

Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale

Frottis sanguin
Coprologie parasitaire

Muriel FROMAGE (Afssaps)
Bernard FORTIER (Hôpital de Brabois, Nancy)
Jean Claude PETITHORY (CHG, Gonesse)

Expédition : 19 octobre 2005

Clôture : 14 novembre 2005

Edition des compte-rendus individuels : 14 février 2006

Paramètres contrôlés :

Frottis sanguin ou culture de moelle : *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*.

Coprologie : *Necator americanus*, *Chlonorchis sinensis*, *Cryptosporidium sp.*, *Endolimax nanus*.

Nombre de laboratoires concernés* : 3949

Nombre de laboratoires participants** : 3802

* Laboratoires ayant déclaré à l'Afssaps pratiquer au moins une des analyses concernées par l'envoi

**Laboratoires ayant retourné un bordereau-réponse correctement identifié par le code laboratoire, avant la date de clôture de l'opération

Résumé de l'opération

A l'occasion de l'opération de contrôle 05PAR2, un frottis préparé à partir d'une culture de *Leishmania donovani* sur milieu Novy-Neal-Nicolle et coloré au May Grünwald Giemsa a été adressé aux laboratoires. Bien qu'il s'agisse, dans ce cas, des formes promastigotes flagellées de leishmanies (formes de culture) et non des formes amastigotes présentes dans les produits pathologiques, près de 9 participants sur 10 ont reconnu ce protozoaire. Deux frottis de paludisme ont également été proposés. L'un à *Plasmodium ovale* ne contenait que des trophozoïtes. En dépit d'une parasitémie relativement faible (0,3%), ce parasite a été correctement identifié par 82,2% des participants ; c'est le meilleur score obtenu à ce jour pour cette espèce. L'autre frottis, à *Plasmodium falciparum* était riche (4 à 6% d'hématies parasitées) et ne contenait que des trophozoïtes âgés. Les taches de Maurer pathognomoniques de *P. falciparum* étaient présentes dans presque toutes les hématies parasitées. Le pourcentage de bonnes réponses, environ 93% reste stable par rapport au dernier envoi en 2004 d'un frottis comparable.

La coprologie parasitaire comportait une selle contenant des œufs de *Necator americanus*. Près de 94% des laboratoires ont reconnu des œufs d'ankylostomidés (*N. americanus* ou *Ancylostoma duodenale* ou sans diagnostic précis d'espèce) ; ce qui est un score habituel. En revanche, on observe une nette augmentation (+12,6% par rapport à l'envoi précédent de 2003) du diagnostic précis de l'espèce *N. americanus*. En l'absence de larves, le diagnostic différentiel entre *N. americanus* et *A. duodenale* est difficile mais néanmoins possible par la mesure des œufs au micromètre oculaire.

Cet envoi comportait également un frottis de selles coloré au Ziehl-Neelsen modifié contenant des oocystes de *Cryptosporidium sp.* reconnus par près de 9 laboratoires sur 10.

En ce qui concerne les œufs de *Chlonorchis sinensis*, on note 84,6% de bonnes réponses, soit une hausse de 10% par rapport aux résultats obtenus il y a 10 ans pour ce parasite.

Quant aux kystes d'*Endolimax nanus* souvent rencontrés au cours d'un examen parasitologique des selles, ils ont été vus par un peu moins de la moitié des participants. Ce score est stable depuis de nombreuses années et la réponse erronée «absence de parasite» reste la plus fréquente (environ un quart des laboratoires) ce qui montre la difficulté à trouver ces petits kystes ovalaires à paroi mince et au cytoplasme hyalin.

Frottis sanguin ou culture de moelle

1 - Echantillon MAHREB ou ZAFAR

Définition de l'échantillon

Il s'agit d'un frottis coloré au MGG.

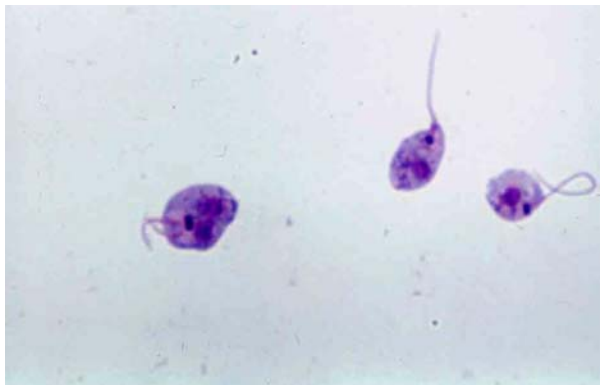
Le diagnostic des experts Dr J-C. PETITHORY (Gonesse), Dr G. GALEAZZI (Colombes), Dr J-F. PAYS (Paris), Dr R. DAHAN HIMY (Strasbourg) est le suivant :

Nom du parasite : *Leishmania donovani*

Stade : forme promastigote

Richesse du frottis : 1 champ au X 100 pour trouver un parasite

Les renseignements cliniques qui accompagnent l'échantillon sont les suivants : frottis préparé à partir d'une culture de 5 jours sur milieu N.N.N. d'une moelle prélevée sur un malade d'origine maghrébine HIV positif.



Leishmania donovani
Culture : forme promastigote
Obj. 100

Résultats des participants

L'ensemble des réponses transmises par les 1916 laboratoires participants (1 à 3 réponses par laboratoire) ainsi que leur pourcentage respectif sont rassemblés dans le tableau I.

Pour rappel, le pourcentage de bonnes réponses obtenu lors de l'envoi précédent, en 1999, d'un frottis parasité d'une richesse comparable est rapporté dans le tableau II.

Tableau I - Ensemble des réponses des 1916 laboratoires participants.

STADE	NOM	% diagnostics de stade	% diagnostics d'espèce
forme promastigote	<i>Leishmania donovani</i>	48,3	89,7 soit 93,4% des 1840 laboratoires ayant rendu un diagnostic
forme végétative		13,2	
adulte		5,6	
forme amastigote		4,2	
trophozoïte		1,9	
divers		1,9	
non précisé		20,0	
divers/non précisés	<i>Trypanosoma brucei sp.</i>		4,5
divers/non précisés	<i>Trypanosoma cruzi</i>		0,8
Parasites divers			0,9
Absence de parasite			0,1
PAS DE REPONSE			0,6
EXAMEN TRANSMIS			3,4

Tableau II - Bilan des deux opérations de contrôle « forme promastigote - *Leishmania donovani* »

Année de l'envoi	Nombre de laboratoires participants	Richesse du frottis *	% de laboratoires ayant répondu :	
			« <i>Leishmania donovani</i> »	« <i>Trypanosoma brucei</i> » ou « <i>T. cruzi</i> »
2005	1916	1	89,7	5,3
1999	3817	1	95,2	1,2

