunistes

Tableau 10. 8 : Pouvoir pathogène, Caractères macroscopiques et microscopiques des champignons filamenteux opportunistes

	Habitat/pouvoir pathogène	Macroscopie	Microscopie
<b><i>Penicillium sp</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Saprophyte de l'environnement</li> <li>-Utilisation dans l'industrie agro-alimentaire (affinage du fromage et du saucisson) et pharmaceutique</li> <li>-Rares espèces incriminées en pathologie humaine : <i>P.marneffi</i> responsable d'infections systémiques chez les individus immuno-déprimés (Asie du Sud Est)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Surface poudreuse, blanche à bleu-vert</li> <li>-Revers incolore à jaunâtre.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Mycélium septé (eumycélium)</li> <li>-<b>Conidiophore en pinceau</b></li> <li>-Phialides à l'extrémité des ramifications</li> <li>-Conidies rondes ou ovoïdes, lisses ou rugueuses, hyalines ou colorées, en longues chaînes</li> </ul>
<b><i>Mucor</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Saprophyte du sol, des fruits et graines de céréales</li> <li>-mycose rhinocérébrale</li> <li>-mycose cutanée chez les grands brûlés</li> <li>-mycose pulmonaire chez les leucémiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Surface cotonneuse, blanc beige à brun</li> <li>-Revers incolore.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-<b>Sporocystes (=sporangies) bruns</b></li> <li>-Sporocystophore (=sporangiofère) non ramifié</li> <li>-Columelle (=dilatation de la partie apicale du sporocystophore) ovoïde ou cylindrique</li> <li>-Spores ovoïdes, lisses ou rugueuses</li> </ul>
<b><i>Geotrichum</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Saprophyte des plantes et du tube digestif de l'homme</li> <li>-Atteintes respiratoires, digestives et buccopharyngées sur terrain débilite</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Surface cireuse ou duveteuse, blanche</li> <li>-Revers incolore.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mycélium septé (eumycélium)</li> <li>-<b>Arthrospores à paroi épaisse</b></li> </ul>

## E. Méthodes de détermination de la sensibilité aux antifongiques des micromycètes

Le but de l'antifongigramme est de détecter une résistance, donc un possible échec thérapeutique. Il faut d'emblée souligner que l'antifongigramme ne concerne que les infections justifiant l'administration d'antifongiques systémiques (dans certains cas/ dans certaines mycoses profondes).

Les techniques utilisées pour l'antibiogramme des bactéries sont applicables aux champignons quand la recherche de la sensibilité a un intérêt (dans certaines mycoses profondes). Toutefois, l'utilité de l'antifongigramme pour la thérapie est loin d'égaliser celle de l'antibiogramme utilisé lors des traitements anti bactériens. Quelle que soit la technique utilisée, le meilleur critère de sensibilité reste la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les seuils définissant la sensibilité ou la résistance sont disponibles uniquement pour les levures.

### 1. Méthodes de référence

Il existe deux techniques de référence : la technique **EUCAST** (European Committee on Antimicrobial Susceptibility) et la technique **CLSI** (Clinical and Laboratory Standards Institute). Ces méthodes n'étant pas commercialisées, elles sont réservées uniquement aux centres de référence.

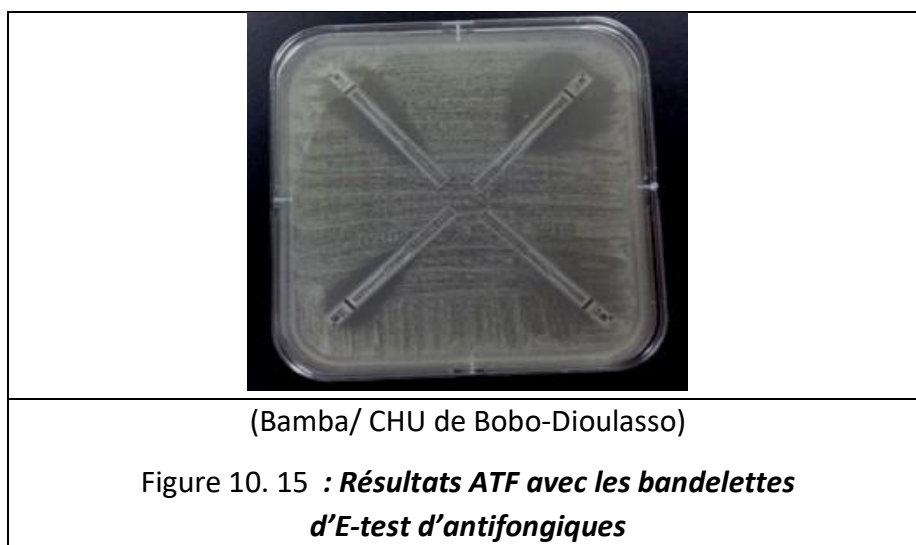
La technique européenne, **EUCAST** mise au point après celle américaine (**CLSI**), visait à standardiser la lecture des résultats (remplacement de la lecture visuelle par celle spectrophotométrique) et à réduire la durée de lecture (24 au lieu de 48 heures).

La méthode **EUCAST** est une technique européenne dérivée de la méthode **CLSI**. Elle s'en distingue par un inoculum plus dense ( $1-5 \times 10^5$  UFC au lieu de  $0,5-2,5 \times 10^3$  UFC), une concentration supérieure en glucose (2% au lieu de 0,2%) et une lecture par spectrophotométrie. Par rapport à la technique CLSI, ces modifications permettent une possible automatisation de lecture des plaques et en outre, une lecture plus précoce (24 heures au lieu de 48 heures). Cependant, les CMI obtenues par la méthode **EUCAST** sont généralement plus basses que celles enregistrées avec la technique **CLSI**. Les seuils de CMI définissant la résistance ou la sensibilité par la méthode EUCAST ne pouvant être transposés à la méthode CLSI, des seuils spécifiques ont été définis pour chaque technique.

## 2. Tests utilisés en routine

### a. Etest®

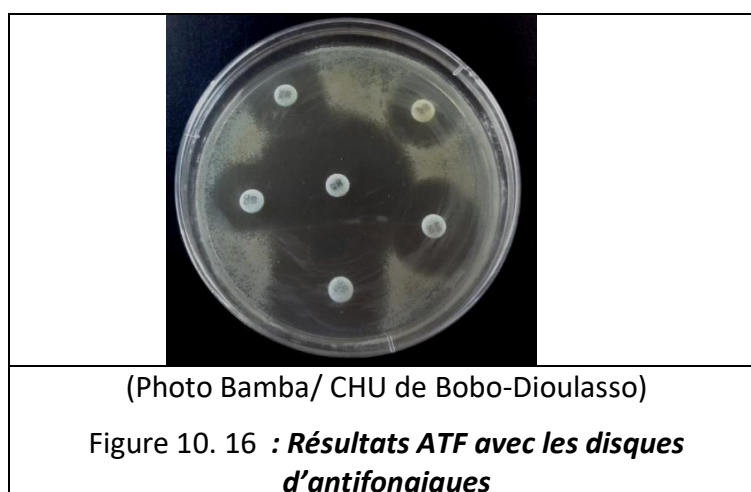
Le Etest® est une méthode **d'antifongigramme en bandelette**. Le verso des bandelettes est imprégné d'un gradient exponentiel et continu d'antifongique ; le recto, gradué, représente une échelle de concentrations permettant la lecture d'une CMI ( $\mu\text{g/ml}$ ). Elle présente une excellente corrélation avec la technique CLSI.



### b. Autres tests

Les autres tests commercialisés sont nombreux. On peut citer entre autres le Sensititre Yeast One®, la technique de diffusion en gélose, etc.

Actuellement, en dehors du Etest®, seul le Sensititre Yeast One® permet de tester les nouveaux antifongiques (échinocandines, posaconazole).



Quelques particularités :

- le milieu utilisé peut être particulier en raison de spécificités des antifongiques (milieu semi-synthétique pour la 5 fluorocytosine et les autres en routine, milieu complexe au casitone pour les polyènes et imidazolés car donnant une lecture plus franche) ;
- la durée d'incubation dépend du champignon.

### III. Autres techniques de diagnostic mycologique

#### 1. La technique protéomique ou spectrométrie de masse : MALDI-TOF

##### A. Principe

La spectrométrie de masse (SM) est une technique de détection et d'identification de microorganismes entiers par mesure de leur masse. Il existe plusieurs variantes de la SM. La SM à ionisation douce de type MALDI-TOF est une technique de phénotypage des champignons (levures et filamenteux) qui associe une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionisation) et un analyseur de temps de vol (TOF, time-of-flight).

L'identification des microorganismes par cette technique repose sur la mise en évidence d'un profil spectral qui va être différent d'un genre à l'autre et d'une espèce à l'autre. Il existe des banques de données qui regroupent l'ensemble des spectres de référence nécessaires à l'identification des microorganismes.

##### B. Technique

L'identification par SM est effectuée sur des colonies issues de cultures pures obtenues après 24 à 48 heures d'incubation sur milieux chromogènes (BBL-CHROMagar *Candida*<sup>™</sup> ou CandiSelect4<sup>™</sup>) ou sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques.

Pour les levures, l'étape d'extraction, qui consiste en une extraction protéique à l'aide d'acide formique, est indispensable. Elle peut être réalisée préalablement au dépôt ou directement sur la plaque lors du dépôt. Puis, une quantité exacte du standard reconstitué « BTS » à base de la bactérie *Escherichia coli* (servant de témoin positif de la réaction) est déposée sur la Cible en inox. Ensuite, un volume exact de solution de matrice (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acide [HCCA ; Bruker Daltonics]) à 10mg/ml est ajouté à l'extrait de protéines fongiques et séché.

Peu importe la procédure utilisée pour l'extraction des protéines, une fois la matrice HCCA déposée, la lecture de la Cible est faite au bout de deux heures maximum à l'aide du système MALDI-TOF (Bruker®).

## C. Lecture et interprétation des résultats

La signification des scores est détaillée dans le tableau ci-dessous.

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Source : .....

## 2. Techniques moléculaires

Devant les résultats parfois décevants des techniques de biologie classique, des techniques de biologie moléculaire basées sur l'amplification d'ADN d'agents fongiques ont été mises au point. Des techniques d'amplification génique par PCR ou RT-PCR ont ainsi été développées et aident au diagnostic des infections fongiques.

La séquence d'ADN des agents pathogènes choisie pour être amplifiée varie selon les techniques et les équipes. De nombreuses méthodes ont été investiguées, utilisant des cibles moléculaires variées, des formats d'extraction d'amplification et de détection des acides nucléiques différents.

La technique de la PCR LightCycler est mise au point et a pour but une détection rapide et une différenciation des ADN fongiques à partir d'échantillons dermatologiques. Cette technique permet la différenciation entre ADN de dermatophytes et ADN de levures ou moisissures.

De plus en plus, on a recours à une approche de diagnostic moléculaire par séquençage de régions variables du génome pour l'identification précise d'un champignon, permettant souvent un gain de temps et de précision, surtout quand cela est utile cliniquement.

Parmi les mycoses profondes, la pneumocystose est celle pour laquelle la RT-PCR est indispensable pour une détection et un traitement précoce.

La PCR nichée (nested-PCR) est positive dans les tissus chez les sujets atteints de paracoccidioïdomycose, d'où son intérêt en Amérique latine. Aussi, la PCR (nested-PCR) peut être utile au diagnostic de la pénicilliose ou infection à *Penicillium marneffe*.

Dans la sporotrichose, en cas de culture positive, l'identification précise de la souche repose sur le séquençage de différentes régions génétiques.

Le diagnostic moléculaire est fiable et rapide dans les phaeohyphomycoses correspondant à des mycoses provoquées par de nombreux types de champignons noirs, appelés dématiés observés sur tous les continents (*Bipolaris*, *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Ochronosis*, *Rhinocladiella* et *Wangiella*).

Dans les zygomycoses (entomophthoromycoses, conidiobolomycose et basidiolobomycose), les techniques de biologie moléculaire permettent l'identification directe des champignons, mais elles nécessitent un laboratoire spécialisé.

Cependant, les principaux obstacles au développement de tests de détection moléculaires fongiques ont trait à la difficulté à extraire l'ADN d'un champignon, à la faible quantité d'ADN fongique dans le sang, et à l'inhibition par ce fluide biologique. L'absence de standardisation et de tests commerciaux limite drastiquement l'emploi en clinique de la biologie moléculaire, malgré leur intérêt potentiel évident.

### 3. La technique histopathologique

L'histopathologie permet de mettre en évidence au niveau cellulaire et tissulaire des aspects spécifiques des lésions fongiques. Cet examen a l'immense avantage de permettre de visualiser les éléments fongiques directement dans les tissus au site d'infection, et est souvent requis pour poser un diagnostic de certitude. Cependant, l'examen histopathologique, qui nécessite de disposer d'un fragment de tissu, est rarement pratiqué pour diverses raisons. Selon la nature de l'infection fongique, les techniques de colorations et le type de réactions histologiques diffèrent.

- Le **diagnostic histologique des entomophthoromycoses, conidiobolomycose et basidiolobomycose** repose sur la mise en évidence d'un granulome inflammatoire, centré sur les filaments mycéliens, par l'imprégnation argentique de Gomori-Grocott. La coloration HES permet de mettre en évidence au pourtour des filaments un épais manchon constitué de dépôts amorphes éosinophiles qui correspond au phénomène de Splendore-Hoeppli.
- **L'examen anatomo-pathologique d'une candidose profonde** utilise des prélèvements tissulaires colorés par le PAS ou le Gomori-Grocott.
- **Dans le cadre de la cryptococcose**, l'histologie des biopsies (peau...) montre des granulomes avec présence de levures encapsulées après coloration au HES, PAS, Gomori-Grocott.
- Au **cours de l'histoplasmosse disséminée**, l'histologie montre un granulome tuberculoïde avec des levures apparaissant en noir au Gomori-Grocott chez l'immunocompétent. Ce granulome histiocytaire est riche en levures chez l'immunodéprimé.
- Un granulome histiocytaire sans caséum, avec des levures de grande taille, soit extracellulaires, soit à l'intérieur des macrophages, est noté en cas de **la blastomycose ou blastomycose nord-américaine ou maladie de Gilchrist**.
- **Dans la sporotrichose**, l'examen histologique avec à la coloration à l'HES permet d'observer des corps astéroïdes caractéristiques (complexe antigènes-anticorps) mais non spécifiques.
- L'examen histologique permet la mise en évidence de cellules fumagoïdes spécifiques au sein d'un granulome au cours de la **chromomycose ou chromoblastomycose**

## **Conclusion**

Différentes méthodes de diagnostic mycologique des champignons sont disponibles et permettent de répondre à l'objectif d'une identification correcte des agents étiologiques, pour une bonne maîtrise de la prise en charge des mycoses. Les méthodes classiques, basées sur les observations macroscopiques et microscopiques en vue d'une identification phénotypique des champignons, bien que délicates ou limitées, sont généralement pertinentes dans ce cadre, pour des praticiens bien formés. **La technique histologique, utilisant des coupes de tissus ou des biopsies, permet de mettre en évidence au niveau cellulaire et tissulaire des aspects spécifiques des lésions fongiques.**

La spectrométrie de masse (MALDI-TOF) semble prometteuse pour une identification rapide et à haut débit des champignons. Les méthodes moléculaires permettent des identifications plus précises, plus fiables et plus exactes. Enfin, toutes ces méthodes ne dispensent pas d'une bonne formation en mycologie des microbiologistes afin de garder un regard critique sur les résultats générés et pour leur interprétation dans un contexte réglementaire de plus en plus exigeant.



## Bibliographie

1. Adachi H, Shimizu K, Hattori H, Tanaka R, Chibana H, Takagi Y et al. **Genotyping of *Candida albicans* by fragment analysis of microsatellites combined with 25S rDNA and RPS-based strategies.** J. Med. Mycol. 2009, 50, 167–174.
2. Aguilar C., Jullien V., Alanio A., Bretagne S., Frange P., Lanternier F., Lortholary G. **Antifongiques.** EMC - Maladies infectieuses, 2015 :1-22
3. Bontems O, Hauser PM, Monod M. **Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis.** Br. J. Dermatol. 2009, 161, 791–796.
4. Caillot, D., Chretien M.L., Legouge C. et al. **Aspergilloses invasives.** EMC-Maladies infectieuses 2014; 11(2): 1-6.
5. Charles D., Loulerque P., Viard J.P., Drauer F., Lortholary O. **Infections fongiques au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine.** Encycl. Méd. Chir, Maladies infectieuses. 8002-C-10, 2007.
6. Damiani C., Legal S., Nevez G., Totet A. **Infections à *Pneumocystis jirovecii* : biologie et clinique.** EMC-Maladies infectieuses. 2013;10(3):1-8
7. Develoux M., Bretagne S. **Candidoses et autres levures.** EMC-Maladies infectieuses 2014; 11(2): 11-13
8. Dupont B. **Histoplasmoses.** EMC-Maladies infectieuses. 2014; 11(2): 1-10
9. Ellis D, Davis S, Alexiou H, et al. **Descriptions of medical fungi.** Adelaide, Australia, 2007
10. Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M et al. **International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole.** J Clin Microbiol. 2005;43:3884-9. 3.
11. Garcia-Hermoso D, Dannaoui E, Lortholary O, Dromer F. **Agents of systemic and subcutaneous mucormycosis and entomophthoromycosis.** In: Manual of clinical microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology. 2011..
12. Glenn TC. **Field guide to next-generation DNA sequencers.** Molecular ecology resources. 2011; 11(5), 759–69.
13. Morand JJ, Maslin J. **Sporotrichose.** Encycl. Med. Chir, Maladies infectieuses. 8-604-A-10, 2003, 8 p.
14. Paugam A, Lassal H, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J. **Évaluation d'une nouvelle technique d'antifongigramme : le Etest®. Étude de la sensibilité au fluconazole de souches de *Candida* référencées.** J Mycol Med 1995;5:163-4. 6.
15. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Jones RN. **Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal plate for antifungal susceptibility testing of the new triazoles voriconazole, posaconazole, and ravuconazole.** J Clin Microbiol 2004; 42:4577-80.

16. Pihet M, Chabasse D. Zygomycoses (II). **Entomophthoromycoses tropicales : basidiobolomycose et conidiobolomycose.** EMC-Maladies infectieuses. 2014 ; 11(3) : 1-11
17. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing:** approved standard, 3rd ed; M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2008
18. Shoan Tehrani M, Charlier-Woerther C, Lortholary O. **Cryptococcose.** EMC-Maladies infectieuses. 2014; 11(2): 1-12.
19. Zijlstra EE, van de Sande WW, Welsh O et coll. **Mycetoma : a unique neglected tropical disease.** Lancet Infect Dis. 2016; 16 :100-102

## **11 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES AFFECTIONS PARASITAIRES ET MYCOSIQUES OPPORTUNISTES DU SIDA**

---

*Rédigé par Pr Bouyou Marielle (Gabon), Relu par Pr Badiane Aïda Sadikh (Sénégal)  
et Pr Kassi Fulgence (Côte d'Ivoire)*

## **Introduction**

### **Définition**

Il s'agit d'un ensemble de parasitoses et mycoses favorisées par l'immunodépression cellulaire chez les patients infectés par la VIH, d'autant plus que le taux de CD4 est inférieur à 200/mm<sup>3</sup>. Elles sont responsables d'une infection aiguë, sévère, récidivante, à localisation atypique ou disséminée, capable d'entraîner la mort chez l'immunodéficient.

### **Intérêt épidémiologique**

Le SIDA a provoqué l'éclosion de pathologies infectieuses nouvelles ou peu connues, à majorité parasitaires et mycosiques. Il s'agit principalement de protozooses et de mycoses cutanéodermiques ou profondes.

Avant les antirétroviraux, leurs prévalences étaient très élevées, notamment en Afrique où les moyens diagnostiques et thérapeutiques étaient peu répandus. A titre d'exemple, la cryptosporidiose était la parasitose la plus fréquente avec une prévalence de 7 à 47%, celle de l'isosporose était de 5 à 19%, celle de la cryptococcose de 10 à 30%, celle de la candidose oropharyngée de 40 à 73%, alors que les prévalences de la toxoplasmose et de la pneumocystose étaient plus faibles ou mal connues.

Depuis l'avènement des ARV et leur distribution gratuite chez les patients infectés, grâce au financement du Fonds Mondial de Lutte contre le VIH, la Tuberculose et le Paludisme, la prévalence des infections opportunistes a considérablement diminué. En 2014, elles étaient estimées comme suit dans une étude multicentrique d'Afrique de l'Ouest chez des patients sous ARV : candidose 10,3%, toxoplasmose 9,5% ; cryptococcose 19-5,9% ; pneumocystose 0,8% ; cryptosporidiose 1,3% ; microsporidiose 0,7%. ; (Lewden, 2014 ; Siddiqi, 2014).

### **Intérêt médical**

Ces affections engagent souvent le pronostic vital des malades infectés par le VIH, alors que chez les immunocompétents, elles sont bénignes, inapparentes pour certaines et/ou spontanément résolutive.

Ce sont des affections classantes du SIDA au stade cliniques 3 ou 4 majoritairement. Elles sont responsables d'une mortalité élevée, même traitées.

### **Intérêt diagnostique et thérapeutique**

L'identification des parasites ou champignons responsables est de plus en plus fréquente en Afrique du fait de la disponibilité de moyens diagnostiques radiologiques (IRM, TDM) et biologiques (Immunologiques tels que les TDR et moléculaires).

L'évolution est tributaire de la restauration immunitaire. En effet, la guérison et la prévention, aussi bien primaire que secondaire, sont conditionnées par le maintien de l'immunité qui passe par le contrôle de la réplication du VIH à l'aide d'un traitement antirétroviral efficace.

Les rechutes sont fréquentes.

### **Historique**

Juin 1981 : description premiers cas pneumocystose et VIH (5 cas) ;

## Diagnostic biologique des affections parasitaires et mycosiques opportunistes du sida

Juin 1981- Septembre 1982 : parmi 593 cas de VIH : 51% cas de pneumocystose ; 12% d'autres affections opportunistes ; létalité : 48% (CDC, 1982) ;

1985 : première identification d'*Enterocytozon bienewisi*, chez des patients atteints du Sida (Desportes et coll.) ;

1993 : identification d'*Encephalitozoon intestinalis* ;

1993 : affections parasitaires et fongiques classées dans la liste des maladies opportunistes du SIDA (Classifications OMS-CDC, 1993)

2014: Diminution considérable de la prévalence de ces maladies opportunistes dans certaines régions Afrique où le traitement antirétroviral est accessible (Lewden, 2014: Siddiqi, 2014).

## I. Rappels étiopathogéniques

Parmi les parasitoses opportunistes, on retrouve majoritairement de protozooses : cryptosporidiose, cyclosporose, microsporidiose, toxoplasmose, leishmanioses, une helminthose : l'anguillulose dans une moindre mesure. Les mycoses sont dues, soit à des champignons levuriformes : candidose ; cryptococcose ; soit à des champignons filamenteux : aspergillose ; soit à des champignons dimorphiques : histoplasmose, coccidioïdomycose, et à *Pneumocystis jiroveci* (Tableau 11. 1).

