

Travaux Pratiques



Institut des Sciences exactes et des sciences de la nature et de la Vie

Département de Biologie

Licence L3 Microbiologie- Semestre 5

T.P. N°01

Matière: Parasitologie

Titre : Techniques d'étude en parasitologie

Objectif : Déterminer les différentes techniques de concentration et colorations.

Introduction : Le parasite est un être vivant, animal ou champignon (règne des Fungi), qui, pendant une partie ou la totalité de son existence, vit aux dépens d'autres êtres organisés (hôtes). l'organisme parasite vit aux dépens d'un hôte qui lui fournit un biotope nécessaire à sa survie.

On distingue 4 grands groupes :

1-LES PROTOZOAIRES (Unicellulaires)

- ☉ LES RHIZOPODES :Entamoeba,Endolimax, Pseudolimax, Dientamoeba
- ☉ LES FLAGELLES : Chilomastix ,Giardia,Trichomonas ,Dientamoeba, Enteromonas
- ☉ LES CILIES : Balantidium
- ☉ LES APICOMPLEXA :Cryptosporidium, Isospora, Cyclospora, Sarcocystis
- ☉ LES MICROSPORIDIES : Enterocytozoon, Encephalitozoon
- ☉ SANS CLASSIFICATION : Blastocystis

2- Les METAZOAIRES- Pluricellulaires HELMINTHES ou (Vers):

- ☉ LES NEMATODES (Embranchement Némathelminthes) :
 - ENTEROBIUS VERMICULARIS –Oxyure.
 - TRICHURIS TRICHURA –Trichocéphale.
 - ASCARIS LUMBRICOIDES.
 - STRONGYLOIDES STERCORALIS. Anguillule.
 - ANKYLOSTOMA DUODENALE et NECATOR AMERICANUS. Ankylostomes.
 - TRICHINELLA SPIRALIS –Trichine.
 - TOXOCARA CANISE et SYNDROME DE LARVA MIGRANS VISCERALE
 - LES FILAIRES EXOTIQUES.
- ☉ LES CESTODES : Plathelminthes segmenté
 - TAENIA SAGINATA.
 - TAENIA SOLIUM et CYSTICERCUS CELLULOSAE.
 - DIPHYLLOBOTHRIUM LATUM – Bothriocéphale.
 - ECHINOCOCCUS GRANULOSUS.
 - ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS .
- ☉ LES TREMATODES : Plathelminthes non segmenté
 - FASCIOLA HEPATICA –Grande Douve du Foie
 - SCHISTOSOMA ou Bilharzies

3-Arthropodes : Classe Insectes

- Anoploures (Pediculus corporis et Pediculus capitis
- Hémiptères (Cimex lectularius,Triatoma megista et Rhodnius prolixus
- Siphonaptères (Pulex irritans et Xenopsylla cheopsis)
- Diptères : Anophèles, Phlebotomus et Glossina palpalis

4-Fungi ou micromycètes : ce sont des champignons , identifiés sous forme de spores isolées ou regroupées, ou de filaments libres ou tissulaires.

1. Examens directs

La recherche de parasites à l'état frais sera fonction de la nature du prélèvement. Il s'applique à un grand nombre de parasites, sous diverses formes : formes végétatives et kystes de protozoaires, larves et oeufs d'helminthes dans les selles ; oeufs de schistosomes dans les urines, les sécrétions vaginales ou la salive ; formes végétatives de *Trichomonas*, oeufs de *Paragonimus*, larves d'anguillules, scolex ou crochets d'*Echinococcus* sur des prélèvements respiratoires (expectoration, aspiration bronchique et lavage bronchiolo-alvéolaire [LBA]), *Giardia*, cryptosporidies, autres coccidies ou amibes dans les biopsies digestives (duodénales et coliques) ; oeufs de schistosomes dans les biopsies rectales et vésicales, etc. Cet examen direct pourra être complété par la mise en oeuvre de colorations spécifiques, « Techniques de coloration »).

