

QUELQUES TECHNIQUES DE
PROTOZOOLOGIE PARASITAIRE

par Jean-Louis FREZIL
Elève ORSTOM
2e année - Parasitologie.

RAPPORT DE STAGE

A. 09. 69

19 NOV. 1969

O. R. S. T. O. M.
Collection de Référence
n°/3534

I n t r o d u c t i o n

Nous avons voulu consigner dans ce rapport les techniques originales que nous avons apprises au cours de nos différents stages, qui ont eu lieu successivement :

Chez Mr. le Pr. BIGUET de la Faculté de Médecine de Lille

Chez Mrs. les Prs. GRENIER et LAMY de l'Institut Pasteur
de Paris

Chez Mr. le Pr. RIOUX de la Faculté de Médecine de Montpellier

Chez Mr. le Pr. CHABAUD du M.N.H.N. de Paris

et à la London School of Hygiene and Tropical Medicine de
Londres.

Nous remercions tous ces Professeurs, ainsi que leurs collaborateurs, de l'accueil qu'ils nous ont réservé dans leurs laboratoires et de nous avoir communiqué leur savoir avec autant de gentillesse.

Ce rapport comprend deux parties : l'une est consacrée aux techniques purement Protozoologiques et l'autre à des techniques d'immunologie, que nous avons apprises dans un laboratoire spécialisé dans l'étude des Vers, mais qui peuvent également être appliquées à la Protozoologie.

Protozoaires parasites du sang

1. Introduction et systématique

Les Protozoaires parasites du sang des Vertébrés se classent de la façon suivante :

A - Sous Phylum SPOROZOA

Classe Telosporozoa

Sous Classe Coccidia

Ordre Eucoccida

Sous Ordre Adeleina

Eimeriina

Haemosporina

- Adeleina : 3 Familles d'"Hemogregarines"

- F. Haemogregariniidae - genre Haemogregarina

- F. Karyolysidae - genre Karyolysus

- F. Hepatozoidae - genre Hepatozoon.

- Eimeriina: 1 seule Famille d'"Hemogregarine"

- F. Lankesterelliidae - genre Schellackia

genre Lankesterella

-- Haemosporina : 2 super Familles :

S.F Plasmodioidea et S F Babesioidea

- S F Plasmodioidea :

Famille Plasmodiidae - genre Plasmodium

Famille Haemoproteidae : g. Haemocystidium

g. Simondia

g. Haemoproteus

g. Parahaemoproteus

g. Polychromophilus

g. Nycteria

g. Hepatocystis.

Famille Leucocytozoïdæ : g. Leucocytozoon

g. Akiba

g. Saurocytozoon.

- S F Babesioidea :

Famille Theileridae - genre: Theileria

g. Cytanxoon

g. Haematoxenus

Famille Babesiidae - genre : Babesia

g. Nuttalia

g. Echinozoon.

B - Sous Phylum SARCOMASTIGOPHORA

Super Classe Mastigophora

Classe Zoomastigophorea

Ordre Kinetoplastida

Famille Trypanosomatidae

genre Leishmania

genre Trypanosoma.

- Comme nos stages ont été effectués dans des laboratoires de Protozoologie humaine, les Protozoaires d'intérêt médical auront une place prépondérante dans ce rapport.

Nous allons étudier successivement les diverses techniques se rapportant à chaque groupe, mais auparavant nous allons donner les techniques de coloration du sang qui sont communes à tous ces Protozoaires.

11. Coloration au Giemsa

La coloration du sang au Giemsa est depuis longtemps reconnue comme étant la meilleure. Cette technique possède diverses variantes ; nous en avons choisi une qui tend à être universellement appliquée aujourd'hui, du fait de sa simplicité et de la qualité de ses résultats.

- Frottis de sang

- Effectuer le frottis et sécher rapidement en agitant vigoureusement la lame.
- Verser l'eau distillée tamponnée dans la boîte de Laveran.
- Ajouter 8% de Giemsa et mélanger.
- Fixer le frottis quelques secondes à l'alcool méthylique.
- Sans laver, placer la lame, frottis au-dessous, dans la boîte.
- Laisser colorer 50 mn.
- Rincer 1 seconde à l'eau courante et sécher en position verticale.

- Goutte épaisse

- Préparer le colorant comme précédemment.
- Sans fixer, placer la lame, goutte épaisse au dessous, dans la boîte.
- Laisser colorer 30 mn.
- Rincer à l'eau courante 1 seconde, en prenant garde à ne pas décoller la goutte épaisse.
- Laisser sécher en position verticale.

- Appositions d'organes

- Prélever un fragment d'organe contenant les Protozoaires (ex : râte ou foie)
- Eponger le sang sur papier filtre, puis effectuer les appositions sur la lame
- Préparer le colorant et fixer comme pour un frottis, mais laisser colorer 1 heure.
- Laisser sécher.

Les frottis, goutte épaisse et appositions ainsi préparés peuvent être observés à l'immersion ; l'huile d'immersion est ensuite éliminée par rinçage au xylène.

Pour conserver les lames et les protéger on peut les monter à l'huile de cèdre où mieux, à l'Euparal vert.

- Conditions de réussite

- L'eau tamponnée doit avoir un Ph 7,2 - 7,4

Formule : Phosphate de Na disodique = 3 g

Phosphate de K monopotassique = 0,65 g

Eau distillée = 1 l.

Au lieu d'eau tamponnée, on peut éventuellement utiliser de l'eau d'Evian.

- Utiliser des Giemsa de marque Revector ou Merck
- Après coloration, ne pas rincer plus d'une seconde ; un rinçage prolongé décolore.
- Ne pas sécher la lame sur une source de **chaleur**.
- Ne jamais monter au Baume du Canada.
- Si la lame est trop colorée, éclaircir dans l'eau tamponnée (1 mn maximum).

Conservation des frottis non colorés

Il vaut mieux colorer les frottis aussitôt après leur préparation ; mais, le cas échéant, on peut les conserver indéfiniment, sans colorer, dans des récipients rigoureusement hermétiques, contenant des produits dessiccateurs tels que : Ca Cl_2 anhydre, Silica Gel ou P2 O5.

De tels frottis sont ensuite colorés par la méthode au "Giemsa - salé"

- Fixer alcool méthylique.
- Placer dans un mélange : 2 cc eau tamponnée 7,2
7 cc eau salée 0,85%
1 cc Giemsa
- Laisser colorer 60 mn
- Rincer 1 seconde et sécher.

Cette longue conservation des frottis avant la coloration présente quelques inconvénients pour les parasites ; elle détruit notamment les grains de Schuffner et les taches de Maurer chez les Plasmodium.

III. Plasmodium

Les Protozoaires appartenant à ce genre se trouvent chez les Vertébrés situés au-dessus des Batraciens.

A titre d'exemple nous allons étudier les techniques d'entretien et d'étude d'une souche de Plasmodium de Rongeurs, puis nous indiquerons les quelques variantes particulières à l'étude des espèces aviaires et humaines.

A - Plasmodium de Rongeurs

1. Isolement de la souche

Le sang des *Thamnomys* sauvages est étudié sur goutte épaisse, puis sur frottis.

Lorsqu'il est infecté, l'animal l'est le plus souvent par deux espèces appartenant l'une au groupe Berghei et l'autre au groupe Vinckei - Chabaudi.

Le problème posé est tout d'abord de séparer ces deux espèces, puis ^{d'entretenir} chaque souche sur des Rongeurs de laboratoire.

La séparation des souches est assez aisée car *P. berghei* infecte facilement les rats et hamsters au premier passage et non les souris ; tandis que *P. vinckei* infecte les souris et non les rats et hamsters.

On peut aussi installer une souche sur souris à partir d'*Anophèles* sauvages infectés.

Pour cela les glandes salivaires positives sont écrasées entre lame et lamelle ; puis la lamelle est retirée, les sporozoïtes sont prélevés dans une goutte de Ringer et inoculés en injection intraveineuse

2. Splénectomie

La splénectomie diminue la réponse immunologique de l'hôte et favorise l'implantation de la parasitémie. On a donc intérêt à splénectomiser les animaux pour installer les souches

récalcitrantes soit à partir du Moustique, soit à partir du sang d'un autre Vertébré.

Technique :

- Endormir l'animal à l'éther
- Le placer sur le flanc droit et fixer les pattes avec du sparadrap.
- Placer sa tête dans un flacon à large ouverture contenant un coton imbibé d'éther.
- Raser le ventre et le flanc gauche.
- Inciser transversalement au-dessus du niveau de la rate.
- Sortir la rate, ligaturer sa base et sectionner.
- Recoudre la couche musculaire profonde, puis la peau (avec une aiguille à coudre et du fil ordinaire)
- Vaporiser sur la plaie un produit antibiotique.

3. Passage Rongeur - Rongeur.

Avant d'effectuer le passage, il est nécessaire de s'assurer que le sang du donneur contient de nombreux parasites.

- Passage intraperitonéal :

- à la pipette : Prélever une goutte de sang à la queue du rongeur avec une pipette à double effilure et insuffler dans le péritoire du receveur.

- à la seringue : Prélever le sang, à la pipette, dans le sinus sanguin de l'oeil ; le rejeter dans une coupelle contenant une goutte d'héparine et quelques gouttes de sérum physiologique.

Aspirer à la seringue et injecter dans le péritoine.

- Passage intraveineux

Même préparation que pour passage intrapéritonéal à la seringue mais injection intraveineuse.

Chez la souris, injecter dans l'une des quatre grosses veines de la queue ; pour faciliter l'opération, placer au préalable la queue de la souris dans l'eau chaude pour faire gonfler les veines.

Si le passage a été effectué à partir d'un animal mort, injecter dans la fesse du receveur 0,1 cc de Spécilline G (Rhône Poulenc) injectable (100 000 U) pour éviter l'infection.

4. Etude du Plasmodium dans le sang

La recherche des Parasites dans le sang doit débiter 3 jours après le passage.

L'étude des divers stades est faite sur frottis colorés au Giemsa.

Selon le cas, on peut apporter quelques modifications à la coloration classique pour faire ressortir certaines structures.

- Coloration des réticulocytes

- Préparer une solution saturée de Bleu de Crésyl brillant dans l'alcool à 100°.
- Tracer sur une lame un cadre au crayon gras ; y déposer une goutte de la solution saturée et laisser sécher.
- Mettre une goutte de sang dans le cadre, touiller légèrement

avec le coin d'une lame rodée ; reprendre le sang et effectuer un frottis sur une autre lame

- Fixer alcool méthylique et colorer comme un frottis ordinaire.

Cette coloration concerne surtout *P. berghei* qui parasite principalement les réticulocytes.

- Rougeoiement des hématies parasitées

Opérer soit avec de l'eau d'Evian, soit avec de l'eau distillée tamponnée à 7,4 de la façon suivante :

- Teinter l'eau distillée de quelques gouttes de bromothymol (vire à 7,4)
- Si jaune = acide, ajouter quelques gouttes de carbonate de Lithium jusqu'à bleu pâle permanent.
- Fixer et colorer normalement.

- Eperythrozoon coccoides

L'observation du sang des souris infectées peut révéler la présence d'Eperythrozoon coccoides, parasite d'affinité incertaine, se présentant sous forme de petits disques libres ou accolés aux hématies.

Ces organismes empêchent le développement de *P. berghei*.

Pour les éliminer, pratiquer une injection sous cutanée de Novarsenobenzol à raison de 125 mg par kilog.

- Etude et coloration d'une exflagellation

Placer une goutte de sang contenant les gamétocytes entre lame et lamelle et observer au 40ième.

Au bout d'un certain temps, variable selon les espèces, et que l'on doit justement déterminer, on voit les gametocytes mâles s'agiter frénétiquement et émettre les flagelles. Observer alors à l'immersion.

- coloration : - Poser une goutte de sang au bord d'une lame rodée et mettre ensuite en chambre humide.

- Attendre le nombre de minutes nécessaire, donné par la première observation et effectuer le frottis sur une lame sèche.