* nombre de champs au X100 pour trouver un parasite

Commentaires

En culture incubée à 22 °C (primo-culture ou après repiquage chaque semaine pendant un mois), sur milieu NNN (gélose additionnée de sang de lapin), les leishmanies se multiplient sous forme promastigote. Facilement repérable par sa mobilité, le parasite est reconnaissable par sa forme allongée mesurant environ 20 µm et présentant un flagelle. Ce flagelle prend naissance au niveau du blépharoplaste, situé en avant du noyau, va jusqu'à l'extrémité antérieure, et dépasse nettement la membrane cellulaire sur une longueur sensiblement identique à celle du corps cellulaire. Il ne présente pas de membrane ondulante contrairement au trypanosome cité par 5,3% des laboratoires participants. Parfois les leishmanies sont attachées entre elles par l'extrémité de leur flagelle, formant ainsi une rosace. La forme promastigote est infectieuse pour l'homme. C'est également sous cette forme que le parasite se développe dans l'intestin du vecteur, le phlébotome femelle.

In vivo, ce parasite se présente sous forme amastigote, dépourvue de flagelle. Le parasite immobile est intracellulaire dans les cellules histio-monocytaires (macrophage, histiocyte, monocyte...). Toutefois, il peut être libre après éclatement cellulaire. Il est ovoïde à complètement arrondi, mesurant 2 à 6 µm. Le noyau, coloré en rouge au May-Grünwald-Giemsa, occupe le tiers du cytoplasme assez souvent mal coloré en bleu pâle. Cette forme amastigote est reconnaissable par la présence d'un kinétoplaste situé près du noyau. C'est un bâtonnet de coloration rouge foncée souvent disposé perpendiculairement au noyau. Selon la disposition du parasite, il est parfois vu sous forme d'un point. Le kinétoplaste est formé d'un corps parabasal fortement coloré et d'un blépharoplaste punctiforme souvent invisible en microscopie optique. Du kinétoplaste, part le rhizoplaste qui est l'amorce du flagelle. Il se présente sous forme d'une ligne fine colorée en rouge foncé, allant vers la membrane cellulaire (formant ainsi avec le kinétoplaste un T caractéristique). Mais, inconstamment visible, il peut aussi être vu sous forme d'un point. L'association kinétoplaste-blépharoplaste près du noyau, sous forme d'un T, d'un trait ou d'un point, est pathognomonique des leishmanies, évitant les confusions avec d'autres parasites ou mycètes intracellulaires (histoplasmes, toxoplasmes....).

L'identification précise de l'espèce (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. tropica* ...) ne peut se faire sur des critères cytologiques. Elle passe par l'analyse iso-enzymatique ou la biologie moléculaire.

Cette souche provenait d'un patient de 42 ans, VIH+, atteint d'une leishmaniose viscérale évoluant depuis 10 ans, résistante aux traitements conventionnels.

Dans le SIDA, les signes cliniques habituels du Kala-Azar (fièvre anarchique, poly-adénopathies, hépatosplénomégalie, pancytopenie, hyper-gammaglobulinémie avec plasmocytose modérée et cellule de Mott) peuvent manquer. Des localisations inhabituelles peuvent être observées (gastro-intestinales, coliques, rectales, pleurales...). L'évolution est défavorable avec rechute, si parallèlement les traitements anti-rétroviraux ne peuvent restaurer l'immunité. La sérologie, souvent négative, n'est pas contributive. La recherche de leishmanies directement à partir du sang par méthode de cyto-concentration est une méthode de choix pour confirmer le diagnostic. Très sensible, facile à répéter, non douloureuse, elle se substitue facilement à la recherche dans la moelle. Chez les sidéens les formes amastigotes s'observent aussi facilement dans les polynucléaires neutrophiles.

G. GALÉAZZI, Hôpital Louis Mourier, Laboratoire de Parasitologie - Colombes.

2 - Echantillon KERBE

Définition de l'échantillon

Il s'agit d'un frottis sanguin coloré au MGG.

Le diagnostic des experts Dr J-C. PETITHORY (Gonesse), Dr G. GALEAZZI (Colombes), Dr J-F. PAYS (Paris), Dr R. DAHAN HIMY (Strasbourg) est le suivant :

Nom du parasite : *Plasmodium falciparum*

Stade : Trophozoïtes

Richesse du frottis : 4 à 6% d'hématies parasitées.

Les renseignements cliniques qui accompagnent l'échantillon sont les suivants : recherche de parasites sanguins chez un malade fébrile de retour du Sénégal.

Résultats des participants

L'ensemble des réponses transmises par les 955 laboratoires participants (1 à 3 réponses par laboratoire) ainsi que leur pourcentage respectif sont rassemblés dans le tableau III.

Pour rappel, les pourcentages de bonnes réponses obtenus lors des six envois précédents d'un frottis parasité par *P. falciparum* au stade trophozoïte avec une parasitémie comprise entre 1,5 et 5 % sont rapportés dans le tableau IV.

Tableau III - Ensemble des réponses des 955 laboratoires participants.

STADE	NOM	% diagnostics de stade	% diagnostics d'espèce
Trophozoïtes	<i>P. falciparum</i>	87,1	92,9 soit 95% des 934 laboratoires ayant rendu un diagnostic
Schizontes jeunes		11,0	
Schizontes âgés		3,9	
Gamétocytes		1,4	
divers/non précisés		0,5	
divers/non précisés	<i>P. vivax</i>		2,9
divers/non précisés	<i>P. ovale</i>		2,2
divers/non précisés	<i>P. malariae</i>		0,4
Trophozoïtes espèce non précisée			0,2
Parasites divers			0,2
PAS DE REPONSE			0,4
EXAMEN TRANSMIS			1,8

Tableau IV - Bilan des sept opérations de contrôle « trophozoïtes *Plasmodium falciparum* » avec une parasitémie comprise entre 1,5 et 5%.

Année de l'envoi	Nombre de laboratoires participants	% d'hématies parasitées	% de laboratoires ayant répondu :	
			« <i>P. falciparum</i> »	«absence de parasite»
2005	955	4 - 6	92,9	0
2004	1266	2 - 3	92,0	0,6
1997	1281	1 - 3	84,1	1,1
1994	1204	3 - 5	77,9	1,3
1990	1140	1 - 2	90,5	1,1
1984	1045	1 - 2	93,6	1,5
1981	765	5	86,2	0,5

Commentaires

Cette patiente de 16 ans n'avait pris aucune prophylaxie. Sur ce frottis, il suffit de mettre au point à l'immersion pour voir plusieurs hématies parasitées par champ microscopique étant donné la parasitémie de 4 à 6%.