2. Techniques de concentration des selles

2.1. Techniques physiques de sédimentation ou de flottation

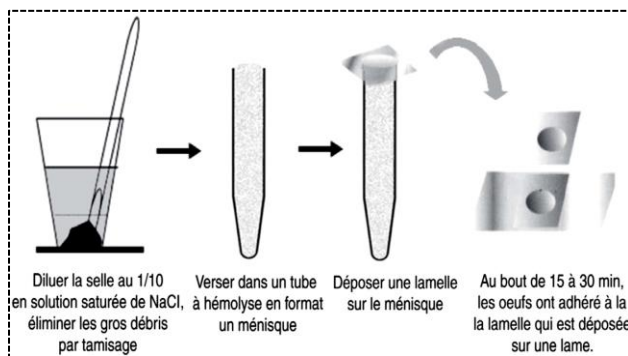


Figure 2. Technique de Willis.

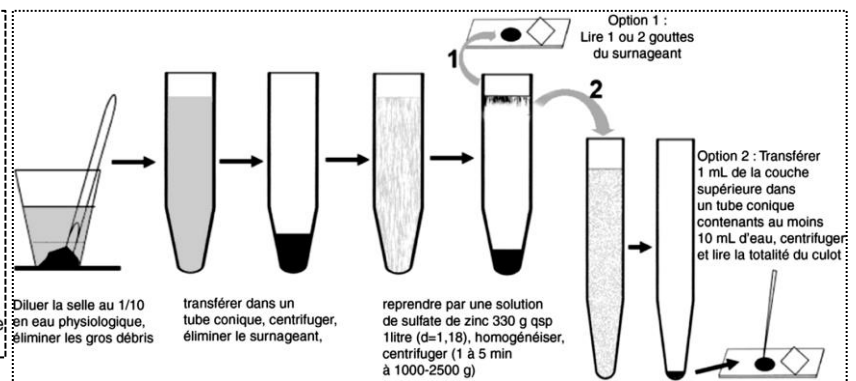


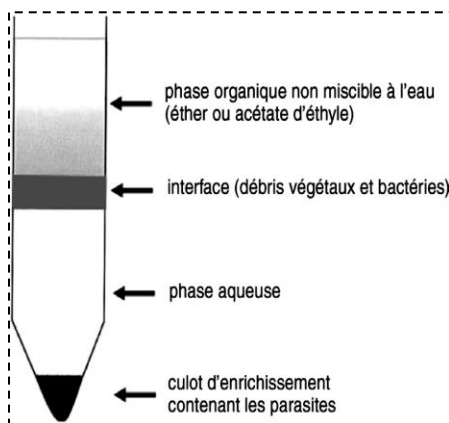
Figure 3. Technique de flottation en sulfate de zinc.

2.2. Techniques physico-chimiques ou diphasiques

La concentration des éléments parasitaires est obtenue en combinant la sédimentation accélérée par centrifugation et l'élimination des résidus par l'action dissolvante de certains réactifs chimiques comme l'utilisation d'une émulsion aqueuse avec éther ou acétate d'éthyle, permettant ainsi d'éliminer les débris gênants la lecture et de réduire notablement les culots.

L'échantillon fécal dilué dans une solution aqueuse après élimination des gros débris est transféré dans un tube conique ; la phase organique est ajoutée (1/3 à 1/2 du volume final). L'ensemble est agité de façon à obtenir une émulsion homogène.

Après centrifugation (différentes combinaisons de 1 à 3 minutes et de 200 à 500 g selon les techniques), on obtient 4 couches. On se débarrasse des couches sus-jacentes après avoir pris soin de décoller le gâteau solide à l'aide d'une pipette de transfert et, après avoir essuyé les parois, on prélève le culot alors très réduit qui doit être examiné en totalité. Le culot doit être dilué au tiers pour avoir une préparation lisible.



Technique de Ritchie modifiée

- Phase aqueuse : eau physiologique formolée à 10 % – phase organique : éther.
- Culots importants. Concentre les oeufs et les kystes de protozoaires.

Technique de Bailenger [11]

- Phase aqueuse : tampon acéto-acétique à pH 5
 - Acétate de sodium 15 g
 - Acide acétique 3,60 mL
 - Eau distillée q.s.p. 1000 mL. Ajuster à pH 5
- Phase organique : éther

Avantage : petits culots, concentre bien les protozoaires et acceptable pour les oeufs et larves. Cette technique donne des facteurs de concentration de l'ordre de 10 à 20 fois selon les parasites.

Technique du MIF concentration [12,13]

- Phase aqueuse : MIF
- Phase organique : éther
- Composition du MF : solution mère de MF

- Teinture de mertholiate à 1 p. 1000

- 200 mL
- Formol 36–41 % 25 mL
- Glycérine 5 mL
- Eau 250 mL

On peut y ajouter extemporanément une solution iodo-iodurée composée d'iode 0,5 g ; iodure de K 1 g et eau distillée 10 mL.