- Fixer et colorer comme un frottis ordinaire.

5. Infection des Anophèles

Les gamétocytes mâles et femelles apparaissent généralement le quatrième jour après le passage. Avant d'infecter les moustiques il faut s'assurer que la proportion de ^{gametocytes} mâles soit satisfaisante (environ 10 mâles pour 100 leucocytes).

Pour augmenter les chances de réussite, on utilisera de préférence des Anophèles âgés de 6 à 9 jours ainsi que des souris du 3ème passage à partir de l'inoculation des sporozoïtes.

Ne pas oublier que la production des gamétocytes décroît en fonction du nombre des passages.

- La souris infectée est fixée sur une planche avec du sparadrap et son ventre est rasé ; puis elle est placée dans une cage contenant environ 400 moustiques.

On laisse les moustiques se gorger toute la nuit, puis on élimine les non gorgés en les capturant avec un tube à essai contenant un coton imbibé de chloroforme.

6. Etude du Plasmodium chez l'Anophèle

- Ookinète : Prélever sur lame l'estomac d'un Anophèle gorgé depuis 18 à 20 heures.

Le rompre et le dilacérer dans une petite goutte de Ringer.

Observer entre lame et lamelle à l'immersion.

Si l'examen est positif, recommencer l'opération avec un autre moustique et faire un frottis très épais que l'on colorera au Giemsa pendant 30 mn.

Oocystes

Dès le 3^e jour après le repas infectant on peut observer les oocystes sur la surface de l'estomac.

Ils atteignent leur complet développement en 10 ou 11 jours, puis ils éclatent et libèrent les sporozoïtes qui gagnent les glandes salivaires.

Pour suivre leur développement on pourra, jour après jour, colorer en totalité l'estomac des moustiques à l'Hematoxyline de Ehrlich ou bien effectuer des coupes histologiques soit de l'estomac, soit du moustique entier.

Coloration de l'intestin du moustique à l'Hematoxyline de Ehrlich

- Retirer l'intestin et fixer 24 h. au formol salé.
- Placer ensuite 24 h. dans l'alcool à 70°.
- Colorer 10 mn dans une solution d'Hematoxyline de Ehrlich (1 part) et d'eau (3 part)
- Bleuir à l'eau courante - 10 mn.
- Puis rincer à l'alcool acide (99 cc alcool 70° + 1 cc HCl) jusqu'au rouge
- Bleuir à nouveau à l'eau courante - 10 mn.
- Deshydrater : 30 mn dans l'alcool absolu
15 mn dans le xylène
- Monter au Baume du Canada.

Sporozoïtes

Lorsque l'estomac de l'Anophèle présente des oocystes mûrs, les glandes salivaires sont prélevées et observées entre lame et lamelle dans une goutte de Ringer ou de sérum physiologique.

Si les sporozoïtes sont présents, écraser les glandes salivaires et étudier à frais ; puis retirer la lamelle, laisser sécher. Fixer et colorer 30 mn au Giemsa, comme pour un frottis.

7. Dissection de masse

Lorsque les moustiques d'une cage sont infectés, il faut prélever les sporozoïtes des glandes salivaires et les injecter aux souris.

L'inoculation des sporozoïtes permet de rajeunir la souche et d'étudier les stades exoerythrocytaires qui ne se produisent pas au cours des passages souris-souris.

Technique : - Placer dans la glace pilée un tube à essai et un flacon de 199 (ou de Ringer)

- Dissequer, sur lame de matière plastique, les anophèles par groupe de 5, dans une goutte de 199.

- Aspirer les glandes salivaires à la pipette et les placer dans le tube.

- Lorsque la dissection est terminée, broyer les glandes salivaires

- Injecter très lentement un demi cc intraveineux à chaque souris.

(Proportion adéquate : 15 paires de glandes pour un demi cc de liquide physiologique).

Au lieu d'inoculer les sporozoïtes dans le sang, on peut aussi les injecter directement dans un lobe du foie, après avoir ouvert l'animal.

Le milieu de culture 199 peut être acheté soit à l'Institut Pasteur soit aux Glasco Laboratories Ltd Greenford-England.

8. Etude du cycle exoerythrocytaire primaire

Après avoir inoculé les souris avec les sporozoïtes, il est nécessaire de déterminer la durée du cycle exoerythrocytaire primaire, et d'effectuer des coupes de foie pour rechercher et étudier les schizontes primaires.

Pour cela on injectera toutes les 2 heures du sang de la souris infectée à une souris vierge, à partir de 50 heures jusqu'à 70 heures après l'inoculation.

La première souris du passage présentant des Plasmodium dans le sang donnera l'heure d'éclatement des schizontes primaires.

- Dans le même temps, (50 - 70 h) on effectuera 3 ou quatre biopsies de foie et on fixera aussitôt le matériel prélevé au Carnoy.

Après inclusion à la paraffine, les coupes seront colorées au Giemsa - colophane.

Biopsie de foie - Endormir l'animal à l'éther.

- Fixer la souris sur le dos avec du sparadrap.
- Raser le ventre
- Inciser transversalement, du côté droit, sous la cage thoracique.
- Sectionner et prélever un lobe de foie.
- Coudre d'abord la couche musculaire profonde, puis la peau avec une aiguille et du fil ordinaire.
- Vaporiser un antibiotique.

On a intérêt, au cours de l'opération, à effectuer des frottis, gouttes épaisses et appositions.

9. Conservation des souches aux basses températures

Cette technique est très intéressante car elle permet de conserver des souches de Plasmodium pendant très longtemps, sans avoir à effectuer continuellement des passages.

On congèlera de préférence le sang des souris de deuxième passage après l'inoculation des sporozoïtes, pour avoir la souche dans toute sa fraîcheur.

Ce procédé de conservation par le froid s'applique également aux autres Protozoaires parasites du sang (Babesia, Trypanosomes, etc.).

Technique

- Préparer un mélange de glycerine pure à 10% dans du sérum physiologique.

- Prélever le sang au coeur avec une seringue rincée au préalable avec une goutte d'héparine.

- Mélanger dans la seringue une quantité égale de sérum physiologique - glycérine et de sang.

- Répartir dans des ampoules de verre de 2 cc à raison de 1 cc par ampoule.

- Sceller et conserver dans la carboglace (- 75°) ou dans l'azote liquide (- 195°)

- Au besoin, décongeler à la température du laboratoire et inoculer à d'autres souris.

10. Giemsa pour coupes histologiques

Cette méthode a l'avantage de donner aux Protozoaires, dans les coupes de tissus, des couleurs identiques à celles obtenues sur les frottis de sang. Elle convient tout particulièrement à l'étude des schizontes exoerythrocytaires.

On peut également l'employer sur des coupes d'insectes infectés avec des Plasmodium, Babesia, Leptomonas ou Trypanosoma.

On évitera le ratatinement des formes flagellées en tuant l'insecte dans des vapeurs d'acide osmique, avant de le fixer au Carnoy.

- Fixation : - Préparer de petites pièces et les fixer pendant 3 h au Carnoy, fraîchement préparé :
 - 60 cc alcool 100
 - 30 cc chloroforme
 - 10 cc acide acétique.

Si les pièces sont très petites (ex : estomac de moustique), mettre un grain d'éosine dans le fixateur pour pouvoir les repérer plus facilement par la suite.

Pour les gros insectes, on aura intérêt à percer quelques trous dans le thorax, avec une aiguille fine, pour faciliter la pénétration du fixateur.

Deshydratation :

Placer dans l'alcool butylique :

1er bain : demi heure

2ème et 3ème bain : 24 h (au besoin on peut conserver longtemps les pièces dans le 3ème bain).

Coupes : Mettre quelques heures dans le butyparaffine, puis inclure dans la paraffine.

Effectuer les coupes et les coller à l'albumine glycinée.

Déparaffiner et rehydrater par 3 bains de Toluène, 3 bains d'alcool à 100 ; puis l'eau ordinaire.

Coloration

Pour préparer le colorant, mélanger :

- 10 cc eau tamponnée (7,2)
- 1 cc Giemsa
- 1 cc acétone
- 1 cc alcool méthylique.

Colorer 1 h dans des cuves de Laveran en porcelaine, coupes en dessous.

Puis placer dans l'eau ordinaire. Un bain prolongé (24h) fait ressortir les bleus, mais n'est pas indispensable.

Différencier^(10-15s) dans un mélange de 150 gr de colophane dans 1 l d'acétone :

Lorsque le rouge commence à apparaître, stopper la différenciation en rinçant avec une solution de 70% acétone + 30% toluène pour chasser l'acétone et monter à l'Euparal vert.

Variante : On peut aussi préparer le colorant avec 10 cc d'eau distillée, colorer pendant 2 h ; puis placer^{les} lames 15 s dans 50 cc d'eau distillée acidifiée avec une microgoutte d'acide acétique glacial.

Différencier et monter normalement.

Si on a utilisé d'autres fixateurs que le Carnoy, tel que le formol - salé, il est généralement nécessaire de laisser colorer 24 h au lieu d'1 h.

- Comment colorer à nouveau une coupe déjà montée

Pour retirer la lamelle et rehydrater, on aura le choix entre deux procédés :

1. Plonger la lame dans l'essence d'Euparal.

Lorsque la lamelle est décollée, revenir à l'eau en passant successivement par le xylol, l'alcool 100 et l'alcool 70.

2. Décoller la lamelle dans un bain de toluène.

Dissoudre l'Euparal avec le différenciateur colophane acetone.

Eliminer la colophane en plongeant dans l'acetone - toluène.

Puis placer dans le toluène pur et rehydrater.

- Les lames ainsi traitées seront colorées au Giemsa comme d'habitude.

- Hydrolyse :

L'hydrolyse élimine le cytoplasme et permet de mieux observer les structures nucléaires.

Elle est pratiquée sur des coupes normalement colorées, que l'on a déjà observées, mais dont on veut approfondir les détails.

Avant l'hydrolyse il faudra donc le plus souvent retirer la lamelle et rehydrater.

Technique :

- Placer les lames 6 à 8 mn dans une solution Normale d'HCl à 58°.

(HCl Normal = 82,5 cc d'acide pur pour 1 l d'eau)

- Rincer 5 mn à l'eau courante.
- Colorer normalement au Giemsa pour coupes.

En fin de coloration la coupe doit paraître rose.

B - Plasmodium d'Oiseaux

Chacun des 4 sous genres de Plasmodium d'Oiseaux possède des espèces parasites soit de Passereaux, soit de Gallinacés : les souches seront donc entretenues, au laboratoire, sur Canaris ou sur Poussins.

Les techniques d'étude sont pratiquement identiques à celles que nous avons déjà vues et ne diffèrent que par quelques points de détail liés à l'anatomie de l'hôte Vertébré.

- Pour effectuer les frottis, on se procurera une goutte de sang en sectionnant un ongle d'une patte.

- Pour les passages, on prélèvera le sang, à la seringue héparinée, soit au coeur, soit aux grosses veines situées sous l'aile ou sur le côté du genou.

Les inoculations seront intrapéritonéales ou intravei-
neuses ; ces dernières^{se} feront à la jugulaire, que l'on mettra en évidence en mouillant les plumes du cou.

- Pour infecter les Aedes ou autres Moustiques : on rasera le ventre de l'oiseau ; puis on le placera dans un grillage métallique que l'on ajustera aux dimensions de son corps de telle sorte qu'il ne puisse faire aucun mouvement, sinon respirer. On l'introduira alors dans la cage de Moustiques.

C - Paludisme humain

1. Diagnostic microscopique

Les malades présentant une franche attaque de Paludisme ne posent généralement pas de problème de diagnostic ; les parasites étant en nombre assez grand pour être détectés sur goutte épaisse et frottis après 2 ou 3 minutes d'observation. Cependant dans le cas de *P. falciparum*, les parasites sont parfois difficiles à trouver, surtout si le malade a une tierce classique ; en effet, au cours de la crise, les parasites vont dans la circulation périphérique pour terminer leur schizogonie ; il faudra donc effectuer plusieurs examens à quelques heures d'intervalle.