Une fois assurée la présence d'hématozoaires dans un certain nombre d'hématies, il faut en préciser le ou les stade(s) d'évolution. Nous sommes en présence ici de trophozoïtes assez grands ayant un cytoplasme bleu épais de forme arrondie ou piriforme voire en « filet de papillon » avec un noyau rouge un peu étalé et une vacuole nutritive incolore. Il s'agit du stade trophozoïte âgé de *Plasmodium falciparum*, stade où apparaissent en général les taches de Maurer pathognomoniques de cette espèce et qui sont ici particulièrement visibles. Le frottis a été coloré avec une eau à pH 7-7,2 qui les met bien en évidence. Ces taches sont toujours en nombre limité (on peut les compter), elles sont de toutes formes : rondes, triangulaires en « coup d'ongle » et de toutes tailles mais souvent grandes, ce qui les différencie des granulations de Schüffner punctiformes et très nombreuses.

Sur la planche 1 en couleur ci-dessous, on peut comparer les granulations de Schüffner sur l'hématie parasitée par *P. vivax* au centre, des taches de Maurer dans les nombreuses hématies parasitées par *P. falciparum*.

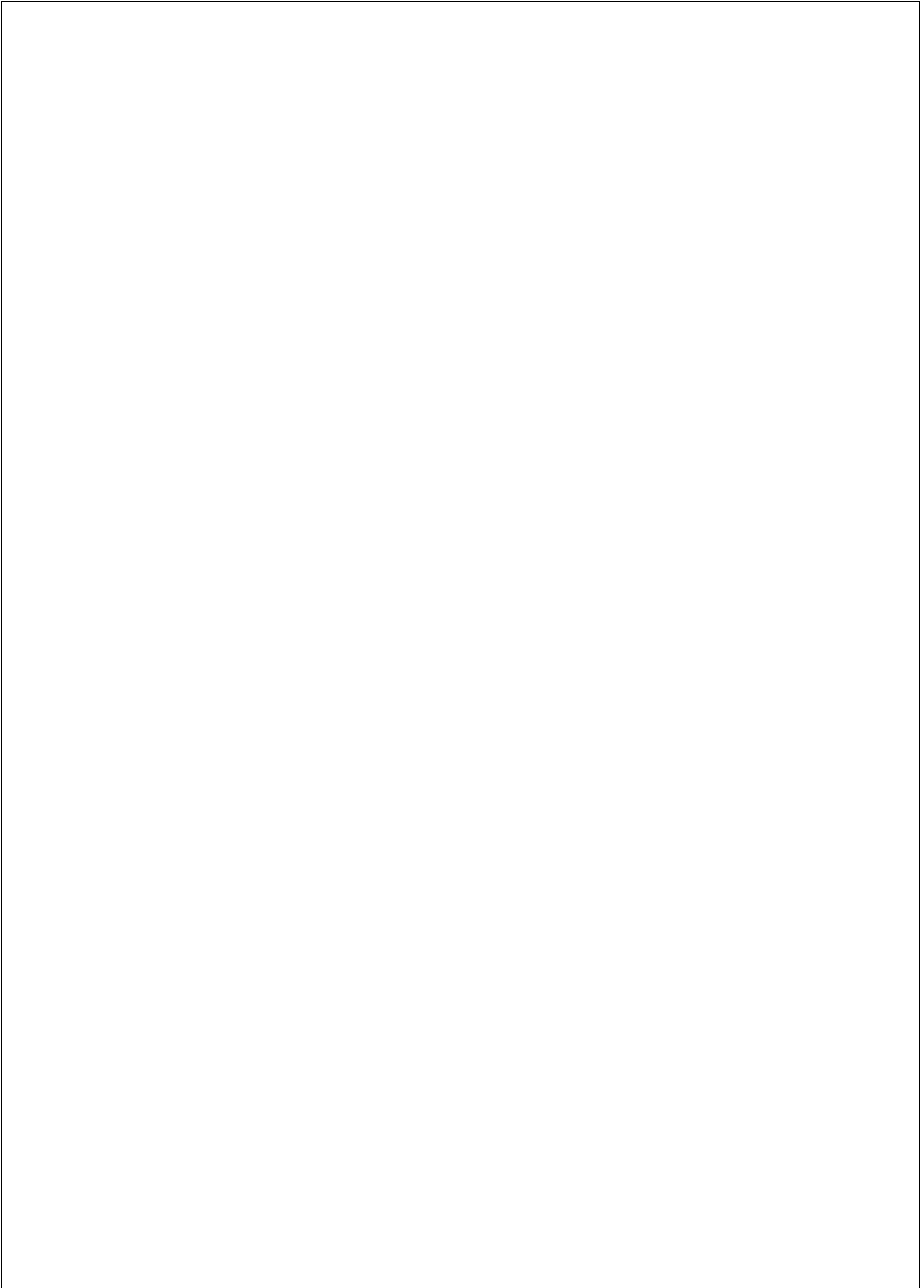
Au stade trophozoïte jeune il n'y a pas de taches de Maurer, ce stade n'était pas présent ou exceptionnel sur ce frottis.

Enfin, ce qui est intéressant ici, c'est la position du parasite dans l'hématie. On le voit en position marginale comme « collé » au bord interne de l'hématie ou faisant hernie à la surface donnant l'impression que le parasite va sortir du globule rouge. Ces deux positions du parasite dans l'hématie, que l'on rencontre assez fréquemment sont très caractéristiques de *Plasmodium falciparum*.

On observe également quelques hématies bi et tri-parasitées. Aucun schizonte jeune ou âgé ni aucun gamétocyte n'ont été vus. L'aspect du frottis est monotone.

F. ARDOIN, Centre hospitalier, Laboratoire – 95500 Gonesse.

Planche 1 - Comparaison entre les granulations de Schüffner d'un *P. vivax* (hématie dans le cadre central) et les taches de Maurer d'un *P. falciparum* (hématies tout autour).



3 - Echantillon DIBALA

Définition de l'échantillon

Il s'agit d'un frottis sanguin parasité coloré au MGG.

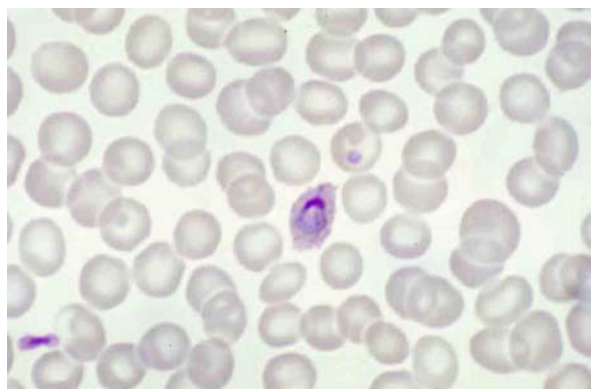
Le diagnostic des experts Dr J-C. PETITHORY (Gonesse), Dr G. GALEAZZI (Colombes), Dr J-F. PAYS (Paris), Dr R. DAHAN HIMY (Strasbourg) est le suivant :

Nom du parasite : *Plasmodium ovale*.