Culots plus importants qu'avec la technique de Bailenger. Concentre bien les oeufs et larves, particulièrement les oeufs de schistosomes. Donne des facteurs de concentration généralement plus faibles que la technique de Bailenger (de l'ordre de 5 à 10 fois selon les parasites).

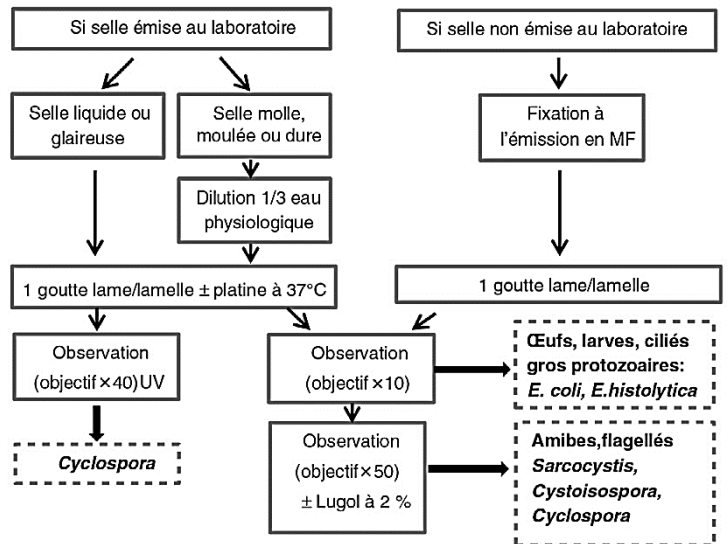


Figure 1. Conduite à tenir devant une selle (examen direct).

3. Techniques de coloration

3.1. Colorations des parasites sanguicoles et tissulaires

Giemsa La technique de Giemsa est la méthode de coloration la plus utilisée en parasitologie, notamment dans le domaine des protozoaires sanguicoles et tissulaires. Les parasites identifiables avec cette coloration sont : *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Babesia* spp., *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Trichomonas* spp., microfilaires, *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp.

Coloration au Giemsa de frottis sanguins (donnée à titre d'exemple)

Solution aqueuse de Giemsa à	3 % (Giemsa lent : L)	10 % (Giemsa rapide : R)
Solution de Giemsa (L/R) :	0,3 mL (L)	1 mL (R)
Eau tamponnée :	10 mL	10 mL
Réalisation d'eau tamponnée* :	Na ₂ HPO ₄ anhydre :	1 g
	KH ₂ PO ₄	0,7 g
	Eau distillée	1000 mL
	Ajuster à pH 7,2 en ajoutant du Na ₂ HPO ₄ ou du KH ₂ PO ₄	

Modalités techniques

- Sur lame dégraissée, tirer un frottis mince du sang à examiner prélevé sur tube EDTA ou ACD (*acid-citrate-dextrose*).
- Fixer au méthanol.
- Recouvrir les lames de la solution de Giemsa R à 10 % pendant 10 minutes ou de la solution de Giemsa L à 3 % pendant 20 minutes.
- Rincer longuement à l'eau du robinet.
- Laisser sécher.

Interprétation

Le cytoplasme des parasites est basophile et apparaît en bleu ; les masses nucléaires sont colorées en rouge rubis ou grenat ; les vacuoles sont incolores, apparaissant comme un vide dans le cytoplasme bleu. Pour les *Plasmodium* spp., les granulations de Maurer sont rouge brique et les granulations de Schüffner sont colorées en orangé ou rose.

3.2. Coloration des protozoaires intestinaux

3.2.1. Coloration des amibes et des flagellés : « Coloration en tube : MIF coloration »

Préparation du MIF selon la technique de Sapero Lawless et Strome (donnée à titre d'exemple)

Préparation du colorant

Teinture de merthiolate (solution mère)

- Merthiolate 0,10 g
- Éosine 0,2 g
- Alcool absolu 52,5 mL
- Acétone 10 mL
- Monoéthanolamine 0,1 g
- Eau distillée q.s.p. 100 mL

Ce réactif doit être conservé à l'abri de la lumière.

Réactif de Sapero et Lawless

- Teinture mère de merthiolate 200 mL
- Formol 25 mL
- Glycérine pure 5 mL
- Eau distillée 250 mL

Cette solution se conserve quelques mois en flacon brun à l'abri de la lumière, à température ambiante.

