

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale

N° 11

septembre 98

**AMIBES ET FLAGELLÉS
INTESTINAUX**

AMIBES OCULAIRES

LEUR DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE





Cher Confrère,

BIOFORMA est heureux de vous présenter le numéro 11 des Cahiers de Formation de Biologie Médicale issu de la collaboration avec la Direction des Contrôles et des Laboratoires de l'Agence du Médicament, qui fait suite à un contrôle de qualité national en parasitologie.

Ce document est exceptionnel.

Placé sous le parrainage du Professeur L.C.DRUMPT, préparé par le Professeur PETITHORY et ses collaborateurs, il vous apporte un recueil de données inédites, commentées et illustrées qui sera pour vous, nous l'espérons, un outil précieux de formation permanente et un vade-mecum utile sur ce sujet devenu un thème récurrent de Santé Publique.

Cette fin de siècle est caractérisée par de grands mouvements de population entraînant dans notre pays, comme ailleurs, l'apparition ou le retour de pathologies parasitaires qu'il est nécessaire de pouvoir diagnostiquer avec précision.

Nous sommes certains que vous serez sensible à l'effort de qualité scientifique et technique de ce document et nous espérons qu'il sera, pour vous, une aide journalière dans vos travaux.

Nous vous en souhaitons bonne réception et vous prions d'agréer, Cher Confrère, nos confraternelles et cordiales salutations.

**Adrien BEDOSSA
Président**

AMIBES ET FLAGELLÉS INTESTINAUX

AMIBES OCULAIRES

LEUR DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE

CAHIER **BIOFORMA**
DE
Formation
version numérique

J.C. PETITHORY

Correspondant national de l'Académie de Médecine

F. ARDOIN-GUIDON

C. CHAUMEIL

HO THI SANG *In memoriam*

Préface de L..C. BRUMPT

Membre de l'Académie de Médecine

Avec la collaboration technique de :

J-G. Gobert – P. Jousserand – S. Le Ponner - M. Antoine

M. Burlandy – L. Batellier – C. Debbasch et Y. Scat.

Toute reproduction, même partielle, ne peut être faite
qu'après autorisation des auteurs
et de Bioforma

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués à l'ensemble des LABORATOIRES D'ANALYSES de BIOLOGIE MEDICALE en FRANCE.

]

TOUT LE CONTENU DE CE FICHER RESTE LA PROPRIETE DE BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

]

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

]

Seule une impression pour une copie personnelle (étudiant, interne, biologiste de labm) est permise.





Emile Brumpt au microscope, dans l'ancien laboratoire de parasitologie de la faculté de médecine de Paris, en 1925 année où il présenta à l'Académie Nationale de Médecine sa grande découverte :

Etude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n. sp.

PRÉFACE

La publication, en 1925, qui décrivait une nouvelle espèce d'amibe, l'Entamoeba dispar, provoqua un scandale parmi les chercheurs professionnels. Ceux-ci estimaient que l'Université devait limiter le rôle de ses professeurs à l'enseignement et à la rédaction de manuels : c'est méconnaître la vocation de l'enseignant, souvent sélectionné par plusieurs concours. Il lui a fallu d'abord s'instruire et perfectionner ses connaissances pour transmettre à ses élèves des notions qu'il a lui-même vérifiées. Enfin la personnalité d'un chercheur se bâtit au cours d'événements de sa vie, même en dehors de sa spécialisation.

Il est certain que, depuis le début du siècle jusqu'en 1935 Émile Brumpt avait parcouru de nombreux pays tropicaux, comme l'Abyssinie de 1901 à 1903, le Brésil de 1911 à 1914. Il avait accepté plusieurs missions antipaludiques à la demande de la Société des Nations et de la Fondation Rockefeller. L'expérience acquise sur le terrain avait élargi son horizon scientifique, au contraire du chercheur qui est dans son laboratoire, aussi bien équipé soit-il

En 1925, l'épidémiologie de l'amibiase s'impose à son attention. La fréquence des kystes à quatre noyaux de type dysentérique était de 5 à 10 % dans les pays tempérés alors que presque jamais n'y était observée d'hépatite amibienne, complication majeure de l'amibiase. Alors que, dans les pays tropicaux, pour une prévalence à peu près similaire des kystes, les atteintes hépatiques sont très souvent observées. En réalité il existait deux espèces distinctes d'amibes, Entamoeba histolytica, invasive pour les tissus, fréquemment hématophage et Entamoeba dispar, non invasive, non hématophage.