Stade : Trophozoïtes

Richesse du frottis : 0,2% en moyenne d'hématies parasitées.

Les renseignements cliniques qui accompagnent l'échantillon sont les suivants : recherche de parasites sanguins chez un malade fébrile de retour du Sénégal.



Plasmodium ovale
Trophozoïte âgé
Obj.100

Résultats des participants

L'ensemble des réponses transmises par les 929 laboratoires participants (1 à 3 réponses par laboratoire) ainsi que leur pourcentage respectif sont rassemblés dans le tableau V.

Pour rappel, les pourcentages de bonnes réponses obtenus lors des trois envois précédents d'un frottis parasité par *P. ovale* et comportant uniquement des trophozoïtes ou des trophozoïtes associés à des gamétocytes sont rapportés dans le tableau VI.

Tableau V – Ensemble des réponses des 929 laboratoires participants.

STADE	NOM	% diagnostics de stade	% diagnostics d'espèce
Trophozoïtes	<i>P. ovale</i>	74,2	82,2 soit 84,7% des 902 laboratoires ayant rendu un diagnostic
Schizontes jeunes		16,8	
Schizontes âgés		10,2	
Gamétocytes		2,6	
divers/non précisés		0,5	
divers/non précisés	<i>P. vivax</i>		7,8
divers/non précisés	<i>P. falciparum</i>		5,5
divers/non précisés	<i>P. malariae</i>		1,6
Trophozoïtes espèce non précisée			0,4
Parasites divers			0,3
ABSENCE DE PARASITE			0,3
PAS DE REPONSE			0,8
EXAMEN TRANSMIS			2,2

Tableau VI - Bilan des quatre opérations de contrôle « *Plasmodium ovale* » :
Trophozoïtes (T) ou trophozoïtes + gamétocytes (T+G)

Année de l'envoi	Nombre de laboratoires participants	% d'hématies parasitées	stades	% de laboratoires ayant répondu :		
				« <i>P. ovale</i> »	« <i>P. vivax</i> »	« <i>P. falciparum</i> »
2005	929	0,2	T	82,2	7,8	5,5
2005	1260	0,5	T + G	77,0	19,4	1,2
2002	1328	0,4	T + G	81,8	12,3	3,7
1996	1272	0,3	T + G	72,6	21,6	2,0

Commentaires

Le frottis sanguin DIBALA provenait d'un patient fébrile de retour du Sénégal. Il permettait la mise en évidence d'une impaludation par *Plasmodium ovale* avec une parasitémie de l'ordre de 0,2 %, essentiellement représentée par des trophozoïtes.

Naturellement, tout épisode fébrile de retour de zone d'endémie doit faire évoquer en priorité le diagnostic de paludisme. Seuls 0,3 % des laboratoires ont conclu à l'absence de parasites et 82,2 % ont bien reconnu *Plasmodium ovale*.

Cette espèce plasmodiale principalement africaine est vue assez fréquemment en France mais loin derrière *Plasmodium falciparum* dans le cadre du paludisme d'importation. Les hématies hôtes de *Plasmodium ovale* sont généralement d'une taille légèrement supérieure à la moyenne. Leur cytoplasme contient de fines granulations azurophiles dites granulations de Schüffner mais leur mise en évidence nécessite lors de la coloration d'utiliser une eau distillée tamponnée à pH 7,2. Elles sont souvent déformées, de forme ovale voire franchement frangées avec un aspect en comète.

Les trophozoïtes de *Plasmodium ovale* sont classiquement plus épais et d'une taille supérieure à celle rencontrée pour *Plasmodium falciparum*. L'apparition d'un pigment grossier se rencontre dès les stades précoces des trophozoïtes. Les autres stades de développement parasites, schizontes ou corps en rosace et gamétocytes peuvent coexister avec les trophozoïtes mais ils étaient rares ou absents sur la lame DIBALA.

La principale difficulté théorique mais également rencontrée en pratique reste le diagnostic différentiel d'espèce avec *Plasmodium vivax* diagnostiqué par 7,8 % des participants. Cette différenciation qui reste difficile peut être aidée par quelques éléments. Pour *Plasmodium vivax*, l'hématie hôte est généralement une hématie jeune, donc de grande taille, souvent légèrement déformée, quadrangulaire. Les granulations de Schüffner sont également présentes. Les trophozoïtes ont souvent un contour festonné, améboïde. Le pigment produit est plus fin que celui de *Plasmodium ovale*. Les schizontes de *Plasmodium vivax* peuvent contenir jusqu'à 16 mérozoïtes ce qui ne s'observe pas avec *Plasmodium ovale*. Enfin, cette espèce ubiquitaire n'est, en principe, pas rencontrée en Afrique occidentale d'où provenait le patient DIBALA.

Les difficultés sont moins importantes avec *Plasmodium falciparum*. Dans ce cas, le frottis sanguin monotone comporte de petits trophozoïtes jeunes souvent binucléés ayant une tendance à faire hernie sur la paroi de l'hématie. Lorsque des gamétocytes sont présents sur la lame, leur forme en banane est bien entendu pathognomonique. Les taches de Maurer parfois présentes sont plus grandes et plus grossières que les granulations de Schüffner.

Plasmodium malariae est beaucoup plus rarement rencontré. Les hématies parasitées sont généralement de petite taille sans granulation visible. Les trophozoïtes ont une tendance à se positionner en bande équatoriale sur le diamètre de l'hématie et produisent un pigment grossier.

En conclusion le diagnostic d'espèce *Plasmodium ovale* reste très intéressant pour le clinicien : il lui garantit une évolution très exceptionnelle vers les formes graves du paludisme et une sensibilité conservée à l'ensemble des antimalariques.

E. VANDEMEULEBROUCKE, Centre Hospitalier, Laboratoire de Parasitologie - Gonesse.

Coprologie parasitaire

1 - Echantillon MOTER

Définition de l'échantillon

Il s'agit d'une selle parasitée formolée.