Lugol à 5 %

- Iode en paillette 5 g
- Iodure de potassium 10 g
- Eau distillée 100 mL

Dissoudre l'iode de potassium dans très peu d'eau. Ajouter l'iode peu à peu en agitant jusqu'à complète dissolution. Ajouter le reste de l'eau. Cette solution est stable pendant 3 à 4 semaines et doit être conservée en flacon brun à l'abri de la lumière.

Modalités techniques

Dans un tube à hémolyse, mélanger extemporanément, dans l'ordre, les deux réactifs dans les proportions suivantes :

- Lugol à 5 % 0,15 mL
 - Réactif de Sapero et Lawless 2,35 mL
- Ajouter environ 0,25 g de selles et triturer jusqu'à obtenir une suspension homogène. Laisser sédimenter au minimum 20 à 30 minutes.

Prélever avec une pipette dans la partie supérieure du sédiment. Si la coloration est ancienne, agiter le tube pour remettre le sédiment en suspension et laisser à nouveau déposer 15 à 20 minutes.

Intérêt : Tous les parasites sont fixés et colorés et peuvent être conservés pendant des années.

Interprétation : Cette coloration est la meilleure pour l'identification des amibes et des flagellés intestinaux. En cas d'examen 20 à 30 minutes après la coloration, les trophozoïtes sont roses et les kystes incolores mais la chromatine des noyaux est déjà visible (réfringente).

3.2.2. Coloration des coccidies « Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz »

Préparation de la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz (donnée à titre d'exemple)

Fuchsine phéniquée

- Solution A :
 - Fuchsine basique 15 g
 - Éthanol à 95° 1000 mL
- Solution B :
 - Solution A 10 mL
 - Eau phéniquée à 5 % 90 mL
- Solution de vert malachite à 5 % :
 - Vert malachite oxalate 5 g
 - Eau distillée 100 mL

Acide sulfurique à 2 %

Modalités techniques

- Faire un frottis à partir des selles à examiner ou à partir du culot de centrifugation (voir paragraphe « Les techniques de concentration des selles »). Laisser sécher puis fixer à l'alcool méthylique.
- Colorer à froid pendant une heure dans un bac contenant une solution de fuchsine phéniquée (solution B).
- Rincer à l'eau du robinet.
- Différencier 20 secondes dans une solution d'acide sulfurique à 2 % en agitant constamment.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Contre-colorer dans une solution aqueuse de vert de malachite à 5 % pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Sécher à la température du laboratoire.

Interprétation

Selon les selles, le fond de la préparation varie du vert pâle au vert foncé, en passant par le bleu et même le violet. Si les selles ont été conservées dans une solution formolée, le fond de la préparation n'est jamais vert. Les coccidies sont colorées en rose fuchsia ; les noyaux et les corps résiduels peuvent être colorés en noir. Les levures apparaissent uniformément colorées en vert et les graisses colorées en rouge.

Forme de la page de garde « P1 »

Nom Prénom

Date

**Groupe / sous
groupe**

N° de paillasse

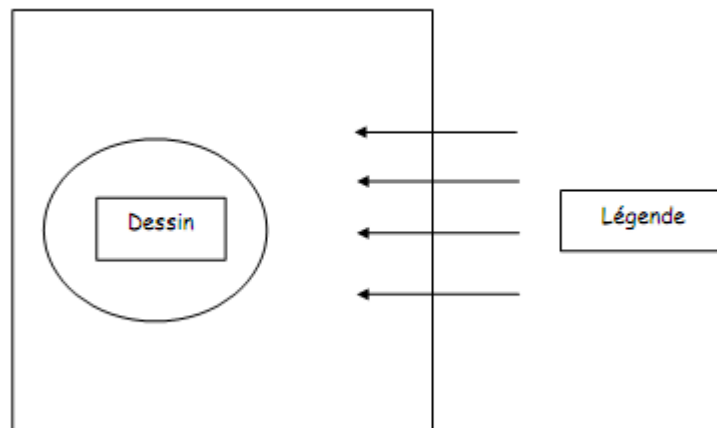
TP N° : Titre du TP

Note et Observation

Travail à faire :

-
-

Forme de la page du dessin « P2 »



Titre du dessin

Nom scientifique de l'espèce

Outil d'observation et Grossissement