Ces amibes sont décrites dans ce livre avec des illustrations de qualité exceptionnelle.

La méconnaissance de ces faits aboutissait à une imperfection des diagnostics d'amibiase, allant jusqu'à des compérages, mais surtout à la prescription abusive de médicaments dangereux, à la surmédication, voire à l'automédication. Nous avons vu jadis des myocardites et des polynévrites emétiniennes

La dualité des espèces fut très discutée : certains auraient admis l'existence d'une souche E. histolytica avirulente, alors qu'Émile Brumpt, en éminent zoologiste, restait intransigeant sur la notion d'espèce.

Dans les années 80, les travaux de Sargeaunt P. sur les zymodèmes de ces deux espèces d'amibes, ainsi que de nombreux autres travaux confirmèrent de façon éclatante la dualité des deux amibes, définitivement reconnue par Diamond L.S. et Clark C. G. en 1993.

Ces considérations scientifiques ne doivent pas faire oublier la situation des cliniciens devant un résultat de laboratoire, sans compter l'impatience du malade qui exige un traitement.

Nous pouvons faire confiance aux médecins cliniciens ou gastro-entérologues pour faire œuvre de thérapeutes et aussi de psychologues.

Pr L. C. BR UMPT

De l'Académie Nationale de Médecine

REMERCIEMENTS

Nous remercions de leurs apports à cet ouvrage :

L.R. Ash - Los Angeles U.S.A.

B. Beauvais - Paris

A.C. Bisognani - Gonesse

R. Caillet - Bry sur Marne

J-L. Cardot - Gonesse

J. De Loye - Gonesse

G. Galeazzi - Colombes

S. Gatti - Pavie (Italie)

T. Giacomini - Aulnay sous bois

N. Godineau - Saint-Denis

R. Himy - Strasbourg

Ch. Junod – Paris

M. Kremer - Strasbourg

V. Lavarde - Paris

M. Mauron - Gonesse

Ph. Pariente - Paris

J.F. Pays - Paris

F. Poujade - Gonesse

J. Rousselot - Gonesse

J.J. Rousset - Bobigny

C. Sarfati - Paris

P.G. Sargeaunt - Londres (G.B.)

M. Scaglia - Pavie (Italie)

E. Vandemeulebrouke - Gonesse

TABLE DES MATIERES



Pages

- INTRODUCTION :	
- Test CQN <i>Dientamoeba fragilis</i>	3
- Difficulté du diagnostic microbiologique des amibes et flagellés	5
- Nomenclature et abréviations	7
- TECHNIQUES DE COLORATION	
• Coloration au M.I.F.	9
• Fixation et coloration permanente des amibes par l'A.P.V.-trichrome	15
• Etalement et fixation des selles	20
• Coloration par la laque ferrique. Hématoxyline de Heidenhain.....	21
• Coloration au Noir chlorazol.....	24
• Méthode de Bailenger et Faraggi	27
• Fixation des trophozoites et différenciation des structures nucléaires Junod 1972	30
• Techniques de colorations diverses.....	30
• Coloration des Kystes au Lugol	32
• Coloration des corps sidérophiles par la méthode de Sargeant.....	34
• Réactifs.....	35
- DIVISION DES FORMES VÉGÉTATIVES D'AMIBES	
• Division cellulaire en général.....	39
• Division des formes végétatives d' <i>Entamoeba histolytica</i>	39
• Division des formes végétatives des autres amibes de l'Homme	48
• Application des notions sur la division des amibes au diagnostic microscopique courant....	52
- AMIBES GÉNÉRALITÉS	
• Type Entamibe et Type Limax	54
• Comment distinguer une forme végétative d'un kyste	55
• Figure 1 : aspect comparatif et taille des formes végétatives d'amibes.....	56
• Prévalence des amibes et flagellés	58
• Résistance des amibes	59

- ÉTUDE DES FORMES VÉGÉTATIVES D'AMIBES

• Comment étudier une forme végétative d'amibe à frais	62
• Forme végétative d' <i>Entamoeba histolytica</i>	64
• Figure 2 : Différentes formes végétatives d' <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	67
• Forme végétative d' <i>Entamoeba dispar</i>	78
• Forme végétative et kyste d' <i>Entamoeba moshkovskii</i>	94
• Forme végétative d' <i>Entamoeba hartmanni</i>	96
• Forme végétative d' <i>Entamoeba coli</i>	101
• Figure 3 : formes végétatives d' <i>Entamoeba</i>	102
• Forme végétative d' <i>Entamoeba polecki</i>	113
• Forme végétative d' <i>Endolimax nanus</i>	117
• Forme végétative d' <i>Iodamoeba butschlii</i>	121

