

**Profil du portage parasitaire intestinal observé au
laboratoire de parasitologie de l'hôpital militaire
Moulay Ismail, Meknès**

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE PRESENTE PAR

Docteur EL- HASSANI Imane

**POUR L'OBTENTION DU DIPLOME NATIONAL DESPECIALITE EN
MEDECINE**

Option : Biologie médicale.

Sous la direction de : PROFESSEUR ER-RAMI

Session: Octobre /2014

A mes parents, mon mari, mes sœurs, ma fille et toute ma famille.

A la mémoire de Milalla et mon oncle Abdelhakim.

Dédicaces.

A mes maîtres, qui m'ont accueillie, soutenue et aidée

durant ces quatre années d'apprentissage

Vous constituez pour moi et pour tous les résidents le

symbole du respect, de la responsabilité. Veuillez

trouver, chers maîtres, dans ceci le témoignage de ma

profonde gratitude et de ma sincère reconnaissance, et

Acceptez mes remerciements pour votre présence et

votre disponibilité.

**Profil du portage parasitaire intestinal observé au
laboratoire de parasitologie de l'hôpital militaire
Moulay Ismail, Meknès**

Plan :

Résumé	4
I. Introduction.....	6
II. Matériels et méthodes.....	7
III. Résultats	8
IV. Discussion.....	11
1. Examen parasitologique des selles.....	11
A. Orientation de l'EPS	11
B. Indications de l'EPS.....	11
C. Limites.....	14
D. Conduite de l'EPS.....	14
1- Phase pré-analytique.....	14
i. Modalités du prélèvement.....	14
ii. Précautions lors du recueil.....	15
2- Réalisation de l'EPS.....	16
i. Examen macroscopique.....	16
ii. Examen microscopique.....	16
• Examen direct.....	17
❖ Examen direct à l'état frais.....	17
❖ Examen direct après dilution.....	17
❖ Examen direct après coloration.....	18
iii. Examen après concentration.....	23
❖ Méthodes physiques.....	23
❖ Méthodes physicochimiques.....	26

❖ Méthodes combinées.....	31
2. Comparaison de nos résultats avec la littérature.....	32
V. Conclusion.....	39
Références.....	40

Résumé.

Introduction :

Le tube digestif de l'homme peut être colonisé par diverses espèces de parasites appartenant à des classes différentes. Bien que certaines d'entre elles soient cosmopolites, leur prévalence varie d'une région à l'autre. Cette variation est due à différents facteurs notamment environnementaux, socio-économiques et/ ou ceux liés aux habitudes alimentaires. L'étude du portage parasitaire intestinal d'une population reflète son niveau d'hygiène alimentaire et fécale.

Matériel et méthodes :

C'est une étude rétrospective réalisée au laboratoire de parasitologie de l'hôpital militaire Moulay Ismail de Meknès sur une période de 30 mois entre janvier 2011 et juin 2013.

Nous avons inclus tous les prélèvements de selles reçus au laboratoire. Pour chaque prélèvement coprologique, nous avons réalisé un examen parasitologique des selles à l'état frais et après coloration au Lugol. Une concentration par technique de Baillenger a été réalisée pour 185 prélèvements.

Résultats :

Les prélèvements de 2220 cas ont été étudiés durant cette période. L'examen parasitologique des selles était positif dans 19.6% des cas (n=435). Un poly-parasitisme a été retrouvé chez 15.4% de cas (n=67). Nous avons recensé ainsi 481 parasites. Le germe le plus fréquemment retrouvé était *Blastocystis hominis* chez 28.5% des cas (n=137) suivi de *Dientamoeba fragilis* chez 16.4% des cas (n=79), *Entamoeba coli* a été retrouvé chez 16 % des cas (n=77), *Endolimax nana* chez 15.2% des cas (n=73), *Entamoeba histolytica/ dispar* chez 6.6% des cas (n=32) et

Giardia intestinalis chez 5.8% (n=28). Les œufs d'*Hymenolepis nana* ont été observés chez 0.4 % des cas (n=2), les œufs et les proglottis de *Teania saginata* ont été objectivés chez 0.4 % des cas (n=2), les larves de *Strongyloides stercoralis* chez 0.2 % des cas (n=1)

Pour les 185 prélèvements pour lesquels une concentration par la technique de Baillenger a été effectuée, la réalisation de cet enrichissement a fait apparaître des kystes d'*Entamoeba coli* chez trois cas (1.6%), ceux d'*Endolimax nana* chez 1 cas (0.5%), de *Pseudolimax butschlii* chez un cas (0.5%) et de *Chilomastix mesnili* chez un autre cas (0.5%). La réalisation de cette technique a fait disparaître *Blastocystis hominis* chez cinq cas (2.7%) et *Dientamoeba fragilis* chez un cas (0.5%).

Conclusion :

Le portage parasitaire intestinal dans notre laboratoire été représenté dans sa quasi-totalité par des protozoaires avec une rareté des helminthes.

I. Introduction :

La coprologie parasitaire est un examen de laboratoire qui permet la mise en évidence et l'identification de parasites qui vivent dans le tube digestif de l'homme ou ceux pour lesquelles les selles constituent le véhicule normal de leurs formes de dissémination dans le milieu extérieur. Il s'agit d'un outil important dans la démarche diagnostique mise en œuvre pour confirmer une parasitose intestinale suspectée sur des signes cliniques.

Un examen parasitologique des selles est un examen de routine qui comporte un examen direct à l'état frais, après coloration et après concentration par deux méthodes de routine (physique et physico-chimique). Le choix des techniques est orienté par les renseignements obtenus lors de l'interrogatoire du patient, l'examen clinique et les examens biologiques.

L'étude du portage parasitaire intestinale d'une population reflète son niveau d'hygiène alimentaire et fécale.

L'objectif de notre étude était de déterminer le profil épidémiologique des espèces parasitaires isolées lors des bilans coprologiques effectués au service de parasitologie de l'hôpital militaire Moulay Ismail de Meknès et d'en déduire le niveau d'hygiène oro-fécale.

II. Matériel et méthodes :

Il s'agit d'une étude rétro-prospective s'étalant sur une période 30 mois, rétrospective entre janvier 2011 et octobre 2012 et prospective entre novembre 2012 et juin 2013.

Nous avons inclus tous les prélèvements de selles reçus de malades hospitalisés et externes ainsi que ceux de cuisiniers issus de différentes unités militaires dans le cadre d'un dépistage systématique périodique.

Pour chaque prélèvement coprologique, nous avons réalisé un examen parasitologique des selles. Cet examen a comporté :

- Un examen macroscopique précisant :
 - l'aspect,
 - la couleur,
 - la consistance,
 - la présence de sang, de glaire ou de mucus
 - et la présence éventuelle d'éléments parasitaires (ver adulte, proglottis) objectivés à l'œil nu.
- Un examen microscopique à l'état frais entre lame et lamelle recherchant des kystes, des formes végétatives et leurs modes de mobilités puis un examen après coloration au Lugol pour mieux voir la chromatine des noyaux. Cet examen est réalisé à l'aide de microscope à objectif 10X puis objectif 40 X.
- Une concentration utilisant une méthode diphasique : technique de Baillenger, a été réalisée pour 185 prélèvements traités pendant la période prospective de l'étude.