Dans les régions à Paludisme, lorsqu'un malade arrivera à l'hôpital dans un état comateux, pouvant correspondre à une forme pernicieuse, on commencera le traitement avant même d'avoir les résultats du diagnostic microscopique ; la guérison étant fonction de la rapidité d'intervention.

Les frottis et gouttes épaisses sont effectués avec du sang prélevé soit à l'extrémité du doigt, soit au lobe de l'oreille. La peau est nettoyée, puis, lorsqu'elle est bien sèche,

on pique avec un vaccino-style, on élimine la première goutte de sang et on prépare les lames avec les suivantes.

Pour faire ressortir les grains de Schuffner ou de Maurer, on réduira au maximum le temps de la fixation à l'alcool méthylique (moins d'une seconde).

Pour les enquêtes épidémiologiques on peut centrifuger le sang, préalablement hépariné ; puis, effectuer les frottis à partir de la couche située juste au-dessous du niveau de séparation sang-sérum, où sont concentrés les parasites. La valeur de cette méthode est cependant controversée car les jeunes formes, notamment les petits "anneaux" de *P. falciparum*, ne sont pas sensibles à la centrifugation.

Lorsqu'on aura à examiner un grand nombre de gouttes épaisses on pourra employer la méthode de Field.

Méthode de Field

Préparer :

Colorant A : Bleu de Méthylène (Médicinal)....	0,8 g
Azur I.....	0,5 g
Eau distillée tamponnée.....	500 cc

Colorant B : Eosine.....	1 g
Eau distillée tamponnée.....	500 cc

Eau tamponnée : $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$	5 g
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	6,25 g
Eau distillée.....	500 cc

Coloration :

- Plonger la lame 2 secondes dans A.
- Laver 10 secondes dans un bol d'eau tamponnée.
- Agiter la lame pour éliminer l'excès d'eau.
- Plonger la lame 1 seconde dans B
- Laver 10 secondes dans l'eau tamponnée.
- Laisser sécher verticalement.

Notes pratiques :

- Après la préparation des colorants attendre 24 h et filtrer avant l'emploi.
- Tester les colorants sur une goutte épaisse connue avant l'emploi.
- Colorer les gouttes épaisses dans les 24 h.
- Examiner les bords de la goutte épaisse.

2. Coupes anatomo-pathologiques

Pour étudier l'action des parasites dans les tissus, on peut effectuer des coupes histologiques de cerveau, rate et foie.

Le matériel doit être prélevé et fixé moins de trois heures après la mort du patient.

Si l'on est intéressé d'avantage par la structure du Protozoaire, on fixe au Carnoy et colore au Giemsa.

Si l'on veut étudier les lésions, il vaut mieux fixer au formol salé et colorer à l'Hematoxyline de Ehrlich, car le Carnoy provoque la lyse des globules rouges.

Hématoxyline de Ehrlich - éosine

- Fixer les tissus 24 h au moins, 7 jours au plus dans le Formol salé (10 cc formol du commerce et 90 cc d'eau salée à 8,5g/l)
Après la fixation on peut conserver longtemps dans l'alcool à 70°
- Deshydrater, inclure, effectuer les coupes et rehydrater.
- Recouvrir la lame d'Hématoxyline de Ehrlich et chauffer 5 mn au-dessus d'une lampe, puis laisser colorer 15 mn à température ordinaire.
- Rincer à l'eau courante (alcaline) jusqu'au bleu (au moins 2 mn)
- Différencier rapidement (environ 5 s) à l'alcool acide, jusqu'au rouge.

(HCl à 1/2% dans l'alcool 70°).

- Bleuir à nouveau à l'eau courante et observer au microscope.
Si coloration non satisfaisante, recommencer..
- Colorer 2 mn à l'éosine à 1%
- Rejeter l'éosine et rincer 2 mn à l'eau courante..
- Deshydrater et monter au Baume du Canada.

- Colorant : Hématoxyline2g; alcool absolu = 100 cc

Eau distillée 100 cc

Glycérine 100 cc

Acide acétique glacial 10 cc

Alun de Potassium 3 g (ou en excès)

Dissoudre l'Hématoxyline dans l'alcool, puis ajouter l'eau. Mettre l'alun et agiter jusqu'à dissolution. Compléter avec les autres produits.

Boucher le flacon d'une gaze et oxyder par exposition à l'air et à la lumière en agitant tous les jours.

Transvaser dans une autre bouteille, bouchée normalement et conserver dans un endroit chaud 3 ou 4 semaines. Agiter de temps en temps.

La solution reste stable plusieurs années.

Résultat : les noyaux sont colorés en bleu.

3. Coupes histologiques d'Anophèles entiers

- Tuer l'insecte aux vapeurs d'acide osmique
- Fixer 1 à 2 h au Carnoy ou au Schaudinn 5-24 h.
- Laisser 12 h dans l'alcool à 90°.
- Puis alcool absolu : 2 bains d'1 h.
- Mettre dans le mélange benzoate de méthyle + 1% de celloidine jusqu'à ce que l'insecte coule (12 à 24 h).
- 2 bains d'1 h dans le benzène.
- Inclure comme d'habitude après plusieurs bains de paraffine.
(Si l'inclusion est faite dans un verre de montre, ne pas oublier de l'enduire d'albumine de Mayer).

Les coupes pourront être colorées soit au Giemsa, soit à l'Hematoxyline de Ehrlich, soit au Feulgen. (hydrolyse = 8 mn). Cette technique de double inclusion est valable pour tous les insectes ainsi que pour les tissus de Vertébrés.

Bibliographie.

- Laboratory technique for the study of Malaria
P. Shute and M. Maryon - 1966. ...
J. and A. Churchill Ltd.
 - Malaria Parasites - P C C Garnham. 1966. Blackwell.
 - Notes L.S.T.M.H.
-

IV - Babesia - Haemogregarines

Les techniques de coloration, tant chez le Vertébré que chez le vecteur restent les mêmes que pour les Plasmodium.

Les passages sur animaux de laboratoire se pratiquent aussi de la même façon.

Rappelons simplement que, dans le cas des Babesia, il faut que le Vertébré donneur présente de nombreuses formes de division pour que le passage "prenne".

V - Trypanosomes

Les Protozoaires du Genre Trypanosoma peuvent se rencontrer dans les 5 classes de Vertébrés ; cependant, seules, les espèces affectant les mammifères supérieurs peuvent être pathogènes et ont une grande importance médicale et vétérinaire.

Nous allons donc donner quelques techniques concernant ces dernières.

1. Etude et entretien des souches sur animaux de laboratoire

La plupart des Trypanosomes de la section Stercoraria sont étroitement spécifiques et, pour cela, ne peuvent s'entretenir sur les animaux de laboratoire. Seuls T.cruzi et T.rangeli qui peuvent infecter des hôtes très variés dans la nature sont susceptibles d'être entretenus sur Rongeurs.

Par contre, tous les Trypanosomes de la section Salivaria (à part T.suis et T.uniforme) peuvent passer sur animaux de laboratoire.

La liste de ces hôtes artificiels s'établit comme suit :

T. vivax	-	Rats (difficile)
T. congolense	-	Rongeurs (Toutes les souches ne sont pas infectantes)
T. simiae	-	Cercopithèques (très pathogènes) Lapins splenectomisés.
T. brucei	-	Rongeurs, lapins, singes
T. rhodesiense	-	id
T. gambiense	-	Rats (en intratesticulaire) Rhesus et Cricetomys.

T. evansi	-	Rongeurs
T. equinum	-	Rongeurs
T. equiperdum	-	Lapins (intratesticulaire) chiens.

Pour effectuer les passages, on prélève une goutte de sang à la queue d'une souris infectée avec une pipette à double effilure et on l'injecte dans le péritoine d'une souris neuve

Bien que les souches, une fois installées, soient assez faciles à entretenir ; ce système de passages répétés présente de nombreux inconvénients ; ainsi, au bout de quelques passages, les souches de Trypanosomes du groupe Brucei deviennent monomorphiques et perdent leur pouvoir infectant pour les Glossines.

Colorations : Les Trypanosomes se colorent sur frottis, au Giemsa, pendant 30 mn, avec de l'eau tamponnée à pH = 6,8.

49 cc de M de Na ₂ HPO ₄		+ 900 cc eau distillée.
15		
51 cc de M KH ₂ PO ₄		
15		

La technique au "Giemsa-salé" (pH = 7,2 - 1 h) donne également d'excellents résultats ; en particulier elle permet de voir nettement départ du flagelle du kinetoplaste, et fait admirablement ressortir les grains de volutine.

Précisons que dans le cas de T.cruzi, les frottis doivent être très épais, car ces Protozoaires sont très fragiles et un étirement excessif du sang les endommage fortement.

Pour ce dernier Trypanosome, on pourra également étudier le développement des pseudokystes dans le coeur du Vertébré :

- Fixer un morceau de coeur au Formol salé et colorer à l'Héματοxyline de Ehrlich, ou bien fixer au Carnoy et colorer au Giemsa.

2. Infection des Vecteurs.

A - Salivaria : groupe brucei

Les Glossines sont conservées dans de petites cages formées par un parallélogramme de fil de fer sous tendant un tissu à mailles très lâches. Le cobaye infecté, représentant un premier passage de préférence, aura l'abdomen rasé, puis sera endormi au Nembutal (1 cc pour 2,250 kg de poids, intrapéritonéal ou intraveineux).

La cage de Glossines sera posée sur la partie rasée.

Les Glossines s'infectent le premier jour après leur éclosion et leur pourcentage d'infection décroît ensuite pour être pratiquement nul le 4e jour, car la membrane péritrophique est alors complètement développée et empêche les Trypanosomes de poursuivre leur cycle.

Il est donc très important d'utiliser des Glossines nées le jour même, que l'on obtiendra facilement par l'éclosion artificielle : lorsque on aura eu 25% d'éclosions naturelles dans un même lot de pupes, on pourra faire éclore artificiellement les pupes restantes en découpant délicatement une calotte

autour du pôle arrondi et en pressant légèrement pour faire sortir la mouche.

Le pourcentage d'infection sera plus élevé si les pupes utilisées ont été conservées à 25 - 28°C ; ce pourcentage d'infection excèdera rarement 10%, ce qui constitue tout de même un bon résultat si l'on considère que dans les conditions naturelles seulement 1 à 3% des mouches sont infectées.

Les Trypanosomes pourront être observés entre le 6e et le 10e jour dans le proventricule et entre le 30e et le 35e jour dans les glandes salivaires.

Il suffira de nourrir des Glossines porteuses de Trypanosomes métacycliques sur un animal neuf pour déclencher une nouvelle infection.

Le sang de l'animal positif sera congelé pour conserver la souche, puis on pourra faire des passages, des mises en culture, ou infecter à nouveau des Glossines.

Les Trypanosomes chez le Vecteur seront colorés au Giemsa, sur frottis ou étalements, 30 mn à pH 6,8.

Les coupes de Mouches seront effectuées et colorées de la même façon que les coupes d'Anophèles.

B - Stercoraria : T. cruzi

Les Triatomes (T. infestans, Rhodnius prolixus) sont élevés dans des cylindres de verre contenant un carton plié plusieurs fois afin de simuler des fissures, bouchés d'un côté par

un liège, et de l'autre par une gaze tendue.

Pour les infecter, il suffira de poser la cage sur un animal (ex : cobaye) porteur de Trypanosomes.

L'infection pourra avoir lieu même si l'on utilise une vieille souche, car le pouvoir infectieux de T.cruzi, à l'opposé du groupe brucei, n'est pas altéré par de nombreux passages sur animaux de laboratoire.

De même, l'âge des Triatomes utilisés n'est pas important car ils peuvent s'infecter à tous les stades (6 stades larvaires avec un repas de sang à chaque stade).