Le diagnostic des experts Dr J-C. PETITHORY (Gonesse), Dr G. GALEAZZI (Colombes), Dr J-F. PAYS (Paris), Dr R. DAHAN HIMY (Strasbourg) est le suivant :

Nom du parasite : *Necator americanus* (ankylostomidés)

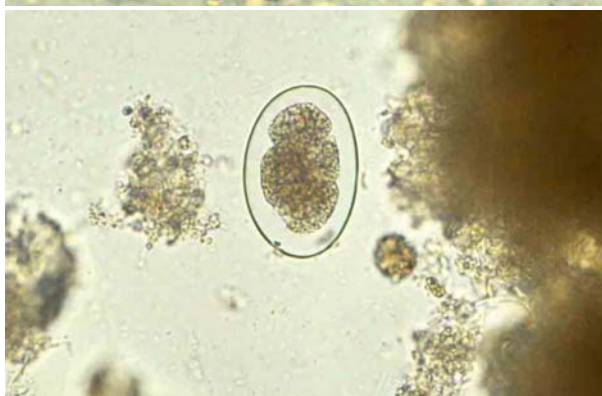
Stade : oeuf

Richesse de la selle : 4 à 8 œufs par lamelle 22X22

Les renseignements cliniques qui accompagnent l'échantillon sont les suivants : recherche de parasites dans les selles chez un français ayant fait de nombreux voyages en Afrique et présentant une légère anémie hypochrome.



Œuf de *Necator americanus* à 8 blastomères
Obj. 40



Œuf d'*Ancylostoma duodenale* à 4 blastomères
Obj. 40

Résultats des participants

L'ensemble des réponses transmises par les 951 laboratoires participants (1 à 3 réponses par laboratoire) ainsi que leur pourcentage respectif sont détaillés dans le tableau VII.

Pour rappel, les pourcentages de bonnes réponses obtenus lors des six envois précédents d'une selle contenant des œufs de *N. americanus* sont rapportés dans le tableau VIII.

Tableau VII - Ensemble des réponses des 951 laboratoires participants.

STADE	NOM	% diagnostics de stade	% diagnostics d'espèce
oeufs	<i>Necator americanus</i>	45,9	46,8
divers/non précisés		0,9	soit 48,5% des 918 laboratoires ayant rendu un diagnostic
oeufs	<i>Ancylostoma duodenale</i>	29,7	
divers/non précisés		1,2	
oeufs	ankylostomidés		16,0
Helminthes divers			2,2
Protozoaires divers			1,1
ABSENCE DE PARASITE			1,2
PAS DE REPONSE			0,5
EXAMEN TRANSMIS			2,9

Tableau VIII - Bilan des sept opérations de contrôle « œufs de *N. americanus* ».

Année de l'envoi	Nombre de laboratoires participants	Richesse de la selle parasitée *	% de laboratoires ayant répondu :				
			<i>Necator americanus</i>	<i>Ancylostoma duodenale</i>	ankylostomidés	total	"absence de parasite"
2005	951	4 - 8	46,8	30,8	16,0	93,6	1,2
2003	1272	5 - 12	34,2	32,2	23,1	89,5	2,6
2001	1288	6 - 15	36,9	32,5	22,7	92,7	1,9
1998	1307	2 - 8	35,1	37,6	12,3	85,0	3,7
1997	1423	3 - 10	32,2	36,9	21,9	91,0	4,6
1996	1272	2 - 8	31,6	36,0	21,3	88,9	5,6
1991	1132	2 - 8	13,0	40,9	25,1	79,0	12,5

* : nombre d'œufs au X40 par lamelle 22X22

Commentaires

La selle formolée MOTER provenait d'un français ayant fait de nombreux voyages en Afrique et présentant une légère anémie hypochrome. Les nombreux séjours en Afrique expliquent la contamination du malade. En effet, des cas autochtones furent découverts en France, notamment dans les mines de charbon, mais ceux-ci ont maintenant disparu et il n'y a plus de cas autochtones. Le diagnostic précis de l'espèce a été fait par 46,8 % des participants, celui d'œufs appartenant à la famille des ankylostomes a été fait par 93,6 % des laboratoires ce qui montre une très bonne connaissance de ces œufs.

Les œufs sont de forme ovale à ellipsoïdale avec une coque incolore, lisse et mince. Le diagnostic microscopique différentiel avec ceux d'*A. duodenale* est difficile à faire, les principales données morphologiques sont semblables : largeur moyenne semblable (40 µm), longueur moyenne légèrement différente (60 à 65 µm pour *A. duodenale* et 70 µm pour *N. americanus*).

Le nombre de blastomères (division de la masse cellulaire) est plus facile à voir : 4 pour *A. duodenale* et 8 pour *N. americanus*, mais il faut que l'examen microscopique de la selle soit fait peu de temps après son émission car ce sont des œufs qui évoluent vite.

Le diagnostic de certitude ne peut être fait que par coproculture sur les larves au stade strongyloïde (cela n'était pas possible avec les œufs fixés envoyés). Le diagnostic exact d'espèce était indispensable il y a quelques dizaines d'années, car les médicaments à utiliser étaient différents selon l'espèce ce qui n'est plus le cas maintenant.

Ankylostomidés et anémie : ces nématodes provoquent une perte de sang régulière comme on le voit dans le tableau ci-dessous. L'anémie est plus modérée pour *N. americanus*. L'infestation par ce ver a d'ailleurs été utilisée chez les malades atteints de polyglobulie avec d'excellents résultats (Lucien Brumpt, 1944).

	<i>Necator americanus</i>	<i>Ancylostoma duodenale</i>
Répartition géographique	Sud de la Chine Sud de l'Inde Viet Nam Afrique sub-saharienne Antilles, Sud des USA, Australie	Nord de la Chine Nord Ouest de l'Inde Europe Côte d'Ivoire Taïwan
Durée de vie chez l'homme	3 à 18 ans	2 à 6 ans
Hémorragie intestinale	±	++
Perte quotidienne de sang par ver	0,03 ml	0,15 - 0,23 ml
Spoliation sanguine pour une infestation moyenne	1,3 ml	2,2 ml
Virulence chez l'homme	±	++

J.C. PETITHORY, Centre Hospitalier, Laboratoire - Gonesse.

2 – Echantillon KHOTAI

Définition de l'échantillon

Il s'agit d'une selle parasitée formolée.

Le diagnostic des experts Dr J-C. PETITHORY (Gonesse), Dr G. GALEAZZI (Colombes), Dr A. SULAHIAN (Paris), Dr R. DAHAN HIMY (Strasbourg) est le suivant :

Nom du parasite : *Clonorchis sinensis*

Stade : oeuf

Richesse de la selle : 16 à 20 œufs par lamelle 22X22

Les renseignements cliniques qui accompagnent l'échantillon sont les suivants : recherche de parasites chez un malade d'origine chinoise présentant un ictère et une éosinophilie à $0,6 \cdot 10^9/l$.