III. Résultats :

Les prélèvements de 2220 patients ont été étudiés durant cette période : 2119 ont été reçus à titre externe et 101 correspondaient à des patients hospitalisés. L'examen parasitologique des selles était positif dans 19.6% des cas (435 cas). Un poly-parasitisme a été retrouvé chez 15.4% de patients (67 cas). Nous avons recensé ainsi 481 parasites. Le germe le plus fréquemment retrouvé était *Blastocystis hominis* chez 28.5% des cas (n=137) suivi de *Dientamoeba fragilis* chez 16.4% des cas (n=79), *Entamoeba coli* a été retrouvé chez 16 % des cas (n=77) et *Endolimax nana* chez 15.2% des cas (n=73). Les œufs d'*Hymenolepis nana* ont été observés chez 0.4 % des cas (n=2), les œufs et les proglottis de *Teania saginata* ont été objectivés également chez 0.4 % des cas (n=2) et les larves de *Strongyloïdes stercoralis* chez 0.2 % des cas (n=1).

Tableau II : Répartition des germes retrouvés.

Parasite	Nombre	Pourcentage (%)
<i>Blastocystis hominis</i>	137	28.5
<i>Dientamoeba fragilis</i>	79	16.4
<i>Entamoeba coli</i>	77	16
<i>Endolimax nana</i>	73	15.2
<i>Entamoeba histolytica/ dispar</i>	32	6.7
<i>Giardia intestinalis</i>	28	5.8
<i>Chilomastix mesnili</i>	21	4.4
<i>Pseudolimax butschilii</i>	21	4.4
<i>Trichomonas intestinalis</i>	03	0.6
<i>Entamoeba hartmani</i>	04	0.8
<i>Hemenolepis nana</i> (œufs)	02	0.4
<i>Taenia saginata</i> (œufs+ proglottis)	02	0.4
<i>Enteromonas hominis</i>	01	0.2
<i>Strongyloïdes stercoralis</i>	01	0.2

Pour les 185 prélèvements pour lesquels une concentration par la technique de Bailenger a été effectuée, les résultats étaient les suivants :

Dans 85.4 % des cas soit 158 prélèvements le résultat était le même avec et sans technique de concentration. Chez 119 cas le résultat était négatif et dans 39 cas il était positif.

Le nombre total de discordance était de 27 (14.6%). *Blastocystis hominis* était le plus concerné dans 74% des cas (n=20).

Tableau III : Résultats sans et avec enrichissement.

Résultat Sans enrichissement	Résultat après enrichissement	Nombre de cas
Négatif	Négatif	119
Positif	Positif (au même parasite)	39
Négatif	<i>Blastocystis hominis</i>	13
Négatif	<i>Chilomastix mesnili</i>	01
Négatif	<i>E. coli</i>	01
Négatif	<i>Endolimax nana</i>	01
<i>Blastocystis hominis</i>	Négatif	05
<i>Entamoeba hartmani</i>	<i>Entamoeba hartmani</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	02
<i>Blastocystis hominis</i>	<i>Blastocystis hominis</i> + <i>Entamoeba coli</i>	01
<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Giardia intestinalis</i> + <i>E. coli</i>	01
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> + <i>Pseudolimax butschilii</i>	01
<i>E. coli</i> + <i>Blastocystis hominis</i> + <i>D. fragilis</i>	<i>E. coli</i> + <i>Blastocystis hominis</i>	01

IV. Discussion

1. Examen parasitologique des selles : [1, 2, 3]

Il permet la mise en évidence des parasites sous leurs différentes formes : œufs, larves, kystes, formes végétatives, oocystes, spores, vers, anneaux. Il comprend de façon standard un examen macroscopique et microscopique direct à l'état frais et après concentration du prélèvement.

A. Orientation de l'EPS et précautions à prendre

Le diagnostic d'une parasitose est basé sur :

- Le diagnostic de présomption qui repose sur les signes cliniques, les résultats des examens para cliniques (radiologie) ou biologiques.
- Le diagnostic de certitude qui repose sur l'EPS.

B. Indications de l'EPS :

L'EPS est indiqué dans différentes situations cliniques, épidémiologiques et radiologiques :

Devant des signes cliniques évocateurs d'une parasitose, il convient de prescrire trois EPS à 2-3 jours d'intervalles.

- Diarrhée aigue persistante plus de 3 jours malgré un traitement symptomatique.
- Diarrhée persistante (2 semaines) ou chronique (> 4 semaines).
- En cas de diarrhée glairo-sanglante chez un malade ayant séjourné dans une région à risque, il convient de prescrire en EPS avec recherche de formes végétatives d'*Entamoeba histolytica*.

- Douleurs abdominales.
- Troubles digestifs divers (anorexie, boulimie, nausées, dyspepsie, ténesme, prurit anal)
- En présence d'un prurit anal, il convient de rechercher des œufs d'helminthes par EPS ou au mieux par Scotch test de Graham.

L'origine géographique du malade, ainsi qu'un éventuel voyage ou séjour dans un autre pays est une donnée fondamentale à noter (les dates et durées des séjours éventuels doivent être mentionnés, même s'il s'agit d'un séjour ancien (la longévité de certaines espèces de schistosomes atteint 20 ans), la notion de baignades éventuelles, mode de vie urbain ou rural, la présence d'animaux familiers, l'existence d'une pathologie identique dans la famille ou le voisinage, recherche de douleurs abdominales.

Critères biologiques de présomption :

- ✓ Hémogramme : anémie et/ou hyper éosinophilie qui évoquent certaines parasitoses.

En cas d'hyper éosinophile (> 500/mm), il faut évoquer une helminthiase en phase d'invasion ou une infection en phase d'état. Compléter le bilan, en fonction du contexte, par des sérologies parasitaires (ascaridiose, toxocarose, anisakiase, trichinose, bilharziose, distomatose).

- ✓ Vitesse de sédimentation : utile en cas d'abcès amibien ou de destruction tissulaire d'origines parasitaire.
- ✓ Bilans biochimiques divers : la destruction du tissu hépatique par migration de certaines larves de parasites ou blocage des voies

biliaires par un parasite adulte, peut se traduire biologiquement par des élévations de certaines enzymes.

Critères radiologiques de présomption: l'échographie et la scintigraphie apportent des informations précieuses pour les atteintes hépatiques. Pour le colon, la radiographie et la coloscopie peuvent objectiver des lésions amibiennes ou permettre de repérer certains vers.

Si l'EPS (au total 3) est négatif et si les symptômes persistent, il convient de demander alors des recherches spécifiques (cryptosporidies, microsporidies, *Cyclospora*, *Isospora belli*)

Chez un malade immunodéprimé, les recherches sont identiques aux situations précédentes :

- ✓ En cas de séropositivité pour le VIH et si la numération des CD4 est < 200/ μ l, il convient de demander une recherche de cryptosporidies et de microsporidies.
- ✓ En cas de traitement immunosuppresseur réalisé chez un sujet ayant voyagé dans des zones à risque, il convient de demander également une recherche de larves d'anguillules (méthode de Baermann).