Tableau 11. 1 : **Agents pathogènes responsables d'infections opportunistes au cours du SIDA**

Pathologies	Agents pathogènes	Localisations préférentielles Chez les PVVIH
<b>PROTOZOOSSES</b>		
<b>Cryptosporidiose</b>	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Cryptosporidium hominis</i>	Intestin, voies biliaires
<b>Cyclosporose</b>	<i>Cyclospora cayentanensis</i>	Intestin
<b>Isosporose</b>	<i>Cystoisospora belli</i>	Intestin
<b>Leishmaniose</b>	<i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania donovani</i> <i>Leishmania tropica</i> , <i>Leishmania guyanensis</i>	Viscères Peau
<b>Microsporidioses</b>	<i>Enterocytozon bienewisi</i> <i>Encephalocytozoon intestinalis</i> <i>Encephalocytozoon hellem</i>	Intestin Intestin, voies urinaires
<b>Toxoplasmose</b>	<i>Toxoplasma gondii</i>	SNC, rétine, poumons
<b>HELMINTHOSE</b>		
<b>Anguillulose</b>	<i>Strongyloides stercoralis</i>	SNC, disséminée
<b>MYCOSES</b>		
<b>Aspergillose</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Poumons
<b>Candidose</b>	<i>Candida albicans</i> Autres levures du genre <i>Candida</i>	Cavité buccale, œsophage, disséminées
<b>Cryptococcose</b>	Complexe d'espèces <i>Cryptococcus neoformans</i> et Complexe d'espèces <i>C. gattii</i>	SNC, poumon, peau
<b>Coccidioïdomycose</b>	<i>Coccidioides immitis</i>	Poumon, SNC
<b>Histoplasmose</b>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Poumons, ganglions, disséminée
<b>Pneumocystose</b>	<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Poumon

L'immunodépression induite par le VIH serait plus favorable à la réactivation de protozoaires unicellulaires qu'à la dissémination des parasites pluricellulaires comme les helminthes.

Les mécanismes pathogéniques évoqués sont :

- la réactivation ou l'exacerbation d'une infection acquise antérieurement et habituellement bénigne en l'absence de déficit immunitaire. Sur le plan épidémiologique, la fréquence de ce type d'infection opportuniste sera entièrement dépendante de la prévalence de l'infection dans la population. Le rôle de l'environnement est mineur.
- l'acquisition d'une infection par un micro-organisme habituellement peu ou pas pathogène en cas de déficit immunitaire profond, de protozoaires et champignons dont certaines espèces ne sont habituellement infectantes que chez l'animal. Le rôle de l'environnement est important : c'est le cas pour *Cryptosporidium*, *Aspergillus*, et *Pneumocystis*.

Il existe une dissémination fréquente à partir d'un foyer primitif pour certaines affections, et pour d'autres, des localisations inhabituelles fréquentes.

Ces affections peuvent se succéder chronologiquement en fonction du stade de l'immunodépression (taux de CD4) ou survenir de façon concomitante chez un individu, surtout en cas d'immunodépression profonde ou prolongée. Ainsi entre 500 et 200 CD4/mm<sup>3</sup>, les candidoses oropharyngées surviennent les premières ; entre 200 et 100 CD4/mm<sup>3</sup>, les pathologies cérébrales et pulmonaires prédominent ; et en dessous de 100 CD4, les pathologies digestives sont plus fréquentes (Voir tableau 11. 2).

Elles peuvent aussi être inaugurales (mode de découverte de l'infection par la VIH).

Sur le plan clinique, la fièvre et les troubles digestifs sont les symptômes les plus fréquents de la maladie. La diarrhée chronique aggrave ou accélère l'amaigrissement préexistant. Les signes cutanéomuqueux sont fortement évocateurs du SIDA et les manifestations respiratoires et neurologiques indiquent un stade avancé de la maladie.

Tableau 11. 2 : Chronologie de la survenue des affections opportunistes en fonction du taux des CD4

Affection opportuniste	Stade de la maladie à VIH (OMS)	Taux de CD4/mm <sup>3</sup>
Candidose buccale	3	500-200
Candidose vaginale récidivante	3	500-200
Candidose oesophagienne	4	<200
Candidose bronchique, trachéale ou pulmonaire	4	<200
Pneumocystose	4	<200
Toxoplasmose cérébrale	4	<200
Aspergillose	4	<100
Coccidioïdomycose disséminée ou extrapulmonaire	4	<100
Cryptococcose extrapulmonaire	4	<100
Cryptosporidiose intestinale chronique (>1 mois)	4	<100
Cyclospore	4	<100
Histoplasmose disséminée ou extrapulmonaire	4	<100
Isosporose intestinale chronique (>1 mois)	4	<100
<b>Microsporidioses</b>	<b>4</b>	<b>&lt;50</b>

## II. Diagnostic biologique

### A. Circonstances du diagnostic biologique

Il peut s'agir de manifestations généralisées ou focalisées. Celles présentées ci-dessous ne sont pas exhaustives (voir chapitres des parasitoses et mycoses correspondants).

#### 1. Fièvre prolongée avec altération de l'état général sans focalisation cérébrale

#### 2. Manifestations digestives

- Dysphagie avec douleurs rétro-sternales ;
- Syndrome diarrhéique chronique d'intensité variable, mais le plus souvent avec diarrhée massive, parfois cholériforme, avec ou sans fièvre ;
- Hépatosplénomégalie fébrile ;
- Syndrome douloureux abdominal évoquant une cholangite ou cholécystite alithiasique.

### **3. Manifestations pulmonaires**

- Syndrome de pneumopathie interstitielle bilatérale rebelle aux antibiotiques ;
- Syndrome de pneumopathie radiologique d'allure non bactérienne ;
- Toux sèche avec dyspnée dans un contexte fébrile ;
- Syndrome de détresse respiratoire.

### **4. Manifestations cutanéomuqueuses**

- Muguet, glossite, perlèche, ou dépôts blanchâtres à tout endroit de la cavité buccale
- Lésions papuleuses ombiliquées dans un contexte d'infection disséminée
- Lésions cutanées ulcérées et/ou croûteuses, insurgées entourées d'un bourrelet inflammatoire, d'évolution chronique et résistantes aux traitements chez une personne ayant séjourné en zone d'endémie de leishmaniose
- Polyadénopathies.

### **5. Manifestations neurologiques**

- Syndrome déficitaire localisé ;
- Convulsions localisées ou généralisées ;
- Céphalées tenaces dans un contexte fébrile avec absence de syndrome méningé ;
- Syndrome méningé ;
- Signes d'encéphalites ;
- Image radiologique d'abcès cérébraux.

### **6. Autres circonstances du diagnostic**

- Baisse de l'acuité visuelle ;
- Manifestations urinaires avec des antécédents de diarrhée ;
- Pancytopenie fébrile ;
- Hyperéosinophilie cyclique (ou ondulatoire).

## **B. Prélèvements**

Ils sont fonction des manifestations cliniques et de la localisation préférentielle des agents pathogènes (Tableau 11. 2).

Il peut s'agir de sang, selles, urines, expectorations, expectorations induites, liquide de lavage bronchiolo-alvéolaire, liquide de tubage duodénal, écouvillonnage buccal, prélèvement de squames ou grattage des lésions cutanées, exsudat cutané, de pus, de suc



*Diagnostic biologique des affections parasitaires et mycosiques opportunistes du sida*  
ganglionnaire, appositions ganglionnaires, biopsies, frottis médullaire, urines, humeur aqueuse par ponction de la chambre antérieure de l'œil, etc.

## C. Examens parasitologiques et mycologiques

### 1. Examens microscopiques

La goutte épaisse, le frottis sanguin ou un test de diagnostic rapide pour doivent être systématiquement réalisés en zone d'endémie afin d'éliminer un paludisme ou de rechercher une co-infection qui aggrave le pronostic du patient.

#### Examen direct à frais

- Selles fraîches pour la mise en évidence d'oocystes d'*Cystoisospora belli*, examen au microscope à UV pour la détection d'oocystes de *C.cayetanensis* ;
- Liquide gastrique, Liquide cerebrospinal (LCS ou anciennement appelé LCR), Liquide de lavage broncho alvéolaire (LBA) pour la mise en évidence de larves d'anguillule ;
- LBA montrant des filaments mycéliens hyalins ramifiés à angle aigus (*Aspergillus*) ;
- Pus, sérosités, appositions (*Histoplasma*) ;
- Tout prélèvement ; levures bourgeonnantes avec pseudofilaments (*Candida sp*).

#### Examen direct après coloration

- Giemsa et May Grunwald Giemsa (MGG) : formes amastigotes de leishmanies, levures du genre *Candida*, grandes levures en double contour, pseudo-encapsulées d'*Histoplasma*, ascospores de *Pneumocystis* disposées en rosette ;
- Gram : levures du genre *Candida* ;
- Encre de chine : *Cryptococcus* ;
- Coloration argentique ou bleu de toluidine : *Pneumocystis* ;
- Imprégnation argentique : *Aspergillus* ;
- Uvitex 2B ou Weber : microsporidies.

#### Examen après technique de concentration des selles

- Technique de Ritchie ou Kato Katz (*Cystoisospora belli*) ;
- Technique de Ritchie puis coloration de Ziehl neelsen modifiée : *Cryptosporidium sp*, *Cystoisospora belli*, *C. cayetanensis*.

#### Examen microscopique après marquage aux anticorps monoclonaux

- *Toxoplasma*, *Aspergillus*, *Pneumocystis*.

### 2. Cultures

- Hémo-cultures à la recherche de levures du genre *Cryptococcus* ou *Candida*, cependant la sensibilité est faible comparativement à celle des autres méthodes ;
- Coproculture (*Strongyloides*) ;

### *Diagnostic biologique des affections parasitaires et mycosiques opportunistes du sida*

- Culture sur milieu NNN (Novy, Mcneal, Nicolle) ou milieu de Schneider (Leishmanies) ;
- Culture sur autres milieux fongiques tels que milieu de Sabouraud additionné de chloramphénicol et de gentamycine ;
- Culture sur milieux chromogéniques qui confèrent aux colonies qui s'y développent une coloration particulière en fonction de l'espèce.

## **D- Détection d'antigènes spécifiques**

- Immunofluorescence directe : microsporidies ;
- Recherche de mananes ou  $\beta(1,3)$ -D-glucanes (*Candida*, *Pneumocystis*, *Aspergillus*), galactomananes (*Aspergillus*), d'antigènes capsulaires (*Cryptococcus*) ; Leur sensibilité peut varier en fonction de l'immunodépression ;
- Katex (*Leishmania*) ;
- Tests immunochromatographiques (Tests de diagnostic rapide, TDRs) : ex *Cryptococcus*.

## **E- Diagnostic moléculaire**

Des protocoles de détection moléculaire de ces parasites et mycètes ont été mis au point. L'ADN est amplifié par PCR conventionnelle ou en temps réel ou par séquençage. Des protocoles de PCR multiplex sont en cours d'évaluation pour une utilisation en routine ; ex : FilmArray ou PCR multiplex (BioRad®) syndromique (sang, gastro-intestinal, respiratoire, méningite encéphalite). Ces techniques ont l'avantage d'avoir des sensibilités élevées. Cependant, il n'existe pas de protocoles standardisés, et elles ne permettent pas toujours de différencier le portage d'un agent pathogène et sa relation avec la symptomatologie, notamment en cas de présence de pathogènes multiples.

## **F- Diagnostic histologique**

Il permet la détection des pathogènes en cause des affections opportunistes dans les prélèvements des patients (Voir chapitres concernés).

D'autres outils diagnostiques tels que la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) permettent d'identifier les espèces fongiques. Un antifongigramme doit systématiquement être effectué avant la mise en route du traitement.

### **Résumé - Conclusion**

Les mycoses et parasitoses opportunistes sont nombreuses au cours du Sida. Bien que leurs manifestations soient non spécifiques ou atypiques, elles doivent être initialement évoquées devant tout signe d'appel chez tout patient VIH positif. Leur diagnostic constitue une urgence. La mise en évidence de l'agent pathogène par les techniques usuelles constitue toujours une étape essentielle du diagnostic. Cependant, devant la fréquence élevée des formes disséminées, les nouvelles méthodes telles que la détection d'antigènes circulants par les tests de diagnostic rapide, la spectrométrie de masse et les techniques de biologie moléculaire devraient être disponibles dans les laboratoires centraux afin de permettre une prise en charge rapide.

## **12 LES ANIMAUX VENIMEUX**

---

*Rédigé par Pr Djohan Vincent (Côte d'Ivoire), Dr Bernard Allali\* (Côte d'Ivoire),  
Dr Marc Hermann Akaffou\* (Côte d'Ivoire), Relu par Pr Same Ekobo (Cameroun) et  
Pr Kassi Fulgence (Côte d'Ivoire)*

*\*Département Environnement et Santé, unité d'entomologie et  
d'herpétologie, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.*

## Introduction

Les animaux venimeux, aussi appelés animaux venimeux « actifs », sont caractérisés par la présence dans leurs tissus d'un dispositif inoculateur de venin, par opposition aux animaux vénéneux ou venimeux « passifs » dépourvus d'organe d'inoculation de venin contenu dans leur tissu.

Le venin est un mélange complexe de substances chimiques et d'enzymes généralement mortelles, paralysantes et servant probablement à faciliter la digestion des proies. L'envenimation se réalise par voie transcutanée en cas de piqûre et quelquefois par la muqueuse oculaire. L'appareil inoculateur varie d'un genre à l'autre, du simple poil, épine ou écaille au dard, à l'aiguillon et au crochet.

Les animaux venimeux sont présents dans la quasi-totalité des groupes d'animaux, aussi bien en milieu terrestre que marin, notamment parmi les reptiles qui engendrent des envenimations souvent mortelles et les arthropodes ; les mammifères, les mollusques et les amphibiens sont à l'origine des envenimations relativement peu dangereuses.

Au plan géographique, les animaux venimeux sont moins abondants en zones tempérées qu'en zones intertropicales, notamment en Afrique où 20 000 personnes succombent chaque année de morsure de serpents<sup>1</sup> et en Australie, pays où l'on trouve le plus grand nombre d'animaux venimeux au monde. Les morsures de serpents ont été classées par l'OMS parmi les Maladies Tropicales Négligées.

## I. Rappel historique

En étudiant des gènes des animaux venimeux parmi lézards, les serpents, et les sphénodons, Nicolas V. et Blair S<sup>2</sup> démontrèrent que ces animaux seraient nés il y a environ 150 millions d'années sur terre et non en milieu aquatique. Dans l'antiquité, l'histoire des serpents était inséparable de la spiritualité et des religions; des figurines de la civilisation minoenne en Crète représentaient le serpent pour désigner la divinité ; en Égypte antique, l'art de charmer les serpents était connu ; et en Inde, le serpent était apprivoisé et considéré comme un animal sacré. Par contre, les adeptes de Vishnu furent les premiers à attribuer au serpent une auréole maléfique alors que la tradition gréco-romaine l'associait au Dieu de la Médecine, comme en témoignent les caducées des médecins et des pharmaciens. Aristote décrit près de 50 espèces de reptiles et en définit quatre sous-groupes : les serpents, les lézards, les crocodiliens et les batraciens.

C'est au Moyen Age que commence à se poser la véritable problématique de l'envenimation, dans les traditions paysannes de l'Ancien et du Nouveau Mondes en termes de croyances et des pratiques qui cherchaient à connaître et à combattre les animaux venimeux et à ce titre, parler d'envenimation comme une « expérience toxique mortelle ». Effectivement, en Bretagne, on appelait v'lin (ou "venin") un ensemble d'animaux qui réunit, les reptiles, des

---

<sup>1</sup> Chippaux et al ., 1999

<sup>2</sup> Nicolas Vidal et S. Blair Hedges. Université d'État de la Pennsylvanie

batraciens, des arachnides et différents insectes dont ceux pourvus d'un dard. On y trouvait aussi bien la couleuvre que la vipère, le lézard vert, la salamandre, le crapaud ou encore l'araignée, la guêpe ainsi que le frelon.

## **II. Principaux animaux venimeux**

Les principaux animaux venimeux d'intérêt médical réel se répartissent en six groupes par ordre de dangerosité décroissante : les reptiles, les arthropodes, les mollusques, les cnidaires, les échinodermes et les poissons.

### **A. Reptiles**

#### **1. Classification**

La classe des reptiles (du latin, *rampant*) définit l'ensemble des animaux à température variable (ectothermes), au corps souvent allongé et recouvert d'écailles. Parmi eux, seuls les serpents comportent les espèces venimeuses. On connaît actuellement plus de 2000 espèces de serpents réparties en 4 groupes et 6 familles (Tableau 12. 1) ; les espèces venimeuses piquent environ 2,4 millions de personnes chaque année dans le monde provoquant plus de 100 000 cas de décès. Elles appartiennent principalement aux familles des élapidés, hydrophidés et vipéridés ; en effet chez les colubridés, les glandes à venin sont tantôt absentes, tantôt rudimentaires, si bien que seules quelques espèces sont capables d'injecter le venin à une proie. S'agissant des Typhlopoïdes, ce sont de petits serpents fouisseurs aux yeux rudimentaires et sans organes inoculateurs de venin. Les boïdés (python et boa) ne sont pas venimeux ; ce sont des serpents constricteurs et par conséquent très dangereux.

Tableau 12. 1 : Répartition des serpents en fonction de leurs familles et genres

GROUPES	FAMILLES	GENRES <sup>3</sup>
Colubriformes	Colubridés	Couleuvres : <i>Coluber</i> (Couleuvre verte et jaune), <i>Coronella</i> , <i>Elaphes</i> ou <i>Pantherophis</i> (Couleuvres d'Esculape, Serpents des blés), <i>Malpolons</i> (Couleuvres de Montpellier), <i>Dispholidus</i> , <i>Thélotornis</i> , <i>Hétérodon</i> , <i>Farancia</i> (Couleuvre américaine), <i>Lampropeltis</i> (Serpent royal d'Amérique du Nord).
	Boïdés	Boa, Python, Eunecte ( <i>Anaconda</i> ), <i>Calabaria</i> , <i>Uropeltis</i> , <i>Rhinophis</i> .
Protéroglyphes	Elapidés	Najas ( <i>N. haje</i> L. ou Aspic de Cléopâtre, ou Serpent à lunettes), Cobra royal, Mamba (Serpent des bananiers), <i>Elaps</i> (Serpent corail), Taïpan, Serpent-tigre, <i>Acanthophis</i> .
	Hydrophidés	<i>Platurus</i> , <i>Aepysurus</i> , <i>Laticauda</i> , <i>Hydrophis</i> , <i>Pelamydrus</i> .
Solénoglyphes	Vipéridés	<b>Vipérinés</b> : Vipères ( <i>Aspic</i> , Péliade, Vipère d'Orsini), <i>Cérastes</i> (Vipères cornues), <i>Bitis</i> (Vipères géantes), <i>Causus</i> (Vipères cracheuses), <i>Echis</i> .
		<b>Crotalinés</b> : Crotales (Serpents à sonnette, Cascavelles), Sistrures (Petits serpents à sonnette), Fer-de-lance, Mocassins, Souroucoucou, Trimesurus.
Opotérodonte	Typhlopidés	<i>Typhlops</i> , <i>Cephalolepis</i> , <i>Stenostoma</i> .

## 2. Répartition géographique

Les serpents, comme l'ensemble des reptiles, sont plus abondants dans la zone intertropicale que dans la zone tempérée, et c'est surtout sous les tropiques que l'on rencontre les espèces les plus dangereuses, notamment en Australie et en Afrique (Figure 12. 1).



(Chippaux, 2017)

**A : Élapidés** (najas, cobras, mambas). **B : Vipéridés** (vipères, crotales, petits serpents à sonnette, mocassins...)

Figure 12. 1 : Distribution géographique des serpents venimeux

<sup>3</sup> Les genres sont donnés ici sous leurs dénominations communes

### 3. Caractéristiques morphologiques

#### Denture

Selon leurs dentures, les serpents se classent en 4 catégories : aglyphes, opistoglyphes, solenoglyphes et proteroglyphes.

Les serpents **aglyphes** (Fig.115 et Fig.116) ne possèdent pas de crochets à venin et sont en général inoffensifs pour l'homme, à l'exception des boïdés qui sont les serpents constricteurs.



<https://www.google.fr/shorouknews.com> et <https://www.google.fr/serpent-rafi-toumayan.fr>

: Serpent  
**aglyphe (boa)**  
autour d'un  
crocodile

Figure 12. 2:  
Serpent  
**opistoglyphe**  
(couleuvre)

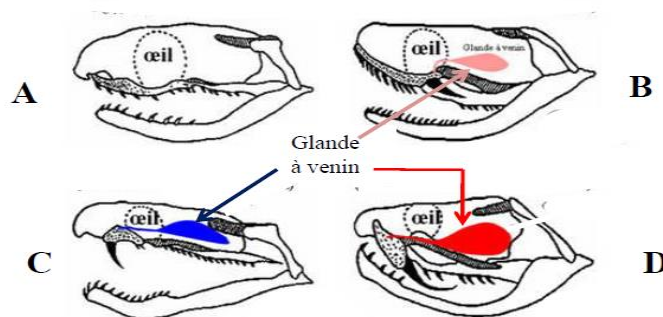
Figure 12. 3:  
Serpent  
**protéroglyphe**  
(cobra)

**Figure 12. 4 :**  
Serpent  
**solenoglyphe**  
(vipère)

Les serpents **opistoglyphes** (Fig.12. 6B) comme certaines couleuvres ont des crochets à venin situés dans la partie postérieure du maxillaire ; l'animal ne peut injecter son venin que si sa proie est déjà partiellement avalée. En théorie, le risque d'envenimation par les couleuvres est faible pour l'homme, sauf pour certaines grandes couleuvres.

Les serpents **protéroglyphes**, les cobra (Fig.12. 6C) ont des crochets à venin de petite taille, percés d'un canal non clos et, situés en position très antérieure à l'avant du maxillaire.

Les serpents **solénoglyphes**, les vipères (Fig. 12. 6D), ont de longs crochets à venin, mobiles et percés d'un sillon clos ; ils sont situés en position très antérieure à l'avant du maxillaire.



(Chippaux, 2017)

**A : serpent aglyphe (boa, python), B : serpent opistoglyphe (couleuvre) C : serpent protéroglyphe (cobra) D : serpent solénoglyphe (vipère)**

Figure 12. 5 : Schémas des dentures des serpents

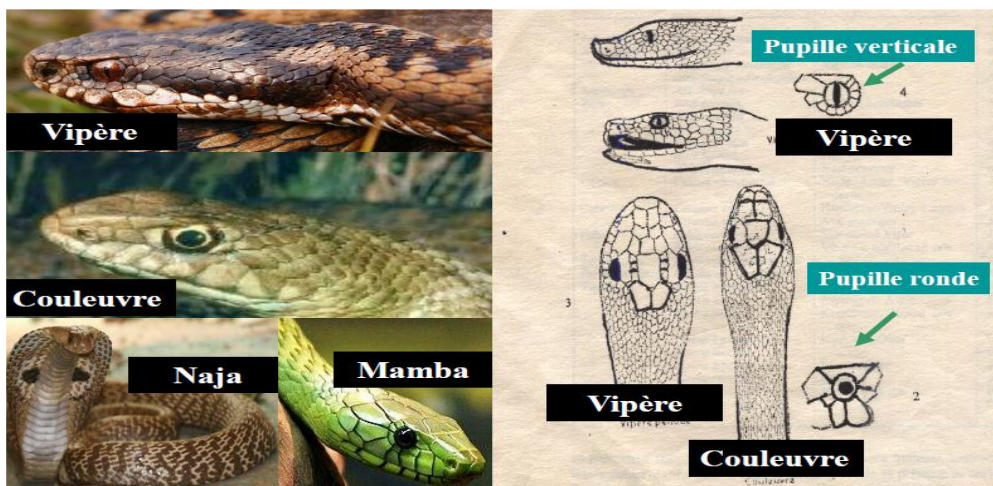
#### Morphologie de la tête, du corps et des écailles



La tête des vipères (*Bitis. Echis. Vipera*) est aplatie et lancéolée avec un museau tronqué, un cou large et les yeux disposant d'une pupille en forme de fente verticale (Fig.12. 7). Les écailles de la tête sont de petite taille, nombreuses (> 9) et disposées en deux ou trois rangées entre l'œil et la fente buccale (Fig.12. 7). La queue est courte et conique.