Œuf de *Clonorchis sinensis*

Obj. 100

Résultats des participants

L'ensemble des réponses transmises par les 955 laboratoires participants (1 à 3 réponses par laboratoire) ainsi que leur pourcentage respectif sont détaillés dans le tableau IX.

Pour rappel, les pourcentages de bonnes réponses obtenus lors des trois envois précédents d'une selle contenant des œufs de *Clonorchis sinensis* sont rapportés dans le tableau X .

Tableau IX – Ensemble des réponses des 955 laboratoires participants.

STADE	NOM	% diagnostics de stade	% diagnostics d'espèce
Oeuf	<i>Clonorchis sinensis</i>	82,2	84,6 soit 87,3% des 926 laboratoires ayant rendu un diagnostic
divers/non précisés		2,4	
divers/non précisés	<i>Metogonimus yokogawai</i>		3,7
divers/non précisés	<i>Heterophyes heterophyes</i>		2,9
divers/non précisés	<i>Opistorchis felineus</i>		2,5
divers/non précisés	<i>Dicrocoelium dendriticum</i>		2,2
trématodes divers			1,7
helminthes divers			0,4
protozoaires divers			1,0
ABSENCE DE PARASITE			0,1
PAS DE REPONSE			0,5
EXAMEN TRANSMIS			2,5

Tableau X - Bilan des quatre opérations de contrôle « œufs de *C. sinensis* ».

Année de l'envoi	Nombre de laboratoires participants	Richesse de la selle parasitée *	% de laboratoires ayant répondu :			
			<i>Clonorchis sinensis</i>	<i>Heterophyes heterophyes</i>	<i>Metagonimus yokogawai</i>	douves diverses
2005	2005	16 - 20	84,6	2,9	3,7	5,2
1986	1986	20 - 50	74,4	10,3	5,0	6,9
1983	1983	20 - 50	73,5	8,1	5,6	7,6
1982	1982	4 - 5	74,2	5,8	4,9	3,5

* : nombre d'œufs au X40 par lamelle 22X22

Commentaires

Des œufs de *Clonorchis sinensis* (16 à 20 par lamelle 22 x 22) ont été reconnus par 84,6% des laboratoires. *C. sinensis* ou douve de Chine est un trématode appartenant à la famille des Opisthorchiidae. C'est un parasite des voies biliaires, endémique en Asie du Sud Est, Chine, Japon et Corée. L'homme se contamine par ingestion de poisson d'eau douce, cru ou mariné hébergeant des métacercaires. Les œufs peuvent être retrouvés dans les selles ou dans le tubage duodénal.

Les œufs de *Clonorchis sinensis* mesurent 27-35 µm x 12-19 µm. Ils sont clairs et ovoïdes, allongés ou en forme de bouteille ventrue et possèdent un opercule qui débord largement, évoquant un chapeau chinois ou un couvercle de soupière. On observe une petite protubérance à l'extrémité opposée à l'opercule. La coque est lisse mais des débris de petite taille peuvent adhérer à la coque. Les œufs de couleur jaune pâle à marron contiennent un miracidium.

Les œufs d'autres espèces d'Opisthorchiidae (*Opisthorchis felinus* et *Opisthorchis viverrini*) et de certaines douves intestinales (*Heterophyes heterophyes* et *Metagonimus yokogawai*) ont un aspect, une taille et une morphologie qui les rendent parfois difficiles à différencier de ceux de *Clonorchis*. Ceci peut expliquer les erreurs de diagnostic de l'ordre de 2,5 % pour *Opisthorchis felinus*, 2,9 % pour *Heterophyes heterophyes* et de 3,7 % pour *Metagonimus yokogawai*. Ces deux dernières espèces sont des douves intestinales et ne causent pas d'ictère.

Opisthorchis felinus est responsable d'une distomatose biliaire qui sévit d'Europe Orientale jusqu'en Extrême Orient. Les œufs mesurent 26-30 µm x 11-15 µm. Ils sont moins larges et ventrus que ceux de *C. sinensis*, jaune clair à brun jaunâtre, souvent asymétriques avec un côté plat et un côté bombé. La coque est lisse, sans aspérités. L'opercule est saillant mais ne débord pas sur les rebords. L'œuf contient un miracidium.

O. viverrini a été rapporté en Asie du Sud Est. Dans certaines parties de la Thaïlande, plus de la moitié de la population est infectée par ce parasite. Ces œufs de 25-30 µm x 15-17 µm sont identiques à l'espèce précédente et ne diffèrent que par les cellules flamme des cercaires et métacercaires.

Heterophyes heterophyes est une distomatose intestinale qui sévit en Asie, au Moyen Orient et en Egypte (delta du Nil). L'homme s'infeste par ingestion de poisson cru. Les œufs sont allongés ou légèrement ovoïdes, symétriques, avec une petite protubérance à l'extrémité opposée à l'opercule. L'opercule est plus large que chez *Clonorchis* et ces œufs de couleur brun jaunâtre contiennent un miracidium.

Metagonimus yokogawai est une distomatose intestinale très répandue en Extrême Orient (Japon, Chine et Sibérie). Les œufs mesurent 26-30 µm x 15-20 µm et sont allongés ou ovoïdes. La coque de couleur brun jaunâtre est lisse, plus mince et plus claire que celle des œufs d'*Heterophyes*. L'opercule est plus large mais moins visible que chez les œufs de *Clonorchis*. Une petite protubérance existe au pôle opposé à l'opercule. Ces œufs contiennent un miracidium.

Quant aux autres erreurs, les dimensions des éléments parasites demeurant la base de toute observation, ces réponses soulignent le non étalonnage du microscope (taille des œufs de *Dicrocoelium dendriticum* et d'autres espèces de trématodes) et l'absence d'observation attentive des caractères morphologiques (helminthes et trématodes divers).

Les réponses « présence de protozoaires » (1%) ou « absence de parasite » (0,1%) étaient évitables car les préparations mises à disposition étaient suffisamment « riches » (16 à 20 œufs par lamelle 22 x 22).

A. SULAHIAN, Hôpital Saint-Louis, Laboratoire - Paris.

3 – Echantillon ZURTAL

Définition de l'échantillon

Il s'agit d'un frottis de selles coloré au Ziehl - Neelsen modifié.