Après 8 à 20 jours, on dissequera les Triatomes et on cherchera les Trypanosomes dans l'intestin postérieur. On pourra alors confectionner des frottis que l'on colorera au Giemsa et infecter d'autres mammifères en inoculant intraperitonéalement quelques Trypanosomes prélevés avec une goutte de sérum physiologique.

L'infection pourra aussi se produire chez le Vertébré si on effectue des scarifications sur l'abdomen et si on y dépose^{des} excréments prélevés dans l'intestin postérieur des Triatomes et contenant des Trypanosomes métacycliques.

3 - Conservation des Trypanosomes par congélation

On peut utiliser le même procédé de conservation dans des ampoules scellées que nous avons indiqué pour les Plasmodium; mais en agissant ainsi, le sang d'une souris donnant environ

deux ampoules, la souche ne peut être utilisée que deux fois. Il vaut donc mieux employer la méthode de Cunningham, Lumsden et Webber (Experimental parasitology, 14, 280-284, 1963), qui consiste à répartir le sang dans une quinzaine de tubes capillaires. On pourra ainsi faire de nombreuses expériences avec la même souche.

Technique : Prélever le sang au coeur avec une seringue héparinée et compléter le volume avec de la glycérine pure de telle sorte qu'elle soit à 7,5% par rapport au sang.

Puis répartir le sang dans des tubes capillaires d'une dizaine de centimètres de long.

(Veiller à ce que le sang ne remplisse pas le tube entièrement, pour éviter qu'il soit altéré ensuite par la chaleur).

Sceller ensuite les tubes à la petite flamme d'un Bunsen et les placer dans un tube à essai rempli d'alcool absolu, qui est lui même introduit dans un mélange de carboglace et d'alcool.

Pour les manipulations pratiques, on se procurera l'appareil dont la description est donnée par la communication de Cunningham et Lumsden citée plus haut.

4 - Cultures

A - Stercoraria

Les Trypanosomes de cette section (ex : T. cruzi) se cultivent très bien sur milieu NNN.

Ce milieu convient également à la culture des Leishmanies et même à des flagellés libres tels que les Bodonidés.

a) - Milieu NNN

Préparation de la gélose :

- Utiliser : 5 g de Gélose Difco
3 g de ClNa.
500 cc d'eau distillée.
- Dissoudre le ClNa dans l'eau, puis chauffer.
- Ajouter la gélose lorsque l'eau salée frémit et remuer jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes de 17 à raison de 5 cc par tubes
- Stériliser à l'autoclave à 120° pendant 20 mn.
- Conserver à + 5°C.

Ponction cardiaque

- Prélever stérilement le sang (environ 40 cc) au coeur du lapin, à la seringue de 50 cc paraffinée
- Verser le sang dans un flacon contenant du citrate de Na à 1% sterile (3 cc pour 40 cc de sang)
- Ajouter extemporanément 250.000 U de Pénicilline.
- Agiter le tout un moment (mouvements circulaires)
- Conserver à + 5°.

Mélange gélose-sang

- Réchauffer les tubes de gélose et flacons de sang 2 heures à la température du laboratoire.
- Liquefier la gélose au bain-marie, puis maintenir la température aux environs de 45°.
- Verser 1 cc de sang dans chaque tube (par série de 10).

- Mettre les tubes gélose + sang en attente dans un bain-marie à 40°C.
- Agiter les 10 tubes d'un mouvement circulaire, en évitant la formation de bulles.
- Laisser refroidir en position inclinée.
- Après la prise de la gélose, éprouver la stérilité 24 h à 37°.
- Conserver à + 5°C (3 à 4 semaines maximum)...

Ensemencement

- Ajouter un peu d'eau physiologique à l'eau de condensation qui est déjà au fond du tube.
- Prélever par ponction veineuse 6 ou 7 cc de sang au patient avec une seringue contenant 1 cc de Liquéfide Roche.
- Mélanger et distribuer à raison de 0,5 cc par tubes. Puis conserver à l'étuve à 25 - 28°.
- Examiner les tubes à partir du 10e jour.

Coloration : Etaler une goutte de culture sur lame, laisser sécher

Colorer, comme un frottis, au Giemsa 15 mn à $pH = 6,8$.

b) - Culture des formes amastigotes

On peut étudier la transformation de formes flagellées en amastigotes en ensemençant ces formes flagellées dans une culture de macrophages de souris.

- Culture de macrophages

- Tuer la souris à l'éther, la fixer sur le dos et laver à l'alcool.
- Ouvrir l'abdomen.

- A la pipette, rincer les intestins avec du milieu 199, puis reprendre et verser le liquide dans des tubes à lamelles.
- Le lendemain, observer à la loupe si les macrophages sont fixés sur la lamelle, puis changer le milieu.
- Changer le milieu ensuite tous les 8 jours.

- Culture des amastigotes

- Ensemencer avec des *T. cruzi* prélevés dans l'intestin postérieur d'un Triatome et incubé à 37°.

Le lendemain on pourra observer de nombreux amastigotes dans les macrophages.

- Coloration : Dans le tube à lamelle

- Fixer 4 mn à l'alcool méthylique
- Colorer 30 mn au Giemsa (8 gouttes pour 5 cc d'eau neutre)
- Retirer la lamelle, rincer, sécher et monter à l'euparal vert.

B - Salivaria

A ~~titre~~ d'exemple nous allons donner deux milieux pouvant servir l'un à l'isolement et l'autre à l'entretien de souches de *T. du groupe brucei* et *T. congolense*.

Ces milieux sont utilisés pour le diagnostic de la Trypanosomiase humaine.

a) Pour l'isolement : Milieu d'Almeida

- Gelose 2 g
- ClNa 8,5 g
- eau distillée : 1000 cc

- Dissoudre au bain-marie.
- Répartir à raison de 4 cc par tubes de 17.
- Stériliser à 110° pendant 20 mn.
- Ajouter à 50°C, 2 cc de sang total humain citraté.

Placer les tubes à - 20° pendant 48 h puis décongeler pour provoquer l'hémolyse des hématies.

b) Pour le maintien : Milieu de Tobie, von Brand et Mehlman, 1950.

- Phase solide.

- Dissoudre 1,5 g Bacto - beef (Difco) ; 2,5 g Bacto-peptone (Difco) ; 4 g de NaCl et 7,5 g Bacto-agar (Difco) dans 500 cc d'eau distillée.

- Ajuster le pH à 7,2 - 7,4 avec de l'hydroxyde de sodium et autoclaver à 110° pendant 20 mn.

- Refroidir à 50°C et ajouter le sang total de lapin ou humain citraté (citrate de sodium stérile à 0,5%) et inactivé (30 mn à 56°C), dans la proportion de 25 cc de sang pour 75 cc de solution de base.

- Répartir à raison de 5 cc par tubes et laisser solidifier en position inclinée.

- Phase liquide

- Solution de Locke modifiée : Na Cl = 8 g ; K Cl = 0,2 g ; Ca Cl₂ : 0,2 g ; K H₂ PO₄ : 0,3 g ; glucose = 2,5 g ; et un litre d'eau distillée.

- Stériliser par filtration sur bougie Chamberlain L 3 ou autoclavage.

- Ajouter 2 cc de solution dans chaque tube et les boucher avec un coton entouré de gaze.

- Après ensemencement les tubes sont incubés à 24 - 25°C.

La population maximum est atteinte entre 10 et 14 jours après l'inoculation.

5 - Diagnostic des Trypanosomiasés humaines

A - Trypanosomiase africaine

- Lésion primaire : Dans le cas d'une infection récente on pourra détecter les Trypanosomes en examinant le liquide fourni par une piqûre du chancre d'inoculation.
- Examen du sang : A frais, entre lame et lamelle ou en gouttes épaisses colorées selon la méthode de MacLennan (1957 - Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg. 51, 301).
 - Effectuer les gouttes épaissées et laisser sécher.
 - Préparer le colorant : Giemsa à 10% dans l'eau tamponnée à pH = 7,2.
 - Plonger la lame 1 seconde dans le bleu de méthylène aqueux à 0,5%
 - Rincer à l'eau courante et placer la lame dans le colorant (30 mn).
 - Laver rapidement à l'eau courante et laisser sécher.

Le bain préliminaire de bleu de méthylène réduit les dégâts causés aux Trypanosomes durant la coloration au Giemsa.

Les Trypanosomes ne se trouvent pas tous les jours et à toutes les heures dans le sang ; on a donc intérêt à faire des gouttes épaisses 3 jours de suite.

Pour avoir plus de chances de trouver les Trypanosomes on peut aussi faire la triple centrifugation de Hoare

- Centrifuger le sang veineux 7 mn à 1000 t/mn
- Décanter le surnageant dans un second tube et centrifuger 10 mn à 1500 t/mn.
- Décanter à nouveau le surnageant dans un troisième tube et centrifuger 15 à 20 mn à 2000 t/mn.
- Examiner le culot entre lame et lamelle.

L'examen du sang est de première importance pour T.rhodesiense car les formes parasites du sang sont toujours en nombre suffisant pour être décelées.

- Examen des glandes lymphatiques : Dans le cas de T.gambiense, l'examen du liquide obtenu par ponction des glandes lymphatiques est une des plus sûres méthodes de diagnostic pendant les premiers stades de la maladie. (Résultats positifs dans 90% des cas).
- Examen du liquide cerebrospinal : effectuer une ponction lombaire, centrifuger et examiner.
- Inoculation d'animaux de laboratoire : Cette méthode est de valeur incertaine car T.gambiense passe parfois difficilement sur les animaux de laboratoire ; on peut cependant essayer d'infecter des rats par inoculations intratesticulaires. Les Cercopithèques s'infectent mieux mais coûtent trop cher.

- Cultures : La mise en culture est également une méthode de valeur relative car seules les souches transmissibles par le vecteur réussissent en culture.

- Signes de présomption :

- Réaction de fixation du complément

- Leucoformolgelification :

Dans un tube à hémolyse contenant 1 ou 2 cc de sérum à tester, ajouter 2 ou 3 gouttes de formol; agiter largement pour mélanger.

Résultats : Prise en masse et ~~lactescence~~ apparaissant :

- au bout de 5 mn = +++

- avant 30 mn = + (douteux)

- au-delà de 30 mn = -

B - Trypanosomiase américaine

- Examen du sang : On peut déceler les Trypanosomes en gouttes épaisses mais seulement dans les cas aigus.

- Cultures : T. cruzi se développe très bien sur milieu NNN mais il faut que les Trypanosomes soient relativement nombreux dans le sang pour que la culture prenne.

- Xénodiagnostic : On nourrit un T. infestans de laboratoire sur le malade. Après 10 jours on presse le Triatome pour le faire defequer sur lame et on examine.

Faire de même après 20 jours.

Avec Rhodinus prolixus : disséquer après 15 jours et chercher les flagellés dans l'intestin.

Le Xénodiagnostic est le meilleur procédé de diagnostic de la trypanosomiase américaine.

- Diagnostics sérologiques.

- Réaction de fixation du complément
- Test d'immunofluorescence.

VI - Leishmanies

Les Leishmanies sont des Protozoaires parasites des macrophages et des cellules du système réticulo-endothélial de Lézards, de Rongeurs, de Carnivores et de l'Homme.

Les vecteurs appartiennent au genre *Sergentomya* pour les parasites de Reptiles et aux genres *Phlebotomus* et *Lutzomya* pour les parasites de Mammifères.

Les Leishmanies déterminent chez l'Homme le Kala-Azar, le Bouton d'Orient, ainsi que les Leishmanioses américaines.

1 - Isolement de la souche à partir des réservoirs de virus

Les principaux hôtes réservoirs des Leishmanioses humaines sont les chiens et les rongeurs sauvages.

Chez ces animaux, les différences entre Bouton d'Orient et Kala Azar sont moins marquées que chez l'Homme, car dans les deux cas ils peuvent présenter des lésions apparentes et des invasions viscérales.

a) Pas de lésions apparentes

- Rongeurs

- Tuer l'animal à l'éther
- Aseptiser à l'alcool
- Ouvrir du côté ventral
- Chercher les ganglions ou organes anormaux et prélever la rate et le foie.