Chez les Elapidés (*Naja, Mamba*), la tête est ovale avec deux voiles latérales caractéristiques chez les Mamba et les Naja, mais ne permettant pas de distinguer ces deux serpents. La plupart des espèces ont une pupille ronde, mais certains ont des pupilles verticales.

Les couleuvres présentent des caractères assez spécifiques : une tête triangulaire avec un museau ovoïde, le cou étroit et la pupille toujours ronde. Les écailles de la tête sont larges, peu nombreuses (<9) et disposées en une seule rangée entre l'œil et la fente buccale (Fig.12. 7) Le corps est cylindrique et allongé avec une queue longue, effilée et pointue.



(Chippaux, 2017)

Figure 12. 6 : Morphologie des têtes de la vipère, couleuvre, naja et mamba

## 4. Physiologie et venin des serpents

### Physiologie

Les principaux caractères physiologiques des serpents concernent leur sensibilité, la nutrition et la reproduction.

**Sensibilité** : la vision est excellente ; l'olfaction bonne ; l'audition médiocre (les serpents ne possèdent pas d'oreille externe ; l'oreille moyenne est rudimentaire ; il n'y a ni trompe d'Eustache ni tympan). La sensibilité proprioceptive (perception de vibrations) est excellente.

L'organe de Jacobson est un récepteur situé dans la région palatine conférant aux serpents le sens « vomeronasal » qui permet à leur langue bifide d'analyser immédiatement les substances volatiles présentes dans le milieu. Cette propriété est complétée par les fonctions des fossettes loreales sensibles à la chaleur, permettant de détecter à plusieurs mètres une proie ou un prédateur, et d'en suivre les déplacements.

**Reproduction** : Les serpents vivent généralement en solitaire, et rarement en contact avec le partenaire sexuel qui leur convient. Après l'accouplement, les femelles peuvent mettre en réserve les spermatozoïdes, réduisant ainsi la fréquence des rapports sexuels tout en préservant la chance de se reproduire. La plupart des serpents sont ovipares, certains sont ovovivipares, l'incubation des œufs ayant lieu à l'intérieur du corps de la mère. Chez certains serpents, tels les mambas, la plupart des vipères et les crotales, les mâles se battent pour s'accoupler avec les femelles.

### **Venin**

Le venin des serpents est sécrété dès la naissance par des glandes venimeuses qui dérivent des glandes salivaires labiales. C'est un liquide de consistance gommeuse généralement jaune ombré. Chaque serpent sécrète un venin de composition biochimique propre, qui s'exprime autant par son action pharmacologique que par ses propriétés antigéniques, c'est-à-dire sa capacité à induire les mécanismes de défense chez l'animal mordu. Cela explique que le sérum antivenimeux doit être adapté à l'espèce de serpent responsable de la morsure.

Les venins sont essentiellement composés d'enzymes et de toxines.

**Les enzymes** : il s'agit des phospholipases, l'acétylcholinestérase, phosphoesterase, la L-amino-acide-oxydase, la hyaluronidase, les protéases, des enzymes lytiques divers (amylase, transaminases, déshydrogénases). La plupart est dépourvue d'action toxique et détermine des troubles cliniques mineurs. D'autres ont une action clinique marquée, parfois mortelle. D'une manière générale, les venins des vipéridés sont riches en enzymes dont certaines provoquent des nécroses sévères. D'autres agissent sur les différentes étapes de l'hémostase, en particulier sur la coagulation sanguine. La coagulation sanguine et la fibrinolyse sont activées à plusieurs niveaux (complexe prothrombinase et fibrinofibrinolyse en particulier). Il en résulte une coagulopathie liée à l'activation et à la consommation de ces facteurs, mais également à la consommation de plaquettes.

**Les toxines** sont des protéines de petites tailles (neurotoxines, cytotoxines, dendrotoxines, fasciculines, myotoxines, sarafotoxines, désintégrines), diffusant rapidement dans l'organisme, qui se fixent sur des récepteurs cellulaires spécifiques dont elles perturbent le fonctionnement. Les plus importantes sont les neurotoxines qui bloquent la transmission neuro-musculaire. Les toxines postsynaptiques se lient au récepteur de l'acétylcholine de la jonction neuro-musculaire et empêchent la liaison avec l'acétylcholine, entraînant une paralysie musculaire. Les toxines présynaptiques, plus volumineuses et plus complexes que les précédentes, empêchent la libération de l'acétylcholine au niveau de la plaque neuromotrice. Les venins des élapidés sont riches en toxines comme les neurotoxines des cobras. Ces neurotoxines agissent au niveau de la plaque motrice et bloquent la conduction neuromusculaire.

Les venins des élapidés (Mamba, cobra) sont les plus riches en toxines ; ils provoquent presque toujours les paralysies musculaires (muscles respiratoires, des paupières et des voies urinaires) ; cependant, il a été isolé du venin du mamba noir, *Dendroaspis polylepis*,

trois peptides appelées *mambalgines*, permettant de diminuer efficacement la douleur, sans provoquer de complication.

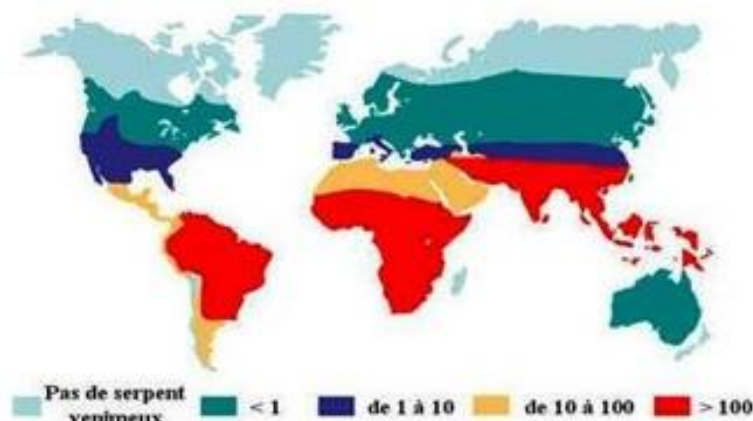
Les toxines d'*Atractaspis* sont principalement cardiotoxiques, mais ont également des propriétés hémorragiques et nécrotiques.

## 5. Syndromes d'envenimation par les serpents

Sur les 2,4 millions de cas d'envenimations par morsures de serpent qui surviennent chaque année dans le monde, il faut ajouter 400 000 personnes supplémentaires devant être amputées ou souffrant d'autres conséquences graves, telles que le tétanos, les cicatrices, contractures et séquelles psychologiques.

L'Afrique paie le lourd tribut (Figure 12. 8) de 500 000 cas de morsures par an dont plus de 20 000 décès.

Il faut cependant relever que toutes les morsures de serpent ne sont pas venimeuses, et que toute envenimation n'évolue pas inéluctablement vers la mort, même en l'absence de traitement.



(Chippaux, 2017).

Figure 12. 7 : **Incidence annuelle d'envenimations ophidiennes dans le monde**

### Symptômes

Les symptômes observés en cas d'envenimation par morsures de serpents, peuvent être classés en cinq groupes : de symptômes locaux, d'état de choc, avec troubles de coagulation, troubles neurologiques et le groupe de complications à long terme.

**Symptômes locaux.** L'inflammation locale est rapide dans le cas des morsures de *Viperidae* (vipères vraies et crotales). La douleur est immédiate, toujours intense et parfois domine le tableau clinique. L'œdème d'apparition progressive, s'installe en quelques minutes après les morsures de *Viperidae* et devient maximal en deux ou trois heures, parfois douze à vingt-quatre heures. Cet œdème est massif, volontiers étendu à l'ensemble du membre mordu.

Après une morsure d'*Elapidae* les signes d'inflammation locale sont absents ou faibles, dans ce cas souvent très localisés et retardés de vingt-quatre à quarante-huit heures. La nécrose locale peut être précoce. Le venin de *Naja nigricollis* provoque une nécrose sèche, se momifiant en 12 à 24 heures. La nécrose peut être lente et progressive, conduisant à la destruction complète du membre mordu en 3 à 5 semaines.

**Etat de choc.** Un état de choc dans les minutes ou les toutes premières heures suivant la morsure est relativement fréquent. Son étiologie peut être variable : stress, choc toxique, réaction anaphylactique, collapsus hypovolémique.

**Troubles de la coagulation.** Il s'agit sans conteste de la symptomatologie la plus préoccupante survenant à la suite des morsures de *Viperidae*. De nombreuses toxines et surtout des enzymes des venins de serpent ont une action pro-coagulante ou anticoagulante, altérant la chaîne de la coagulation sanguine selon des processus complexes qui dépendent de la quantité de venin injectée et du lieu d'injection. Ces actions peuvent aboutir à des hémorragies ou à une coagulation intravasculaire disséminée.

**Troubles neurotoxiques.** La paralysie flasque induite par les neurotoxines post-synaptiques d'*Elapidae* et d'*Hydrophidae* est de diagnostic évident. Le début est progressif. Localement, la douleur est remplacée par des paresthésies à type de picotements, fourmillements ou simplement une anesthésie qui remontent le long du membre mordu. Une douleur épigastrique, un vomissement, une hyper-sialorrhée, une angoisse, un larmoiement et une somnolence attestent de la progression de l'envenimation. Trismus et ptose palpébrale symétriques sont caractéristiques du syndrome cobraïque. La mort survient dans un tableau d'asphyxie due à la paralysie des muscles respiratoires, associée à une baisse de la vigilance mais sans restriction de la conscience.

**Complications à long terme.** Elles peuvent apparaître dans les semaines ou les années qui suivent une envenimation sévère, même s'il n'y a pas de relation directe entre la gravité d'une envenimation et le risque de complications à long terme. Les séquelles observées à la suite d'une nécrose locale peuvent nécessiter des interventions chirurgicales allant jusqu'à une amputation partielle ou totale du membre mordu.

Les lésions rénales apparaissent dans les jours ou les semaines qui suivent la morsure. La circulation de microthrombus entraîne des infarctissements viscéraux à distance, qui peuvent se manifester plusieurs années après la morsure.

Tableau 12. 2 : Signes d'envenimation neurotoxiques des mambas et cobras

	Serpents en cause	Signes cliniques
<b>Envenimation cobraïque (neurotoxique)</b>	<i>Dendroaspis</i> (Mamba), <i>Naja</i> /Cobra	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Douleur locale et signes inflammatoires locaux rares sauf chez <i>Dendroaspis</i></li> <li>• Troubles digestifs</li> <li>• Troubles ORL (bourdonnement d'oreille)</li> <li>• Perte de conscience progressive aboutissant à un coma</li> <li>• Décès rapide par asphyxie (atteinte des muscles respiratoires)</li> </ul>

Tableau 12. 3 : Signes d'envenimation nécrotiques et hémorragiques

	Serpents en cause	Signes cliniques
<b>Envenimation vipérine (nécrotique et hémorragique)</b>	Vipères, Crotales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Signes inflammatoires locaux : douleur, œdème, phlyctène</li> <li>• Installation de nécrose locale secondaire</li> <li>• Signes hémorragiques, d'intensité variable en moins de 48 heures</li> <li>• Signes rénaux (anurie, insuffisance rénale).</li> <li>• Anémie importante avec état de choc cardiovasculaire conduisant au décès.</li> </ul>

### Prise en charge des envenimations

La prise en charge ici présentée obéit aux recommandations de la Société Africaine de Venimologie (SAV) en 3 étapes : gestes de premiers secours, gradation de l'envenimation, bilan biologique, le traitement et la surveillance.

### Gestes de premiers secours

Chez un sujet déclarant une morsure de serpent il faut : i) rassurer le patient et son entourage ; ii) nettoyer la morsure et rechercher les traces de crochets, puis iii) faire un examen général pour évaluer la gravité. Il faut ensuite distinguer les signes de stress (nausées, vomissements, palpitations, respiration rapide...) des symptômes d'envenimation (douleur importante au niveau de la morsure, œdème, saignement local ou général, troubles neurologiques, nécrose. L'observation des symptômes d'envenimation confirment la gravité de la morsure déclarant une urgence vitale qui doit être prise en charge sans délai en milieu hospitalier.

### Gradation de l'envenimation

Il est essentiel de mesurer l'importance de l'envenimation par une échelle de gradation, dès l'entrée du patient à l'hôpital, répéter si nécessaire, pour adapter le traitement (Tableau 12. 4).

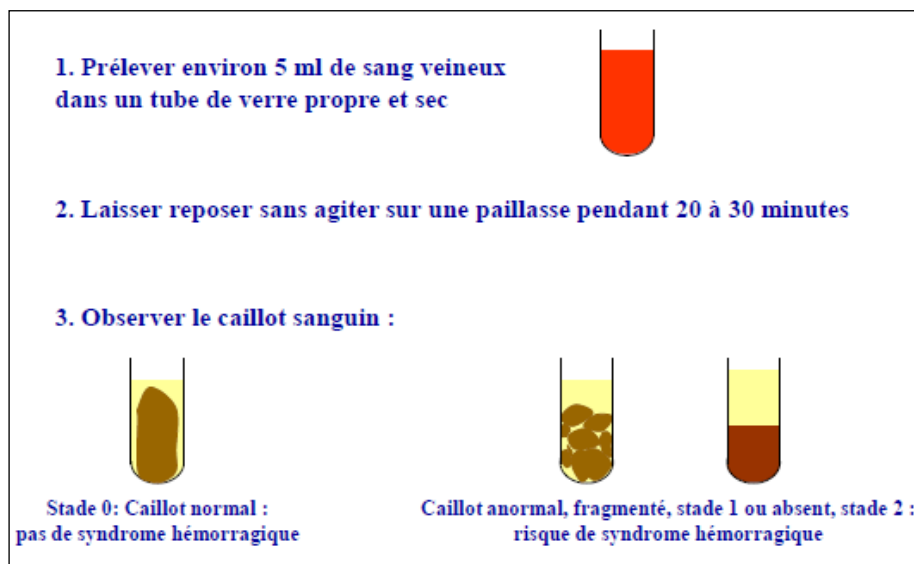
**Tableau 12. 4 : Evaluation clinique de la gravité d'une envenimation**

Grades	Signes cliniques		
	Œdème	Troubles hémorragiques	Troubles neurologiques
Grade 1	Œdème localisé atteignant l'articulation la plus proche.	Saignement local persistant plus d'une heure.	Anesthésie, fourmillements, picotements locaux.
Grade 2	Œdème progressif ne dépassant pas 2 articulations.	Saignements de la bouche, du nez ou des cicatrices.	Sueur et salive abondantes, vomissements, myosis.
Grade 3	Œdème extensif ne dépassant pas la racine du membre.	Ecchymoses, hématomes, purpura, phlyctènes.	Chute des paupières, vue, ouïe et déglutition anormales.
Grade 4	Œdème dépassant la racine du membre (anasarque).	Hémorragies internes (péritonéale, méningée).	Détresse respiratoire, communication impossible.

### Bilan biologique

Après la gradation, en cas d'envenimation, réaliser un bilan biologique qui comprendra un hémogramme avec le taux de plaquettes, le dosage de la prothrombine, du fibrinogène, des D-dimères, de la créatine phosphokinase, de la créatinine et le test de coagulation sur tube sec (TCTS) devra être réalisé selon le protocole suivant :

a) Prélever 2ml de sang veineux dans un tube en verre ; b) Laisser reposer le tube sans le toucher ; c) interpréter le résultat après 20 minutes d'attente comme suit : si le sang est coagulé en masse le TCTS est considéré normal (stade 0) ; si le sang est incomplètement coagulé le TCTS est dit stade 1 ; si le sang est liquide : TCTS stade 2 (risque hémorragique).



(Source : Chipaux J-P., 2006)

Figure 12. 8 : Test de coagulation en tube sec

Le traitement et la surveillance comportent trois volets : le traitement médical, la surveillance et la prise en charge chirurgicale.

#### Traitement médical

Après la confirmation de l'envenimation et de sa gradation, il faut procéder immédiatement au traitement en trois temps :

##### Premier temps : administration de l'antivenin

L'antivenin s'administre toujours par voie intraveineuse, soit en perfusion (dilué au 1/10) en 30 minutes, soit directement (IVD) en 3 minutes pour chaque 10ml (Figure 12. 10) selon le protocole de la Société Africaine de Vénomologie (SAV).

##### Deuxième temps : traitement symptomatique (associé à l'antivenin)

Selon les moyens disponibles et les connaissances du personnel médical, la douleur sera traitée en première intention avec le paracétamol, ensuite le tramadol et la morphine en dernier recours ; pour l'œdème, on commence avec l'ibuprofène, ensuite le kétoprofène et enfin l'indométacine. Devant les hémorragies, les traitements substitutifs (transfusion, plasma frais congelé, etc.) ne doivent être administrés que 30 minutes après l'antivenin.

La prise en charge des signes de neurotoxicité doit être réservée à un urgentiste ou réanimateur, comme suit :

- Syndrome muscarinique (grade neurologique 2) : atropine (10mg en intraveineuse, puis 1mg en sous-cutané toutes les 5 minutes jusqu'à disparition du myosis) ;
- Syndrome cobraïque (grade neurologique 3 ou 4) : atropine (1mg en intraveineuse) + néostigmine (3 doses de 2,5mg en intraveineuse à 30 minutes d'intervalle).

Nécrose : le diamètre doit être mesuré régulièrement - lavage 2 fois par jour avec une solution de Dakin (eau de javel 0,5% + permanganate 100mg/l).

Les cas de réactions indésirables au traitement sont également pris en charge. Administrer des antihistaminiques en cas d'urticaire, de prurit ou de toux. On administrera l'adrénaline en cas de choc anaphylactique et les antibiotiques en cas d'infections avérées. Dans les cas, d'envenimation, les corticoïdes ne sont pas recommandés.

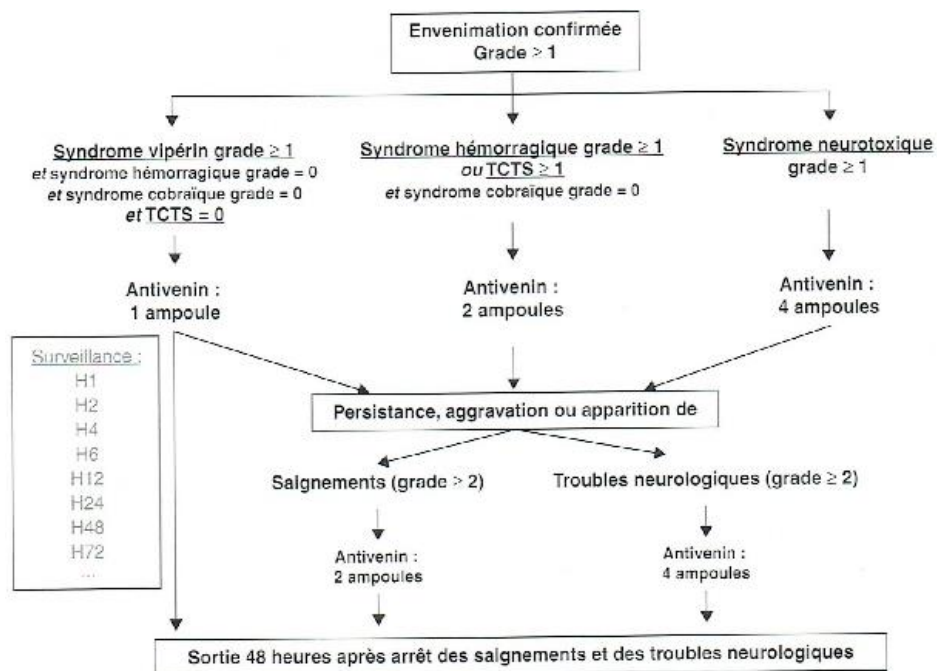


Figure 12. 9 : Protocole de prise en charge d'une envenimation (Recommandation de la Société Africaine de Venimologie)



Tableau 12. 5 : Quelques sérums antivenimeux commercialisés en Afrique

NOM DU PRODUIT	GENRES NEUTRALISES	TYPE ET PRESENTATION	DISPONIBILITE
<b>Snake Venom Antiserum African (ASNA)</b>	Polyvalent : <i>Echis, Bitis, Naja, Dendroaspis</i>	F(ab') <sub>2</sub> de cheval purifiés, Liquide (10ml)	Disponible dans certains pays
<b>Africain Antivenin</b>	Polyvalent : <i>Echis, Bitis, Naja, Dendroaspis</i>	F(ab') <sub>2</sub> de cheval purifiés, Lyophilisé	Disponible dans certains pays

Tableau 12. 6 : Quelques sérums antivenimeux commercialisés en Afrique

NOM DU PRODUIT	GENRES NEUTRALISES	TYPE ET PRESENTATION	DISPONIBILITE
<b>Polyvalent Snake Antivenin</b>	Polyvalent : <i>Echis, Bitis, Naja, Hemachatus, Dendroaspis</i>	F(ab') <sub>2</sub> de cheval purifiés, Liquide (10ml)	Disponible en Afrique orientale et méridionale
<b>FAV Afrique</b>	Polyvalent : <i>Bitis, Echis, Naja, Dendroaspis</i>	F(ab') <sub>2</sub> de cheval hautement purifiés, Liquide (10ml)	Disponible dans certains pays
<b>Inoserp</b>	Polyvalent : <i>Naja nigricollis, Dendroaspis polylepsis, Echis ocellatus, Bitis arietans</i>	F(ab') <sub>2</sub> lyophilisé	Disponible en Afrique de l'Ouest

### Surveillance

Elle comprend trois volets : la surveillance de l'administration de l'antivenin, la prise en charge chirurgicale et la surveillance après la sortie de l'hôpital.

#### Surveillance de l'administration de l'antivenin

Pendant l'heure suivant l'administration de l'antivenin, il faut surveiller le patient pour :

- identifier des effets indésirables,
- Suivre l'évolution clinique.

Le bilan de surveillance sera effectué : 1 heure, 3 heures, 6 heures, 12 heures, 24 heures, puis toutes les 24 heures après le premier traitement.

Il est particulièrement important de surveiller la fonction rénale (diurèse + créatinine).

La décision de renouveler l'antivenin sera prise en cas de :

- la persistance ou l'apparition de saignements imposant le renouvellement du traitement antivenimeux par l'administration de 2 ampoules ;
- la persistance ou l'apparition des signes neurologiques imposant le renouvellement du traitement antivenimeux par l'administration de 4 ampoules.