C. Limites : L'EPS n'est pas contributif dans les situations suivantes :

- Lors de période dite muette c'est-à-dire absence d'élimination transitoire des éléments parasitaires vers le milieu extérieur.
- Lorsqu'il s'agit d'un parasite d'origine animale en impasse parasitaire chez l'homme ne pouvant pas atteindre le stade adulte (syndrome de *larva migrans*, anisakiase)
- Lorsque le parasite n'est pas éliminé par voie intestinale.
- Au cours de l'oxyurose où les œufs se trouvent volontiers au niveau de la marge anale.
- Parasite en phase de migration tissulaire.

D. Conduite d'un EPS :

a. Phase pré-analytique.

Etape cruciale pour la réalisation de l'EPS puisqu'elle conditionne la validité du résultat.

D'ailleurs un certain nombre d'examens coprologiques sont faussement négatifs parce que les malades n'ont pas été soumis à l'indispensable préparation ou que celle-ci a été insuffisante.

i. Modalités du prélèvement

Précautions avant l'émission des selles :

Ne pas ingérer dans les jours précédant l'EPS des aliments fournissant beaucoup de résidus (fruits, légumes) qui surchargent les préparations microscopiques.

Ne pas utiliser de médicaments à base de mucilage, de charbon, d'huile de vaseline.

Ne pas absorber de produits opaques en vue d'examens radiologiques.

Il faut éviter l'administration d'un purgatif qui diminue la concentration des parasites.

ii. Précautions lors du recueil

Accueil du consultant

L'accueil du malade et son interrogatoire devront être effectués discrètement. Il est nécessaire de tenir compte de la pudeur qui entoure la fonction de défécation quelle que soit la banalité que le coprologiste mette dans cet examen.

Pour un EPS classique 30 à 50 g de selles suffisent. Elles sont recueillies dans un récipient sec et stérile. L'idéal est de demander au patient de déféquer au laboratoire, ce qui n'est pas le plus souvent le cas. Dans ce cas, les selles ne doivent pas être conservées à température ambiante. En effet, cette température favorise la multiplication des bactéries qui gêne l'observation microscopique et provoque la lyse des formes végétatives des protozoaires. Il faut donc placer le flacon à +4°C pour la conservation des œufs et des kystes en sachant que les formes végétatives sont mal conservées. Une meilleure conservation des éléments parasitaires est obtenue en mélangeant les selles avec des conservateurs fixateurs tels que le formol à 5% ou la solution de MIF (Merthiolate-Iode-Formol).

b. Réalisation d'un examen parasitologique des selles

- i. Examen macroscopique : Il consiste à étudier les caractères organoleptiques : la couleur, la consistance (liquide en bouse, afécale, pâteuse, moulée,..), les éléments surajoutés (mucus, glaire, sang) et la présence d'éléments nutritionnels macroscopiquement visibles et non mastiqués ; il faut signaler que c'est dans le mucus que les formes hématophages d'amibes sont recherchées.

Il est recommandé d'observer la surface des selles pour rechercher la présence de parasites adultes tels que les femelles oxyures qui après fécondation migrent au niveau de la marge anale.

- ii. Examen microscopique :

C'est le temps essentiel de l'analyse. Il permet de dépister les œufs et les larves des helminthes, les kystes et les formes végétatives des amibes et de flagellés, les oocystes de coccidies et les spores de microsporidies. Les cristaux de Charcot-Leyden sont dus à la destruction des polynucléaires éosinophiles du tube digestif. Il n'existe pas de parallélisme entre eux et l'éosinophilie sanguine. Leur constatation doit inciter à rechercher une helminthiase, mais ils peuvent également se rencontrer au cours de protozooses (amibiases, isosporose).

- Examen direct

L'examen direct est indispensable pour détecter les formes végétatives des protozoaires qui sont fragiles. Il consiste à réaliser un examen direct à l'état frais et

un autre après coloration. Cet examen direct permet d'apporter un résultat dans l'heure qui suit la réception du prélèvement.

❖ L'examen direct à l'état frais

Il permet de voir la mobilité de certains parasites sans dilution sur des selles liquides ou glaireuses ou après dilution dans l'eau physiologique sur des selles moulées ou dures

- ❖ Examen direct après dilution dans l'eau de robinet, permet grâce à la présence de chlore dans cette eau de lyser rapidement *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis* et *Pseudolimax butshlii* et de laisser intacts les kystes d'amibes ou de flagellés pathogènes.

Déposer une petite goutte de sérum physiologique sur une lame.

- Ajouter une petite portion du spécimen (1-2 mg) et bien mélanger pour obtenir une suspension uniforme.
- Retirer les débris avec un bâton applicateur, s'il y a lieu.
- Déposer une lamelle 22 x 22 mm (no 1) sur la préparation et examiner le plus tôt possible.

La densité du matériel fécal doit être telle qu'on puisse lire sans difficulté des caractères d'imprimerie à travers la préparation. Si l'examen de la préparation doit être reporté, il est possible de sceller celle-ci à l'aide de vernis à ongles.

L'examen direct des selles liquides ou diarrhéiques devrait être fait en dedans de 30 minutes après l'émission de la selle; celui des selles molles ou pâteuses, moins d'une heure après l'émission. Sinon, le matériel devrait être fixé.

L'iode à 1 % peut être utilisé dans la préparation des frottis pour préciser les détails morphologiques des organismes [4].

Ces frottis peuvent également être préparés à partir des selles fixées.

Examen microscopique :

OBJECTIF 10X : - Examen systématique de la préparation pour dépister surtout les helminthes.

OBJECTIF 40X : - Identification plus précise des organismes retrouvés à l'objectif 10X.

❖ L'examen direct après coloration.

Il facilite le repérage et l'observation des éléments parasitaires.

Coloration par le lugol double : elle colore la chromatine des noyaux en couleur foncée.

Coloration par le MIF (Merthiolate Iode Formol): la plus utilisée, il s'agit de la méthode de Sapero et Lawiess 1951, méthode de fixation et de coloration en tube qui permet une bonne observation des structures nucléaires (chromatine, caryosome) nécessaires à l'identification des formes végétatives ou kystiques de nombreux protozoaires en particulier les amibes. En plus de la coloration des parasites, la réalisation du MIF permet une légère concentration des éléments parasitaires à la surface du culot. C'est la méthode de choix pour les formes végétatives de protozoaires, en particulier des amibes [1].

La fixation intervient rapidement et fige les amibes dans la position qu'elles ont à ce moment-là. Ceci permet d'apprécier la forme des pseudopodes

Leur noyau devient facilement observable (sauf pour *Dientamoeba fragilis* qui reste difficile à diagnostiquer par cette méthode). La membrane nucléaire de tous les autres protozoaires est colorée en brun- noir.

Les globules rouges intra et extra cytoplasmiques sont colorés en rouge vif.

Les phagocytes sont facilement reconnaissables grâce à la structure de leur(s) noyau(x).

Pour les kystes, qui peuvent prendre plusieurs heures avant d'être complètement colorés, la cytologie des noyaux se voit parfaitement, la membrane nucléaire devenant brun-noir à terme.

Les corps sidérophiles sont colorés en rouge vif.

Les coccidies (oocystes) se conservent bien dans ce milieu, bien que la coloration de leur contenu mette des semaines avant d'être complète.