- ÉTUDE DES KYSTES D'AMIBES

• Comment étudier un kyste d'amibe	129
• Figure 4 : différents kystes d'amibes	131
• Kyste d' <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	132
• Kyste d' <i>Entamoeba hartmanni</i>	141
• Kyste d' <i>Entamoeba coli</i>	144
• Kyste d' <i>Entamoeba polecki</i>	155
• Kyste d' <i>Endolimax nanus</i>	158
• Kyste d' <i>Iodamoeba butschlii</i>	162

- FLAGELLÉS FORMES VÉGÉTATIVES ET KYSTES

• Comment étudier un flagellé.....	169
• Forme végétative et kyste de <i>Giardia intestinalis</i>	171
• Forme végétative et kyste de <i>Chilomastix mesnili</i>	183
• Forme végétative et kyste de <i>Retortamonas intestinalis</i>	190
• Forme végétative et kyste d' <i>Enteromonas hominis</i>	193
• Forme végétative de <i>Pentatrichomonas intestinalis</i>	195
• Forme végétative de <i>Dientamoeba fragilis</i>	196

- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES KÉRATITES ET ULCÈRES DE CORNÉE À AMIBES LIBRES

206

- BIBLIOGRAPHIE

• Ouvrages de bases	235
• Kyste d' <i>Iodamoeba butschlii</i>	237

- INDEX DES PHOTOS

- INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

INTRODUCTION

Le diagnostic d'espèce des amibes présentes dans des selles, surtout au stade de forme végétative, est un des plus difficiles qui soit.

Les difficultés du diagnostic des formes végétatives d'amibes ont des origines variées :

- leur relative rareté pour les laboratoires polyvalents qui ont donc rarement l'occasion de les diagnostiquer et donc de les connaître ;
- la nécessité de selles émises au laboratoire avant et après réactivation et immédiatement étudiées pour l'observation des formes végétatives ;
- les importantes variations de taille et d'aspect dans une même espèce, liées principalement au stade de division (voir p. 38) ;
- la présence possible chez l'homme de huit espèces différentes d'amibes de morphologie voisine et parfois identique.

Malgré cette multiplicité des espèces, un diagnostic précis est nécessaire pour assurer le traitement de l'amibiase due à la redoutable *Entamoeba histolytica* pour laquelle on a estimé qu'il y avait 40 000 à 110 000 morts par an dans le monde en 1985 (47 ; 109). Mais il ne faut pas non plus faire méconnaître par une fausse identification le diagnostic exact de troubles réels correspondant à une autre pathologie comme la recto-colite-ulcéro hémorragique ou le cancer du colon.

L'examen coprologique microscopique parasitaire reste indispensable puisqu'il est le seul actuellement à pouvoir permettre le diagnostic différentiel simultané de nombreuses espèces d'amibes et de flagellés, ainsi que d'helminthes.

Pourtant cette voie présente des insuffisances, en particulier pour le diagnostic différentiel entre *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba dispar*, espèce découverte par Émile Brumpt en 1925 et méconnue pendant près de 70 ans, il en est de même pour *Entamoeba moshkovskii* et *E. histolytica*. Ces différenciations nécessitent le recours à d'autres techniques : la culture de l'amibe mais aussi des méthodes plus complexes comme l'étude du zymodème, l'emploi de P.C.R., ou de tests E.L.I.S.A. pratiqués sur les selles, qui devraient se développer.

Ces méthodes ont en effet un très grand avenir pour le diagnostic positif et différentiel de la trop souvent mortelle amibiase à *E. histolytica*, comme le montre les résultats imparfaits pour le diagnostic de cette amibe obtenus par les laboratoires de biologie médicale lors du Contrôle National de Qualité en Parasitologie (tableaux 111 ; VI).

Ces nouvelles méthodes sont par contre inutiles pour le diagnostic d'une maladie jamais mortelle comme la *Giardiase* où le diagnostic microscopique est presque parfait (tableau XI).

Un diagnostic précis d'*E. histolytica* est capital étant donné la gravité de l'amibiase dont elle est la cause. Indirectement, le diagnostic exact d'*E. dispar* est très important depuis 70 ans combien de traitements inutiles et même dangereux, dans le passé surtout, auraient pu être économisés. Très longtemps le médicament utilisé dans l'amibiase était l'émétine qui fut à l'origine de nombreux accidents cardiaques ou neurologiques mortels (62 ; 64). Nul doute que ces morts auraient pu être évitées en majeure partie si la grande découverte d'É. Brumpt en 1925 avait été reconnue plus tôt et si l'étude diagnostique du pouvoir pathogène pour le chat s'était alors généralisée.