### **Surveillance après la sortie de l'hôpital**

Il est important de prévenir le patient qu'il peut présenter 1 à 2 semaines après l'antivenin une maladie sérique (fièvre, arthralgies, myalgies, urticaire, adénopathies) traitée par un antihistaminique ou un anti-inflammatoire non stéroïdien (éventuellement corticoïde dans les formes graves). La plaie sera soignée jusqu'à cicatrisation, et les séquelles seront traitées en fonction de leur gravité.

### **Prise en charge chirurgicale**

Le principe ici est d'éviter dans la mesure du possible, toute intervention chirurgicale qui risque d'entraîner des surinfections et des complications fonctionnelles. En cas d'œdème important, il est impératif de mesurer la pression intracompartimentale pour évaluer le risque d'apparition d'un syndrome des loges (la pression intramusculaire doit être d'au moins 10mm de mercure sous la pression artérielle diastolique), avant de pratiquer une incision de décharge.

Pour le parage de la nécrose ou l'amputation : seulement après stabilisation des lésions (absence d'extension pendant 48 heures consécutives).

## **B. Arthropodes**

Les animaux venimeux actifs du phylum des arthropodes appartiennent à 4 classes : les arachnides, les insectes, les myriapodes et les crustacés<sup>4</sup>.

### **1. Arachnides venimeux**

#### **a. Classification et distribution géographique des arachnides venimeux**

Parmi les arachnides venimeux, se retrouvent 2000 espèces de vrais scorpions et une centaine d'espèces d'araignées.

**Les scorpions venimeux** se répartissent en deux familles : les buthidés et les scorpionidés.

- la famille des Buthidés regroupe les espèces les plus dangereuses appartenant aux genres *Buthus*, *Leiurus*, *Parabuthus*, *Tityus*, *Centruroides* et *Androctonus* ; ce dernier

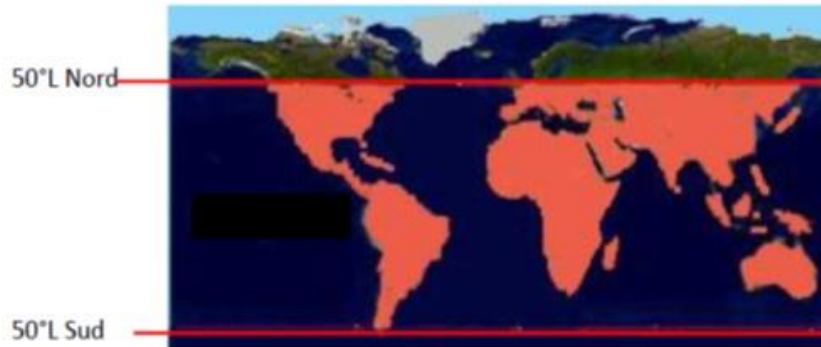
---

<sup>4</sup> **Crustacé venimeux** : à ce jour, une seule espèce de crustacé venimeux a été décrite : *Speleonectes tulumensis*

### Les animaux venimeux

comprend les espèces les plus dangereuses comme *Androctonus australis* que l'on rencontre en Afrique du Nord.

- la famille des Scorpionidés comporte le genre *Pandinus* rencontré en Afrique subsaharienne avec deux espèces *Pandinus imperator* et *Pandinus gambiensis* qui sont moins dangereux.



(Source : <http://www.animaux.arroukatchee.fr/scorpion.htm>)

Figure 12. 10 : Distribution géographique des scorpions

**Les araignées venimeuses** comprennent les Mygalomorphes ou mygales d'une part (exemple le redoutable *Atrax* d'Australie), et d'autre part, les aranéomorphes ou veuves, comme *Latrodectus mactans* dite veuve noire d'Amérique qui est en réalité une araignée cosmopolite et l'"araignée-banane" du genre *Phoneutria* au Brésil.

**Les mygales** vivent principalement dans les régions tropicales et subtropicales du globe, le plus souvent dans les forêts profondes et humides, notamment dans le sud de l'Amérique du Nord (Mexique), en Amérique centrale, en Amérique du sud (mygale rose du Chili), en Afrique (où elles sont plus petites), en Asie, en Europe (mygale maçonne, mygale *affinis*, etc.) et en Australie.

**Les veuves** (araignées du genre *Latrodectus*) se rencontrent naturellement comme les mygales aux États-Unis et au Mexique. Elles ont été introduites à Hawaï et à Cuba et signalées en de nombreux autres points du globe où elles sont souvent confondues avec d'autres aranéomorphes. Elles sont appelées *Capulina* ou *Chintatlahua* au Mexique.

Tableau 12. 7 : Principales espèces et genres des scorpions et araignées venimeux

Groupes	Familles	Genres/Espèces
Scorpions	Buthinidés	<i>Androctonus</i> , <i>Buthus</i> , <i>Centruroides</i>
	Scorpionidés	<i>Pandinus imperator</i> , <i>Pandinus gambiensis</i>
Araignées	Mygalomorphes (Mygales)	<i>Atrax robustus</i> ; <i>Phoneutria</i> sp <i>Avicularia metallica</i>
	Aranéomorphes (Veuve noire <sup>5</sup> )	<i>Latrodectus mactans</i> <i>Latrodectus formidabilis</i> <i>Loxosceles rufescens</i>

## b. Caractères morphologiques, physiologiques et venimeux des arachnides

Les arachnides sont des arthropodes chélicérates, terrestres ou aquatiques. Les espèces adaptées à la vie en eau douce (comme les hydracariens ou l'araignée du genre *Argyroneta*) ou marine (halacariens), sont rares et non venimeuses. Les arachnides sont majoritairement insectivores ; ils se distinguent des autres arthropodes par quatre paires de pattes chez l'adulte et trois chez la nymphe. Ils n'ont ni ailes, ni antennes ; leurs yeux sont simples (ocelles). La plupart des arachnides sont ovipares, et les sexes sont généralement de morphologies distinctes (dimorphisme sexuel).

**Les Scorpions** se distinguent des autres arachnides par leurs pédipalpes terminés en pinces didactyles ; la partie postérieure de leur abdomen est effilée en une queue portant un aiguillon où débouchent des glandes à venin. Leur cuticule (ou exosquelette) a la particularité d'être fluorescente ; cette fluorescence se conserve à la mort de l'animal, et certains fossiles sont encore fluorescents. La plupart des scorpions a une reproduction sexuée, ovopares ou ovovivipares et quelques espèces sont parthénogéniques. Lors de la parade, le mâle tient la femelle par les pinces et/ou par les chélicères et les deux partenaires semblent exécuter une danse appelée "*promenade à deux*". Un scorpion vit entre 3 et 10 ans selon les espèces, les grandes espèces (*Androctonus* d'Afrique et *Centruroides* d'Amérique du Sud) vivent plus longtemps.

<sup>5</sup> **Veuve noire** désigne *Latrodectus mactans* et les autres espèces du genre *Latrodectus*



(Tournoud, 2014)

Figure 12. 11 : **Scorpion**

Leur activité est essentiellement nocturne et crépusculaire, sous les pierres, les endroits arides, les vieux murs, mais quelques-uns peuvent se cacher sous les lits, les draps ou dans les couvertures. Les scorpions se nourrissent essentiellement d'insectes vivants, qu'ils paralysent avec leur venin ; ils utilisent toutefois leur venin avec parcimonie, le stock mettant deux semaines à se reconstituer. La piqûre de l'aiguillon caudal, très douloureuse, produit des accidents qui peuvent être mortels pour l'homme.

**Le venin des scorpions** est essentiellement composé comme celui des serpents, des enzymes, des toxines et des amines biogènes comme la sérotonine, l'histamine, la kinine et des substances non protéiques, en nombre et nature variables selon les types de scorpions.

Onze variétés de toxines ont été identifiées chez les scorpions de la famille des Buthidés, avec des activités sélectives vis-à-vis des groupes d'animaux précis. Le venin des scorpions des genres **Buthus** et **Parabuthus** d'Afrique et de l'Inde possède une phospholipase A provoquant les troubles hémorragiques y compris la coagulation intravasculaire diffuse (CIVD). Le venin des genres **Chactoides** est également riche en enzymes (hyaluronidase, phospholipases, coagulases, hémolysines phosphodiesterases) responsables des douleurs importantes ressenties pendant les piqûres de scorpion. **Hemiscorpion lepturus** est le seul scorpion à venin cytotoxique (et non neurotoxique) provoquant des nécroses importantes.

**Les araignées venimeuses** se caractérisent par leur taille relativement petite par rapport aux scorpions, leur dimorphisme sexuel assez marqué, les mâles étant nettement plus petits et moins colorés que les femelles. Les deux espèces parmi les plus redoutables sont *Latrodectus mactans* ou veuve noire et *Selenocosmia crassipes* ou mygale siffleuse d'Australie.

**La veuve noire** (Figure 12. 13A) est reconnaissable à son dessin en forme de sablier de couleur rouge vif, sur un abdomen globuleux de couleur noir brillant. Ce nom lui est attribué parce qu'elle dévore souvent le mâle après accouplement. En 2007, une équipe de l'Université de Californie aurait identifié deux gènes de la synthèse de la soie chez la veuve noire ; cette soie présente des propriétés mécaniques remarquables de par son élasticité, sa

résistance et sa légèreté, permettant des applications industrielles dans les armatures de guerre (gilets pare-balle) armures de guerre et les matériaux médico-chirurgicaux.

La **mygale** (Figure 12. 13B) se reconnaît par son corps noir couvert de soies épaisses, et ses larges pattes courtes et trapues.



(Source : Figure 12. 13 A (<http://www.astrium.com/espace-medecins/risques-et-situations/Veuve-noire.html>)

(Source : Figure 12. 13 B : <https://www.spiders.com.au/australian-tarantula-spider.html>)

Figure 12. 12 : **Les araignées venimeuses.** A : *Latrodectus mactans* (la veuve noire) B : *Selenocosmia crassipes* (mygale siffleuse d'Australie)

**Le venin des araignées** contient des toxines nécrotiques, injectées au cours de l'envenimation. Il s'agit souvent de neurotoxines, parmi lesquelles se trouvent les neurotoxines de type polyamine agissant sur le système nerveux central. La veuve noire, *Latrodectus mactans*, contient l'alpha-latrotoxine, plus toxique que le venin du serpent à sonnette (vipère crotale), détruisant les vésicules synaptiques de l'acétyl-choline.

## c. Syndromes d'envenimation par les arachnides

Deux grands types de tableaux cliniques sont déterminés par les arachnides : les envenimations scorpioniques et les aranésismes.

**Envenimations scorpioniques**, parmi les centaines d'espèces de scorpions décrites dans le monde, seulement quelques-unes sont toxiques pour l'homme occasionnant cependant 40.000 décès chaque année. Le tableau clinique des envenimations scorpioniques se décline classiquement en trois stades appelés grades 1,2 et 3.

**Le grade 1** correspond aux signes locaux au pourtour de la piqûre (douleur, fourmillements, paresthésies) qui s'estompent habituellement dans un délai de 24 heures, sans aucun désagrément : c'est le cas tout à fait bénin. Les piqûres de certains Chactoïdes (comme le

*Buthus sauloci* d'Iran) peuvent entraîner un érythème, un œdème, une lymphangite, voire une gangrène cutanée ou une nécrose du territoire (Figure 12. 14).

**Le grade 2.** Les signes locaux précités sont plus marqués et les troubles systémiques s'installent avec une élévation de la tension artérielle, un syndrome muscarinique (sueurs, rhinorrhée, diarrhée, vomissements) la fièvre, les frissons, le priapisme. Tous ces troubles peuvent s'amender en 48 heures sans séquelles.

**Le grade 3.** Les signes généraux sévères s'installent après un intervalle libre de quelques heures. Aux signes précédents s'ajoutent des troubles respiratoires majeurs, cardiovasculaires et une altération de la conscience. C'est le stade de la défaillance vitale (état de choc, défaillance cardio-respiratoire, des convulsions et du coma. Les troubles biologiques sont dominés par une hyperleucocytose quasiment constante tout comme l'acidose métabolique, les signes de l'insuffisance rénale provoquée par l'hémolyse (*Buthus sauloci*) et l'élévation des enzymes musculaires. Les facteurs de gravité dépendent d'une part, de l'animal (espèce, âge et poids, quantité de venin inoculée) et d'autre part, de la victime (voie et zone d'inoculées, âge et délai de la prise en charge correcte).



**Figure 14** Nécrose des tissus d'une fillette après la morsure de *Hemiscorpion lepturus*. (site Arachnoda, par Leleina, 2017)



(site You Tube Venomous Spider, 2017)

Figure 12. 13: **Nécrose du pouce, suite d'une morsure d'araignée aranéimorphe, *Loxosceles sp***

Les signes cliniques de mauvais pronostic sont l'hypersudation, les vomissements, l'agitation, l'hypertension, le priapisme, l'hyperthermie (>40°C) et les convulsions. Au plan paraclinique, il faut craindre l'hyperglycémie et un allongement de l'espace QT. La mortalité varie de 0,15% à 7,1%. La grande majorité des décès s'observent chez les jeunes de moins de 15 ans, et pratiquement jamais chez les adultes indemnes de tares physiologiques.

**La prise en charge** comporte le traitement symptomatique et le traitement spécifique.

Le traitement symptomatique a trois volets : le traitement banal utilisant les antalgiques et les antihistaminiques ; le traitement antipyrétique et le traitement à base de vasodilatateurs pour contrôler l'hypertension artérielle.

Le traitement spécifique consiste à administrer de fortes doses d'antivenin (par voie intraveineuse lente à raison de 5 à 10 ml d'antivenin polyvalent dilué dans 50 ml de solution saline) et de corticoïdes (3 g par voie générale). Cependant ce traitement ne semble pas



modifier l'évolution même associé au sérum antiscorpionique. Par contre le bien fondé de l'utilisation des anticorps spécifique semble être prometteur mais encore discuté.

### **Aranéisme ou manifestations dues aux morsures des araignées**

Les symptômes d'envenimation par les araignées se répartissent aussi en 3 catégories en fonction des familles et genres des araignées.

- **première catégorie** : les manifestations dues aux morsures des mygalomorphes qui sont les réactions allergiques, la nécrose provoquées par tous les genres de mygale et la mort résultant des morsures des mygales du genre *Atrax*.
- **deuxième catégorie** : les manifestations dues aux araneomorphes ; il s'agit de lactrodectisme (manifestations dues aux veuves noires de genre *Lactrodectus* (douleur intense différée, contractures musculaires, troubles végétatifs et au syndrome neuro-psychiatrique).
- **troisième catégorie** : les lésions nécrotiques débilantes désignées sous le terme loxoscelisme, dues aux araignées du genre *Loxosceles sp.*

D'une manière générale, les symptômes d'envenimation par les araignées sont d'autant plus intenses que les sujets sont jeunes ou très âgés et souffrant d'une cardiopathie. Il s'agit de troubles polymorphes : locaux (œdème, une paresthésie de la plante des pieds, pathognomonique), neurovégétatifs (variations de la température, transpiration et sueurs froides, hypotension), algiques (céphalées, spasmes musculaires douloureux), digestifs (nausées), neurologiques (hallucinations). Toutefois, les cas mortels sont rares.

**Le traitement** est basé sur l'injection de gluconate de calcium IV, qui supprime les contractions et les douleurs musculaires, puis d'un sérum anti-latroecte spécifique : fraction Fab de *Latrodectus*. En l'absence de ce sérum, on pratique une injection d'un relaxant musculaire, comme le dantrolène. Ce traitement est très efficace s'il est administré dans les vingt-quatre heures suivant la morsure.

## **2. Insectes venimeux**

Trois catégories d'insectes possèdent des substances toxiques ou venimeuses : les urticants, les vésicants et vulnérants ; parmi elles, seuls les vulnérants (certains hyménoptères) sont capables d'inoculer leurs substances toxiques et considérés comme des animaux venimeux. En effet, les insectes urticants (chenilles, larves de certains papillons) et les vésicants (certains coléoptères) n'ont pas d'appareil inoculateur de venin et sont considérés comme des nuisants et non venimeux au sens strict du terme. L'intoxication se fait par contact du poil avec le tissu exposé (peau ou muqueuses) en induisant les lésions de type allergique (érythème, urticaires, les phlyctènes...).



## a. Classification des hyménoptères venimeux

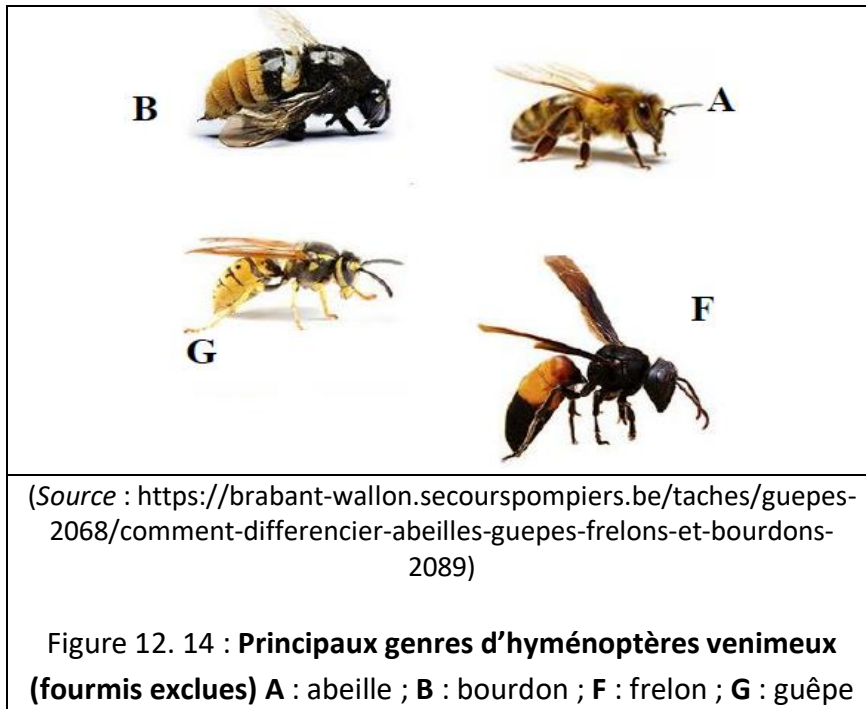
Ils sont tous des apocrites aculéates, c'est-à-dire les hyménoptères chez lesquels l'abdomen est bien distinct du thorax du fait d'un étranglement, et qui se termine chez la femelle par un aiguillon. Les principaux genres d'hyménoptères venimeux (Tableau 12. 8 et Fig. 12. 5) sont : les abeilles, les guêpes, les bourdons et les fourmis. Parmi eux, les plus dangereux sont :

- **les fourmis**, notamment celles des régions tropicales telles que les *Paraponera* encore appelées fourmis balle de fusil en raison de la douleur de leur piqûre, comparable à celle provoquée par un coup de fusil et qui peut durer toute une journée ; les « fourmis légionnaires » forment de grandes colonies s'attaquant à leur proie de manière massive, en effectuant des reconnaissances préalables malgré le fait qu'elles soient aveugles et les fourmis de feu rouge (*Solenopsis invicta*) à la piqûre particulièrement toxique ;
- **les abeilles** (*Apis* sp.) qui n'attaquent l'homme que lorsqu'elles se sentent agressées ;
- **les guêpes** (*Vespa* sp.) : ne cherchent pas les humains, sauf s'ils sentent que leur territoire est menacé ;
- **les frelons** ou guêpes maçonnes ont une capacité à attirer d'autres insectes de leur genre en utilisant une certaine odeur qui met la victime en danger ;
- **les bourdons** dont les piqûres ne sont pas dangereuses du tout, sauf en cas d'allergies ou d'intoxication.

**Tableau 12. 8 : Principales familles d'Hyménoptères avec les genres et les espèces correspondants**

FAMILLES	Genres	ESPECES	REPARTITION
<b>Vespidés</b> (Guêpes)	<i>Vespula</i> (Guêpe)	<i>V. vulgaris. V.germanica</i>	Europe, Afrique
	<i>Vespa</i> (Frelon)	<i>V. crabo</i>	Tous les continents
	<i>Polistes</i> (Polistes)	<i>P. dominula</i>	Europe
<b>Apidés</b> (Abeilles)	<i>Apis</i> (Abeille mellifère)	<i>A. mellifera (ou mellifica)</i>	Tous les continents
	<i>Bombus</i> (Bourdon)	<i>B. pensylvanicus</i>	Amerique
<b>Formicidés</b> (Fourmis)	<i>Solenopsis</i>	<i>S. invicta</i> (Fourmi de feu rouge)	Amérique
	<i>Pogonomyrmex</i>	<i>Pogonomyrmex barbatus</i> (Fourmi rouge moissonneuse)	Australie Etats Unis, Mexique
	<i>Pachycondyla</i>	<i>P. sennaerensis</i>	Afrique
	<i>Paraponera</i>	<i>Paraponera clavata</i> (Fourmi balle-de-fusil)	Amérique du Sud
	<i>Polyergus</i>	<i>P. rufescens</i> (Fourmi amazone)	Amérique du Sud

	<i>Myrmecia pyriformis</i>	Fourmi bulldog	Tous les continents
	<i>Dorylus bishyiganus</i>	Fourmi legionnaire	Tous les continents



## b. Venin d'hyménoptères

Le venin des hyménoptères est un mélange complexe d'amines biogènes d'enzymes et de protéines. Injectés dans le corps, ces composés exercent des actions conjuguées, complémentaires et synergiques, provoquant la douleur et l'irritation :

- l'histamine provoque la douleur et l'inflammation locale après la piqûre, la contraction des muscles lisses et l'augmentation de la perméabilité des capillaires. La melitine, principale toxine du venin d'abeille détruit les globules rouges et provoque la douleur suite à la constriction ou la dilatation des vaisseaux, elle accroît la perméabilité vasculaire et provoque la contraction des muscles lisses.
- L'apamine est un polypeptide neurotoxique agissant sur le système nerveux central et périphérique.
- Le MCD-peptide (Mast Cell Degranulating peptide) a une action dégranulante sur les mastocytes.
- Les kinines augmentent la perméabilité vasculaire, provoquent la contraction des muscles lisses et la douleur.

- Les phospholipases A et B provoquent la contraction des muscles lisses, abaissent la pression sanguine, accroissent la perméabilité capillaire, détruisent les mastocytes et les membranes cellulaires
- La hyaluronidase facilite l'accès des membranes aux autres constituants du venin.

La composition des venins de fourmis se caractérise par une extrême diversité des substances précitées, d'un genre à l'autre. Parmi les hyménoptères, seules les fourmis de la sous famille des formicinés contiennent l'acide formique dans leur venin.

## c. Envenimation par piqûres d'hyménoptères et traitement

Une piqûre d'hyménoptère est généralement sans conséquences. Le retrait du dard et le nettoyage de la plaie sont suffisants. On peut cependant observer des réactions fortes nécessitant des interventions médicales rapides. Le tableau 12. 9 résume les principales manifestations cliniques associant les réactions allergiques et les réactions toxiques.

Lorsque les symptômes sont de faible intensité et peu étendus, limité, à l'urticaire, l'œdème ou angioœdème, l'utilisation d'antihistaminiques peut prévenir la phase de l'anaphylaxie ; on peut associer aux antihistaminiques les glucocorticoïdes dans les cas sévères. L'épinéphrine peut-être prescrit en cas d'angioœdème sévère localisé au niveau de la région laryngée.

Lors d'effets systémiques résultant d'une réaction anaphylactique ou d'un angioœdème du larynx, la prise charge requiert une action rapide, le pronostic vital étant en cause. Les moyens mis en œuvre doivent permettre de maintenir une ventilation, un débit en oxygène suffisant et de soutenir le système cardiovasculaire par la mise en place d'un traitement pharmacologique spécifique.