Les œufs de tous les helminthes se conservent bien dans ce fixateur- colorant.

Les larves de nématodes sont aussi bien conservées par cette technique.

Dans le cas où le prélèvement de selles fraîches s'avère indispensable mais où le malade est loin du laboratoire, le prélèvement à domicile ou au lit du malade est possible en fournissant les deux flacons de colorant et le mode d'emploi de ceux-ci. Il faut juste respecter la proportion de selles (1 volume) par rapport au colorant (3 volumes) : il vaut mieux mettre trop peu de selles qu'un excès.

On peut aussi, à partir du matériel conservé par cette technique, pratiquer une concentration des éléments parasitaires par le MIF- concentrations.

Colorations spécifiques : lorsque le diagnostic est orienté, des colorations spécifiques sont réalisées. A titre d'exemple pour la recherche de cryptosporidies on effectue la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée ou bien la technique de Weber pour la recherche des microsporidies.

Technique de coloration de Ziehl-Neelsen modifié: elle est basée sur le caractère acido-résistant des cryptosporidies.

Réactifs :

- Fuschine phéniquée
- Vert de malachite à 5%
- Acide sulfurique à 2%

Technique :

- Fixation au méthanol à 5% pendant 5 minutes.
- Coloration à la fuschine phéniquée pendant 60 minutes
- Bain d'acide sulfurique à 2% pendant 20 secondes,
- Rinçage à l'eau de robinet pendant 2 minutes
- Contre coloration par le vert de malachite pendant 5 minutes
- Rinçage à l'eau de robinet pendant 1 minute
- Séchage à l'air libre.
- Lecture au grossissement x 1000

Cette coloration met en évidence les cryptosporidies en rouge foncé sur un fond vert.

Technique de Weber :

- Faire une suspension de selles fraîches (et vortexer),
- Filtrer à l'aide d'une porte filtre fixé sur un tube Falcon,
- Etaler 10 μ L sur une lame,
- Laisser sécher à l'air,
- Fixer le frottis dans du méthanol pendant 5 min,
- Colorer au trichrome modifié pendant 90 min
- Rincer 10 secondes avec de l'acide-alcool (4,5 ml d'acide acétique + 995,5 ml d'alcool à 90%)
- Rincer brièvement avec de l'alcool à 95%,
- Déshydrater le frottis successivement dans de l'alcool à 95% pendant 5 min puis dans de l'alcool absolu pendant 10min et dans du xylène pendant 10 min,
- Laisser sécher à l'air
- Lire pendant 10 min au microscope optique (grossissement x1000, objectif 100 à l'immersion). Cette coloration est utilisée pour mettre en évidence des spores de Microsporidies (coloration rose bipolaire sur fond bleu)

- Méthode de Kato et Miura

Cette technique est à la frontière entre examen direct et méthodes de concentration. Elle ne concentre pas les éléments parasitaires, mais permet, sur une seule lame d'observer le matériel qui aurait nécessité jusqu'à 15 lames par examen direct pour être correctement analysé. Cette technique est basée sur l'éclaircissement du matériel fécal par la glycérine ou le polyéthylène glycol. Donc on observe facilement les éléments parasitaires, restés opaques sur un fond transparent. Cette méthode éclaircit aussi tous les

kystes de tous les protozoaires et les rendent invisibles. Cela peut être compensé en associant cette technique à celle du MIF.

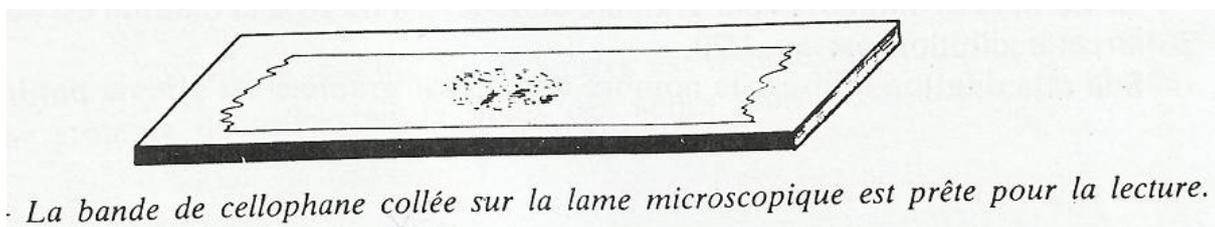
Technique :

Des rectangles de cellophane de 2 x 3 cm sont imprégnés pendant au moins 24 heures dans la solution :

- Glycérine pure 100 ml
- Eau distillée 100 ml
- Solution aqueuse de vert de malachite 1ml

Sur le plan technique, on étale 30 à 50 mg de selles en frottis épais sur la lame et on la recouvre par rectangle de cellophane. On la retourne sur un papier filtre et on la laisse reposer pendant 30 à 60 minutes à la température du laboratoire puis 10 à 15 minutes de 35 à 40°C, et on l'examine au microscope. (Figure 1) [2].

Figure 1 :



- Examen après concentration [1, 2, 3] :

La faible infestation de certains patients implique l'utilisation de techniques permettant la concentration des éléments parasitaires trop rares pour être décelés à l'examen direct. Ces méthodes ont des indications

différentes et la technique idéale qui concentrerait tous les parasites n'existe pas ; il convient donc d'utiliser obligatoirement deux types de techniques.

❖ Méthodes physiques.

Leur principe est basé sur la différence de densité entre les éléments parasitaires et les débris alimentaires. On distingue :

Concentration par sédimentation : elle utilise un liquide dont la densité est inférieure à celle des éléments parasitaires, elles sont actuellement abandonnées en raison de leur manque de fiabilité. Dans ces techniques, les éléments parasitaires des selles sont concentrés sous l'action de la pesanteur ou de centrifugations. On les retrouve donc dans le sédiment des solutions où les selles ont été diluées. On prélève le sédiment à la pipette et on l'examine après dépôt entre lame et lamelle après coloration au lugol.

Technique par sédimentation simple : technique artisanale peu efficace et grande consommatrice de temps, réservée à des laboratoires démunis de matériel.

Technique par sédimentation- centrifugation : technique plus rapide mais d'une efficacité inférieure à la moyenne.

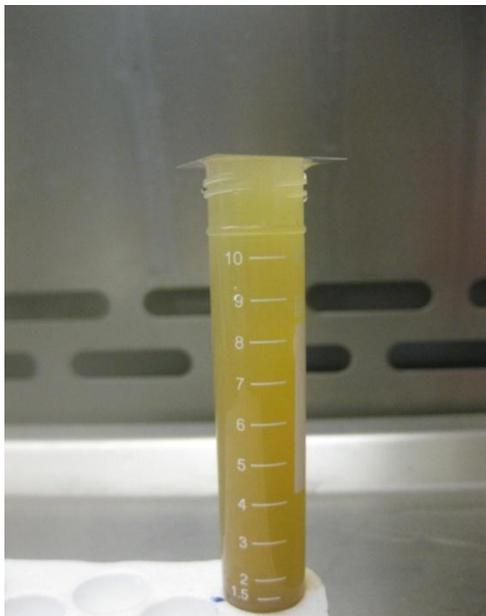
Concentration flottation (Figures 2, 3): basée sur l'emploi d'un liquide très dense qui provoque la flottation des éléments parasitaires à la surface. La difficulté de leur prélèvement est contournée par la possibilité que l'on a de remplir un tube avec plus de liquide qu'il ne peut contenir, provoquant ainsi la création d'un ménisque convexe en haut du tube. Le prélèvement des éléments parasitaires flottants est fait en touchant ce ménisque avec la face

inférieure d'une lamelle, qui est ensuite déposée sur une lame préparée avec une goutte de lugol double.