Le diagnostic des kystes d'amibes est justement considéré comme plus facile, ce qui conduit à faire un premier examen sur selles non réactivées. Leur coloration par le Lugol double est aisée. Mais les difficultés de diagnostic différentiel entre *E. histolytica*, *E. dispar* et *E. moshkovskii* sont encore plus grandes que pour les formes végétatives. Pour les principales de ces amibes, nous traiterons séparément le diagnostic des formes végétatives et celui des kystes, en regroupant ainsi les problèmes que posent leurs aspects microscopiques.

La pratique répétée (3 fois) de l'examen parasitologique de selles permet d'augmenter de 20 % environ le dépistage d'*E. histolytica* / *E. dispar*, sinon le recours à un examen de selles émises spontanément et un autre après réactivation est utile (58 ; 67 ; 69 ; 74).

Pour les flagellés, *Giardia intestinalis*, sous la forme végétative ou kystique ne pose pratiquement pas de problème. *Chilomastix mesnili* est plus difficile à identifier. Quant à *Retortomonas intestinalis* et *Enteromonas hominis*, leur présence dans les selles est rare.

Les amibes libres de l'œil, se voient plus fréquemment du fait de l'augmentation du nombre de porteurs de lentilles de contact et d'une meilleure connaissance de leur diagnostic : celui-ci doit encore être amélioré pour éviter la perte oculaire.

C'est pour cette raison que nous avons jugé important que soit précisé son diagnostic biologique par l'équipe de l'hôpital ophtalmologique des Quinze-Vingts.

Nous avons, grâce à l'activité de Bioforma, fait parvenir à la totalité des 4 500 laboratoires d'analyses médicales de France, publics ou privés, une selle contenant *Dientamoeba fragilis*, qui est en fait un flagellé comme le prouve la présence d'un corps parabasal visible en microscopie électronique. Ce flagellé en pratique se présente comme une forme végétative d'amibe, avec d'importantes difficultés de diagnostic.

Trois échantillons différents de ce même parasite avaient été envoyés à chaque biologiste :

- un millilitre de suspension de selles formolées,
- un millilitre de suspension de selles colorées par le Merthiolate Iode Formol,
- un frottis de selles fixés par l'Alcool PolyVinylique coloré par le trichrome de Gomori-Wheatley.

Ce test avait un double but :

- la formation permanente des biologistes,
- faire le bilan des possibilités de diagnostic des formes végétatives d'amibes ou assimilées actuellement.

Les résultats détaillés figurent dans les annales du. Contrôle National de Qualité en Parasitologie de Novembre 1995. Ils permettent de constater une amélioration des résultats conformes.

	<i>D. fragilis</i>	<i>E. Histolytica</i>	<i>E. Coli</i>
Novembre 1982	18,4 %	51,5 %	26,6 %
Février 1984	28,6 %	30,4 %	20,8 %
Novembre 1995	32,1 %	25,1 %	12,2 %

Mais aussi un chiffre encore trop élevé de diagnostics *d'Entamoeba histolytica*, conduisant à un traitement en général inutile : d'ailleurs les deux porteurs sains ayant fourni pendant un temps prolongé les grandes quantités de selles nécessaires à cet envoi, ont guéri spontanément. Le sondage, fait à l'occasion de ce test, a montré un certain nombre de points importants :

- quatre laboratoires sur cinq n'utilisent pas de coloration pour l'étude des amibes ou flagellés. Certes, quelques biologistes spécialisés en parasitologie arrivent dans ces conditions à identifier les amibes et flagellés, mais il faut pour les biologistes moins entraînés, disposer d'une technique de coloration pour ces diagnostics objectivement difficiles ;
- les différentes colorations employées sont le Lugol (14 %) la méthode de Bailenger (2,5 %) et le Merthiolate Iode Formol = M.I.F. (2 %) ;
- l'hématoxyline ferrique, le noir de chlorazol et l'A.P.V. trichrome ne sont utilisés que par moins de 10 laboratoires ;
- les trois échantillons envoyés ont été notés par les participants.