- Placer chaque prélèvement dans un tube stérile contenant quelques cc d'un mélange : 20 cc de sérum physiologique + 250.000 U de Pénicilline.
- Puis, sectionner un tibia au ciseau
- Prélever la moelle à la pipette.
- Mettre en tube comme précédemment.
- Le contenu de chaque tube est broyé, puis une partie est mise en culture sur milieu NNN, l'autre est inoculée par voie intrapéritonéale à des cobayes.

- Chiens

- Anesthésie

- Dénuder la veine saphène (patte arrière).
- Y placer un trocart de salmon
- Injecter une solution de chloralose à 1% dans du sérum physiologique, selon le poids du chien à raison de 0,10 g de chloralose par kilog.

Recherche des parasites

- Effectuer une biopsie de peau à la face inférieure de la queue et faire des appositions que l'on colorera au Giemsa (45 mn - pH = 7,2)
- Couper la pointe d'un ongle et recueillir une goutte de muqueuse unguéale - Etaler et colorer au Giemsa.
- Introduire un coton monté dans une narine et frictionner la muqueuse ; puis étaler sur lame et colorer.
- Faire des appositions avec des biopsies de foie, rate, moelle osseuse et ganglions.

Isolement des parasites

- Chercher les ganglions anormaux et les ponctionner, à la seringue, en injectant puis en reprenant plusieurs fois du sérum physiologique. Mettre en culture sur NNN et inoculer à des cobayes.
- Prélever des morceaux de rate, foie et moelle ; broyer, en tubes, dans le mélange sérum physiologique Pénicilline - Mettre en culture et inoculer à des cobayes.

b) Lésions apparentes

On prélèvera le pus dans les lésions. On pourra l'étudier sur frottis et l'inoculer à des animaux sains.

2 - Entretien des souches sur animaux de laboratoire

Les meilleurs hôtes de laboratoire sont le hamster, le cobaye, le chien, le loir, le merion et le cotton-rat.

Pour effectuer les passages, on inoculera par voie sous-cutanée (du dos) ou intrapéritonéale les broyats de rate, foie, moelle osseuse dilués dans le sérum physiologique.

3 - Infection des vecteurs

Les Phlébotomes gorgés sur animal infecté sont disséqués au bout de 8 jours, dans une goutte de sérum physiologique.

Ecraser le pharynx et l'intestin antérieur pour libérer les Leptomonas.

4 - Conservation par le froid.

Prélever la phase liquide du milieu et concentrer les Leptomonas par centrifugation à 2500 t/mn pendant 5 mn ; ajouter 10% de glycérine pure.

Placer dans des ampoules scellées et conserver par immersion brutale à - 70°.

Les Leptomonas peuvent rester en vie pendant 1 an et demi.

- Décongeler brutalement à 40°.

5 - Cultures

Les Leishmanies se cultivent sur milieu NNN à 22°C. Les formes obtenues sont des promastigotes qui se développent en voile à la surface de la phase liquide.

Le repiquage doit avoir lieu tous les 7 jours. Pour le diagnostic : il faut ensemencer 6 tubes et poursuivre, le cas échéant, les repiquages pendant 5 semaines.

Pour colorer : il suffit de prélever une goutte de culture, l'étaler sur lame et traiter comme un frottis. (Giemsa - pH = 7,2 - 25 mn).

Les modifications de la virulence des souches de Leishmanies en culture sont fonction de l'espèce : ainsi les souches de *L. donovani* perdent rapidement leur virulence tandis que celles de *L. tropica* la conservent indéfiniment.

Les mammifères peuvent être inoculés en intrapéritonéal ou en sous cutané à partir des cultures.

Les Leishmanies peuvent être cultivées sous forme amastigote dans des cultures de macrophages de souris sur milieu 199 (voir T. cruzi) Lamy (I.P) arrive ainsi à boucler totalement "in vitro" le cycle : amastigote-promastigote-amastigote.

6 - Coloration du flagelle

Le flagelle des Leptomonas ou le rhizoplaste des Leishmania peuvent se colorer de la façon suivante :

- Fixer pendant 10 mn le frottis au sublimé alcoolique de Schaudinn.
(solution saturée aqueuse de sublimé = 2 parties
alcool absolu = 1 partie)
- Rejeter, recouvrir d'alcool iodé et renouveler jusqu'à non décoloration.
- Eliminer l'iode par l'alcool 90°
- Sécher
- Recouvrir de sérum de cheval (10 mn)
- Essorer rapidement, puis colorer au Giemsa à 10% pendant 1 h.
- Rincer et laisser sécher.

7 - Diagnostic des Leishmanioses humaines

- Bouton d'Orient
 - Lorsque le Bouton n'est pas ulcéré, les amastigotes sont très nombreux ; on peut piquer la lésion, presser et recueillir

l'exsudat ou bien planter une pipette et aspirer, puis effectuer des frottis avec le pus et examiner.

- Si le Bouton est ulcéré, les parasites sont rares. Il faudra piquer les bords de la lésion et examiner une partie du pus, après coloration, et mettre l'autre en culture.

- Leishmaniose cutaneomuqueuse

Effectuer des frottis et appositions avec des ponctions ganglionnaires et des biopsies cutanées de lésions.

Le test de Montenegro permet de distinguer l'affection d'une dermatomycose :
inoculer intradermiquement 100.000 promastigotes dans le phenol-sérum salé à $\frac{1}{2}\%$.

Si la réaction est positive on obtient 48 h plus tard une papule palpable de quelques mm de diamètre.

- Leishmaniose viscérale

Il est possible de déceler les quelques rares parasites du sang par la méthode de Ross : effectuer un frottis que l'on arrête brusquement, et chercher les macrophages parasités sur cette ligne.

Il est tout de même préférable de colorer et mettre en culture des biopsies de foie, rate et moelle osseuse.

Tests sérologiques : Formogelification
Fixation du complément
Immunofluorescence.

B i b l i o g r a p h i e.

- The Cultivation of Parasites in Vitro. 1968
A.E.R. TAYLOR and J.R. BAKER
Blackwell.
- Handbook of medical Protozoology. 1949
by Hoare - Ed: Baillière, Tindall and Cox
- Notes données à la L.S.H.T.M.

Protozoaires parasites des cellules
réticulo-endothéliales et musculaires

Dans ce chapitre, nous traiterons deux genres dont le cycle et les affinités systématiques sont encore mal définis : *Toxoplasma* et *Sarcocystis*.

Le "Comitee' on Taxonomy and Taxonomic problems of the Society of Protozoologists" (1964) les classe ainsi :

Subphylum SPOROZOA

Classe Toxoplasmea

Genre *Toxoplasma*

Genre *Sarcocystis*.

A) - Genre *Toxoplasma*

Ce genre comprend une seule espèce (*T. gondii*) de spécificité très large et pouvant infecter de nombreux Vertébrés à sang chaud.

Chez l'homme elle détermine la Toxoplasmose.

Les Toxoplasmes parasitent les macrophages et lymphocytes, le système nerveux central (cerveau), et les cellules musculaires.

1 - Entretien de la souche

a) sur animaux de laboratoire

La plupart des animaux de laboratoire (cobayes, lapins, singes, rats, chiens) peuvent s'infecter, mais l'animal de choix utilisé pour le diagnostic comme pour entretenir la souche est la souris.

Pour effectuer les passages : injecter à la seringue du sérum physiologique dans le p^{er}itoine de la souris infectée, puis **reprendre** et inoculer intrap^{er}itonéalement les souris vierges.

b) par congélation

Injecter 1 cc de serum physiologique dans le p^{er}itoine de la souris ; reprendre et mélanger dans la seringue avec 7,5 cc de glycérine pure.

Mettre en ampoules, sceller à la flamme et conserver dans l'azote liquide ou la carboglace.

2 - Colorations

Zoïtes : Déposer sur lame une goutte de sérosité p^{er}itonéale, prélevée à la seringue, et étaler ou faire un frottis. Colorer au Giemsa (25 mn - pH = 7,2)

Kystes : Prélever le cerveau de la souris, effectuer des coupes et colorer au Giemsa ou à l'Hématoxyline de Ehrlich.

B) - Genre Sarcocystis

Les représentants de ce genre se trouvent chez les oiseaux, les mammifères herbivores et l'homme.

Le seul stade du cycle connu est le kyste, parasite du coeur et des muscles.

On range à côté des Sarcocystis les genres Besnoitia (parasite du bétail) et l'organisme M (parasite du Campagnol.).

L'étude de ces Protozoaires se fait sur coupes histologiques de muscles parasités.

A titre d'exemple, on pourra effectuer des coupes de coeur de mouton, qui sont parasités à 90% par S. tenella.

Protozoaires parasites du tube digestif

Les techniques exposées dans ce chapitre sont essentiellement des techniques de Protozoologie humaine, mais, le cas échéant, elles peuvent être appliquées à l'étude de Protozoaires parasites d'animaux.

Les Protozoaires du tube digestif de l'Homme appartiennent aux groupes suivants :

I - Flagelles

Trichomonadines	-	Trichomonas
Retortamonadines	-	Chilomastix
Diplozoaires	-	Giardia

II - Rhizopodes

Walkampfidae	-	Iodamoeba
Dientamoebidae	-	Dientamoeba
Entamoebinae	-	Entamoeba, Endolimax.

III - Sporozoaires

Eimeriidea	-	Isospora
------------	---	----------

IV - Cilies

Balantidium

A - Examen des selles

I - Prélèvement et transport

Les matières fécales, aussitôt émises, sont prélevées et placées dans un récipient en carton paraffiné à large ouverture. Il est nécessaire de toujours laisser un espace vide important et de ne pas fermer hermétiquement à cause des dégagements gazeux.

L'examen des selles doit être fait le plus rapidement possible ; s'il ne peut être effectué immédiatement, on a intérêt à conserver les selles dans un endroit frais.

Pour les conservations de longue durée, les selles sont fixées et préservées dans une solution de Formol du commerce à 10% dans l'eau ; ou mieux, dans un mélange de Formol à 10% (9 parties) et de Glycérine (1 partie).

2 - Recherche des parasites après enrichissement

Afin d'éviter toute perte de temps et d'augmenter ses chances de trouver les parasites, il vaut mieux, dès le début, procéder à un enrichissement des selles.

- Méthode de Ridley et Hawgood

(1956. J. Clin. Path. 9, 74)

Cette méthode a l'avantage de concentrer, environ 30 fois, tous les kystes de Protozoaires et oeufs d'Helminthes sans exception ; elle ne les altère pas ; elle détruit les Blastocystis et ne prend pas plus de 5 mn.

Technique :

- Emulsionner dans un mortier environ 2 g de matière fécale dans 10 cc d'eau distillée.
- Verser à travers un tamis (maille : 0,6 mm) dans un tube à centrifuger.
- Centrifuger 2 à 3 mn à 2500 t/mn.
- Jeter le surnageant et ajouter du formol salé à 10% de telle sorte que le liquide arrive à 2,5 cm de l'ouverture du tube.
- Emulsionner avec un agitateur.

- Ajouter environ 3 cc d'éther et agiter vigoureusement.
- Centrifuger 2 mn à 2000 t/mn.
- Eliminer le surnageant ainsi que le dépôt de débris qui s'est formé à la surface de séparation des deux liquides.
- Délayer le dépôt situé au fond du tube dans la goutte de liquide restante.
- Examiner une goutte de ce dépôt entre lame et lamelle.

Si des kystes de Protozoaires sont décelés, examiner, entre lame et lamelle, une goutte de ce dépôt mélangée à une goutte de Lugol fort

Formule : Iode = 1 g

Iodure de K = 2 g

Eau distillée = 100 cc

Dissoudre l'Iodure de K dans environ 5 cc d'eau distillée, ajouter ensuite l'Iode et dissoudre ; puis compléter avec le reste d'eau distillée.