Figure 2 : méthode de flottaison première étape.



Figure 3 : méthode de flottaison (deuxième étape)



Par ailleurs, l'imprégnation des œufs et des kystes des parasites par les réactifs est susceptible de provoquer leur descente assez rapide donc Il

convient d'éviter d'effectuer des grandes séries de concentration de selles avec ces techniques.

Méthode de Faust 1939 modifiée par Thouvenot 1967 : utilise la solution de sulfate de zinc à 33%, l'eau de robinet chaude et le lugol double. Cette technique réussit la concentration de la plupart des parasites. Cependant l'eau de robinet détruit toutes les formes végétatives de protozoaires qui auraient pu subsister depuis la défécation. Les kystes de protozoaires se rétractent. A la longue l'identification peut devenir difficile par la rétraction des kystes de protozoaires comme dans la plupart des techniques de flottation, les temps de dilution des selles, de concentration et de prélèvement doivent être exécutés assez rapidement au risque de laisser descendre les œufs d'*Ascaris lumbricoides* non fécondés, de *Fasciola hepatica* imprégnés de liquide.

Méthode de Willis : cette technique utilise le Na Cl 30% comme solution, elle met en évidence les œufs d'*Ankylostomes* et ceux d'*Hymenolepis*.

Méthode de Janeckso Urbanyi 1931 : utilise une solution aqueuse d'iodo-mercurate de potassium, l'eau distillée et le lugol double. Cette technique convient très bien pour mettre en évidence un grand nombre d'œufs d'Helminthes difficile à découvrir comme les œufs de *Fasciola hepatica*, des schistosomes, des ankylostomidés, des *Hymenolepis* et les larves d'anguillules. L'identification des kystes des protozoaires devient pratiquement impossible vu la déformation qu'ils subissent réagissant a la densité du liquide. Sur le plan purement coprologique, cette technique échoue complètement en présence de selles de fermentation qui flottent sur ce

liquide. Tous ces inconvénients font que cette technique ne devrait plus être employée, surtout depuis l'apparition de techniques (comme celle de Kato), qui peuvent la remplacer avantageusement dans les cas de suspicion de distomatose, de bilharziose ou d'hyménolépiase.

❖ Méthodes physico-chimiques ou diphasiques.

Consistent à mettre les selles en présence de 2 phases non miscibles, une aqueuse et l'autre organique. En plus de son action dissolvante, la mise en jeu de 2 phases non miscibles, une hydrophile et l'autre lipophile réalise pour chaque élément fécal un coefficient de partage dont la valeur dépend de sa balance hydrophile-lipophile et conditionne sa position dans les phases obtenues après émulsion. Ce sont des techniques simples et rapides.

Ces méthodes utilisent les propriétés de l'éther (ou de l'acétate d'éthyle), qui d'une part, est un solvant des graisses et d'autre part n'est pas miscible avec l'eau, pour séparer les éléments parasitaires du reste de la selle. Le solvant employé pour diluer les fèces joue aussi un rôle non négligeable.

Méthode de Telemann- Rivas 1928 : utilise l'action de l'acide acétique et de l'éther. Cette technique concentre bien les embryophores de cestodes, les œufs de douves, de trichocéphales, d'ankylostomes, les larves d'anguillules et les kystes de *Giardia* et d'amibes.

Méthode de Bailanger 1963 : utilise un tampon acéto-acétique pH 5, éther sulfurique et le lugol simple. C'est une bonne technique qui permet de concentrer la majorité des éléments parasitaires sans déformation des kystes de protozoaires. Ici, il convient d'examiner la totalité du culot de sédimentation qui peut être volumineux et nécessiter la préparation de plusieurs lames. (Figures 4, 5, 6, 7, 8).

Figure 4 : mélange de 3g de selles avec le tampon acèto-acétique.



Figure 5 : tamiser dans un tube à centrifuger et à fond conique



Figure 6: ajouter un volume égal d'éther sulfurique, mélanger et dégazer.



Figure 7 : centrifuger. Le contenu du tube se sépare en 4 couches.

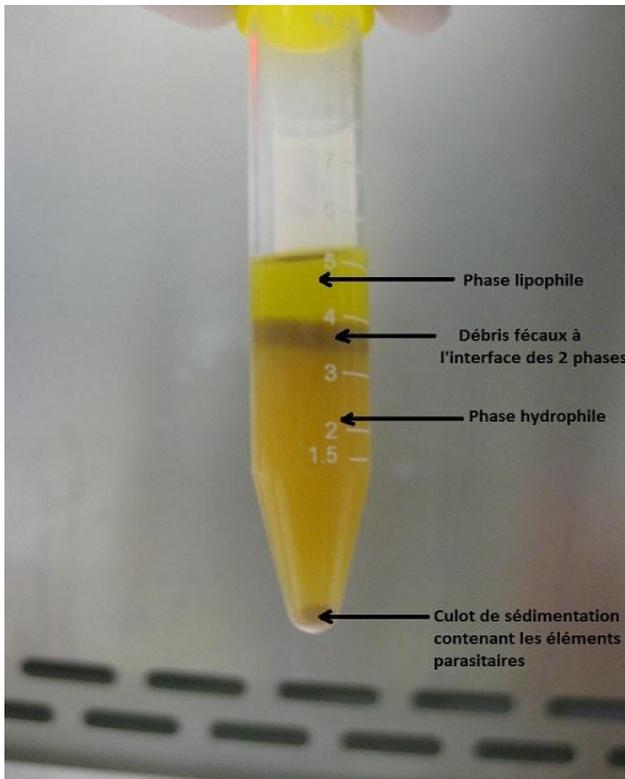
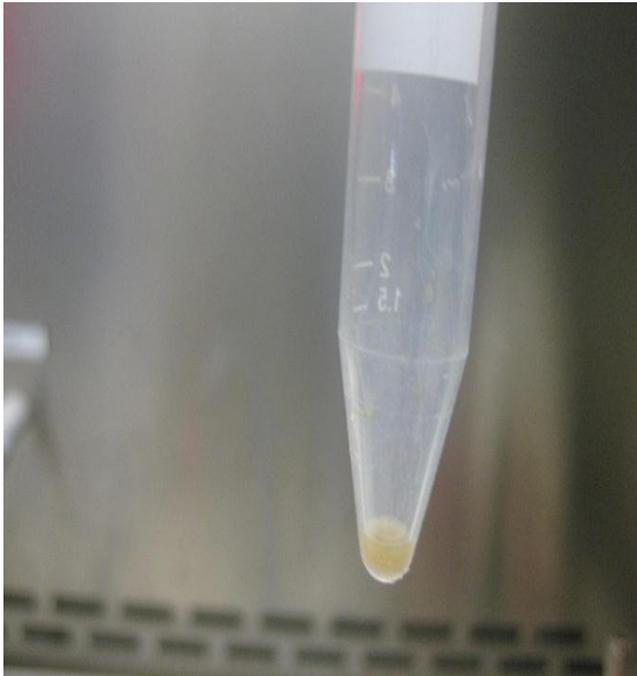


Figure 8 : désobturer le tube et le retourner d'un coup sec. Ne garder que le culot qu'on prélève a la pipette et confectionner entre lame et lamelle.