Pour ceux ayant fait un diagnostic exact de *D. fragilis*, les « bonnes notes » de 4 et 5 ont été données:

à la technique A.P.V. trichrome de Gomori Wheatley	par 45 % des biologistes
à la technique M.I.F.	par 31 % des biologistes
à la technique Selle Formolée	par 12 % des biologistes

Nous estimons que cette notation correspond bien à la qualité. Une grande partie des photographies figurant dans cet ouvrage ont été faites après cette très bonne coloration au trichrome que nous avons introduite en France pour une meilleure qualité des examens coprologiques (41). Elle a le défaut de nécessiter une batterie spéciale de colorants pour permettre une identification satisfaisante alors que les laboratoires polyvalents de taille limitée ont rarement l'occasion de la pratiquer.

La bonne coloration M.I.F. est techniquement plus facile à réaliser, ce qui est important, mais les préparations au M.I.F. entre lame et lamelle sont moins faciles à lire au microscope, en particulier à l'immersion, où les détails morphologiques des amibes et des flagellés se voient un peu moins bien.

Nous avons fait précéder l'étude des différents parasites par des résultats obtenus au Contrôle National de Qualité en Parasitologie en France. Ces données « de terrain » portant sur un nombre significatif de laboratoires testés, plus de mille par échantillon en général, ont un grand intérêt. D'abord elles permettent de situer dans la réalité les problèmes de diagnostic différentiel entre les diverses amibes et flagellés. À ce sujet il convient de souligner que les éléments non parasitaires des selles interviennent aussi dans le diagnostic différentiel : ainsi pour l'envoi de juillet 1988 (tableau XI), le diagnostic fait par erreur de 3,5 % d'œufs d'*Ascaris lumbricoides* n'était pas dû à une confusion avec les kystes de *Giardia intestinalis* qui avaient fait l'objet de cet envoi mais à un élément non parasitaire des selles. Cet aspect a été traité dans l'ouvrage « Vrais et faux parasites en coprologie microscopique » édité par Bioforma (22). Ces résultats du Contrôle National de Qualité en Parasitologie en France montrent souvent de très bons résultats, par exemple pour *Giardia intestinalis* où les résultats conformes dépassent les 95 % des laboratoires participants, avec souvent une amélioration dans le temps. Par contre, ceux concernant l'identification d'*E. histolytica* / *E. dispar* varient de 24,5 à 76 % (moyenne de 54,9 %) pour les kystes (tableau VI) et de 23,9 à 73,8 % (moyenne de 40,5 %) pour les formes végétatives (tableau III) : ce fait est préoccupant.

En conclusion de cette vaste étude, grandeur nature, on en déduit :

- qu'il est très important d'utiliser une technique de coloration pour le diagnostic des formes végétatives d'amibes et aussi des kystes,
- que les techniques de l'A.P.V. trichrome ou du M.I.F., dont les réactifs sont commercialisés, sont souhaitables,
- que les nouvelles techniques de diagnostic d'*E. histolytica*, seule amibe intestinale mortelle, seront les bienvenues.

DIMENSIONS DES AMIBES ET FLAGELLÉS

C'est un des critères les plus importants pour leur diagnostic microscopique, parfois le seul comme pour la différenciation entre *Entamoeba hartmanni* et *Entamoeba histolytica*. Le Guide de Bonne Exécution des Analyses rend la possession d'un micromètre obligatoire pour tous les laboratoires faisant de la parasitologie (arrêté du 2 novembre 1994).

PHOTOS

Elles ont été presque toujours prises à l'immersion, Obj. X 100 ce qui a l'avantage de bien montrer les détails des protozoaires étudiés et de pouvoir les comparer au point de vue taille. Il est parfois possible de les étudier à un grossissement plus faible en particulier pour les formes végétatives mobiles de flagellés.

Les photos ne permettent de saisir qu'un plan horizontal de la sphère des kystes, c'est un examen « tomographique » qui rend donc difficile l'étude complète des protozoaires alors que l'examen microscopique réel permet de faire varier la mise au point et donc l'étude complète d'un kyste : on peut ne voir par exemple que 5 noyaux sur une photo d'un kyste alors qu'en faisant varier la mise au point microscopique on constate qu'il en possède 8.

NOMENCLATURE SCIENTIFIQUE ET ABRÉVIATIONS

- Pour les noms d'espèces d'amibes et de flagellés nous avons utilisés :

International Nomenclature of Diseases

Infectious Diseases Volume II

CI OMS, Genève 1987

WHO 1211 Genève 27 Suisse

et les publications récentes de Clark et Diamond, 1991 ; Diamond et Clark, 1993 Martinez et al., 1998

- Pour *Entamoeba coli* nous utilisons l'abréviation *Ent. coli* et non pas *E. coli* à cause de la confusion possible avec *Escherichia coli*.