Le Lugol met en évidence les noyaux dans les kystes.

S'il y a des kystes d'Amibes dans le dépôt, on utilisera la méthode de P.G. Sargeant pour colorer les chromatoides et faciliter ainsi le diagnostic.

(1962. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 56. 12)

Colorant : Vert Malachite = 0,2 g

Acide acétique glacial = 3 cc

Alcool 95° = 3 cc

Dissoudre le Vert Malachite dans l'alcool, ajouter l'acide acétique et compléter jusqu'à 100 cc avec de l'eau distillée.

Mélanger une goutte du culot avec une goutte de colorant et examiner entre lame et lamelle. Les contours de kystes, les membranes nucléaires et les centrosomes sont colorés en vert clair ; les chromatôïdes sont colorés en vert foncé.

Cette méthode ne "marche pas" directement ou après une autre méthode de concentration. L'action préliminaire de l'éther sur les kystes semble être nécessaire.

3 - Examen direct

A frais : Homogénéiser un petit fragment de selles dans une goutte d'eau physiologique. On peut observer ainsi, entre lame et lamelle, la motilité des Protozoaires : pseudopodes, flagelles, membranes ondulantes.

Au Lugol : Délayer un peu de selles dans une goutte de Lugol et examiner entre lame et lamelle.

4 - Colorations

Les Amibes et Flagellés intestinaux se colorent, sur frottis humides, soit au chlorazol, soit à l'Hematoxyline.

- Frottis humide : Pour confectionner un frottis, il est possible d'étaler sur lame un peu de matière fécale à l'aide d'une baguette, mais nous préférons la technique suivante : Prélever très peu de selles sur un bâtonnet et tracer des stries parallèles, fines et assez rapprochées, sur une lamelle. Après coloration, les parasites seront examinés sur les bords des stries, dans les zones de moindre épaisseur.

Il est très important de fixer le frottis immédiatement après sa confection.

- Coloration par le Chlorazol - Technique de Kohh (1960)
d'après L. Lamy

I. Colorant : Chlorazol Black E = 5 g

II. Solution de base : Alcool éthylique 90° = 170 cc

Alcool méthylique = 160 cc

Acide acétique glacial = 20 cc

Phénol liquéfié = 20 cc

Acide phosphotungstique à 1% = 12 cc

Eau distillée jusqu'à = 1000 cc

Le chlorazol est broyé dans un mortier en ajoutant la solution II au fur et à mesure, par petites quantités.

Le tout est placé dans un flacon en verre blanc et laissé au repos, à la lumière pendant 4 à 6 semaines. Pendant ce temps, la préparation mûrit, un dépôt se forme alors que la partie surnageante devient claire et de couleur rouge cerise. Si le surnageant ne s'éclaircissait pas, il conviendrait de recommencer la solution. On peut éventuellement accélérer le mûrissement en plaçant le flacon sous une lampe à U.V. C'est le liquide surnageant qui est utilisé pour la coloration.

Les frottis humides sont plongés directement dans le colorant et maintenus ainsi quelques heures, puis montés au Baume du Canada, après deshydratation.

Cette technique est intéressante car les 3 temps, fixation, coloration et différenciation sont réunis en un seul.

Le Chlorazol colore en gris vert foncé les noyaux, la chromatine et les caryosomes.

Cette coloration est valable pour tous les Protozoaires intestinaux.

- Hematoxyline au Fer - Méthode alcoolique

Cette coloration peut être aussi bien utilisée sur des frottis de selles que sur des coupes histologiques.

Solution A : (Hematoxyline de Heidenhain)

Hematoxyline = 1 g

Alcool absolu = 10 cc

Eau distillée = 90 cc

Thymol = 1 cristal.

Dissoudre l'hématoxyline dans l'alcool absolu, et ajouter ensuite l'eau distillée.

Solution B : Alun de Fer = 4 g

Eau distillée = 100 cc :

Coloration :

- Fixer le frottis au Schaudinn, 20 mn.
- Laver 10 mn à l'alcool 70° (conservation à ce stade)
- Laver 10 mn à l'alcool 70° contenant assez de Gram's Iodine pour présenter une couleur acajou
- Rincer 10 mn à l'alcool 70°.
- Mordancer 12 à 24 h dans :

Solution B = 1 partie

Alcool 50° = 10 parties

- Laver 5 mn dans l'alcool 70° pour éliminer l'excès de mordant.
- Colorer 24 h dans :
 - Solution A = 1 partie
 - Alcool 70° = 10 parties
- Différencier dans :
 - Solution B = 1 partie
 - Alcool 50° = 10 parties.
- Rincer pendant deux heures dans plusieurs bains d'alcool à 70°, pour éliminer l'alun de fer.
- Déshydrater et monter au Baume du Canada.

Gram's Iodine = 1 g d'iode
3 g d'iode de K
100 cc d'alcool méthylique.

Phosphotungstic acid Haematoxylin - Modifiée par W. Cooper

- Colorant : Eau distillée = 80 cc
 - Hématoxyline = 0,1 g
- Dissoudre l'Hématoxyline dans un peu d'eau, en chauffant, puis compléter avec le restant d'eau.
- Ajouter 20 cc d'acide Phosphotungstique à 10%
- Laisser mûrir plusieurs mois avant l'emploi.
- Coloration :
 - Fixer le frottis humide au Schaudinn 30 mn
 - Laver rapidement à l'alcool 70°
 - Pour réduire les sels mercuriques, immerger 5 mn dans un mélange : alcool 70° + 3 à 5% de Lugol fort.

- Pour éliminer l'iode, placer pendant 5 mn dans l'alcool à 70° contenant 3 à 5% de solution d'hyposulfite de Sodium à 5%.
- Laver rapidement dans l'alcool à 70°, puis dans l'alcool à 90°.
- Placer 5 mn dans l'alcool absolu pour durcir les Protozoaires.
- Revenir graduellement à l'eau distillée en passant par les alcools 70°, 50°, 30°. (1 mn dans chaque).
- Placer la lamelle, verticalement, dans un récipient contenant le colorant et laisser pendant 12 h.
(Si le colorant est frais placer à 37° pendant la même période).
- Laver rapidement à l'eau ordinaire, déshydrater assez rapidement et monter au Baume de Canada.

Cette technique est très intéressante car il n'est pas nécessaire de différencier ; elle donne les mêmes résultats que l'Hematoxyline de Heidenhain et se pratique plus rapidement que cette dernière.

Si des Ciliés sont présents dans les selles, on peut les colorer au Carmin acétique, qui donne une coloration générale ; mais pour l'étude du cinétome, il est indispensable de les imprégner à l'argent.

Imprégnation à l'argent, d'après Chatton et Iwoff

- - Prélever les Ciliés et les laver dans l'eau physiologique, en saignée.

- Les placer dans l'eau naturelle pour les faire gonfler.
(Surveiller à la binoculaire).
- Fixer très rapidement au Champy.
- Rincer deux fois à l'eau distillée
- Mettre les Ciliés dans le Da Fano salé; il est alors possible de les conserver longtemps dans ce fixateur.
- Rincer une fois à l'eau distillée.
- Mettre sur lame, éliminer l'eau et enrober de gélatine salée en faisant tomber une goutte sur les Ciliés et en étalant avec la pipette.
- Recouvrir la lame de nitrate d'argent à 3% et la placer à l'obscurité pendant 10 mn.
- Rincer à l'eau et faire brunir sous lampe à U.V. sous mince couche d'eau distillée.
- Lorsque le brunissement est suffisant, déshydrater et monter au Baume du Canada.

salé:

- Da Fano/: Nitrate de Cobalt = 1 g
Formol non neutralisé = 10 cc
Cl Na = 1 g
Eau distillée = 90 cc
- Gélatine salée : 1 g de gélatine en feuilles.
10 cc eau distillée
Faire fondre et ajouter 20 gouttes d'eau de mer.

B - Examen de la bile

La bile est prélevée par tubage duodenal. On peut y rencontrer des Giardia ou des Amibes dysentériques que l'on met en évidence par examen direct, examen après légère centrifugation ou mise en culture.

C - Examen de la bouche

Dans les prélèvements effectués dans les espaces interdentaires, dans les caries dentaires ou dans les crachats, on pourra observer des amibes ou des flagellés.

Pour ces deux parasites on peut faire des examens à frais, des cultures ou des frottis colorés :

Frottis humide - Hématoxyline pour Amibes

Frottis sec - Giemsa pour Trichomonas.

D - Coupes histologiques

Lorsque les selles contiennent des Amibes dysentériques, des Ciliés du genre Balantidium ou des ookystes de Coccidies, il est bon de pratiquer des coupes d'intestin et de foie, colorées à l'Hématoxyline de Ehrlich, pour observer le développement des parasites dans les tissus ainsi que la nature des lésions qu'ils provoquent.

E - Cultures

Milieu de Dobell et Laidlaw

Ce milieu comprend : un support coagulé de sérum de cheval, une phase liquide de Ringer-sérum et un élément figuré (amidon de riz).

On peut le préparer soi même selon la technique exposée par Lamy (Traité de Biologie Appliquée - Chap : X, p : 511 ; Ed : Maloine - 1963), mais on peut aussi l'acheter tout préparé à l'Institut Pasteur.

Il est présenté en deux parties : un tube de sérum coagulé et une ampoule contenant le Ringer total, le sérum liquide et l'amidon de riz.

Il suffit au moment de l'emploi de vider le contenu de l'ampoule bien agitée dans le tube de sérum coagulé et de laisser déposer en rechauffant 30 mn à l'étuve à 37°.

Pour le diagnostic, onensemencera le matériel à étudier au niveau du dépôt d'amidon. La culture sera examinée 24 heures après l'ensemencement ; en cas de réponse négative, on pourra la revoir après 48 heures.

Les repiquages seront effectués en prélevant, à la pipette, le matériel situé au contact de l'amidon et du sérum.

Le milieu de Dobell et Laidlaw convient à tous les Protozoaires intestinaux, excepté les Giardia, dont la culture, particulièrement délicate, peut être néanmoins effectuée sur le milieu de Karapetyan (1962).

Colorations

Les flagellés ne posent généralement pas de problèmes particuliers, il suffit de déposer une goutte de culture sur lame, étaler, sécher et traiter comme un frottis que l'on fixe à l'alcool méthylique et colore au Giemsa - pH = 7,2 - pendant 25 mn.

Il n'en est pas de même pour les Amibes qui doivent être colorées sur frottis humides, car ces Protozoaires adhèrent très mal et les frottis se décollent le plus souvent au

cours de la coloration. Lamy préconise de mélanger une microgoutte de sang frais, prélevée à la queue d'une souris, à une microgoutte de culture et de faire un frottis que l'on fixe immédiatement.

Notons que cette technique donne également de bons résultats pour les Trichomonas, fixés à l'acide osmique avant la confection du frottis sec.

B i b l i o g r a p h i e

- LAMY et BENEX. Extrait du Traité de Biologie Appliquée -
Tome II. Diagnostics microbiologiques. - 1963.
- Notes données à la L.S.M.T.M.

Cas de Trichomonas vaginalis

Recherche des parasites

Les glaires prélevées directement dans les culs de sac du vagin, à l'aide d'un coton monté sont étudiées entre lame et lamelle ou colorées au Giemsa après étalement.

On peut aussi mettre en culture sur le milieu de Thomas.

Milieu de Thomas

(1964 - J. Med. Lab. Technol. 21, 46).

Formule : Foie proteolysé = 25 g

Na Cl = 6,5 g

Glucose = 5 g

Sérum de cheval inactivé = 80 cc

Eau distillée = 1 l

Pénicilline G = 1 million U

Streptomycine = 0,5 g

Mélanger, ajuster le pH à 6,4 et stériliser par filtration (Millipore).

Remplir complètement les bouteilles de Mac Cartney et visser fortement le bouchon, pour obtenir des conditions partiellement anaérobiques. Après l'ensemencement, incuber les cultures à 34° ou 37° et examiner après 24 ou 36 h.