Méthode de Ritchie 1948 : utilise le formol et l'éther. Très efficace pour les œufs d'*Ascaris*, y compris les œufs non fécondés, les œufs de schistosomes et les kystes de toutes les amibes.

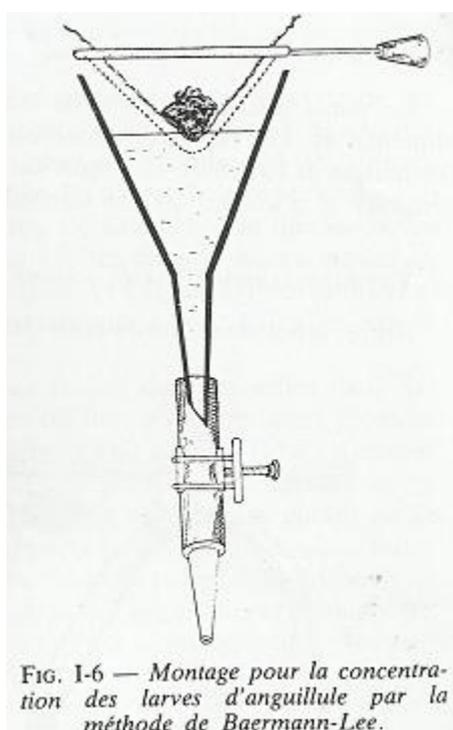
Méthode de concentration au MIF (Blagg et Schloegel 1955) ou MIF-C : Utilise la solution de Merthiolate Iode Formol, le lugol 5% et l'éther sulfurique. Cette technique associe la concentration à l'éther aux pouvoirs fixateurs du MIF. C'est la meilleure technique diphasique actuellement disponible. Elle donne souvent un important culot, long à examiner en entier. Il est possible de laisser décanter la dilution des selles un moment avant de la verser dans le tube à centrifuger en laissant le culot dans le récipient ayant servi à la dilution, sans modification notable des résultats. La concentration est très efficace pour les œufs de tous les schistosomes, d'*Ascaris* (fécondés ou non), d'*Hymenolepis* et les kystes de protozoaires directement colorés et facilement identifiables. Quant aux formes végétatives de protozoaires, les avis sont

partagés, en particulier pour l'identification des amibes. Les mêmes restrictions que celles données pour le MIF simple se retrouvent dans cette technique.

Il existe d'autres méthodes spéciales qui ne sont que rarement indiquées en fonction des renseignements cliniques et biologiques fournis par le praticien, tels que : Méthode de Baermann, Technique de Stoll.

Technique de Baermann (Figure 9): consiste à placer les selles sur plusieurs épaisseurs de gaze dont on forme ensuite un nouet. Suspendre dans un verre à pied contenant quelques millilitres d'eau à 45°C de façon à ce que la surface de cette eau vienne en contact avec les selles. Examiner le sédiment au bout de 1 à 2 heures.

Figure 9 : technique de Baermann [2]



❖ Méthodes combinées :

Les méthodes combinées, comme cette appellation le dit, associent deux des principes utilisés ci-dessous, la flottation dans un premier temps, la sédimentation dans un second. Mais le travail devient long et consomme beaucoup plus de matériel, pour des avantages pas toujours évidents.

Méthode de Junod 1972 :

Réactifs :

-Eau physiologique a 0.8%

-Solution acéto-acétique formolée

-Solution de Iodo-mercurate de potassium.

C'est une technique polluante, compliquée, consommant beaucoup de matériel et de temps et nécessitent une évacuation onéreuse et compliquée des déchets. Cette technique est destinée à la mise en évidence des formes végétatives d'amibes et des flagellés et leurs kystes. Sur le plan purement coprologique, cette technique échoue complètement en présence de selles de fermentation qui flottent sur ce liquide. Tous ces inconvénients font que cette technique ne devrait plus être employée, surtout depuis l'apparition de techniques (comme celle de Kato), qui peuvent la remplacer avantageusement dans les cas de suspicion de distomatose, de bilharziose ou d'hyménolépiase.

2. Comparaison de nos résultats avec la littérature.

Le choix de la technique de concentration à utiliser dépend du (ou des) parasite(s) suspecté(s). Dans notre contexte les parasites observés dans les selles étaient quasi totalement des protozoaires (99% dans notre série). En effet la technique de Bailenger et de concentration au MIF nous ont parues plus convenables.

Sur les 2220 échantillons analysés, 19.6% étaient positifs (435 cas). Le taux de positivité varie dans la littérature selon les régions et la population d'étude. Une étude faite dans la région de Sousse en Tunisie s'étalant sur 23 ans a objectivé un taux de positivité de 29.7% des prélèvements reçus au laboratoire [5]. En Turquie, l'étude faite par Dagci H et al dans la région d'Izmir a trouvé une prévalence de 25.6% [6] et celle faite par Düzyol et al dans le laboratoire de parasitologie du CHU de Celal Bayar en Turquie a détecté un taux de 13.12% de prélèvements positifs [7]. En Mauritanie, l'étude faite par Ould Ahmed Salem Cheikh Baba et al sur des écoliers de 6 à 15 ans dans les wilayas du Gorgol, Guidimagha et Brakna situées au Sud et Sud-est de la Mauritanie a fait sortir un chiffre de 33.4% d'enfants parasités [8]. Au Thaïlande, une étude faite sur les écoliers de trois écoles a fait sortir une moyenne de 13.9% [9]. Au Soudan, cette prévalence a été trouvée très élevée dans des écoles primaires de l'ordre de 90.4% [10].

La consommation de légumes et fruits crus non lavés constituait un facteur de risque comme a été démontré par deux études réalisées en Egypte et en Iran, qui ont mis en évidence des parasites pathogènes sur des légumes vendus sur les marchés [11, 12].