- Pour Forme (s) Végétative (s) nous utilisons l'abréviation F.V. Le terme de trophozoïte employé par les Anglo-saxons est synonyme.

- Pour Merthiolate Iode Formol nous utilisons l'abréviation M.I.F.

- pour Alcool PolyVinylique nous utilisons l'abréviation A.P.V. (voir texte A.P.V.)

TECHNIQUES DE COLORATION



Pages

- TECHNIQUES DE COLORATION

• Coloration au M.I.F.....	9
• Fixation et coloration permanente des amibes par l'A.P.V.-trichrome	15
• Etalement et fixation des selles	20
• Coloration par la laque ferrique. Hématoxyline de Heidenhain.....	21
• Coloration au Noir chlorazol.....	24
• Méthode de Bailenger et Faraggi	27
• Fixation des trophozoites et différenciation des structures nucléaires Junod 1972	30
• Techniques de colorations diverses.....	30
• Coloration des Kystes au Lugol	32
• Coloration des corps sidérophiles par la méthode de Sargeant.....	34
• Réactifs.....	35

COLORATION AU M.I.F.

Technique de Sapero, Lawless et Strome, 1951 et Sapero Lawless 1953.

Le nom de cette technique vient de ses 3 réactifs principaux :

- Merthiolate sous forme de teinture au 1/1000
- Iode sous forme de Lugol à 5 %
- Formol du commerce



Réactifs

Se procurer la « teinture de merthiolate 1/1000 » Lilly, formule n° 99®, ou une préparation équivalente, qui contient du merthiolate, de l'alcool, de l'acétone et de l'éosine. A partir de cette teinture, préparer 480 ml de solution mère M.F. :

Solution mère « M.F. »	Teinture de merthiolate 1/1000 Lilly®.....	200 ml
	Formol du commerce.....	25 ml
	Glycérine.....	5 ml
	Eau distillée.....	250 ml

Cette solution est stable pendant quelques mois.

A conserver en flacon brun.

Lugol 5 %	Iode en paillettes.....	0,5 g
	Iodure de potassium.....	1 g
	Eau distillée.....	10 ml

Pour la préparation du Lugol, voir pages 32 et 33.

Solution stable pendant 3 à 4 semaines seulement.

A conserver en flacon brun à l'abri de la lumière.

On peut procéder de 2 façons pour la coloration, selon les besoins, entre lame et lamelle ou en tube.

COLORATION ENTRE LAME ET LAMELLE

Préparation du réactif

Préparer le mélange suivant :

Teinture de merthiolate de 1/1000 pure ...	7,75 ml
Lugol 5 % frais.....	1 ml
Formol du commerce	1,25 ml

Ce mélange n'étant stable que pendant 6 à 8 heures, il faut donc le préparer au fur et à mesure des besoins. On peut diviser par dix par exemple les quantités de réactifs en fonction du volume nécessaire. Si la solution de Lugol n'est pas fraîche il faut en augmenter la dose aux dépens de celle de la teinture de merthiolate.

Mode opératoire

Sur une lame, faire une dilution de selles dans de l'eau physiologique comme pour un examen direct, mais un peu plus épaisse, en utilisant moitié moins d'eau par exemple. On dépose sur cette dilution une goutte de la solution qu'on vient de préparer. Mélanger soigneusement avec le coin d'une lamelle l'appliquer ensuite sur la préparation. Luter avec de la vaseline ou du vernis à ongle et laisser colorer 20 à 30 minutes. Examiner la préparation.

Intérêt

- Examen presque extemporané, directement sur lame.
- Examen des glaires sanglantes contenant des amibes qui risquent d'être dispersées dans une coloration en tube, ou qui risquent de ne pas être prélevées.
- Coloration d'une suspension en CINa 9p. mille dans laquelle on a vu préalablement des amibes et des kystes à identifier.
- Mais la préparation n'est pas permanente et se dessèche vite.