Les Candida peuvent se développer sur ce milieu, mais sans nuire aux flagellés. Cependant, pour les éliminer, on peut ajouter de la Nystatine.

Le milieu de Thomas peut être aussi bien utilisé pour le diagnostic que pour le maintien des souches.

I M M U N O L O G I E

- IMMUNOELECTROPHORESE selon GRABAR et WILLIAMS

1. Préparation de la solution antigénique

La méthode d'extraction des antigènes joue un rôle primordial dans la pratique immunochimique. Il faut en effet extraire toutes les fractions antigéniques solubles en évitant les causes de dégradation ou de dénaturation pouvant entraîner des variations de leur activité immunologique.

- L'antigène brut est congelé rapidement et lyophilisé. La rupture des cellules de l'antigène lyophilisé et l'extraction des substances solubles se fait par addition d'eau salée à 1^o/100 (1 g d'antigène pour 200 cc d'eau salée), puis congélation à - 30°C et broyage au mortier de la masse jusqu'à liquéfaction.

On recongèle à nouveau et on répète l'opération 8 fois. Puis centrifuger à 20.000 tours/minute pendant 1 heure à 4°C.

Le surnageant obtenu est dialysé pendant 24 h, à 4°C, dans de l'eau distillée.

Le liquide dialysé est ensuite congelé à - 75° et lyophilisé. On obtient ainsi de l'antigène standard ou antigène à 1^o/100.

- L'antigène brut doit être traité de différentes façons selon sa nature. Voici quelques exemples :

VERS

Ascaris : Recueillir le liquide coelomique en sectionnant le ver près des lèvres et en laissant égoutter dans un verre. Ce liquide est réfrigéré à - 75°C, puis lyophilisé.

Douves - Schistosomes : Les Vers sont lavés plusieurs fois à l'eau distillée, puis ils sont placés dans un tube et broyés à froid (Pour cela, placer le tube dans de la glace pilée).

Le broyat est mis dans un pilulier avec un peu d'eau distillée, puis réfrigéré à - 75° et lyophilisé.

Petites filaires (*Dipetalonema witei*) - le Ver entier est lavé plusieurs fois à l'eau distillée puis réfrigéré en présence d'eau distillée, et lyophilisé.

ARTHROPODES

Petites espèces : broyer à froid l'animal entier.

Grandes espèces : éliminer toutes les pièces chitineuses inutiles telles que pattes, élytres, ailes etc ; puis broyer à froid, congeler dans un peu d'eau distillée et lyophiliser.

Antigène d'incubation : Placer les Vers (Douves - Schistosomes)

vivants dans une boîte de Petri contenant de l'eau distillée. Exposer à la lumière pendant 3 heures.

Recueillir le liquide, congeler à - 75° et lyophiliser. Cet incubat donne un excellent antigène, car la plupart des fractions antigéniques sont des protéines d'origine métabolique.

Antigène hématies : Centrifuger le sang pendant une demi heure .

à 10000 tours-minute. Eliminer le sérum, mélanger le culot avec du Ringer et centrifuger à nouveau. Répéter l'opération jusqu'à ce que le surnageant soit clair, puis l'éliminer.

Delayer les hématies dans un peu d'eau distillée, congeler aussitôt et lyophiliser.

Antigène frais : Broyer l'animal à froid et mélanger à une goutte de tampon.

Liquide hydatique : Centrifuger 1 heure à 10000 tours-minute.

Récupérer le surnageant. Dialyser pendant deux jours en renouvelant l'eau de temps en temps.

Congéler - Lyophiliser. On obtient ainsi de l'antigène à 1/1000.

Sable hydatique : Centrifuger à 4000 tours minutes pendant un quart d'heure, 2 fois avec du sérum physiologique, et 2 fois avec de l'eau distillée. Eliminer le surnageant. Récupérer le culot. Ajouter de l'eau distillée. Congéler et lyophiliser. On obtient ainsi de l'antigène brut.

2 - Préparation de l'antisérum

L'antisérum est expérimentalement extrait du sang de lapins immunisés.

Immunisation : Il existe deux techniques d'immunisation, dont l'emploi est conditionnée par la rareté ou l'abondance de l'antigène.

Si l'antigène est abondant : pratiquer toutes les semaines une injection sous cutanée dorsale : broyer dans un petit mortier 20 mg d'antigène brut lyophilisé ; ajouter 0,5 cc d'eau distillée ; faire dissoudre.

Ajouter l'adjuvant de Freund, complet pour la 1ère injection, incomplet pour les suivantes. Cet adjuvant doit être ajouté à l'antigène en quantité égale (soit 0,5 cc).

Si l'antigène est rare : diluer 20 mg d'antigène à 1/1000 dans 5 cc de serum physiologique. Laisser dissoudre à température ambiante, puis mettre au réfrigérateur à 4°C pendant une nuit.

Répartir ensuite dans 10 petits tubes que l'on met au congélateur (- 30°C).

Toutes les semaines mélanger le produit d'un tube avec une quantité égale d'adjuvant complet de Freund ; remuer pour émulsionner, puis injecter dans la cavité sous claviculaire du lapin.

Saignée : Le lapin doit être saigné tous les 15 jours.

On prélève environ 50 cc de sang à chaque saignée.

Technique : Perforer la veine marginale de l'oreille, introduire celle ci dans un flacon où l'on produit un vide de 20 cc de mercure pour activer l'écoulement du sang.

Antisérum : Laisser coaguler le sang et prélever le sérum surnageant. Ce sérum frais peut être conservé plusieurs mois à - 30°.

3 - Immunoélectrophorèse

L'immunoélectrophorèse consiste à faire diffuser les antigènes et les anticorps dans un gel d'Agarose, après avoir séparé les protéines de l'antigène par électrophorèse.

Au bout d'un certain temps, des arcs de précipitation apparaissent, correspondant aux réactions entre chaque fraction antigénique et les anticorps correspondants.

Cette méthode ne met en évidence qu'une seule série d'anticorps : les précipitines.

- Le gel d'Agarose est préparé à l'aide d'une solution tampon, de Ph 8,2, obtenue en mélangeant 160 g de Véronal sodé, 7 litres d'eau distillée et 220 cc d'acide chlorhydrique normal ; remuer et compléter jusqu'à 10 l avec de l'eau distillée.

Le gel d'Agarose doit être préparé extemporanément ; pour cela on fait dissoudre, au bain-marie, 900 mg d'Agarose dans 100 cc de tampon.

On fait couler immédiatement sur la lame soigneusement dégraissée 9,5 cc de ^{gel} ce/. Laisser solidifier un quart d'heure, puis creuser dans le gel les réservoirs où l'on déposera la solution antigénique et l'antisérum.

On fait ensuite dissoudre 5 mg d'antigène standard dans 0,025 cc d'eau distillée. Ce liquide est déposé dans son réservoir, sur la lame, que l'on place elle-même dans la cuve à électrophorèse pendant 5 h et demie, sous une tension de 20 à 22 volts.

Avant d'être déposé dans son réservoir, l'antisérum doit être concentré de la façon suivante : Prélever 90 cc de sérum frais ; congeler à -75°C ; lyophiliser pendant 3/4 heure ; puis ajouter 0,30 cc de sérum physiologique.

On laisse agir l'antisérum pendant 15 heures en chambre humide, à température ambiante ; puis pendant 2 jours à 4°C .

(Les arcs de précipitation apparaissent au bout de 15 heures mais ils n'atteignent leur développement maximum qu'au bout de 2 jours).

4 - Coloration des lames

Avant leur coloration, les lames doivent être lavées pendant 4 jours dans un mélange de sérum physiologique (9 Vol)

et de solution tamponnée (1 Vol.), souvent renouvelée. Elles sont ensuite déminéralisées : recouvrir la lame de papier Wathman, puis dessécher sous ventilateur.

Elles sont enfin rincées à l'eau courante, à ce moment elles sont prêtes à être colorées.

Colorant : Faire dissoudre 2 g d'Amido-Schwartz dans 425 cc d'Acide Acétique à 6°/100 et 425 cc d'Acétate de sodium (13,609 g pour 1 l d'eau). Agiter et filtrer avant l'emploi.

Solution de rinçage : acide acétique à 2°/100

Les lames sont placées 10 mn dans le colorant puis différenciées dans la solution de rinçage.

Lorsque la différenciation est terminée, les lames sont simplement mises à sécher sur du papier filtre.

5 - Utilité de l'Immunoélectrophorèse

L'immunoélectrophorèse sert d'une part à définir la structure antigénique des parasites et d'autre part à diagnostiquer les parasitoses.

Plusieurs procédés sont utilisés pour mettre en évidence les antigènes d'un parasite. En effet on peut soit opposer un antisérum et un antigène autologue ; soit effectuer une réaction croisée, c'est-à-dire mettre en présence un immunosérum et un antigène hétérologue, ceci pour étudier les fractions communes de 2 parasites. Si on veut au contraire éliminer ces fractions communes, on utilise la technique d'épuisement de l'antisérum qui permet d'isoler les arcs spécifiques.

- diluer 20 mg d'antigène dans une goutte de sérum physiologique ; ajouter 1 ml de sérum ; laisser 2 h à 37° puis 1 nuit à 4°.

Eliminer le précipité en centrifugeant à grande vitesse (10.000 tours). Le surnageant est le sérum épuisé que l'on concentre 3 fois avant l'utilisation.

Chez les Nématodes et les Cestodes, les fractions communes sont nombreuses ; ces parasites présentent une grande homogénéité structurale.

Chez les Trematodes les communautés antigéniques sont faibles, parfois même au niveau de deux espèces appartenant au même genre : ex : *S. mansoni* et *S. japonicum*.

Ces fractions communes expriment la parenté systématique, cependant la structure protéique phylétique est certainement transformée par l'adaptation parasitaire, notamment chez les Trematodes où les habitats divergent fortement selon les espèces.

- L'immunoélectrophorèse permet de diagnostiquer une parasitose à condition que le parasite ne soit pas localisé dans la lumière intestinale. En effet tous les parasites intestinaux, à l'exception d'*Hymenolépisma* ne provoquent pas l'apparition d'anticorps.

Chez les Trematodes chaque espèce présente des arcs communs avec les espèces voisines mais il existe toujours un arc spécifique, majeur et apparaissant en premier, caractéristique de l'espèce. Il existe également des arcs spécifiques dans le cas de l'hydatidose. Les arcs spécifiques des filarioses n'ont pas pu encore être établis, faute d'antigène, mais on sait déjà diagnostiquer ces parasitoses en opérant une réaction croisée avec de l'antigène *Dipetalonema witei* ; cette réaction donne pour chaque espèce de filaire un arc majeur caractéristique.

Etude du cycle expérimental de quelques Schistosomes

1 - Schistosoma mansoni

Hôte intermédiaire : Australorbis albinos

Hôte définitif : Homme

Hôte expérimental : Hamster.

- Oeufs : Les oeufs sont répartis sur toute la longueur de l'intestin grêle du hamster.

L'intestin est ouvert dans une boîte de Petri contenant de l'eau d'élevage à 26° ; il est légèrement raclé avec une lame de verre afin que le mucus qui l'entoure soit éliminé.

Puis il est raclé à nouveau, à sec, jusqu'à ce que la paroi devienne translucide.

On ajoute alors de l'eau d'élevage ^{dans la boîte} et on la chauffe jusqu'à ce qu'elle atteigne 30°C, sous éclairage intense.

Au bout de 45 mn les oeufs vont éclore et donner les miracidium.

- Miracidium : Les miracidium sont séparés de la raclure d'intestin par filtrage à l'aide d'un tissu à mailles lâches.

- Mollusques : Les mollusques sont placés dans un becher en compagnie de miracidium (10 miracidium pour 1 mollusque) ; l'infection dure 6 heures. Après cela ils sont mis en aquarium. Les furcocercaires sont libérées 21 jours après.