**Tableau 12. 9 : Principales manifestations cliniques dues aux piqûres d'hyménoptères**  
(Müller, 2016)

STADES	SIGNES CLINIQUES
I	Sensation de malaise général et d'anxiété. Œdème. Urticaire généralisé.
II	Malaise general, oppression thoracique.
III	Malaise général et angoisse. Etat confusionnel. Dyspnée importante. Dysphonie (œdème laryngé). Angioœdème plus ou moins étendu
IV	Détresse respiratoire intense. Collapsus cardio-vasculaire. Perte de connaissance avec perte d'urine, ou diarrhée et vomissement. Urticaire généralisé.

## C. Chilopodes venimeux

Les chilopodes ou centipèdes sont une classe d'arthropodes myriapodes communément appelés « mille-pattes. Leur corps est fait de nombreux segments portant chacun une paire de pattes, sauf le premier dont la paire d'appendices est transformée en paire de crochets à venin appelés forcipules (Figure 12. 16). Cette particularité unique parmi les myriapodes définit leur classe. La morsure des plus grandes espèces est douloureuse et peut être très dangereuse pour un enfant.



Figure 12. 15 : **Scolopendra gigantea**



Figure 12. 16 : **Extrémité antérieure d'une scolopendre montrant les forcipules à l'aide d'une pince**

(Source : <https://fr.wikipedia.org/wiki/scolopendra>)

Les chilopodes sont prédateurs d'autres arthropodes ou de vers. Ils sont tous terrestres lucifuges (qui fuient la lumière). Parmi les espèces les plus connues, se distinguent *Scolopendra cingulata* (répandue sur tout le contour de la mer Méditerranée) et *Scolopendra gigantea*, rencontrée en Amérique du Sud et dans les Caraïbes; c'est l'espèce la plus grande<sup>6</sup> pouvant atteindre 50cm de long, de couleur cuivre à marron et aux pattes jaunâtres.

La morsure de la scolopendre entraîne des douleurs intenses, un érythème, un œdème et une nécrose ; elle nécessite des soins locaux mais en général la douleur s'estompe au bout de quelques heures, et la plaie ne laisse aucune séquelle. Un cas de décès a été signalé en Martinique chez une personne fragile, souffrant d'insuffisance cardiaque ; il y a aussi eu deux cas en Guadeloupe de réactions allergiques graves ayant entraîné les décès (Dabor Resiere, 2015).

### La prise en charge de morsure de scolopendre se fait en 4 temps :

- Rassurer le patient et prendre immédiatement un avis médical avant de transférer le patient aux urgences ;
- Prendre des mesures locales pendant le transfert : désinfection, débridement ; calmer la douleur avec un analgésique (paracétamol) ;
- En milieu hospitalier : la morphine peut être nécessaire pour calmer la douleur nécessaire ; poursuivre les soins locaux (nettoyage de la plaie, pansements quotidiens)

<sup>6</sup> Une nouvelle espèce de mille-pattes géant, mesurant 20 cm, a été découverte en 1981 en Asie du Sud-Est dans les grottes anchielines du Yucatàn; c'est la toute première mille-patte aquatique, *Speleonectes tulumensis*.

et vérifier le statut vaccinal antitétanique et faire la prophylaxie antitétanique si nécessaire. En cas de détresse vitale, administrer un antihistaminique, instaurer l'antibiothérapie et adresser le patient en réanimation ;

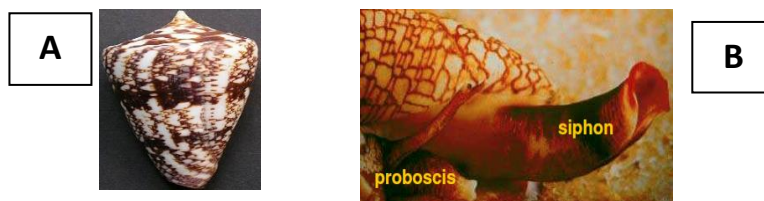
- Protection individuelle (éviter de marcher à pieds nus dans les jardins, la maison, à la cour, etc.). Éviter de manipuler ces animaux.

## D. Mollusques venimeux

Parmi les huit classes du phylum des mollusques, seules les classes des gastéropodes et des céphalopodes contiennent les mollusques vénimeux au sens strict du terme, c'est-à-dire les espèces disposant de glandes à venin et d'un appareil inoculateur de ce venin.

### 1. Gastéropodes venimeux

Ils sont représentés par les conidés, communément appelés cônes. Les cônes, considérés par les conchyliologues comme les plus beaux coquillages au monde (Figure 12. 18A), sont la cause d'une envenimation parfois mortelle, toujours redoutable. Le premier cas mortel a été rapporté en 1705 dans l'archipel des Moluques (Mer des Célèbes). Ce sont des mollusques gastéropodes, prosobranches et toxoglosses c'est-à-dire, possèdent une langue à venin (Figure 12. 18B).



(Conan, P, 2005)

Figure 12. 17 : Cônes. **A** : *Conus amadis* **B** : *Conus textile* avec le proboscis (trompe) inoculateur de venin et le siphon aspirateur des aliments

Lorsque le cône chasse, une dent est engagée dans la trompe. Celle-ci se projette en avant pour implanter dans la proie la dent qu'elle abrite et injecter le venin. Le venin des cônes est neurotoxique et thermostable. De nombreux cônes sont venimeux bien que tous ne soient pas dangereux pour l'homme. Le cône le plus redoutable connu est *Conus geographus*. Après injection, le sujet présente après quelques minutes une douleur vive au point de piqûre, avec un œdème souvent volumineux, un engourdissement puis des paralysies des muscles squelettiques et des muscles respiratoires responsables du décès dans les cas graves. En pratique, l'évolution est variable, mais l'apparition des paralysies doit faire prévoir une assistance respiratoire. Le traitement consiste à extraire la fléchette, aseptiser la plaie et à traiter la douleur et manifestations allergiques et toxiques.

## 2. Céphalopodes venimeux

Il s'agit des pieuvres ou poulpes, noms vernaculaires désignant certains céphalopodes benthiques caractérisés par leurs huit bras et leur grande intelligence. Leur appareil venimeux est composé de glandes salivaires entourant l'orifice buccal et de mandibules ou bec, la bouche étant située au centre de huit tentacules. *Hapalochlaena maculosa*, petite pieuvre de 10 à 15cm, peut tuer en quelques heures. Un seul cas de mort a été documenté (Conan, P, 2005).

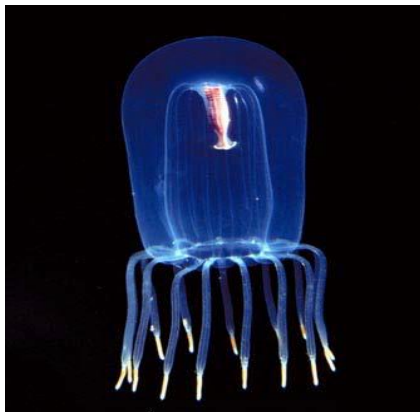


(Planche zoologique, 1896)

Figure 12. 18 : **Pieuvre/Poulpe**

## E. Cnidaires venimeux

Les cnidaires constituent un embranchement d'animaux aquatiques et essentiellement marins. Ils vivent sous deux formes : lorsqu'ils sont fixés (Figure 12. 20), on parle de polypes (c'est le cas du corail ou des anémones de mer), lorsqu'ils sont nageurs (Figure 12. 21), ce sont des méduses. Certaines espèces alternent entre les deux formes.



(Source : <http://www.biologiemarine.com/20100/anemones.htm>)

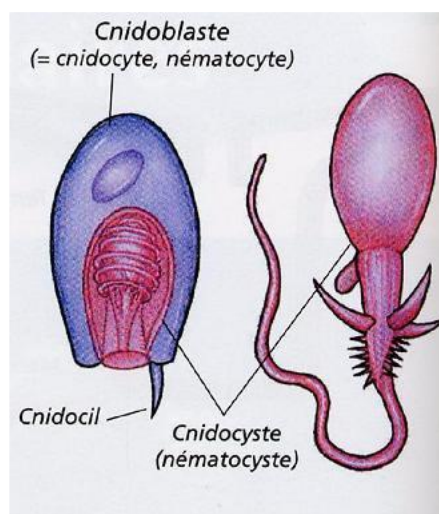
Figure 12. 19 : **Anémone de mer**

Figure 12. 20 : **Les méduses**  
(anthoméduse)



Les cnidaires sont des organismes diploblastiques c'est-à-dire qu'ils sont formés à partir de deux feuillets cellulaires embryonnaires : l'ectoderme et l'endoderme séparés selon le cas par une matrice, la mésogée ou le mésenchyme, riche en cellules migratrices.

L'ectoderme est constitué de quatre sortes de cellules : les cellules ectodermiques, les cellules sensorielles, les cellules interstitielles et les cnidoblastes qui sont des cellules urticantes, très nombreuses sur les tentacules et autour de la bouche. Chaque cnidoblaste renferme une vésicule (Figure 12. 22) dont le contenu, l'actinogestine, est expulsé vers l'extérieur avec un harpon urticant lorsque le cnidocil (une expansion sensorielle excitable de la cellule) est touché ; le cnidoblaste meurt après cette action.



(Source : Bertrand Miserey, 2005)

Figure 12. 21 : **Cnidoblaste**

L'endoderme comporte trois catégories cellulaires : les cellules endodermiques forment l'architecture de base ; elles renferment une forte densité de fibres musculaires ; les cellules sensorielles, dont la stimulation déclenche la réaction de l'animal ; enfin les cellules glandulaires qui assurent la digestion des proies.

La mésogée est une substance gélatineuse, non cellulaire, contenant des cellules nerveuses rudimentaires, les protoneurones qui forment un réseau reliant les cellules sensorielles ectodermiques et endodermiques.

En cas d'envenimation, les méduses piquent leur proie en utilisant les cnidoblastes qui injectent du venin, en provoquant de multiples micro-piqûres. C'est le cas de *Carukia barnesi* et des cuboméduses (*Chironex sp*) en général, extrêmement venimeuses. Les principales manifestations toxiques se traduisent par des urticaires, des crampes musculaires, des vomissements, et dans les cas graves des œdèmes pulmonaires, des troubles cardiaques et de l'hypertension. Certaines méduses tropicales provoquent le syndrome d'Irukandji pouvant être la cause de décès par œdème aigu du poumon ou hémorragie cérébrale. Ce syndrome a été observé en Australie, en Floride et au Guadeloupe.

La conduite à tenir en cas de morsure est de recouvrir la peau avec du sable fin ou la mousse à raser et gratter doucement avec un carton rigide du genre carte postale, sans frotter pour retirer les filaments adhérents. On peut aussi appliquer du vinaigre à l'acide acétique dans les 30 secondes qui suivent la piqûre. Quel que soit le cas, il faut ensuite appliquer une pommade cicatrisante, administrer un antalgique et un anti histaminique et toujours se renseigner avant de se baigner. Il existe un sérum antivenimeux pour les cuboméduses en Australie.



(Berney J-Y, 2004)

Figure 12. 22 : Lésions de piqûres venimeuses d'une cuboméduse

## F. Echinodermes

Ils sont tous venimeux passifs. Une étoile de mer (*Acanthaster planci*) à cinq branches, est connue comme venimeuse. Elle a des piquants venimeux mais surtout pédicellaires pourvus de glandes à venin assurant la protection de l'animal. Certains oursins et concombres de mer peuvent entraîner des envenimements respectivement à partir de leurs piquants ou de filaments contenant des toxines.

Il est à noter que les holothuries (Holothuroïdes) sont toxiques par leur tégument et non venimeux au sens strict car ils n'ont pas d'appareil inoculateur de venin.

## G. Poissons venimeux

Les poissons provoquant des piqûres venimeuses se répartissent dans trois familles : les scopaenidés (rascasse, poisson-scorpion, poisson-pierre), les dasyatidés (raie) et les trichinidés (vives) car ils disposent d'organes inoculateurs de venin. Par contre, les poissons-chirurgiens (Acanthuridés), les poissons chats (Siluridés) et les murettes ont la chair toxique provoquant l'ichthyotoxisme et des appareils vulnérants susceptibles d'engendrer de graves blessures profondes ; cependant, ils n'ont pas d'organes inoculateurs de venin.

**Les Scorpaenidae** ou **rascasses** comprennent trois genres : *Pterois* (*Pterois volitans*), *Scorpaena* (*Scorpaenopsis oxycephala* ou poisson scorpion) et *Synanceia*, le plus vulnérant,



qui comprend l'espèce *Synanceia verrucosa* (ou **poisson-pierre** ou crapaud de mer). Leur appareil venimeux est constitué de 13 épines dorsales. Les Scorpaenidés se trouvent sur les côtes, cachés parmi les rochers, les coraux, le sable avec lesquels ils se confondent.

**Les Dasyatidae** ou **raies** comprennent les raies armées dont la queue porte sur sa face dorsale une épine venimeuse. La raie pastenague (*Taeniura melanospilos*) porte sur la queue un dard souvent mortel d'une vingtaine de centimètres, denticulé et très difficile à retirer.

**Les Trichinidae** ou **vives** vivent enfoncés dans le sable et ne laissent apparaître que leurs nageoires dorsales et le sommet de leur tête. La première des deux nageoires dorsales est réduite à 5 à 7 épines venimeuses dont la piqûre, très douloureuse se produit sur les plages lorsque l'on met le pied sur l'animal.

Les venins des poissons sont très variables tant du point de vue de leurs propriétés chimiques que toxiques ; ce sont des protéines, des mucopolysaccharides et des lipides. Leurs structures exactes demeurent inconnues car leur fragilité rend leur étude difficile.

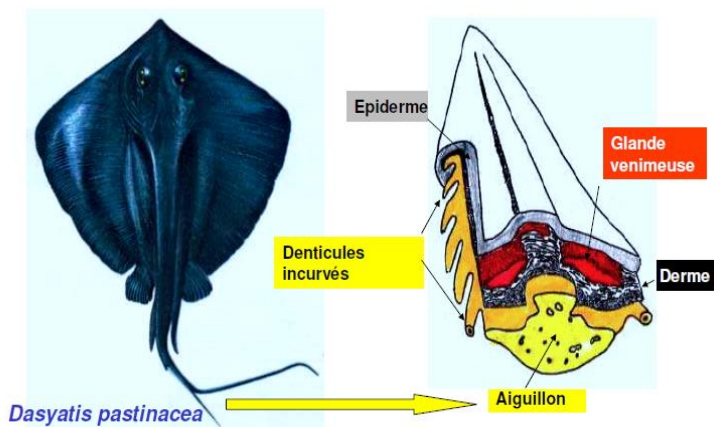
Le traitement est donc symptomatique. Les venins étant thermolabiles, il faut mettre en place un choc thermique le plus rapidement possible (sur la plage ou à domicile) : source de chaleur ponctuelle (cigarette allumée, sèche-cheveux, eau chaude, au-dessus de 50°C), suivie par l'application d'une source de froid (glaçons dans un linge, canette glacée). La douleur est soulagée par les sédatifs et les analgésiques. Une réanimation respiratoire doit être mise en œuvre en cas d'accident grave. Il faut prévenir les surinfections à pyogènes et le tétanos. Il existe un sérum antivenimeux spécifique du poisson pierre en Australie, efficace, s'il est injecté rapidement.



A. Rascasse volante



D. Poisson-pierre



B. Raie pastenague



C. *Trachinus draco* (Grande vive)

(Source : Prof SAME Ekobo, 2009)

Figure 12. 23 : Poissons venimeux. A : rascasse volante (Scorpaenidé). B : Raie (Dasyatidé) C : Grande vive (Trichinidé). D : poisson-pierre (Scorpaenidé)

## H. Mammifères venimeux

Les mammifères constituent un groupe animal pratiquement dépourvu d'espèces venimeuses, excepté quelques espèces de solénodontes et de musaraignes à glandes sous maxillaires venimeuses notamment la musaraigne américaine à queue courte *Blarina* (la plus dangereuse). Certains mammifères carnivores ont également des venins : ce sont la mouffette (Amérique) à glandes anales défensives et un monotrème, l'ornithorynque (Australie) qui a un ergot venimeux sur la face interne du pied postérieur.

### Conclusion

Les animaux venimeux se rencontrent dans toutes les classes du règne animal. Certains possèdent des venins très toxiques pour l'homme et capables d'entraîner la mort en quelques heures. Les serpents sont les plus répandus et les plus dangereux de ces animaux. Une bonne connaissance des signes de leur envenimation est nécessaire à sa prise en charge efficace.

## Bibliographie

**Akaffou M.H. (2004).** Envenimations ophidiennes à Abidjan : principales espèces observées et bilan du traitement de 51 cas en réanimations. Thèse de fin de cycle en pharmacie. Université de Cocody Abidjan. 132p.

**Chippaux J-P, Akaffou MH, Allali BK, Dosso M, Massougbodji A, Barraviera B. (2016).** The 6th international conference on envenomation by Snakebites and Scorpion Stings in Africa: a crucial step for the management of envenomation. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 22:11. doi:10.1186/s40409-016-0062-y.

**Conan Pascal. Féral JP, Jacquet, S. 2005.** Animaux marins dangereux. Laboratoire Arago UMR 7621 - BP44. 66651 Banyuls-sur-Mer

**Djohan V., Menan E.I., Yavo W., Barro P.C., Vanga H., Dempah J.A., N'Dri D.K., Mignonsin D., Akaffou M.H., Koné K.** Herpetological data and management of ophidian envenomation at university hospitals in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Med. Trop.* (Mars). 2010; 70(1):99.

**Marc Hermann Akaffou, Jean-Philippe Chippaux, Bernard Kouadio Allali, Zanakoungo Coulibaly & Mireille Dosso. (2017).** Peuplement ophidien des plantations d'*Hevea brasiliensis* d'Anguédédou (sud-est de la Côte d'Ivoire). *Bull. Soc. Herp. Fr.* 162 : 31-38.

**Lecointre G. et Guyader L. (2001).** Classification phylogénétique du vivant, 2e édition. Paris, France, Edition Berlin. 543 p

**Berney J.-Y. (2004).** Envenimations marines. *Rev Med Suisse* 2004; vol. 0. 23833

## **13 LES ANIMAUX VENENEUX**

---

*Rédigé par Pr Djohan Vincent (Côte d'Ivoire), Relu par Pr Same Ekobo Albert Legrand (Cameroun)  
et Pr Kassi Fulgence (Côte d'Ivoire)*

## Introduction

Les animaux vénéneux sont caractérisés par la présence dans leurs tissus, de substances toxiques et par l'absence d'organe d'inoculation de ces substances. L'intoxication se réalise par voie digestive en cas de consommation d'un animal à chair toxique ou par voie cutanée à travers une porte d'entrée préexistante et quelquefois par voie muqueuse oculaire, nasale ou buccale. C'est respectivement les cas d'ichtyotoxicité<sup>7</sup>, d'envenimation par contact avec certains crapauds et d'intoxications alimentaires avec les fruits de mer. Les animaux vénéneux sont aussi appelés animaux venimeux « passifs » par opposition aux animaux venimeux « actifs » qui, à l'instar des vipères, possèdent un dispositif inoculateur de venin produit et stocké dans une glande.

Contrairement aux animaux venimeux qui sont représentés dans la quasi-totalité des groupes d'animaux, les animaux vénéneux ont une répartition moins large. Aussi, dans ce chapitre, seuls seront traités, les poissons, les amphibiens et les fruits de mer. Ces derniers incluent les crustacés et les coquillages qui désignent non seulement les mollusques à coquille, mais aussi les mollusques sans coquille comme les céphalopodes.

La dangerosité des poissons est connue bien avant l'ère chrétienne ; dans la bible, il est inscrit que « Jéhovah interdisait aux Hébreux de manger les poissons sans écailles qui se gonflent ». La plupart de ces poissons vit dans les mers chaudes du globe ; citons le poisson-globe, le poisson-porc épic, le poisson-ballon et le poisson-soleil, c'est-à-dire tous les tétraodons et diodrons dont le figu, très apprécié en Asie orientale.

Quant aux fruits de mer, les coquillages fossiles, retrouvés en Afrique du Sud en 2011, attestent que les mollusques étaient consommés par *Homo sapiens* il y a 164 000 ans, et par l'homme de Neandertal il y a 150 000 ans.

Plus près de nous, les navigateurs Fernandes de Quieros en 1606 et Cook en 1776 ont rapporté les cas de poissons toxiques au cours de leurs expéditions dans les Pacifiques Nord et Sud. En 1866, Poey attribue à un mollusque communément appelé cigua une intoxication alimentaire fréquente à Cuba et due à la consommation de poissons toxiques.

## I. Principaux animaux vénéneux

Les principaux animaux vénéneux se répartissent entre quatre groupes : les poissons, les amphibiens, les mollusques et les arthropodes.

---

<sup>7</sup> **Ichtyotoxicité** : en rapport avec la consommation de la chair de poissons vénéneux

## A. Poissons

Environ 500 espèces de poissons vénéreux pour l'homme ont été recensées dans le monde, réparties en deux groupes : les poissons vénéreux des eaux tropicales, les plus nombreux, et les poissons vénéreux des eaux tempérées.

### Poissons vénéreux des eaux tropicales

- Les poissons vénéreux des eaux tropicales se répartissent en quatre catégories :
- les **Clupeidés** : sardines, harengs, sprats, anchois ;
- les **Tétraodontidés** : poisson-globe, poisson-ballon, poisson-coffre, poisson-soleil, poisson-porc-épic, poisson-lapin c'est à dire tous les Tétraodons et les Diodons, et en particulier le Fugu, «ce célèbre poisson particulièrement apprécié au Japon » dont le seul nom devrait plutôt donner un frisson d'angoisse à ses amateurs;
- les **Vecteurs de ciguatera** : ce sont d'abord les poissons de récifs herbivores, se nourrissant d'algues et de détritus marins, les poissons mangeurs de crustacés et de coquillages et leurs prédateurs ;
- les **Poissons cartilagineux** : requin, raies et roussettes.

### Poissons vénéreux des eaux tempérées

Les poissons vénéreux des autres continents se répartissent aussi en quatre catégories :

- les **Scombridés** : thons, bonites, thazars et maquereaux ;
- les **Mullidés ou Mugillidés** : mullet, mérour, demoiselle, poisson-coffre, poisson-chirurgiens, poissons-saupes ;
- les **Anguilliformes** : anguille de l'Adriatique, anguille d'Allemagne, murènes, congres ;
- les **Salmonidés** (saumon), **Esocidés** (brochet, lotte) et **Cyprinidés** (carpe).

## B. Amphibiens

Parmi les trois groupes d'amphibiens (Anoures, Urodèles et Gymnophiones), les espèces vénéreuses appartiennent exclusivement à l'ordre des Anoures (du latin *an* « sans » et du grec *oura* « queue » signifiant les amphibiens sans queue) qui comprend les grenouilles et les crapauds. La taille des grenouilles varie entre trente centimètres chez la grenouille de Goliath (*Conraua goliath*) et huit millimètres chez *Paedophryne amauensis*<sup>8</sup>. Les grenouilles et les crapauds ont des venins endogènes et/ou exogènes (provenant de leurs proies) ; mais en dehors de la grenouille *Osteocephalus sp* du Brésil, seuls les crapauds produisent le venin le plus toxique des amphibiens, la bufoténine (N,N-diméthyl-5-hydroxytryptamine) qui est aussi produite par l'étoile de mer, *Asterina pectinifera*, les abeilles et le champignon vénéreux *Amanita phalloides*.