L'usage des eaux usées dans l'agriculture était aussi un facteur favorisant le portage parasitaire chez la population. Deux études faites dans la région de

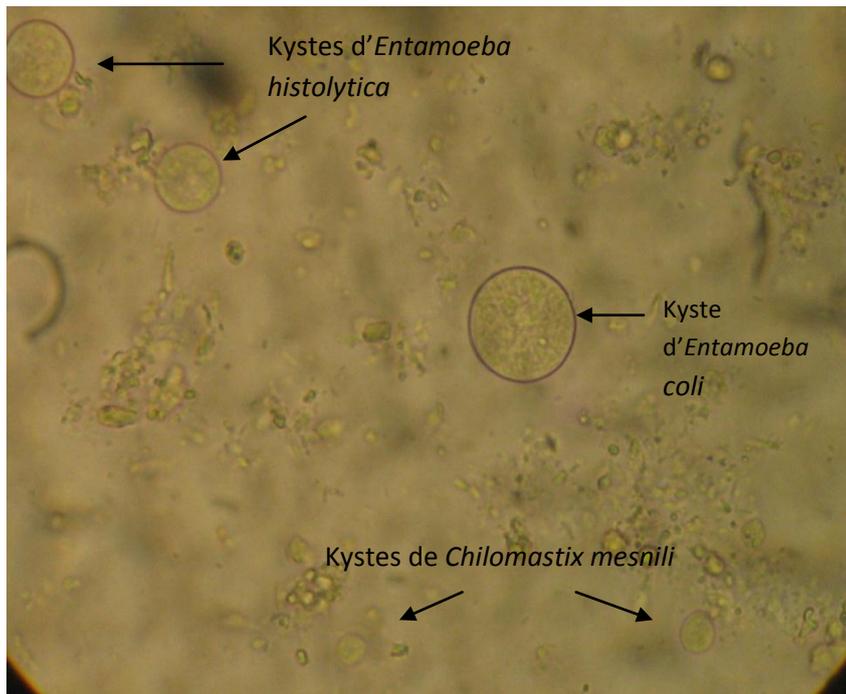
Settat au Maroc ont montré que la prévalence du portage parasitaire (protozoaire et helminthes) était significativement plus élevée chez la population exposée à l'utilisation des eaux usées non traitées dans l'agriculture (66.4 % versus 31.9 %) [13, 14]

Une étude menée en Bangladesh a comparé le portage parasitaire chez des enfants de 1 à 6 ans et qui vivaient soit en milieu rural ou milieu urbain, et a trouvée que ce portage était plus important chez les enfants du milieu rural tandis qu'il était presque nul chez les enfants du milieu urbain. Les auteurs ont expliqué cette différence de prévalence par un manque d'assainissement, le faible niveau de vie, du revenu, de l'éducation des parents et le sevrage précoce [15].

Dans la région de Jenin en Palestine, l'étude de la prévalence des parasitoses intestinales faite sur 10 ans a trouvé des chiffres entre 32 et 41.5% des cas [16].

Dans notre série, le poly-parasitisme a été retrouvé chez 15.4% de patients, (Figure 10) tandis que dans l'étude de Düzyol et al en Turquie, on a mis en évidence plus qu'un parasite dans seulement 6.76% des cas positifs [7].

Figure 10 : image au microscope optique (x 40) d'un poly parasitisme (3 types de kystes).



Parmi les 481 parasites observés dans notre laboratoire, le germe le plus fréquemment retrouvé était *Blastocystis hominis* chez 28.5% des cas. Dans la série de Düzyol D et al ce même germe était le plus prédominant mais avec une prévalence de seulement 7.64 % des cas [7]. C'était pareil pour l'étude de Trabelsi S. faite à l'Hôpital Charles Nicolle de Tunis pour laquelle ce protozoaire représentait 7.27% [17]. En Turquie dans la région d'Izmir, Dagci H et al ont rapporté une prévalence de% [6]. Pour Cekin AH et al, *Blastocystis spp.* était plus fréquent chez les patients atteints de maladie inflammatoire de l'intestin surtout la colite ulcéreuse [18]. Par contre dans l'étude faite par A Yaacoub et al dans la région de Sousse en Tunisie, le *Blastocystis hominis* était isolé en troisième position après *Giardia intestinalis* et *Dientamoeba fragilis* avec une prévalence de 19,27% [5].

Dans l'étude menée en Thaïlande chez des écoliers, on avait observé surtout *Endolimax nana* (7.9%), *Giardia intestinalis* (3%) suivis de *Blastocystis hominis* (1.5 %) [9].

A comparer le *Blastocystis* avec toutes les amibes isolées, on a trouvé que ces dernières étaient majoritaires avec 42.9% des cas toutes amibes confondues, puis vient *Dientamoeba fragilis* dans 16.4% des cas, et *Giardia intestinalis* dans 5.8% des cas. Ces résultats sont comparables avec celles de El Guamri Y et al où (Maroc) qui ont mis en évidence les amibes chez 46.5% des cas suivis de *Blastocystis hominis* dans 28.7% et *Giardia* dans 14% des cas [19].

Blastocystis est un protozoaire unicellulaire, c'est l'un des parasites les plus communément trouvés dans le tractus intestinal humain et animal. Il a été décrit pour la première fois dans la littérature médicale en 1911 par Alexeieff et a été considéré comme une levure inoffensive à ce moment. Toutefois, les études au microscope électronique 50 ans plus tard a conduit Zierdt en 1967 à reclasser *Blastocystis hominis* dans les protozoaires. On le trouve surtout dans les régions tropicales et moins dans les régions tempérées [20, 21]. Sa transmission est oro-fécale. On l'a incriminé dans des manifestations digestives chez des voyageurs revenant de région tropicale et pays sous développés [21].

La pathogénie de *Blastocystis hominis* reste incertaine. Il y a une controverse si le parasite est commensal ou pathogène. Certains manuels décrivent qu'il peut être responsable de maladie intestinale s'il est en grande quantité [20], en effet en Turquie on l'a incriminé chez deux enfants de 11 et 12 ans qui étaient admis aux urgences pédiatriques dans un tableau d'abdomen

chirurgical chez qui on avait isolé *Blastocystis hominis* dans l'EPS et dont le traitement adéquat (métronidazole et co-trimoxazole) a résolu le problème sans avoir recours à la laparotomie exploratrice [22]. Un cas rapporté d'un adulte de 52 ans a mis le point sur l'éventuelle gravité du rôle pathogène de ce germe, ce patient a présenté une appendicite aigue et dont l'étude anatomopathologique a mis en évidence le *Blastocystis hominis* qui été infiltré dans la sous muqueuse de l'appendice [20].

Parmi les 4 génotypes identifiés de *Blastocystis hominis*, le génotype I est le plus pathogène cliniquement et statistiquement chez les patients souffrant du syndrome du colon irritable [23].

La technique d'enrichissement de Bailenger est une technique diphasique, physico-chimique. C'est une bonne technique qui permet de concentrer la majorité des éléments parasitaires, sans déformation des kystes parasitaires. Dans notre contexte, vue la fréquence plus élevée des protozoaires, cette technique nous serait bien convenable [1]. Les résultats des concentrations dans notre série ont fait apparaitre des parasites non pathogènes dans 6 cas et *Blastocystis hominis* dans 13 cas, ce même germe a disparu après la concentration dans 5 cas plus un cas de *Dientamoeba fragilis*. En effet la recherche de *Blastocystis hominis* serait préférable sans méthode de concentration, ca aurait un rapport avec la structure du parasite et en particulier l'absence de paroi cellulaire [21].

Les helminthes dans notre étude étaient rarement isolés (1.2%). Ce résultat était relativement proche de l'étude de S El Kettani et al (Maroc) qui n'ont isolé aucun helminthe dans la population non utilisant des eaux usées dans l'agriculture et 4.7% chez la population utilisant ces eaux. Le taux de

prévalence des protozoaires était de l'ordre de 31 % contre 2 % pour les helminthes dans l'étude faite en Mauritanie chez des enfants scolarisés [8].

L'étude faite en Thaïlande par Kitvatanachai et al a objectivé la présence d'helminthes chez seulement 0.5% des cas examinés (un patient) tandis que les protozoaires représentaient 10.4% des cas [9].