- Furcocercaires : Les Planorbes infestées sont placées dans une boîte de Petri contenant de l'eau distillée que l'on

place sur platine chauffante jusqu'à 30°C, à la lumière.

Au bout de 2 heures les cercaires commencent à sortir de l'hépatopancréas et à nager.

On prélève alors toutes les 20 mn l'eau des boîtes que l'on renouvelle tant qu'il y a émission de furcocercaires, ce qui dure généralement 6 heures.

Pour concentrer les cercaires, on utilise le fort tropisme qu'elles montrent pour la lumière ; elles sont placées dans un ballon à col dont on n'éclaire que la partie supérieure.

Au bout d'un moment, la presque totalité des cercaires est concentrée à cet endroit ; il suffit alors de les prélever à la pipette.

La concentration des furcocercaires doit être connue, ceci pour éviter une sur ou sous infection du hamster.

On étale donc sur 5 lames 1/10 de cc. de liquide, on compte les individus, on additionne les 5 nombres et on obtient ainsi la concentration pour $\frac{1}{2}$ cc.

- Hamster : Les hamsters ont le ventre rasé, ils sont lavés et placés dans des boîtes contenant de l'eau distillée avec des furcocercaires (1000 cercaires pour 1 hamster) ; la durée d'infestation est de 30 à 40 mn.

45 jours après, on peut récupérer les schistosomes adultes et les oeufs.

- Perfusion : Le hamster est tué par 1 cc de mélange d'héparine (1 Vol.) et de Nembutal (5 Vol.), que l'on injecte dans la cuisse. Puis l'animal est disséqué ; une canule est introduite dans l'aorte puis la veine porte, bourrée de Vers adultes, est incisée. On injecte ensuite du sérum physiologique dans

l'aorte jusqu'à ce que la totalité du sang contenant les Vers soit évacué et récupéré dans un verre ;

On laisse décanter jusqu'à ce que tous les schistosomes soient déposés. On élimine alors le surnageant et on ajoute du sérum physiologique. Répéter l'opération jusqu'à ce que le surnageant soit limpide.

- Après la perfusion, on prélève l'intestin grêle contenant les oeufs ; on peut ainsi recommencer le cycle.

II - Schistosoma rodhaini

Hôte intermédiaire : *Biomphalaria sudanica*

Hôte définitif : Rongeur africain

Hôte expérimental : Hamster

Le cycle est identique au précédent ; cependant le hamster ne doit être infecté que par 400 à 500 furcocercaires et le mollusque par 4 à 5 miracidiums.

III - Schistosoma haematobium

Hôte intermédiaire : Bullin du Maroc

Hôte définitif : Homme

Hôte expérimental : Hamster

Il faut 5 à 6 miracidiums pour infecter un bullin et 500 à 600 furcocercaires pour 1 hamster ; chez ce dernier les vers sont adultes au bout de 100 jours.

Etude expérimentale du cycle de la filaire
Dipetalonema witei

Hôte intermédiaire : *Ornithodorus tartakovski* Olenov
Hôte définitif : Mérion
Hôte expérimental : Hamster.

- Cycle : Les filaires adultes mâles et femelles sont généralement localisées dans le tissu cellulaire sous cutané de l'hôte définitif. La femelle est vivipare ; 50 jours après l'infestation de l'hôte on peut trouver des microfilaires dans le sang. Ces microfilaires, pour devenir infectantes, doivent évoluer chez le tique, celui-ci s'infeste en se nourrissant sur un mérion présentant une microfilariémie et, en 3 semaines, les microfilaires absorbées deviennent larves infectantes. Lors du repas suivant, les larves sortant par le ~~postre~~ ^{postérieur} de l'ornithodore infesteront l'animal sain sur lequel celui-ci se nourrit.

- Infestation du Hamster

Les larves infectantes sont extraites du tique par dilacération dans du Ringer à Ph 7,4 ; ces larves sont déposées à la pipette dans le canal d'une sonde que l'on a au préalable introduite sous la peau du hamster, depuis les omoplates jusqu'à la région anale. Les filaires grossissent et atteignent leur taille maximum 180 jours après l'infestation.

Pour savoir si le hamster est infesté correctement, on pratique une microfilarémie. Pour cela, on saigne l'animal en perçant le sinus oculaire avec une pipette fine où l'on fait monter le sang par aspiration.

On dépose sur une lame une goutte de sang d'un volume tel qu'elle occupe entièrement la surface d'une lamelle 18 x 18 sans déborder. Si l'infestation est réussie on doit pouvoir compter de 40 à 60 microfilaires.

- Pour récupérer les filaires adultes il suffit de retirer la peau du hamster et de les prélever, à la pince, dans le tissu sous-cutané.

- Infestation des Ornithodores

Le hamster infesté est attaché sur une planche, on lui rase la région abdominale. On place ensuite, sur la région rasée, 30 tiques adultes, à jeun depuis un mois, retenus prisonniers dans une cage dont le plancher est constitué par une gaze. Les tiques piquent le hamster et on les laisse s'infester pendant 2 heures.

- Elevage des tiques : Les Ornithodores sont élevés dans un bocal contenant du sable de rivière tamisé à 250 microns, bouché par du coton, et conservé à 29°C en atmosphère humide. Ils se nourrissent sur des souriceaux nouveau nés que l'on place dans le bocal pendant 24 heures.

Cycle expérimental de
Hymenolepis nana fraterna

Hôte intermédiaire : *Tenebrio molitor*
Hôte définitif : Souris.

Le cycle peut être direct : la souris ingère l'oeuf qui donne dans l'ileon le cysticercoïde et l'adulte.

Cycle direct - La souris infestée est ouverte ; les intestins sont retirés ; le gros intestin est éliminé ; l'intestin grêle est ouvert depuis sa partie postérieure ; les vers sont prélevés et placés dans du sérum physiologique.

Pour infester la souris saine, on sépare les segments gravides et on les fait ingérer à l'animal à l'aide d'une pissette.

Cycle indirect

- Infestation du *Tenebrio* : Les *Tenebrio* sont mis à jeuner pendant 8 à 10 jours sur une feuille de papier filtre humide, dans une boîte de Petri. Puis des segments gravides sont déposés dans la boîte ; l'insecte les mange et s'infeste ainsi. La durée d'infestation est de 8 jours, après cela le *Tenebrio* est remis en élevage.

- Infestation de la souris : Les cysticercoïdes vivent dans le coelome du *Tenebrio* ; pour les libérer, on dilacère l'insecte dans un verre de montre contenant du sérum physiologique. Chaque souris est infestée par une dizaine de cysticercoïdes introduits

per os, à la pipette.

- Chez l'insecte : les cysticercoïdes sont matures en 30 jours
- Chez la souris : les vers sont adultes en 10 jours, mais ils disparaissent au bout d'un mois.

Une nouvelle infestation ne prend pas car ces animaux sont immunisés.

Cycle expérimental de *Hymenolepis microstoma*

Hôte définitif : souris-rat-hamster

Hôte intermédiaire : *Tribolium confusum*.

Le cycle est toujours indirect.

Les techniques d'infestation sont identiques à celles du cycle précédent.

Chez l'Insecte : les cysticercoïdes sont matures en 3 semaines

Chez le rat : le Ver est adulte au bout d'un mois et peut infester son hôte pendant 5 mois. Il est situé dans la partie antérieure de l'intestin grêle, le scolex est fixé dans le canal choledoque qui est hypertrophié.

Table des matières

<u>Protozoaires parasites du sang</u>	p. 1
I. Introduction et systématique	p. 1
II. Coloration au Giemsa	p. 3
- Frottis de sang	p. 3
- Goutte épaisse	p. 3
- Appositions d'organes	p. 4
- Conditions de réussite	p. 4
- Conservation des frottis non colorés (Giemsa-salé)	p. 5
III. Plasmodium	p. 5
A. Plasmodium de rongeurs	p. 6
1. Isolement de la souche	p. 6
2. Splénectomie	p. 6
3. Passage Rongeur-Rongeur	p. 7
- Passage intrapéritonéal	p. 7
- Passage intraveineux	p. 8
4. Etude du Plasmodium dans le sang	p. 8
- Coloration des réticulocytes	p. 8
- Rougeolement des hématies parasitées	p. 9
- Eperythrozoon coccoides	p. 9
- Etude et coloration d'une exflagellation	p. 9
5. Infection des Anophèles	p. 10
6. Etude du Plasmodium chez l'Anophèle	p. 11
- Ookinète	p. 11
- Oocystes	p. 11
- Coloration de l'intestin du mousti- que à l'Héματοxyline de Ehrlich	p. 12
- Sporozoïtes	p. 12

7. Dissection de masse	p. 12
8. Etude du cycle exoerythrocytaire primaire .	p. 13
- Biopsie de foie	p. 14
9. Conservation des souches aux basses températures	p. 15
10. Giemsa pour coupes histologiques	p. 16
B. Plasmodium d'Oiseaux	p. 19
C. Paludisme humain	p. 20
1. Diagnostic microscopique	p. 20
- Méthode de Field	p. 21
2. Coupes anatomo-pathologiques	p. 22
- Hématoxyline de Ehrlich - éosine	p. 23
3. Coupes histologiques d'Anophèles entiers ..	p. 24
IV. Babesia - Haemogregarines	p. 25
V. Trypanosomes	p. 26
1. Etude et entretien des souches sur animaux de laboratoire	p. 26
2. Infection des vecteurs	p. 28
A. Salivaria : groupe brucei	p. 28
B. Stercoraria : T. cruzi	p. 29
3. Conservation des Trypanosomes par congélation	p. 30
4. Cultures	p. 31
A. Stercoraria	p. 31
a. Milieu N.N.N.	p. 32
b. Culture des formes amastigotes	p. 33
B. Salivaria	p. 34
a. Milieu d'Almeida	p. 34
b. Milieu de Tobie, Von Brand	p. 35

5. Diagnostic des Trypanosomiasés humaines	p. 36
A. Trypanosomiasé africaine	p. 36
B. Trypanosomiasé américaine	p. 38
VI. Leishmanies	p. 41
1. Isolement de la souche à partir des réservoirs de virus	p. 40
2. Entretien des souches sur animaux de laboratoire	p. 42
3. Infection des vecteurs	p. 42
3. Conservation par le froid	p. 43
5. Cultures	p. 43
6. Coloration du flagelle	p. 44
7. Diagnostic des Leishmaniosés humaines	p. 44

Protozoaires parasites des cellules réticulo-endothéliales
et musculaires

A. genre Toxoplasma	p. 47
A. genre Sarcocystis	p. 48

Protozoaires parasites du tube digestif

A. Examen des selles	p. 50
1. Prélèvement et transport	p. 50
2. Recherche des parasites après enrichissement ... (Méthode de Ridley et Hawgood)	p. 51
3. Examen direct	p. 53

4. Colorations	p. 53
- Chlorazol	p. 54
- Hématoxyline au fer	p. 55
- Phosphotungstic acid Haematoxylin	p. 56
- Imprégnation à l'argent	p. 57
B. Examen de la bile	p. 58
C. Examen de la bouche	p. 59
D. Coupes histologiques	p. 59
E. Cultures - Milieu de Dobell et Laidlaw	p. 59

<u>Cas de Trichomonas vaginalis</u>	p. 62
---	-------

Immunologie

- Immunoélectrophorèse selon Grabar et Williams	p. 63
1. Préparation de la solution antigénique	p. 63
2. Préparation de l'antisérum	p. 65
3. Immunoélectrophorèse	p. 66
4. Coloration des lames	p. 67
5. Utilité de l'Immunoélectrophorèse	p. 68
- Etude du cycle expérimental de quelques Schistosomes. p. 70	
I. S. mansoni	p. 70
II. S. rodhaini	p. 72
III. S. haematobium	p. 72
- Etude expérimentale du cycle de la filaire	
Dipetalonema Witei	p. 73
- Cycle expérimental de Hymenolepis nana fraterna	p. 75
- Cycle expérimental de Hymenolepis microstoma	p. 76