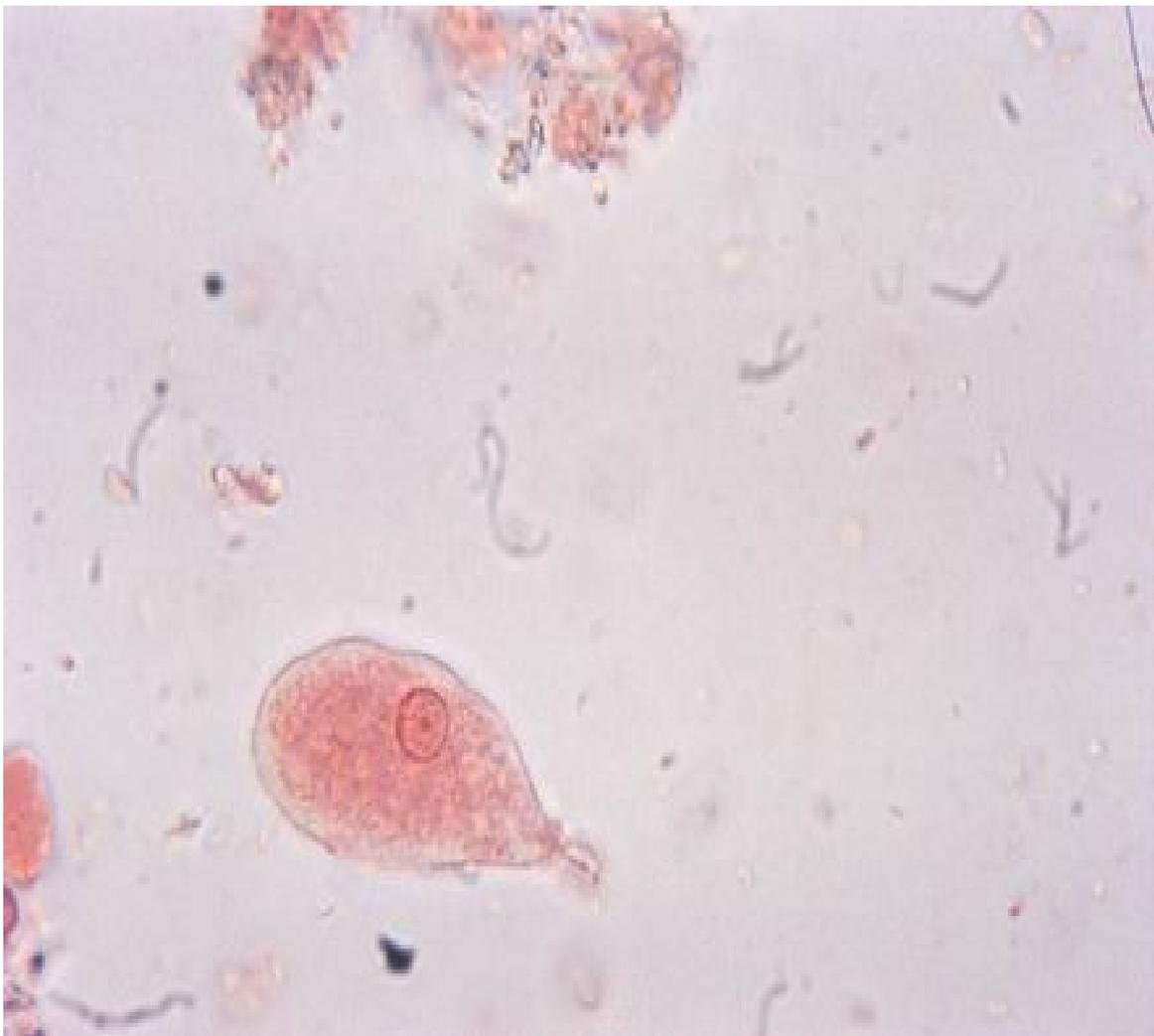


Photo n° 1

Coloration au M.I.F. Forme végétative allongée, d'*E. histolytica* / *E. dispar* fixée en mouvement. Obj. X 100.

COLORATION EN TUBE

Préparation des réactifs

Dans un tube à hémolyse, préparer extemporanément, le mélange suivant :

Solution mère MF.....	2,35 ml
Lugol 5 %	0,15 ml

On peut préparer à l'avance des tubes de solution mère MF bouchés dans lesquels on ajoute 0,15 ml de Lugol au moment de l'emploi.

Mode opératoire

Fermer le tube. Le retourner doucement, juste une fois, pour bien mélanger. Déposer immédiatement dans le fond du tube, avec une petite baguette de verre, gros comme un pois de taille moyenne de selles (environ 0,25 g), soit une dilution au 1/10. Bien triturer pour obtenir une dilution homogène. Laisser déposer. Dès que la sédimentation est complète, la coloration est achevée. Prélever alors à la pipette Pasteur, à la partie supérieure du sédiment où sont concentrés les protozoaires.