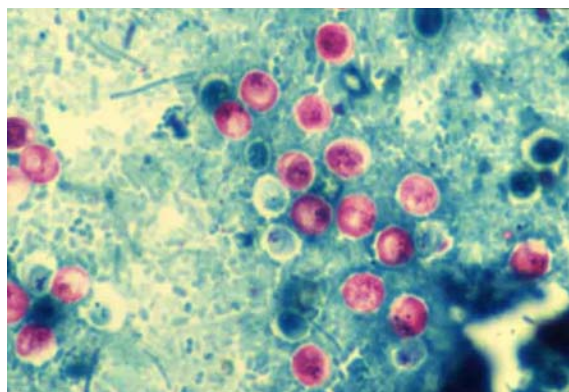
Le diagnostic des experts Dr J-C. PETITHORY (Gonesse), Dr G. GALEAZZI (Colombes), Dr J-F. PAYS (Paris), Dr R. DAHAN HIMY (Strasbourg) est le suivant :

Nom du parasite : *Cryptosporidium sp.*

Stade : oocyste

Richesse de la selle : 8 à 10 champs au X100 pour trouver un oocyste

Les renseignements cliniques qui accompagnent l'échantillon sont les suivants : recherche de l'étiologie d'une diarrhée chez un sidéen.



Cryptosporidium sp.
Oocystes colorés en rouge
Levures colorées en bleu
Ziehl-Neelsen modifié
Obj. 100

Résultats des participants

L'ensemble des réponses transmises par les 965 laboratoires participants (1 à 3 réponses par laboratoire) ainsi que leur pourcentage respectif sont détaillés dans le tableau XI.

Pour rappel, les pourcentages de bonnes réponses obtenus lors des huit envois précédents d'un frottis de selles contenant des oocystes de *Cryptosporidium sp.* sont rapportés dans le tableau XII.

Tableau XI – Ensemble des réponses des 965 laboratoires participants.

STADE	NOM	% diagnostics de stade	% diagnostics d'espèce
Oocyste	<i>Cryptosporidium sp.</i>	74,3	89,5 soit 95% des 909 laboratoires ayant rendu un diagnostic
kyste		5,4	
sporocyste		1,5	
autres		1,7	
Non précisé		6,7	
divers/non précisés	microsporidies		1,2
divers/non précisés	<i>Cyclospora sp.</i>		0,8
Protozoaires divers			2,4
ABSENCE DE PARASITE			0,2
PAS DE REPONSE			0,9
EXAMEN TRANSMIS			4,9

Tableau XII - Bilan des neuf opérations de contrôle « oocystes de *Cryptosporidium sp.* » sur frottis de selles colorés (Col) ou non colorés (NCol).

Année de l'envoi	Nombre de laboratoires participants	Richesse de la selle parasitée *	Type de frottis	% de laboratoires ayant répondu :			
				« <i>Cryptosporidium</i> »	Parasites autres	« absence de parasite »	Pas de réponse ou examen transmis
2005	965	8 - 10	Col	89,5	4,4	0,2	5,8
2003	1290	1 - 3	Col	89,7	5,1	0,9	4,6
2001	1266	5 - 10	Col	88,5	4,7	0,9	6,6
1994	1404	1 - 4	NCol	75,4	1,2	4,8	18
1992	1086	1 - 3	NCol	75,5	1,2	7,3	16
1990	1118	1	NCol	66,5	4,4	10,1	20,5
1990	904	1 - 10	NCol	67,3	3,3	5,1	23,6
1988	1144	1 - 3	NCol	76	2	5,2	16,8
1986	3009	< 1	Col	81	3,4	1,3	14,4

* : nombre de champs au X100 pour trouver un oocyste

Commentaires

Le genre *Cryptosporidium* appartient à la famille des Cryptosporidiidae dans laquelle on distingue plusieurs espèces. Seules deux, semblent impliquées dans la cryptosporidiose humaine : *C. parvum* et *C. hominis*.

Parasites des entérocytes, ces coccidies provoquent des manifestations digestives dominées par une diarrhée qui peut être sévère et prolongée, donc menaçante chez les sujets fragilisés (enfants et surtout patients VIH+ avec un faible taux de CD4).

C'est la cause majeure des diarrhées chez les patients sidéens chez lesquels elle peut entraîner une perte de poids importante, compromettre leur état déjà précaire et provoquer des complications (cholangite, pancréatite ou pathologie respiratoire), probablement liées au degré d'immunodéficience.

La cryptosporidiose est cosmopolite, sa prévalence est différente selon que les sujets diarrhéiques sont immunocompétents (2-6 %) ou immunodéficients (12-14 % voire plus). Cette prévalence a cependant nettement diminué depuis l'introduction de la trithérapie des patients VIH+.

La contamination se fait par ingestion d'oocystes à partir de différentes sources : animal, homme, aliments tels que le lait, le jus de fruits, l'eau de boisson, les eaux de surface contaminées par les animaux d'élevage (grosses épidémies aux USA), etc...

Une contamination directe a été décrite chez les homosexuels (rapports ano-buccaux).

Le diagnostic biologique repose sur la mise en évidence des oocystes dans les selles, ou d'autres sites en fonction de la clinique.

A l'examen direct, les oocystes apparaissent comme des éléments arrondis, réfringents, mesurant 5 à 7 µm avec un cytoplasme granuleux et une tache sombre centrale ou excentrée représentant le corps résiduel.

En fait, il est relativement difficile d'en faire le diagnostic à l'examen direct (ressemblance avec les levures ou *Blastocystis hominis*). C'est pourquoi, on a recours à des techniques de coloration spécifiques. Parmi les nombreuses techniques utilisées, celle de Ziehl-Neelsen modifiée fait référence.

Les oocystes apparaissent colorés en rose fuchsia intense, sur fond bleu-vert, avec une paroi épaisse qui laisse un halo clair autour de l'oocyste ; l'intérieur contient les sporozoïtes nus colorés en brun foncé (il n'y a pas de stade sporocyste chez *Cryptosporidium*).

Le diagnostic peut également se faire par l'utilisation d'anticorps monoclonaux marqués à la fluorescéine ou par PCR.

Spontanément résolutive, la cryptosporidiose peut nécessiter un traitement symptomatique des sujets fragilisés (nourrissons, patients HIV+), ou une courte hospitalisation pour éviter un syndrome de malabsorption dû à la diarrhée.

Dans le frottis « ZURTAL », le fait qu'il s'agisse d'un frottis de selles coloré au Ziehl-Neelsen chez un patient sidéen oriente d'emblée la recherche.

Le diagnostic est facile, d'autant que les oocystes ne sont pas rares et qu'ils sont particulièrement bien colorés. Déjà au faible objectif (X 10), les éléments rose clair attirent l'œil, il suffit de passer à un plus fort grossissement pour observer les caractéristiques morphologiques spécifiques de *Cryptosporidium*.