Cependant, dans d'autres études, faites surtout en Afrique subsaharienne ont révélé plus de portage intestinal d'helminthes, notamment celle faite au Soudan sur des écoliers par pour qui les helminthes représentaient 77% des parasites observés. *Giardia intestinalis* et *Entamoeba histolytica* représentaient respectivement 33.1% et 19.7% [10].

Dans l'étude de AKM Mamunur Rashid et al au Bangladesh, 33% des enfants qui vivaient en milieu rural avaient des helminthes dans les selles contre seulement 4% de protozoaires représentés par *Entamoeba histolytica* [15].

Dans certains pays où les helminthes sont largement présents chez la population en comparaison aux protozoaires, les études s'intéressent surtout à la recherche de ces vers. En effet une étude faite en Inde chez des enfants de 5 à 10 ans, les helminthes étaient présents chez 34.56% des enfants avec un poly parasitisme de deux ou trois helminthes chez 3.75% des enfants examinés [24].

V. Conclusion :

Le portage parasitaire intestinal était modéré dans notre série. Le niveau d'hygiène oro fécal serait moyen dans notre population, il reste beaucoup à faire pour améliorer d'avantage ce niveau.

Il était quasi totalement représenté par les protozoaires notamment le *Blastocystis hominis*, les amibes non pathogènes et *Dientamoeba fragilis*. La technique de Bailenger ou de concentration au MIF nous ont parues plus adaptées à notre contexte.

Référence:

- 1- T. Kien, B. Molet. Techniques coprologiques standards en parasitologie. EMC encyclopédie médico-biologique 90-60-0345
- 2- Golvan y.j, Ambroise- Thomas P. les nouvelles techniques en parasitologie. Flammarion médecine sciences.Paris 2003.
- 3- JEAN-JACQUES ROUSSET. COPRO-PARASITOLOGIE PRATIQUE. ESTEM Paris 1993.
- 4- Karine Thivierge. Méthodes de laboratoire en parasitologie intestinale. Institut national de sante publique.
- 5- A Yaacoub, F Saghrouni, J Ben Abdejelil, S Gheith, S Hamrouni, A Fathallah. Evolution du parasitisme digestif dans la région de Sousse sur une période de 23 ans (1987-2009). Arcbs. Inst. Pasteur Tunis, 2010. Page 78.
- 6- Dagci H, Kurt O, Demirel M, Ostan I, Azizi NR, Mandiracioglu A, Yurdağül C, Tanyüksel M, Eroglu E, Ak M.The prevalence of intestinal parasites in the province of Izmir, Turkey. Parasitol Res. 2008 Sep;103(4):839-45. doi: 10.1007/s00436-008-1065-6. Epub 2008 Jul 8
- 7- Düzyol D, Kilimcioğlu AA, Ozyurt BC, Ozkan H, Girginkardeşler N. Incidence of intestinal parasites detected in the Department of Parasitology in Celal Bayar University Hospital between 2006 and 2010. Turkiye Parazitoloj Derg. 2012;36(3):147-51. doi: 10.5152/tpd.2012.35.
- 8- Ould Ahmed Salem Cheikh Babaa, Bent Mohamed Aminetou, Ousmane Ba, Koita Mouhamedou, Dem Elhdj, Hamidou Sambah, Mohamed Ould Abdallahi, Baidy Lo. Prévalence des parasitoses intestinales chez les écoliers dans les Wilayas du Gorgol, Guidimagha et Brakna (Mauritanie). REVUEFRANCOPHONE DESLABORATOIRES- MARS2012 - N°440

- 9- Sirima Kitvatanachai, Pochong Rhongbutsri. Intestinal parasitic infections in suburban government schools, Lak Hok subdistrict, Muang Pathum Thani, Thailand. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (2013)699-702
- 10-Abdel-aziz M. Ahmed Azam A Afifi Elfatih M Malik Ishag Adam. Intestinal protozoa and intestinal helminthic infections among schoolchildren in Central Sudan. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (2010)292-293.
- 11-Doaa El Said Said. Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. *Alexandria Journal of Medicine* (2012)48, 345–352.
- 12-A. Daryani, G.H. Ettehad, M. Sharif, L. Ghorbani, H. Ziaei. Prevalence of intestinal parasites in vegetables consumed in Ardabil, Iran. *Food Control* 19 (2008) 790-794.
- 13-El Kettani S, Azzouzi E, Boukachabine K, El Yamani M, Maata A, Rajaoui M. Intestinal parasitosis and use of untreated wastewater for agriculture in Settat, Morocco. *East Mediterr Health J.* 2008 Nov-Dec;14(6):1435-44.
- 14- El Kettani S, Azzouzi El M. prevalence of helminthes in a rural population using wastewater for agricultural purposes at Settat (Morocco). *Sante* 2006 Oct-Dec; 16(4): 245-51.
- 15-AKM Mamunur Rashid, AKM Saifur Rashid, Abdur Rahman. Prevalence of intestinal parasitoses in urban and rural children of a developing country. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (2011)S268-S270
- 16-Sami Bdir, Ghaleb Adwan. Prevalence of intestinal parasitic infections in Jenin Governorate, Palestine: a 10-year retrospective study. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (2010)745-747
- 17-Sonia Trabelsi, Ichraf Ben Haj Ali, Samira Khaled. Caractéristiques épidémiologique et cliniques de *Blastocystis hominis*. *LA TUNISIE MEDICALE* - 2010 ; Vol 88 (n°03).

- 18-Ayhan Hilmi Cekin, Yesim Cekin, Yesim Adakan, Ezel Tasdemir, Fatma Gulsun Koclar and Basak Oguz Yolcular. Blastocystosis in patients with gastrointestinal symptoms: a case–control study. *BMC Gastroenterology* 2012, 12:122.
- 19-El Guamri Y, Belghyti D, Barkia A, Tiabi M, Aujjar N, Achicha A, El Kharrim K, Elfellaki L. Parasitic infection of the digestive tract in children in a regional hospital center in Gharb (Kenitra, Morocco): some epidemiological features. *East Afr J Public Health*. 2011 Dec;8(4):250-7
- 20-Poppy M Lintong, Maria Kr Sambuaga, Eddy H Tambajong. Acute suppurative appendicitis with *Blastocystis hominis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* (2012)S965-S968
- 21-Muhammad R. Sohail, Philip R. Fischer. *Blastocystis hominis* and travelers. *Travel Medicine and Infectious Disease* (2005)3, 33–38
- 22-Nesibe Andiran, Ziya Cibali Acikgoz, Sadi Turkay, Fatih Andiran. *Blastocystis hominis*—an emerging and imitating cause of acute abdomen in children. *Journal of Pediatric Surgery* (2006)41, 1489–1491
- 23-Shawky A. Fouad, Maha M.A. Basyoni, Reham A. Fahmy, Mohamed H. Kobaisi. The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Arab Journal of Gastroenterology* 12 (2011) 194–20
- 24-Latha Ragunathan, Senthil Kumar Kalivaradhan, Sasikala Ramadass, Muruganandam Nagaraj, Karthikeyan Ramesh. Helminthic Infections in School Children in Puducherry, South India. *J Microbiol Immunol Infect* 2010; 43 (3):228–232