---

<sup>8</sup> le plus petit vertébré connu au monde, trouvé en [Papouasie-Nouvelle-Guinée](#).

Les principaux crapauds produisant la bufoténine ou ses équivalents sont au nombre de dix sept : *Bufo bufo* ; *Bufo alvarius* ; *B. americanus* ; *B. asper* ; *B. arenarum* ; *B. blombergi* ; *B. gargarizans* ; *B. formosus* ; *B. fowleri* ; *Rhinella marina* (*Bufo marinus*) ; *B. melanostictus* ; *B. peltocephalus* ; *B. quercicus* ; *B. regularis* ; *B. valliceps* ; *B. viridis* et *B. vulgaris*.

Parmi les grenouilles les plus toxiques, certaines appartiennent à la famille des *Dendrobatidae*. Ce sont des grenouilles de petite taille (14 – 64 mm) vivant dans les forêts tropicales humides. Elles possèdent à la surface de leur peau, des substances chimiques très toxiques, stockées dans les glandes séreuses appelées batrachotoxine. Ce sont des neurotoxines capables d'entraîner des paralysies musculaires. Ces toxines seraient secrétées par ces amphibiens à partir des insectes et autres invertébrés dont ils se nourrissent. Certaines espèces sont particulièrement toxiques comme *Phyllobates aurotaenis*, *P. bicolor* et *P. terribilis*. Ce dernier est considéré comme l'espèce la plus toxique du règne animal.



(Boistel et Massary, 1999)

Figure 13.1 : *Phyllobates terribilis*

## C. Mollusques

### Gastéropodes marins

Le buccin (*Buccinum undatum*) ou bulot et la lunatie (*Euspira heros*) sont des espèces de gastéropodes carnivores qui se nourrissent de chair de poissons ou d'autres mollusques comme les moules. Ils deviennent eux-mêmes toxiques en mangeant ces mollusques. Le buccin provoque ainsi l'intoxication paralysante chez les consommateurs ; par contre, la lunatie n'est généralement pas consommée (Figure 13. 2).

Le bigorneau (*Littorina sp*) est un gastéropode herbivore qui se nourrit d'algues (Figure 13. 3). Des cas d'intoxication ont été établis dans le passé mais sont maintenant contestés (ce qui illustre ici la nécessité de bien identifier les espèces et de ne pas confondre les appellations).



(Source : [www.gastropods.com](http://www.gastropods.com))

Figure 13. 2 : **Gastéropodes toxiques**, a : **Buccinum undatum**, b : **Euspira heros (lunatie)**, c : **Littorina sp (bigorneau)**

### Céphalopodes

Parmi les céphalopodes, ce sont surtout les genres benthiques comme la seiche (*Sepia sp*) ou le poulpe ou pieuvre qui peuvent devenir vénéreux. Ils appartiennent à la famille des Octopodidés caractéristiques comme leur nom l'indique par leurs huit bras, qui sont vénéreux, notamment chez le poulpe aux anneaux bleus, *Hapalochlæna sp*, pour paralyser leurs proies.

### Bivalves ou Lamellibranches

Quatre principaux mollusques bivalves présentent un potentiel vénéreux significatif à l'état libre (les moules, les huitres, la mye et la clovisse ou palourde). Ils se nourrissent comme les autres bivalves en aspirant les éléments nutritifs dans les sédiments du milieu aquatique en même temps que les dinoflagellés. Quatre genres de dinoflagellés sont particulièrement redoutés pour leurs propriétés toxiques : *Gonyaulax sp*, responsable de l'intoxication paralysante ; *Dinophysis sp* dont la toxine est thermorésistante et responsable de diarrhée ; *Alexandrium sp*, qui provoque en cas d'intoxication, des fourmillements, des picotements, l'engourdissement des extrémités, les vertiges et, dans les cas les plus graves, la paralysie des muscles respiratoires pouvant conduire à la mort.

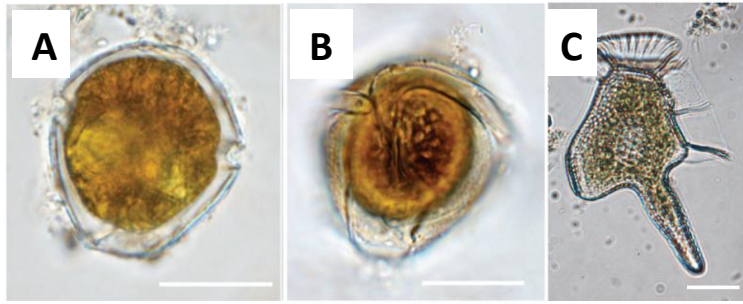


Source : (Source : <http://www.mer-littoral.org/14/galerie-bivalves.php?chx=2>)

(*Mya truncata* et non *Mya truncata* )

Figure 13. 3 : **Quelques bivalves potentiellement toxiques** : A : moules (*Metylida sp*) ; B : huitre (*Ostrea sp*) ; C : *Mya truncata* ; D : Palourde (*Corbicula sp*)





(Source : Toh et al., 2016)

Figure 13. 4 : **Dinoflagellés redoutés pour leur toxicité : A) *Alexandrium sp* ; B) *Gonyaulax sp* ; C) *Dinophysis sp***

Deux autres genres de bivalves, le couteau et le pétoncle, peuvent entraîner les intoxications dans les cas précis d'ingestion de leurs œufs, mais pas de leur chair lorsqu'elle bien lavée.

## D. Crustacés

Parmi les crabes toxiques, ceux qui sont recensés sur les récifs coralliens appartiennent à la famille des **Xanthidæ**, et contiennent de la tétrodontoxine en quantité importante associée à d'autres toxines et surtout à la shigatoxine (STX), qui est également une puissante neurotoxine. Ces crabes vivent exclusivement dans la zone Indo-Pacifique et arborent souvent une tenue tachetée (Fig. 13. 5) ou des couleurs très voyantes attirant l'attention des pêcheurs qui connaissent leur toxicité.

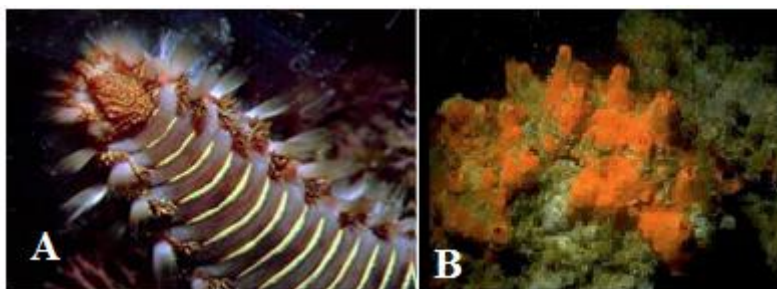


(Source : [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/595731](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/595731))

**Figure 13. 5 : Crabe de genre *Zosimus sp***

## E. Autres animaux vénéneux ou toxiques

Les larves des lépidoptères (ou chenilles) et leurs nymphes (chrysalides) secrètent des toxines provoquant l'irritation des muqueuses oculaires souvent observées chez les enfants. Les plongeurs sous-marins sont confrontés à plusieurs animaux parmi lesquels on peut citer deux groupes principaux : les annélides du genre *Hermodica* aux soies vénéneuses et les éponges brunes du genre *Fibulila* aux spicules toxiques (Fig. 141).



(Conan, P, 2005.)

Figure 13. 6 : Annélide du genre *Hermodica* (A) Eponge du genre *Fibulila* (B).

## II. Mécanismes d'intoxication par les animaux vénéneux

Deux types différents de mécanismes d'intoxication se rencontrent chez les animaux vénéneux : l'ichtyosarcotoxisme qui ne concerne que la consommation des poissons dont les tissus contiennent les substances toxiques et l'envenimation ou intoxication provoquée par d'autres animaux, poissons exclus, par les modalités suivantes : voie digestive, pénétration transcutanée des toxines (avec ou sans lésion cutanée préexistante), passage à travers une muqueuse (nasale, buccale ou oculaire).

### A. Mécanismes d'intoxication par les poissons

Ils sont désignés par le terme ichtyosarcotoxisme qui dérive du grec « *ichthys* » qui signifie poisson, du latin « *sarco* » qui désigne le muscle ou la chair et de « *toxic* » pour traduire le mode d'action des poissons à chair toxique. Certains poissons ont une chair très toxique et d'autres peuvent le devenir s'ils ont ingéré un micro-organisme aquatique à l'instar des dinoflagellés, qui secrètent une substance algale toxique, la neurotoxine ou la saxitoxine.

On distingue d'une part, l'ichtyosarcotoxisme des poissons des mers tropicales et d'autre part, l'ichtyosarcotoxisme des poissons des eaux tempérées.

## 1. Ichtyosarcotoxisme par consommation des poissons des mers tropicales

On distingue quatre modalités.

**Ichtyosarcotoxisme de type ciguatéra** (la gratte), concerne environ la moitié des poissons tropicaux, principalement le barracuda, la murène, le mérou et les carangues. Ce mode de toxicité fait intervenir au moins deux toxiques à tropisme digestif et neurologique.

**Ichthyosarcotoxisme de type tétrodon**, redoutable par sa paralysie respiratoire, il concerne d'une part, l'ensemble des poissons globuleux regroupés sur le nom de Tétrodon (Poisson-lune, Poisson-ballon, Fugu, Diodon, Poisson-hérisson) et d'autre part, le poisson-soleil.

**Ichthyosarcotoxisme ou clupéotoxisme de type clupeidae** dont la toxine a un tropisme pour les lèvres et la langue avant d'atteindre les autres organes. Les poissons concernés sont principalement la sardine, le hareng, le sprat et l'anchois.

**Intoxication par les Sélaciens** : elle concerne les murènes et les requins y compris les roussettes.

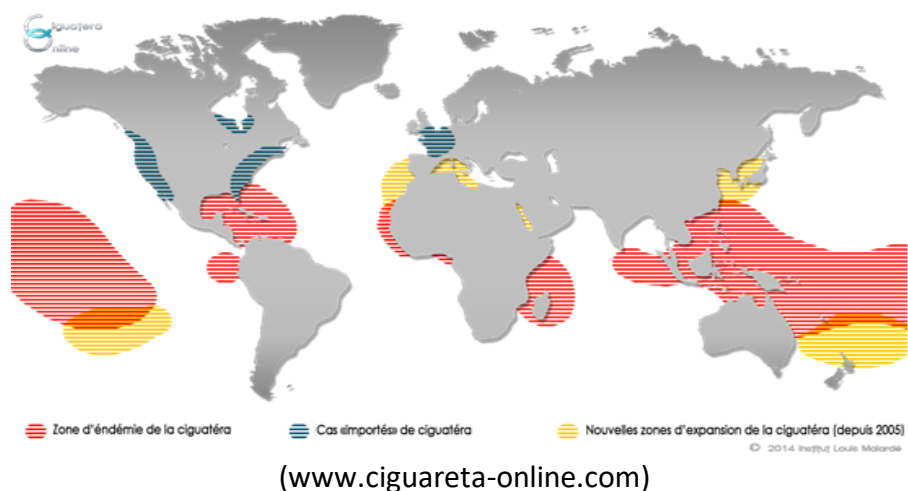


Figure 13. 7 : **Distribution mondiale de la ciguatera** (Institut Louis Malabré,

## 2. Ichtyosarcotoxisme par consommation des poissons des mers tempérées

On distingue en distingue quatre modalités :

- **ichtyosarcotoxisme de type histaminique** : c'est l'intoxication par les poissons qui contiennent de forte concentration d'histamine dans leurs tissus ;
- **ichthyohémotoxisme** : intoxication par les poissons qui contiennent dans leur sang une substance toxique ;

- **ichtyootoxisme** : intoxication par les poissons qui contiennent des toxines dans leurs gonades, laitances et œufs;
- **ichtyosarcotoxisme de type Mullidés ou Muglidés**, par les poissons hallucinatoires, qui contiennent une toxine hallucinante dans leur cerveau et leurs tissus.

### 3. Symptomatologie et traitement des ichtyosarcotoxismes

Elle se présente sous huit tableaux cliniques différents.

**Ichtyosarcotoxisme de type ciguatéra (la gratte)**. Les poissons en cause sont de grands prédateurs, contaminés par une micro-algue benthique *Gambierdiscus toxicus* vivant dans les récifs coralliens<sup>9</sup>. Relativement plus fréquente que les autres ichtyosarcotoxismes, la ciguatera peut être causée par deux toxines synthétisées par *Gambierdiscus toxicus* : la ciguatoxine (inoffensive pour le poisson mais nocive pour l'homme) et la maïtotoxine.

Deux à vingt heures après le repas contaminant, le tableau clinique associe :

- des signes digestifs (nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée aqueuse) entraînant une déshydratation importante ;
- des signes cardiovasculaires : bradycardie, hypotension, extrasystoles ventriculaires, troubles de la conduction auriculo-ventriculaire, parfois trouble de la repolarisation, rarement un collapsus cardiovasculaire entraînant le décès (0,1 à 1% des cas ;
- des signes neurologiques : paresthésies des extrémités et autour de la bouche, goût métallique, trouble de la sensibilité thermique avec inversion des sensations de chaud et de froid, prurit parfois sévère (gratte), ataxie, vertiges, myalgies, arthralgies, rachialgies, confusion, convulsions, coma. Dans le cas particulier des murènes, l'envenimation est dominée par les convulsions, les spasmes laryngés avec paralysies progressives pouvant aboutir rapidement au coma et à la mort dans 10% des cas. Mais habituellement il s'agit des formes simples comportant des symptômes qui durent une dizaine de jours. Le traitement est symptomatique.

L'évolution est assez favorable sous traitement symptomatique, mais les paresthésies peuvent persister plusieurs mois et le traitement symptomatique, fait appel au Mannitol à 20% avec amélioration.

#### **Ichthyosarcotoxisme de type tétrodon, Tétrodo-intoxication**

Il résulte de la consommation du Tétrodon qui désigne les poissons qui ont la propriété d'accumuler de l'air ou de l'eau dans leur œsophage au point de prendre une forme sphérique. Ils contiennent la tétrodotoxine qui est un inhibiteur synaptique de la libération de l'acétylcholine, c'est-à-dire un paralysant neuro-musculaire. Ces poissons sont peu consommés dans les pays tropicaux ; par contre, ils sont appréciés en Asie surtout au Japon où le Figu occasionne une centaine de morts par an. Le tableau clinique s'installe rapidement

---

<sup>9</sup> **Récifs coralliens** : encore appelés barrières de corail sont des structures marines naturelles bioconstruites essentiellement par les coraux qui sont des animaux marins vivants.

après le repas toxique, par des paresthésies des extrémités suivies de dysphagie, des vertiges, des sueurs profuses, des troubles gastro-intestinaux et des troubles respiratoires. Des troubles de la sensibilité profonde peuvent s'observer avec disparition de la sensation de pesanteur : le sujet a l'impression de flotter dans les airs. Les réflexes ostéo-tendineux sont abolis, une paralysie flasque s'installe, mais la conscience est intacte. En l'absence de traitement, le décès survient par paralysie respiratoire. Le traitement des formes simples est essentiellement symptomatique : réhydratation, lavage gastrique. Pour les cas graves, une réanimation respiratoire et cardio-vasculaire est nécessaire.

**Clupéotoxisme, de type clupeidae.** Cette intoxication est due à la présence de la clupéotoxine dans les viscères et les muscles des poissons. Elle sévit aux Caraïbes, aux îles Fidji et dans le Pacifique. Elle débute par des signes buco-pharyngés (goût amer ou métallique dans la bouche, dysesthésies labiales, puis linguales) suivis des signes digestifs (nausées, vomissements, diarrhée, vertiges) et neurologiques (convulsions) qui peuvent emporter le malade. Le traitement est symptomatique.

**Intoxication par les sélaciens.** Les intoxications par ces poissons cartilagineux dépendent du genre et parfois de l'espèce et surtout de l'organe ingéré. Pour les requins, c'est le foie cru, la chair et l'aïeron en soupe (consommés pour leur vertu aphrodisiaque) qui constituent les parties les plus vénéneuses. L'intoxication ressemble à la ciguatera (décrite au paragraphe précédent).

Les requins les plus redoutables à cet effet sont le requin des sables, le grand requin blanc, le requin marteau, le requin de lagon et le requin du Groenland. Le traitement est symptomatique. Une intoxication collective en 1993 a été décrite à Madagascar, impliquant 150 patients d'un même village (35 patients comateux, et 15 décès).

Les roussettes (chiens et Chats de mer) peuvent provoquer un érythème généralisé très prurigineux suivi de desquamation. Le risque d'en mourir n'est pas négligeable. Le traitement est symptomatique.

**Ichtyosarcotoxisme de type histaminique.** Décrit avec les poissons scombridés (thons, maquereaux, bonites), cette modalité d'ichtyosarcotoxisme est due à l'action de l'histidine-décarboxylase de certaines bactéries (*Clostridium*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* qui infectent la peau des poissons) sur l'histidine que ces poissons contiennent en abondance.

Les signes cliniques sont ceux d'une réaction allergique brutale et précoce à l'histamine, après la consommation du poisson riche en histamine. Les signes digestifs sont au premier plan (nausées, vomissements, douleurs épigastriques), suivis d'érythème et de vasodilatation de la face, du cou, d'urticaire généralisée, d'œdème des paupières, des acouphènes et des céphalées. Une hypotension, des lipothymies, un œdème laryngé et un bronchospasme sont possibles. La confirmation du diagnostic passe par le dosage de l'histamine dans le poisson (taux supérieur à 20mg/100g de muscle du poisson) et chez le patient (taux supérieur à 9nmol/l). L'évolution est généralement bonne en 4 à 16 heures.

Le traitement est symptomatique à base de corticoïdes et d'antihistaminiques. La prévention consiste à consommer du poisson fraîchement pêché et/ou stocké dans un endroit réfrigéré.

**Ichtyohémotoxisme.** Il concerne principalement les thons, les anguilles, les raies et les roussettes. Ces poissons contiennent dans leur sang une substance toxique thermolabile qui provoque des troubles chez des personnes qui mangent du poisson cru et celles qui, pendant qu'elles vident ou nettoient le poisson, se blessent ou se piquent et se contaminent par de sang souillé de poisson. Les signes d'intoxication associent les troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées) et des signes neurologiques (disparition du sens du toucher, apathie, convulsion, paralysie respiratoire).

L'évolution est généralement bonne en 4 à 16 heures et quelquefois fatale en cas de forte dose chez l'animal. Le traitement est symptomatique.

**Ichtyootoxisme.** Il concerne principalement les brochets, les saumons, le barbeau (poisson d'eau douce) et les carpes. Ces poissons contaminés et consommés insuffisamment cuits provoquent une gastro-entérite aiguë (douleurs épigastriques, nausées, vomissements et diarrhées) accompagnée ou non de troubles psychiques passagers. Avec le barbeau, ces signes sont souvent très prononcés avec en plus des crampes musculaires, des syncopes et une anurie, tous transitoires, connus sous le nom de « **choléra des barbeaux** ». Avec les œufs de Brochet contaminés, s'observe leur effet purgatif. La guérison survient en quelques heures. Le traitement est symptomatique.

**Ichtyosarcotoxisme de type Mullidés ou Muglidés.** Les poissons en cause provoquent, lorsqu'ils sont contaminés, mal cuits ou mal conservés, les troubles sensoriels de type hallucinations, sensations ébrieuses et/ou de décharge électrique, de rêves. Il s'agit principalement des mulets, mérours, demoiselles, poissons coffres, poissons chirurgiens, et du poisson saupe. Ce dernier est communément désigné « *le poisson qui fait rêver* ».

Leur toxicité est saisonnière en Europe (juin, juillet, août). Après l'ingestion, surviennent trois types de sensations : digestives (nausées, brûlures oro-pharyngées et œsophagiennes) ; un syndrome ébrieux accompagné d'hallucinations visuelles et auditives, de délire et d'une sensation de décharge électrique et un syndrome neurologique avec une incoordination motrice et des paresthésies. La guérison survient en 24h avec un traitement symptomatique laissant persister un état dépressif et des céphalées.

## B. Modalités d'intoxication par les amphibiens vénéreux

L'intoxication par les amphibiens est due à la bufotoxine (crapauds) et la batrachotoxine (grenouilles), toxines localisées dans les glandes parotoïdes et dans les glandes muqueuses sous-cutanées de certains crapauds du genre *Bufo*, ainsi que des grenouilles de la famille des *Dendrobatidae*.

L'intoxication se produit de plusieurs manières, toutes passives : à travers une lésion cutanée, ou par contact avec les muqueuses (buccale, nasale, oculaire), par ingestion (au cours des thérapies traditionnelles).

L'intoxication par les bufotoxines débute par des signes d'apparence bénigne (picotements, brûlures cutanéomuqueuses, pâleur) suivis rapidement de manifestations cardio-vasculaires (troubles de rythme, hypotension), neurologiques (paralysie des extrémités, hypersalivation,

hallucinations, troubles de la vision, convulsions...) et de choc anaphylactique et qui peuvent entraîner la mort du patient.

La batrachotoxine perturbe le fonctionnement musculaire, nerveux et en particulier celui du cœur, ce qui provoque une arythmie, une fibrillation et puis la mort par arrêt cardiaque.

## C. Mécanisme d'intoxication par les mollusques et les crustacés

Les fruits de mer (mollusques et crustacés) représentent une cause non négligeable d'intoxication alimentaire due à leur consommation de plancton de la famille des dinoflagellés qui libère des toxines. Dès qu'un fruit de mer a un aspect ou une odeur suspecte, il doit être considéré comme impropre à la consommation, y compris les pétoncles et les palourdes qui peuvent également être infectées par un dinoflagellé.

On distingue trois principaux types d'intoxication par les fruits de mer : la forme digestive classique, qui est la plus fréquente ; la forme paralysante et la forme amnésiante.

### Forme digestive classique d'intoxication par les fruits de mer

Il s'agit d'un épisode diarrhéique, dû à la consommation de mollusques infectés de *Dinophysis sp.* qui secrètent les toxines responsables de la maladie. Les principaux mollusques en cause sont les moules, les pétoncles (coquilles Saint-Jacques), les praires et les palourdes (myes, clovisses) qui se sont nourris de ces planctons.

Les symptômes incluent la diarrhée, des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales, rarement graves.

Les méthodes de détection de ces toxines dans les mollusques sont les bio-essais avec des souris, l'ELISA et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

### Forme neurologique paralysante d'intoxication par les fruits de mer

Elle réalise habituellement un syndrome neurologique qui se déclare entre 20 minutes et quelques heures après la consommation de mollusques contaminés. Les symptômes initiaux incluent une paresthésie buccale et des extrémités, accompagnées de symptômes gastro-intestinaux évoluant spontanément vers la guérison en quelques jours. Dans les cas graves, une ataxie, une dysphonie, une dysphagie et une paralysie musculaire avec arrêt respiratoire peuvent se produire pendant les premières 12 heures. Les symptômes évoluent habituellement spontanément vers la guérison de quelques heures à quelques jours après l'ingestion

Cette intoxication est due à la consommation des bivalves contenant les saxitoxines et les gonyautoxines produites par les espèces du genre *Alexandrium* et d'autres dinoflagellés.