La majorité des participants (90 %) ont répondu correctement pour le genre *Cryptosporidium*, néanmoins 15 % d'entre eux ont signalé des kystes, sporocystes ou n'ont pas précisé de stade. La connaissance du cycle de cette coccidie suffit à éviter ce genre de confusion.

10 % ont répondu : microsporidies, *Cyclospora* ou protozoaires divers.

Cyclospora cayetanensis se colore effectivement au Ziehl-Neelsen mais de façon non homogène et la couleur rose est plus sombre. De plus, les oocystes de *Cyclospora* sont plus grands (9 µm-10 µm).

Quant aux spores de microsporidies, elles ne sont pas observables sur un frottis de selles coloré au Ziehl-Neelsen et sont de toutes façons beaucoup plus petites (1,2 µm-3,5 µm).

En conclusion, *Cryptosporidium* est un protozoaire de la famille des coccidies qui touche essentiellement les patients immunodéprimés. Responsable d'un syndrome diarrhéique plus ou moins important, en fonction du degré d'immunodépression, on le retrouve dans les selles sous forme d'oocystes d'environ 5-7 µm se colorant en rose fuchsia par le Ziehl-Neelsen modifié et contenant des sporozoïtes nus de couleur plutôt brunâtre.

R. DAHAN-HIMY, Institut de parasitologie et de pathologie tropicale - Strasbourg.

4 – Echantillon DARMON

Définition de l'échantillon

Il s'agit d'une selle parasitée formolée.

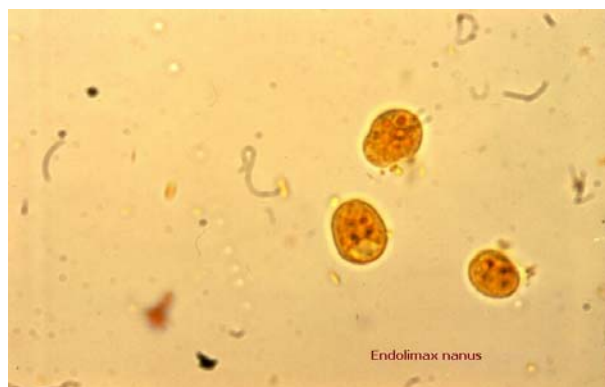
Le diagnostic des experts Dr J-C. PETITHORY (Gonesse), Dr G. GALEAZZI (Colombes), Dr J-F. PAYS (Paris), Dr R. DAHAN HIMY (Strasbourg) est le suivant :

Nom du parasite : *Endolimax nanus*

Stade : kyste

Richesse de la selle : 1 champ au X40 pour trouver un parasite

Les renseignements cliniques qui accompagnent l'échantillon sont les suivants : recherche systématique de parasites chez un cuisinier.



Trois kystes d'*Endolimax nanus* .
Coloration au lugol.
Obj. X100

Résultats des participants

L'ensemble des réponses transmises par les 929 laboratoires participants (1 à 3 réponses par laboratoire) ainsi que leur pourcentage respectif sont détaillés dans le tableau XIII.

Pour rappel, les pourcentages de bonnes réponses obtenus lors des neuf envois précédents d'une selle contenant des kystes d'*E. nanus* sont rapportés dans le tableau XIV.

Tableau XIII - Ensemble des réponses des 929 laboratoires participants.

STADE	NOM	% diagnostics de stade	% diagnostics d'espèces
Kyste	<i>Endolimax nanus</i>	47,0	48,7 soit 50,9% des 887 laboratoires ayant rendu un diagnostic
divers/non précisés		1,9	
divers/non précisés	<i>Entamoeba hartmanni</i>		6,6
divers/non précisés	<i>Entamoeba coli</i>		4,1
divers/non précisés	<i>Dientamoeba fragilis</i>		3,4
divers/non précisés	Autres amibes		3,2
Protozoaires divers			3,9
Helminthes divers			1,5
ABSENCE DE PARASITE			25,2
PAS DE REPONSE			1,4
EXAMEN TRANSMIS			3,1

Tableau XIV - Bilan des dix opérations de contrôle « Kystes d'*Endolimax nanus* ».

Année de l'envoi	Nombre de laboratoires participants	Richesse de la selle parasitée *	% de bonnes réponses « <i>E. nanus</i> »	% réponse « absence de parasite »
2005	929	1	48,7	25,2
2004	1261	1	51,9	27,5
1998	1225	2 - 5	49,6	22,8
1995	1224	1	50,0	31,4
1992	2406	1	52,0	19,7
1989	1139	1 - 5	39,8	18,9
1987	1123	< 1	61,5	6,1
1985	1029	1 - 3	49,2	11,9
1984	1024	1 - 2	46,0	15,3
1983	1016	0,5 - 2	27,1	31,3

* : nombre de champs Obj. X40 pour trouver un kyste

Commentaires

Anciennement dénommée *Endolimax nana*, cette amibe a changé de nom en 1987 sur décision de l'O.M.S. (International nomenclature of disease, Vol. II, part. 4, Parasitic diseases) pour devenir *Endolimax nanus*.

C'est une petite amibe cosmopolite et non pathogène, qui est le plus fréquemment rencontrée sous forme kystique dans les selles.

Ces kystes sont de petite taille : 3 à 7 µm de large et 7 à 12 µm de long. Ils sont peut réfringents, non granuleux, sphéroïdes plus ou moins allongés et optiquement vides. La paroi de ces kystes est mince et ils ne contiennent ni vacuole ni cristoalloïdes.

Les noyaux de type *Endolimax* sont visibles après coloration au Lugol ou bien, de préférence, au MIF. Ils présentent une membrane nucléaire épaisse, sans chromatine périphérique et un gros caryosome ovalaire, en croissant périphérique ou arrondi, et plus ou moins central.

Ils se visualisent à l'intérieur des kystes par 2 à 4 petits grains réfringents dans un halo clair. Dans les kystes mûrs, ils apparaissent groupés deux par deux à chaque pôle.

Dans l'ensemble la petite taille des kystes explique la difficulté à les identifier ce qui a été le cas ici pour d'assez nombreux participants.

Le principal diagnostic différentiel est à faire avec les kystes d'*Entamoeba hartmanni*, mais leur structure nucléaire de type entamibe (caryosome central et couronne périphérique de chromatine) permet de les différencier.

Quant aux arthrosporés (*Geotrichum* en particulier), ils présentent une paroi à double contour épaisse et réfringente, alors que la coque des kystes d'*Endolimax nanus* est mince et peu visible.

Il est à noter qu'*Endolimax nanus* est souvent associée à *Entamoeba coli*. Sa présence témoigne de l'existence d'une contamination féco-orale.

P. JOUSSERAND, Centre Hospitalier, Laboratoire de Parasitologie - Gonesse.