Cette intoxication est commune pour les mollusques collectés dans des eaux froides au-dessus du 30°N parallèle et en dessous de 30°S de latitude, mais elle peut aussi se produire en eaux tropicales.

La forme neurotoxique est due à des proliférations d'algues de *Gymnodinium* produisant la brevétoxine. Des « marées rouges » dues à *Gymnodinium breve* connues depuis longtemps sur les côtes de la Floride, sont associées d'une part aux, cas de toxi-infection par les mollusques, et d'autre part, au taux de mortalité de poissons, d'oiseaux marins et de mammifères marins contaminés par *Gymnodinium breve*.

Après ingestion de mollusques toxiques, les symptômes se manifestent par une paresthésie buccale et des extrémités, suivies d'étourdissements, d'ataxie, de myalgie et des symptômes gastro-intestinaux. L'évolution se fait spontanément vers la guérison rapide et complète.

#### **Intoxication amnésiante par fruits de mer**

Cette intoxication résulte de l'ingestion de mollusques contenant de l'acide domoïque produit par la diatomée *Pseudo-nitzschia pungens*, notamment les moules, les pétoncles, les couteaux et les crabes dormeurs (*cancer magister*).

Elle se manifeste au début par des vomissements, des crampes abdominales, des diarrhées et des céphalées. Les semaines qui suivent sont marquées par une perte de mémoire de fixation. Quelques mois plus tard, les patients présentent des déficits mnésiques antégrades avec préservation relative des autres fonctions cognitives, avec des évidences cliniques et électromyographiques de neuropathie et d'axonopathie sensorimotrices et motrices pures. Les fruits de mer impliqués contiennent des concentrations élevées de l'acide domoïque (supérieures à 20 ppm d'acide domoïque/10mg de chair).

### **III. Prévention des intoxications par les animaux vénéneux**

La prévention des intoxications par les animaux vénéneux rentre dans le contexte général de la sécurité alimentaire dont l'organisation au niveau national ou/et régional élabore des mesures de contrôle de chaque aliment, du producteur au consommateur.

Dans le cas des animaux vénéneux, les mesures de prévention se répartissent en 3 volets principaux : ichthyologique, des fruits de mer (mollusques et crustacés), et amphibiotique. On associe parfois, et accessoirement un quatrième volet qui concerne la prévention des envenimations par les cnidaires et les coelentérés. Chaque volet comporte des mesures de prévention individuelles et collectives.

#### **A. Mesures de prévention individuelle**

Elles comportent quatre temps.

**Avant la préparation des aliments.** Observer les règles de propreté lors de la manipulation des aliments à préparer, s'assurer de la propreté de la cuisine, laver les mains et les ongles avant et après la manipulation des aliments. Ne pas décongeler les produits surgelés à la température ambiante.



**Préparation des aliments.** Pour les poissons, les fruits de mer et les grenouilles, il est conseillé de réduire au maximum le temps de manipulation de ces aliments (entre la préparation initiale et son service) à au plus quatre heures à température ambiante et à deux heures si les aliments doivent être stockés au froid (en dessous de 5°C/41°F). Aussi, est-il recommandé d'éviscérer soigneusement les poissons et les coquillages sans se blesser ou se piquer par les nageoires et/ou les épines ; puis les laver abondamment avant et après l'écaillage.

**Cuisson.** Si les poissons et les coquillages doivent être cuits, la température de la cuisson ne doit pas dépasser 100°C ; en cas de consommation différée, il faut bien réchauffer les aliments déjà cuits.

**Contrôle du patient intoxiqué.** Tout patient présentant des signes suspects d'intoxication sera conduit à un centre de santé pour les premiers soins et pour la notification du cas. Les caractéristiques cliniques majeures, liées à une estimation de la période d'incubation donnent des suggestions utiles quant à l'agent causal probable.

## **B. Mesures de prévention collective**

Les mesures de prévention collective des intoxications par les animaux vénéneux revêtent deux aspects : les mesures immédiates liées aux cas récents et les actions permanentes quel que soit le moment de survenue des cas d'intoxication. Dans les deux éventualités, ces mesures privilégient la lutte pour les fruits de mer et les poissons de bonne qualité, la prévention des intoxications par les amphibiens étant léguée aux mesures de prévention individuelles.

### **Mesures ponctuelles et immédiates : Réalisation d'une enquête épidémiologique sur la source des poissons et des coquillages suspects**

Dès que des cas, isolés ou non, sont détectés, une enquête s'impose, incluant des interviews des personnes malades et en bonne santé afin de déterminer les dates et les lieux de l'approvisionnement des produits en cause et pour identifier les populations à risque. Cette enquête produira une liste complète des poissons et de coquillages encore disponibles qui seront identifiés et stockés en milieu réfrigéré.

### **Actions permanentes de prévention des intoxications**

Ces mesures relèvent des services et des programmes nationaux et régionaux qui garantissent aux consommateurs que les poissons et les fruits de mers vendus répondent aux exigences de sécurité alimentaire et de traçabilité de toutes les étapes de la pêche/récolte jusqu'au conditionnement.

Les normes des services de surveillance comportent entre autres la certification avant livraison, de la qualité et de la sécurité alimentaire à l'échelle du pays ou de la région. Dans certains pays gros producteurs de coquillages, ceux-ci doivent répondre à des exigences données en termes de densité d'élevage, de durabilité des opérations de captage du naissain

et de programme de gestion durable selon les principes de la production « bio ». Les produits répondant à ces exigences peuvent arborer alors le logo biologique ou Ecolabel.

## **Bibliographie**

Conan P., Jacquet S., Féral JP. Animaux marins potentiellement dangereux pour le plongeur. Laboratoire Arago. UMR 7621. 66651. Banyuls-sur-Mer. France

Bagnis R. Les empoisonnements par le poisson en Polynésie française : étude clinique et épidémiologique -, *Rev. hyg. et méd. soc.* 1967 ; 15 ; 7 ; 619-646.

Bagnis R., Kuberski T., Laugier S. - Clinical observations on 3,009 cases of ciguatera in the south pacific - *Am. j. trop. med. hyg.* 1979; 28; 6; 1067-1073.

Bagnis R., Spiegel A., Boutin J.P. - Evaluation de l'efficacité du mannitol dans le traitement de la ciguatera en polynésie française - *med. trop.* 1992 ; 52 ; 1 ; 67-73.

Geistdoerfer P., Goyffon M. - Animaux aquatiques dangereux - *Edition techniques., Encyl. med. chir., toxicologie-pathologies professionnelles*, 16078 c10, 1991, 16 p.

Lagraulet J. - Animaux aquatiques dangereux. - *Encycl. méd. chir.*, Paris, Intoxications, 16078 c10, 12-1982

Ramialiharisoa A., Rafenoherimanana R., De Haro L., Jouglard J. - Intoxication collective de type ciguaterique après ingestion de requin à Madagascar - *La Presse médicale* ; 5 octobre 1996 ; 25 ; n°29 ; p.1350.

Rivolier J. C. - Accidents provoqués par les animaux venimeux et veneneux marins -, les cahiers sandoz juin 1969 ; 14 ; 39-52.

Sciarli R.J., De Haro L. - Principales intoxications et envenimations par animaux marins - *le Concours Médical* 1999 ; 121 ; 25/26 ; 2003-2 - 010

Annexes

1. PROFILS DES POISSONS VENENEUX

Les tableaux 13. 1 et 13. 2 indiquent les poissons les plus incriminés dans les différents types d'intoxications.

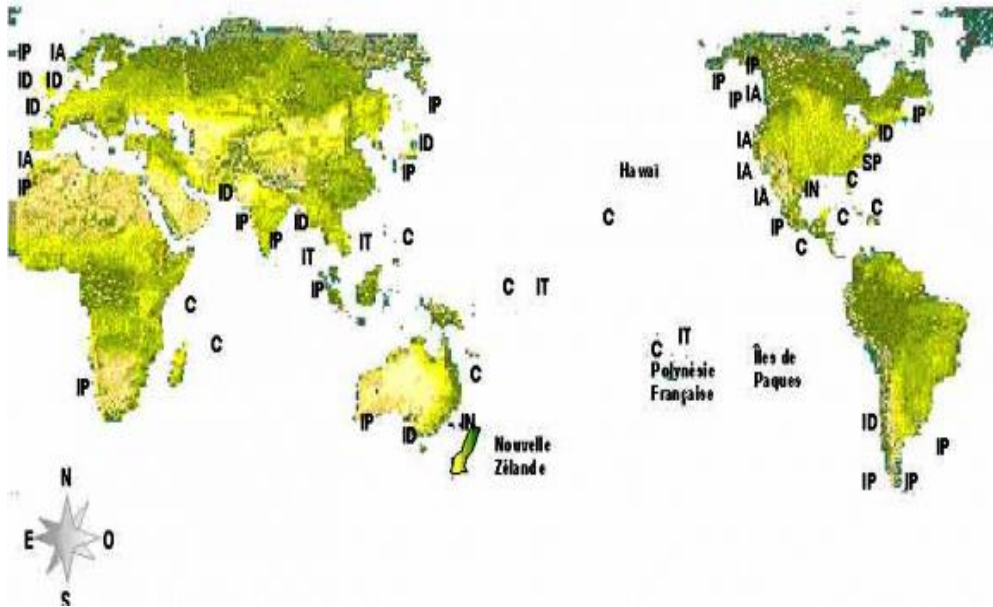
Tableau 13. 3 : Poissons, types d'intoxications et organes véneneux impliqués

NOMS DES POISSONS	TYPES D'INTOXICATION	ORGANES VENENEUX
<b>Scombridés</b> : thons, maquereaux, bonites	Histaminique	Chair
<b>Clupéidés</b> : sardines, harengs, sprat (sprat : anchois de Norvège) <b>Engraulidés</b> : anchois	Clupéotoxisme	Viscères et chair
<b>Scombridés</b> : thons <b>Anguillidés</b> : anguilles, <b>Rajidé</b> : raies <b>Sélacien (Scyliorhinidés)</b> rousettes	Ichtyohémotoxisme (ou intoxication par les poissons qui contiennent dans leur sang une substance toxique)	Sang et viscères
Esocidés: brochets, Salmonidés : saumons <b>Cyprinidés</b> : barbeau et carpe (poissons d'eau douce)	Ichtyootoxisme (ou intoxication par les poissons qui contiennent dans leurs gonades, dans la laitance ou dans leurs œufs une toxine)	Gonades, Laitance, œufs

Tableau 13. 4 : Poissons, types d'intoxications et parties vénéneuses impliquées

NOMS DES POISSONS	TYPES D'INTOXICATION	ORGANES VENENEUX
<b>Serranidé</b> : mérrou <b>Ostraciontidé</b> : Poisson-coffre, <b>Sparidé</b> : saupe « <i>le poisson qui fait rêver</i> » <b>Muglidé</b> : Mulet, <b>Pomacentridé</b> : Demoiselle, <b>Acanthuridés</b> : Poissons-chirurgiens	Ichtyosarcotoxisme de type Mullidés (ou Muglidés)	Tête (cerveau) Chair
<b>Sphyraenadé</b> : barracuda, <b>Anguilliforme</b> (Muraenidé) : murène, <b>Serranidé</b> : mérrou <b>Caranguidé</b> : carangues	Ciguatera : (intoxication par deux types différents de toxines : la ciguatoxine inoffensive pour le poisson mais nocive pour l'homme, et la maïtotoxine.)	Tête, foie, gonades, chair, viscères
<b>Molidés</b> : Poisson-lune, Poisson-ballon, Fugu des Japonais, Diodon -Poisson-hérissou et le Poisson-soleil	Tetrodo-intoxication inhibiteur synaptique de la libération de l'acétylcholine, c'est-à-dire paralysant neuro- musculaire	Chair
Sélaciens : requins ; <b>Scyliorhinidés</b> : roussettes (chien de mer) Poissons osseux : murènes	Atteintes neurologiques (murènes) ; Ciguatera (pour les requins) ; erythème généralisé desquamant (roussettes)	Chair (pour les murènes) ; foie et chair (pour les requins y compris les roussettes qui sont considérées comme de petits requins)
<b>Lamnidés</b> : requin bleu, Grand requin blanc. <b>Sphymidés</b> : requin marteau	Ciguatera	Foie, Chair, Ailerons

CARTES DE TOXICITE DES POISSONS



Répartition géographique des intoxications alimentaires par les toxines marines en 2000. Marie-Ludivine Chateau-Dega : <https://vertigo.revues.org/4698>

**IA**=intoxication amnésique par les fruits de mer ; **ID**= intoxication diarrhéique par les fruits de mer, **IN**=intoxication neurologique par les fruits de mer, **IP**=intoxication paralysante par les fruits de mer (IPFM), **C**=ciguatera, **IT**= intoxication à la tétrodotoxine (TTX) et le **SP**=syndrome associé aux Pfiesteria.

QUELQUES POISSONS ICTHYOTOXIQUES

**1. POISSONS ICTHYOHEMOTOXIQUES (toxiques par leur par leur sang)**

Ce sont principalement l'anguille, le congre, la murène, la roussette, le thon et la bonite.



Poissons responsables de l'ictyohémotoxisme.

De gauche à droite : Anguille. Congre. Murène. Roussette



De gauche à droite : thon et bonite

**2. POISSONS HALLUCI NAOIRES : provoquant l'ichtyo-alliéntoxisme**



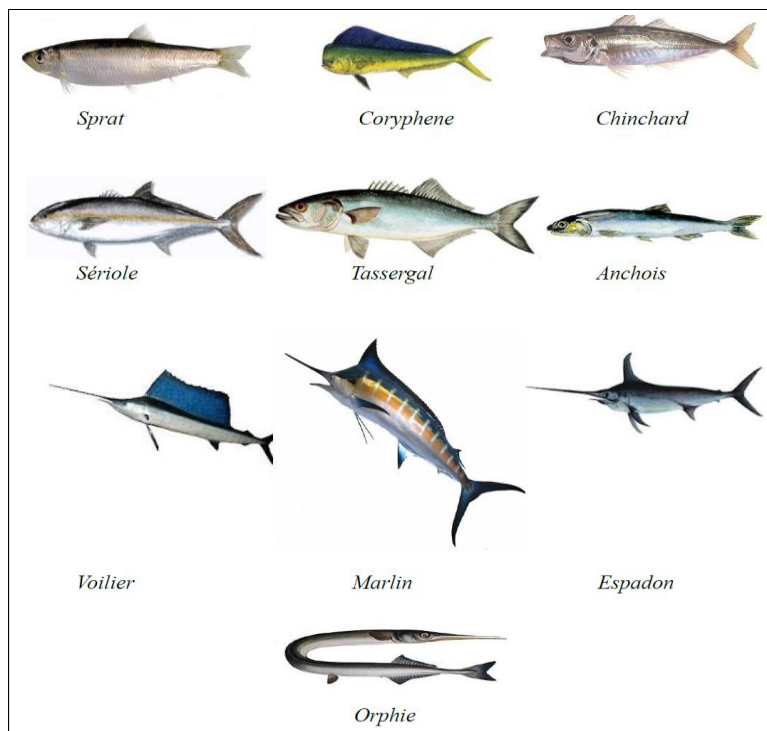
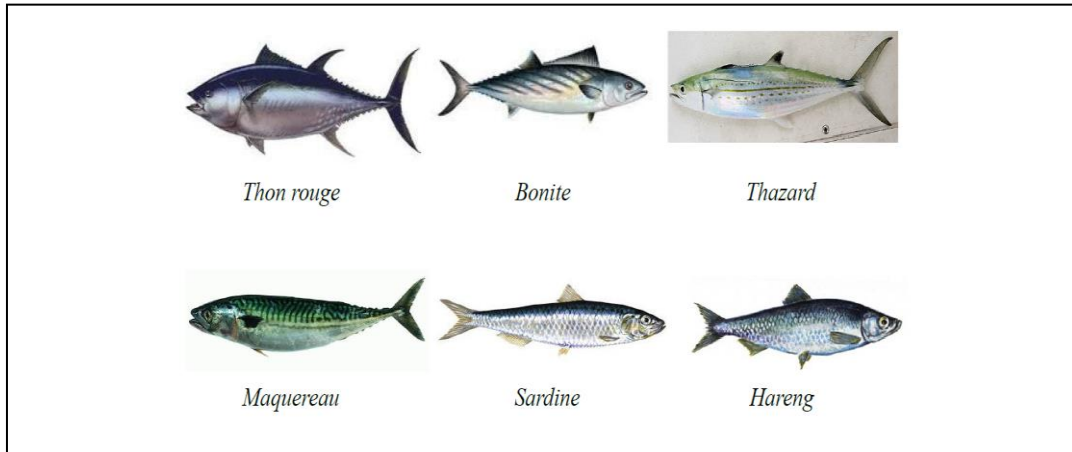
**Demoiselle rayée**

**Poisson chirurgien**

**Poisson lapin**

**Poisson saupe**

3. POISSONS RICHES EN HISTIDINE



## **14 LES CHAMPIGNONS VENENEUX**

---

*Rédigé par Pr Djohan Vincent (Côte d'Ivoire), Relu par Pr Kassi Fulgence (Côte d'Ivoire)*



## Introduction

Les champignons vénéneux sont des champignons supérieurs ou macromycètes (en opposition aux champignons microscopiques ou micromycètes), qui sont responsables d'intoxications alimentaires lors de leur ingestion. Cette intoxication peut s'exprimer par divers syndromes définis par des symptômes caractéristiques et des délais d'incubation plus ou moins longs entre le moment de l'ingestion et l'apparition des signes cliniques.

Les champignons supérieurs, bien que n'ayant pas une grande valeur nutritive, sont très appréciés en Afrique et dans le monde. Ils sont souvent cueillis dans la nature par des amateurs pour la consommation personnelle ou pour le commerce. Parmi plusieurs milliers d'espèces de champignons, environ une centaine est toxique et une vingtaine a pu être responsable de décès.

Le manque de précautions prises par les cueilleurs ou la confusion entre les espèces de champignons peut occasionner la survenue d'intoxication parfois très grave voire mortelle. En effet, dans un même genre, deux espèces proches peuvent être comestibles pour l'une et toxique pour l'autre. Les intoxications occasionnées sont réparties en deux grands syndromes : syndromes d'incubation courte et syndromes d'incubation longue.

## I. Intoxications à incubation courte

Ces intoxications surviennent généralement entre quelques minutes et moins de 6 heures après l'ingestion du champignon. Elles épargnent généralement le pronostic vital du sujet intoxiqué.

### A. Syndrome gastro-intestinal

Les signes cliniques sont ceux d'une gastro-entérite avec des nausées, vomissements, douleurs abdominales et diarrhées. Les signes apparaissent en 15 minutes à 3 heures après l'ingestion et peuvent être parfois sévères. Toutefois, la guérison est de mise. Le traitement est purement symptomatique et se limite habituellement à la réhydratation du patient. Quelques espèces responsables sont : *Entoloma lividum*, *Boletus satanas* et *Agaricus xanthodermus*.

### B. Syndrome muscarinien

Ce syndrome est directement lié à la présence de muscarine. Il est dû aux espèces des genres *Inocybe* et *Clitocybe* qui contiennent assez de muscarine pour induire ce syndrome. Après une incubation d'une demi-heure à trois heures après l'ingestion du champignon, on note une hypersudation très importante, un larmolement, un encombrement bronchique et des troubles digestifs. Apparaissent aussi une bradycardie, une hypotension et un myosis.

L'atropine est l'antidote spécifique. Le décès peut survenir dans des cas exceptionnels notamment sur un terrain ayant un antécédent cardiaque.

## **C. Syndrome panthérinien**

Les intoxications de ce type sont surtout dues à *Amanita panthera* (amanite panthère) et *Amanita muscaria*. Les signes d'intoxication débutent après une incubation inférieure à 3 heures par un syndrome ébrié avec obnubilation, euphorie, agitation psychomotrice, délire et confusion mentale.

Les troubles digestifs sont inconstants. On peut parfois observer une salivation importante et une sudation faisant évoquer l'action de la muscarine. L'évolution est favorable après quelques heures.

## **D. Syndrome psilocybien**

Ce syndrome est dû à la psilocybine et à la psilocine retrouvées chez les champignons des genres *Psilocybe*, *Stropharia*, *Conocybe* (*Pholiotina*). En présence d'un syndrome psilocybien, les effets somatiques apparaissent les premiers avec une augmentation de la fréquence cardiaque, une mydriase, des nausées et une sécheresse de la bouche. Les signes neuropsychiques et sensoriels sont constants avec une euphorie, une hyperesthésie visuelle, auditive, gustative, des hallucinations visuelles et auditives. L'évolution est favorable et suivie d'une amnésie temporaire.

## **E. Syndrome coprinien**

Ce syndrome est très proche du syndrome antabuse. Il est lié à la consommation de champignons du genre *Coprinus* (*Coprinus atramentarius*) simultanée avec de l'alcool. La substance responsable de l'intoxication a été identifiée comme la coprine. L'intoxication se traduit par une vasodilatation de la face et du cou, des céphalées, des sueurs, une tachycardie sinusale et une hypotension artérielle. Ces champignons doivent donc être consommés sans alcool. Le traitement est symptomatique.

## **II. Intoxication à incubation longue**

Ces intoxications surviennent 8 à 10 heures après l'ingestion du champignon. Ce sont les plus fréquentes et les plus graves.

## A. Syndrome phalloïdien

Il est responsable de plus de 90% des décès liés à la consommation de champignons et devra être suspecté en présence de toute intoxication ayant un délai d'incubation supérieur à 6 heures. Il n'existe pas d'antidote à ce jour capable d'inverser seul le pronostic de l'intoxication. La transplantation hépatique reste le seul recours au stade d'insuffisance hépatocellulaire irréversible.

*Amanita phalloides* (amanite phalloïde) est la principale espèce en cause. D'autres amanites peuvent également être responsables de cette intoxication : *Amanita verna* (amanite printanière) et *Amanita virosa* (amanite vireuse).

Après ingestion, l'intoxication se réalise en plusieurs phases :

- la phase de latence qui dure de 6 à 24 heures;
- la phase digestive avec l'apparition de nausées puis de vomissements importants, de douleurs abdominales et d'une diarrhée cholériforme. La déshydratation sévère avec une hypovolémie, une insuffisance rénale fonctionnelle et un choc complique le syndrome digestif;
- la phase d'accalmie avec diminution des symptômes qui précède la phase d'hépatite clinique ;
- la phase d'hépatite réalise une hépatomégalie avec subictère ou ictère qui s'accompagne par la suite d'un syndrome hémorragique, d'une insuffisance rénale aigue. Le décès survient en 6 à 10 jours.



(Silvia et al. 2013).

Figure 14. 1 : *Amanita phalloides*

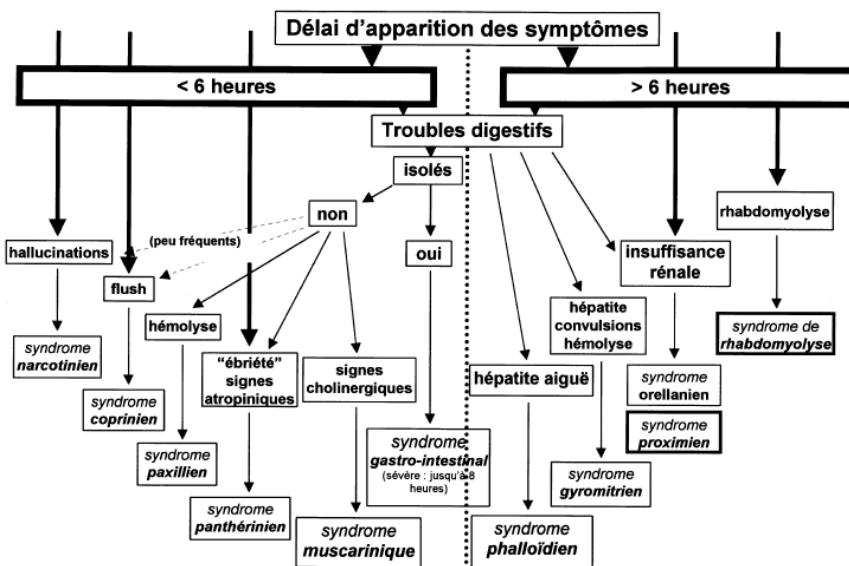
## B. Syndrome orellanien

Il est réalisé après la consommation du cortinaire des montagnes (*Cortinarius orellanus*). Une phase d'incubation longue de 12 heures à 14 jours précède une phase gastro-intestinale faite de nausées, de vomissements et de diarrhée parfois responsable d'une déshydratation. La phase d'état est dominée par une néphrite tubulo-interstitielle avec œdème, albuminurie et hyperazotémie. Le décès survient en 6 à 10 jours et parfois plus.

## C. Syndrome gyromitrien

Il est dû à la consommation de *Gyromitra esculenta* (fausse morille). L'incubation peut durer 4 à 24 heures, et l'intoxication suit plusieurs phases. La première phase d'intoxication se traduit par des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales. La guérison survient en quelques jours. En cas d'intoxications plus sévères, une seconde phase caractérisée par une atteinte neurologique faite de confusion, délire, somnolence, tremblements, associée à une atteinte hépatique apparaît en 36 à 48 heures.

Toutes les intoxications à incubation longue nécessitent une prise en charge dans un service de réanimation.



(Bédry et Saviuc, 2012)

Figure 14. 2 : Syndromes d'intoxication par les champignons supérieurs en fonction du délai et de la symptomatologie.

**Conclusion**

Les champignons sont très appréciés pour leur goût, mais la prudence doit être de mise lors de la cueillette. Il vaut donc mieux, pour ce faire, ne cueillir que les champignons dont on est certain de l'identité afin d'éviter les confusions pouvant aboutir à des intoxications graves.

## **Bibliographie**

- Courtecuisse R, Deveau M. Champignons hallucinogènes d'Europe et des Amériques : mise au point mycologique et toxicologique. *Annales de Toxicologie Analytique*, 2004, 16 (1), 36-64.
- Bédry1R, Saviuc P. Intoxications graves par les champignons à l'exception du syndrome phalloïdien. *Réanimation*, 2002 ; 11 : 524-32.
- Maretic Z, Russel FE, Golobic V. Twenty-five case of poisoning by the mushtoom *Pleurotus olearius*. *Toxicon*. 1975, 13, 379-381.
- Dehay M-H, De Sainte Mareville F, Assez N, Dherbecourt V, Goldtein P. Syndrome muscarinique par ingestion de champignon : à propos de deux cas dont un mortel. *JEUR*, 2009, 22 : 18-23.
- Garrouste C, Hémerly M, Boudat AM, Kamar N. Amanita phalloides poisoning-induced end-stage renal failure. *Clin Nephrol*. 2009 May;71(5):571-4.
- Saviuc P. Intoxications par les champignons supérieurs. In Ripert C. Mycologie médicale. P121-160. Lavoisier, Paris, 2013. 690p.
- Saviuc P. Intoxication par champignons : les syndromes émergents. In Urgences, 2009, p479-487.
- Silvia C, Marina R, Horacio JT. Amanita phalloides poisoning: series of three cases. *Acta Toxicol. Argent*. 2013, 21 (2): 110-117
- Lima ADL, Costa Fortes R, Garbi Novaes MRC and Percário S. Poisonous mushrooms; a review of the most common intoxications. *Nutr Hosp*. 2012; 27(2):402-408

**Table des matières**

1 GÉNÉRALITÉS SUR LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE EN PARASITOLOGIE .....	12
Introduction .....	13
I. Modifications séro-hématologiques .....	14
A. Modifications sérologiques .....	14
B. Modifications hématologiques .....	15
II. Diagnostic parasitologique .....	16
A. Diagnostic des parasites sanguicoles .....	16
1. Indications .....	16
2. Prélèvements (phase pré - analytique).....	16
3. Techniques .....	17
B. Examen parasitologique des selles .....	20
1. Indications .....	20
2. Prélèvements (phase pré – analytique).....	20
3. Examen des selles .....	21
C. Examen parasitologique des urines .....	23
D. Examen parasitologique des prélèvements de la peau .....	24
E. Examen parasitologique du Liquide céphalo-rachidien (LCR) .....	25
F. Diagnostic parasitologique des prélèvements divers.....	25
III. Diagnostic immunologique en parasitologie .....	26
A. Introduction .....	26
B. Méthodes immunologiques.....	27
1. Exploration de l’immunité cellulaire .....	27
2. Techniques sérologiques.....	27
IV. Diagnostic moléculaire en parasitologie .....	28
A. Approches basées sur les acides nucléiques .....	29
B. Réaction de polymérisation en chaine et en temps réel (RT-PCR) .....	29
C. Boucle Amplification isotherme Facilitée (LAMP).....	30
V. Autres méthodes de diagnostic des parasites.....	30
A. Méthodes histologiques et anatomo-pathologiques en parasitologie.....	30
B. Culture des parasites .....	31
1. Culture des parasites du sang et des tissus .....	31
2. Culture des parasites fécaux (coprologie parasitaire).....	32
C. Inoculation à l’animal .....	33
Conclusion .....	34
Bibliographie.....	35

*Table des Matières*

2 MODIFICATIONS HÉMATOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES AU COURS DES PARASITOSEES. ....	37
Introduction .....	38
I. Modifications hématologiques au cours des parasitoses .....	38
A. Eosinophilie parasitaire .....	38
1. Pathogénie de l'hyperéosinophilie parasitaire .....	38
2. Caractères généraux d'une éosinophilie parasitaire .....	39
3. Aspects évolutifs de l'éosinophilie parasitaire .....	40
4. Diagnostic étiologique d'une éosinophilie parasitaire .....	42
5 Diagnostic différentiel avec l'hyperéosinophilie non parasitaire en zone d'endémie.....	43
B. Anémies au cours des parasitoses .....	43
1. Caractères généraux .....	43
2. Principales étiologies parasitaires au cours des anémies.....	44
C. Autres modifications hématologiques .....	45
1. Hyperleucocytose .....	45
2. Leucopénie .....	46
3. Thrombopénie .....	46
4. Syndrome mononucléosique .....	46
5. Augmentation de la vitesse de sédimentation .....	46
II. Modifications biochimiques au cours des parasitoses.....	46
A. Modifications biochimiques dues à des atteintes systémiques .....	46
B. Modifications biochimiques dues à des atteintes localisées.....	47
1. Au niveau digestif .....	47
2. Au niveau hépatique.....	47
3. Au niveau du système nerveux central.....	48
III. Cas particulier du paludisme grave .....	48
Bibliographie.....	49
3 DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DES PARASITOSEES.....	50
Introduction .....	51
I. Généralités.....	51
II. Indications du diagnostic sérologique en parasitologie [3;4].....	52
III. Antigènes parasitaires [2;5] .....	53
IV. Anticorps anti-parasitaires .....	53
V. Méthodes sérologiques .....	54
A. Principes du diagnostic sérologique [2 ; 3-8].....	54
B. Prélèvements étudiés [1].....	54



## Table des Matières

C. Différentes méthodes sérologiques [1-13].....	54
1. Méthodes à antigènes figurés.....	55
a. Méthodes limitées à une ou deux applications.....	55
b. Méthode polyvalente : Immunofluorescence indirecte [5].....	56
2. Techniques à antigènes solubles [6 ; 9].....	58
a. Hémagglutination indirecte (HAI) [9].....	59
b. Electrosynérèse [6].....	60
c. Immunodiffusion.....	61
3. Techniques de confirmation.....	66
a. Western Blot [17].....	66
b. Immuno-électrophorèse.....	68
D. Autres méthodes : Tests de diagnostic rapides (TDR).....	69
1. Principe du diagnostic biologique rapide.....	69
2. Technique du diagnostic biologique rapide par immuno-chromatographie appliquée aux maladies parasitaires.....	70
a. TDR du paludisme.....	70
b. TDR de la Maladie de Chagas [31 ; 32].....	73
c. TDR de la leishmaniose viscérale [33].....	73
d. TDR de l'échinococcose kystique humaine ou hydatidose humaine [34].....	73
VI. Particularités des sérologies dans les parasitoses.....	73
A. Amibiase (amoébose) viscérale [3 ; 4].....	73
B. Amibiase intestinale [35].....	74
C. Anisakiase [36].....	74
D. Anguillulose [37].....	74
E. Cysticercose [38 ; 39].....	74
F. Distomatoses à <i>Fasciola hepatica</i> et à <i>F. gigantica</i> [40].....	75
G. Échinococcose alvéolaire [41].....	75
H. Hydatidose [42].....	75
I. Leishmaniose viscérale [43].....	76
J. Paludisme [44].....	76
K. Schistosomiasis [45 ; 46].....	77
L. Toxocarose [47].....	77
M. Toxoplasmose [14].....	77
N. Trichinose [48 ; 49].....	78
O. Trypanosomiase humaine africaine [50].....	78
P. Trypanosomiase américaine ou Maladie de Chagas.....	79
Q. Autres parasites uniquement intestinaux.....	79

## Table des Matières

Conclusion .....	79
Bibliographie .....	80
4 DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PARASITOSEES .....	84
Introduction .....	85
I. Principe du diagnostic moléculaire des infections .....	86
II. Prélèvements .....	86
A. Parasites sanguicoles .....	86
B. Parasites cutanés et sous-cutanées .....	87
C. Parasites intestinaux et génito-urinaires .....	87
III. Extraction de l'ADN parasitaire .....	87
IV. Techniques moléculaires les plus utilisées .....	88
A. PCR classique .....	88
B. PCR nichée .....	89
C. PCR RFLP ou Polymorphisme de longueur de fragment de restriction .....	90
D. PCR en temps réel (rt-PCR) .....	90
E. Techniques de PCR à température constante .....	90
V. Parasites sanguicoles et tissulaires .....	91
A. Plasmodium .....	91
B. Toxoplasma gondii .....	92
C. Leishmania .....	92
D. Trypanosoma .....	92
VI. Parasites intestinaux et génito-urinaires .....	93
Conclusion .....	93
Bibliographie .....	94
5 EXAMENS PARASITOLOGIQUES DU SANG .....	96
Introduction .....	97
I. Parasites à rechercher .....	97
A. Dans les hématies .....	97
B. Dans les leucocytes .....	97
C. Dans le plasma .....	98
II. Prélèvement .....	98
A. Période .....	98
B. Type de prélèvement .....	98

## Table des Matières

III. Techniques de recherche des parasites .....	100
A. Méthodes directes .....	100
1. Etat frais ou examen direct .....	100
2. Frottis sanguin (FS) mince .....	100
3. Goutte épaisse .....	103
4. Frottis mixte : association GE/FS sur une même lame .....	105
5. Leucoconcentration .....	109
6. Technique de Fullbörn à l'eau distillée .....	109
7. La technique de Knott modifiée .....	110
8. Triple centrifugation .....	110
9. Centrifugation en tube à microhématocrite (technique du « buffycoat »).....	111
10. La technique du QBC™ (Quantitative Buffy Coat) .....	111
11. La technique d'éluion du sang sur résine échangeuse d'ions (méthode de Lanham) .	114
12. Test de diagnostic rapide (TDR) du paludisme.....	115
13. Le test de PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	121
14. Les tests de culture .....	122
Bibliographie .....	124
6 EXAMENS PARASITOLOGIQUES DES SELLES .....	125
Introduction .....	126
I. Conditions de prélèvement et de conservation des selles.....	126
A. Préparation du sujet.....	126
B. Réactivation des selles.....	127
C. Recueil des selles .....	127
D. Délai entre la défécation et l'examen parasitologique.....	127
E. Conservation des selles.....	128
II. Examens des selles .....	129
A. Examens directs .....	129
1. Examen macroscopique .....	129
2. Examen microscopique direct .....	129
B. Méthodes de concentration parasitaire.....	130
1. Les méthodes physiques .....	131
a. Techniques par sédimentation .....	132
b. Techniques par flottation.....	133
2. Les méthodes physico-chimiques ou méthodes diphasiques.....	135
a. Principe .....	135

## Table des Matières

b. Technique de Telemann-Rivas .....	137
c. Technique de Bailenger .....	137
d. Technique de Ritchie simplifiée .....	138
e. Technique de Blagg ou de MIF concentration.....	138
f. Méthode de Thébault simplifiée par Valentin et Solle.....	139
3. Méthodes combinées ou méthodes mixtes .....	140
a. Technique de Junod .....	140
b. Technique de Junod modifiée .....	141
C. Techniques spéciales .....	141
1. Le scotch-test anal de GRAHAM.....	141
2. Méthode de Baermann.....	142
3. Coproculture .....	143
a. Coproculture des helminthes .....	143
b. Coproculture des protozoaires.....	145
4. Recherche d'oocystes de cryptosporidies .....	146
D. Technique de numération des œufs d'helminthes : technique de KATO-KATZ.....	147
1. Principe .....	147
2. Matériel.....	147
3. Réactifs.....	147
4. Mode opératoire .....	147
5. Intérêts.....	148
6. Inconvénients .....	148
Bibliographie .....	149
7 EXAMENS PARASITOLOGIQUES DIVERS (Urines, LCR, LBA, expectorations, liquide de tubage duodéal, produit de ponction de la moelle osseuse, produit de ponction ganglionnaire, biopsie de la muqueuse rectale) .....	150
Introduction .....	151
I. Type de prélèvements et préparation du produit biologique .....	151
A. Liquide Céphalo-Rachidien (LCR) .....	151
B. Expectorations .....	151
1. Liquide de Lavage broncho-Alvéolaire (LBA) (Aspergilloses, Pneumocystose) .....	151
2. Autres Expectorations.....	152
3. Le crachat profond.....	152
C. Liquide de tubage duodéal .....	152
D. Produit de ponction de la moelle osseuse .....	153
E. Produit de ponction ganglionnaire.....	153

## Table des Matières

F. Urine .....	153
H. Biopsie de la muqueuse rectale.....	153
II. Examen Direct et Culture.....	153
A. En Mycologie.....	154
1. LCR .....	154
2. Expectations.....	155
3. Liquide de tubage duodéal.....	156
4. Produit de ponction de la moelle osseuse.....	156
5. Produit de ponction ganglionnaire.....	157
6. Urines.....	157
7. Biopsie de la muqueuse rectale .....	157
B. Parasitologie.....	158
1. LCR .....	158
2. Expectations.....	159
3. Liquide de tubage duodéal.....	160
4. Produit de ponction de la moelle osseuse.....	160
5. Produit de ponction ganglionnaire.....	160
6. Urines.....	160
7. Biopsie de la muqueuse rectale .....	161
III. Recherche d'antigènes solubles ou circulants.....	161
A. Indications.....	161
B. Techniques.....	161
Conclusion .....	162
Bibliographie.....	163
8 DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DES PARASITES SANGUICOLES.....	164
Introduction.....	165
I. Plasmodium .....	165
A. Description générale de <i>Plasmodium</i> : .....	165
B. <i>Plasmodium falciparum</i> .....	167
C. <i>Plasmodium vivax</i> .....	170
D. <i>Plasmodium malariae</i> .....	172
E. <i>Plasmodium ovale</i> .....	174
II. Leishmanies.....	176
III. Trypanosomes.....	177
IV. Toxoplasmes .....	179

## Table des Matières

V. <i>Loa loa</i> .....	182
VI. <i>Wuchereria bancrofti</i> .....	182
VII. <i>Brugia malayi</i> .....	183
VIII. <i>Onchocerca volvulus</i> .....	184
IX. <i>Mansonella</i> .....	185
Conclusion .....	187
9 DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DES PARASITES INTESTINAUX ET URO-GÉNITAUX .....	188
Introduction .....	189
I. Morphologie des parasites intestinaux .....	189
A. Protozoaires intestinaux .....	189
1. Amibe pathogène .....	189
2. Amibes non pathogènes .....	190
B. Helminthes intestinaux .....	194
1. Nématodes .....	194
2. Cestodes .....	198
3. Trématodes .....	201
II. Morphologie des parasites uro-génitaux .....	203
A. <i>Shistosoma heamatobium</i> .....	203
B. <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	203
Bibliographie .....	205
10 TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC MYCOLOGIQUE .....	206
Introduction .....	207
I. Les prélèvements en mycologie .....	207
A. Respect des règles .....	207
B. Modalités d'obtention des prélèvements en fonction de la localisation des lésions .....	208
1. Prélèvements de la peau, des phanères et des muqueuses .....	209
a. Les lésions de la peau glabre .....	209
b. Les lésions de teignes et des régions pileuses .....	210
c. Les lésions des plis .....	210
d. Les Onyxis fongiques .....	210
e. Les lésions des muqueuses et orifices naturels .....	211
2. Prélèvements sous-cutanés .....	211
3. Prélèvements profonds .....	211

## Table des Matières

II. Les techniques de diagnostic mycologique .....	212
A. Examen direct du produit pathologique .....	212
1. Les méthodes .....	213
a. Choix des méthodes en fonction des prélèvements .....	213
B. Mise en culture des prélèvements biologiques : Isolement et Numération .....	216
1. Milieux d'isolement et/ou d'identification .....	216
2. Numération des micromycètes dans les prélèvements biologiques .....	217
C. Choix du contenant des milieux, des conditions d'incubation et de surveillance des prélèvementsensemencés .....	218
1. Choix du contenant : tubes ou boîtes.....	218
2. Conditions d'incubation et de surveillance des prélèvementsensemencés.....	219
a. Conditions d'incubation (Température et Humidité) .....	219
b. Conditions de surveillance des prélèvementsensemencés .....	219
D. Identification des champignons.....	219
1. Identification des levures d'intérêt médical .....	219
a. Différenciation des genres .....	220
b. Différenciation des espèces du genre <i>Candida</i> .....	222
c. Identification des autres espèces du genre <i>Candida</i> .....	226
d. Recherche de capsule de cryptocoques (à l'encre de Chine (India ink)) .....	227
2. Identification des champignons filamenteux.....	228
a. Généralités .....	228
b. Identification des dermatophytes .....	229
c. Identification des <i>Aspergillus</i> .....	233
d. Identification des champignons filamenteux opportunistes .....	237
E. Méthodes de détermination de la sensibilité aux antifongiques des micromycètes .....	238
1. Méthodes de référence .....	238
2. Tests utilisés en routine .....	239
a. Etest® .....	239
b. Autres tests .....	239
III. Autres techniques de diagnostic mycologique .....	240
1. La technique protéomique ou spectrométrie de masse : MALDI-TOF .....	240
A. Principe .....	240
B. Technique .....	240
C. Lecture et interprétation des résultats .....	241
Conclusion .....	243
Bibliographie.....	244

*Table des Matières*

11 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES AFFECTIONS PARASITAIRES ET MYCOSIQUES OPPORTUNISTES DU SIDA .....	246
Introduction .....	247
I. Rappels étiopathogéniques .....	248
II. Diagnostic biologique .....	250
A. Circonstances du diagnostic biologique .....	250
1. Fièvre prolongée avec altération de l'état général sans focalisation cérébrale .....	250
2. Manifestations digestives .....	250
3. Manifestations pulmonaires .....	251
4. Manifestations cutanéomuqueuses .....	251
5. Manifestations neurologiques .....	251
6. Autres circonstances du diagnostic .....	251
B. Prélèvements .....	251
C. Examens parasitologiques et mycologiques .....	252
1. Examens microscopiques .....	252
2. Cultures .....	252
D- Détection d'antigènes spécifiques .....	253
E- Diagnostic moléculaire .....	253
F- Diagnostic histologique .....	253
Résumé - Conclusion .....	254
12 LES ANIMAUX VENIMEUX .....	255
Introduction .....	256
I. Rappel historique .....	256
II. Principaux animaux venimeux .....	257
A. Reptiles .....	257
1. Classification .....	257
2. Répartition géographique .....	258
3. Caractéristiques morphologiques .....	259
4. Physiologie et venin des serpents .....	260
5. Syndromes d'envenimation par les serpents .....	262
B. Arthropodes .....	269
1. Arachnides venimeux .....	269
a. Classification et distribution géographique des arachnides venimeux .....	269
b. Caractères morphologiques, physiologiques et venimeuses des arachnides .....	271
c. Syndromes d'envenimation par les arachnides .....	273



## Table des Matières

2. Insectes venimeux .....	275
a. Classification des hyménoptères venimeux .....	276
b. Venin d'hyménoptères.....	277
c. Envenimation par piqûres d'hyménoptères et traitement .....	278
C. Chilopodes venimeux .....	279
D. Mollusques venimeux .....	280
1. Gasteropodes venimeux .....	280
2. Cephalopodes venimeux.....	281
E. Cnidaires venimeux .....	281
F. Echinodermes .....	283
G. Poissons venimeux .....	283
H. Mammifères venimeux .....	285
Conclusion .....	285
Bibliographie.....	286
13 LES ANIMAUX VENENEUX.....	287
Introduction .....	288
I. Principaux animaux vénéneux .....	288
A. Poissons .....	289
B. Amphibiens .....	289
C. Mollusques.....	290
D. Crustacés .....	292
E. Autres animaux vénéneux ou toxiques .....	293
II. Mécanismes d'intoxication par les animaux veneneux .....	293
A. Mécanismes d'intoxication par les poissons .....	293
1. Ichtyosarcotoxisme par consommation des poissons des mers tropicales .....	294
2. Ichtyosarcotoxisme par consommation des poissons des mers tempérées.....	294
3. Symptomatologie et traitement des ichtyosarcotoxismes.....	295
B. Modalités d'intoxication par les amphibiens vénéneux .....	297
C. Mécanisme d'intoxication par les mollusques et les crustacés.....	298
III. Prévention des intoxications par les animaux vénéneux .....	299
A. Mesures de prévention individuelle .....	299
B. Mesures de prévention collective .....	300
Bibliographie.....	301
Annexes .....	302
14 LES CHAMPIGNONS VENENEUX.....	307

## Table des Matières

Introduction .....	308
I. Intoxications à incubation courte .....	308
A. Syndrome gastro-intestinal .....	308
B. Syndrome muscarinien .....	308
C. Syndrome panthéринien .....	309
D. Syndrome psilocybien .....	309
E. Syndrome coprinien .....	309
II. Intoxication à incubation longue .....	309
A. Syndrome phalloïdien .....	310
B. Syndrome orellanien .....	311
C. Syndrome gyromitrien .....	311
Conclusion .....	312
Bibliographie .....	313
Table des matieres .....	314

**Les Éditions d'AVENIR, Abidjan, Côte d'Ivoire**

Tome 3 – Diagnostic biologique des parasitoses et mycoses

– Animaux et champignons venimeux et vénéneux

ISBN 978-2-38003-029-7

Dépôt légal N° 17104 du 08 janvier 2021 (*Première édition*)