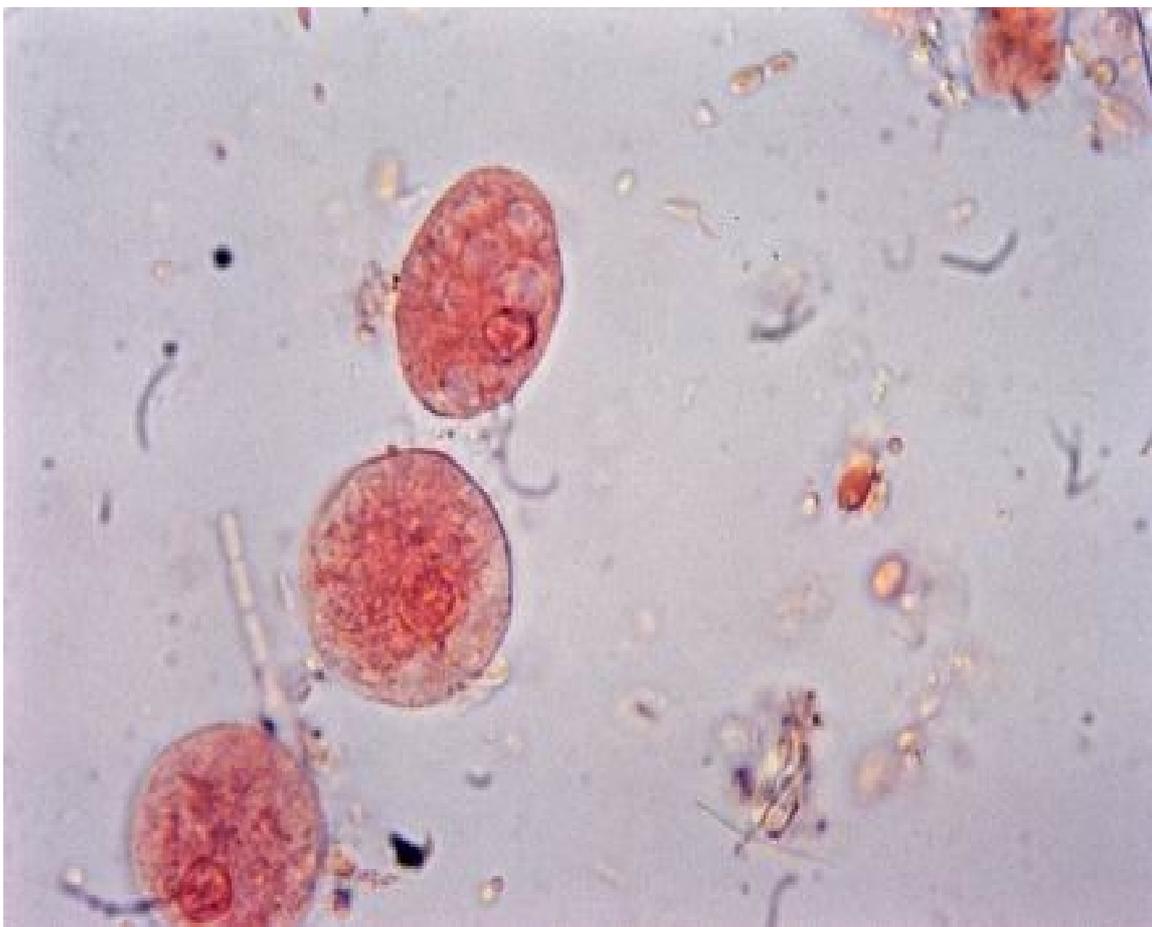


Photo n° 2

Coloration au M.I.F. Trois formes végétatives arrondies d'*E. histolytica* / *E. dispar*. Obj. X 100.

Lorsqu'on veut examiner un tube coloré depuis plusieurs semaines, il faut remettre le sédiment en suspension en secouant le tube assez énergiquement et laisser de nouveau déposer pendant 15-20 minutes.

Intérêt

- Fixation et conservation des protozoaires et œufs d'helminthes en milieu liquide. Ce matériel reste en bon état pendant des années et peut servir comme matériel d'enseignement, de référence, ou comme document pour un malade. On peut, en multipliant les doses citées ci-dessus, fixer une grande quantité de selles.
- Coloration des protozoaires grâce à l'action conjuguée de l'iode et de l'éosine, permettant leur identification.
- Permet l'envoi d'un échantillon de selles à un laboratoire spécialisé pour confirmation d'un diagnostic.

CAHIER **BIOFORMA**
DE
Formation
version numérique

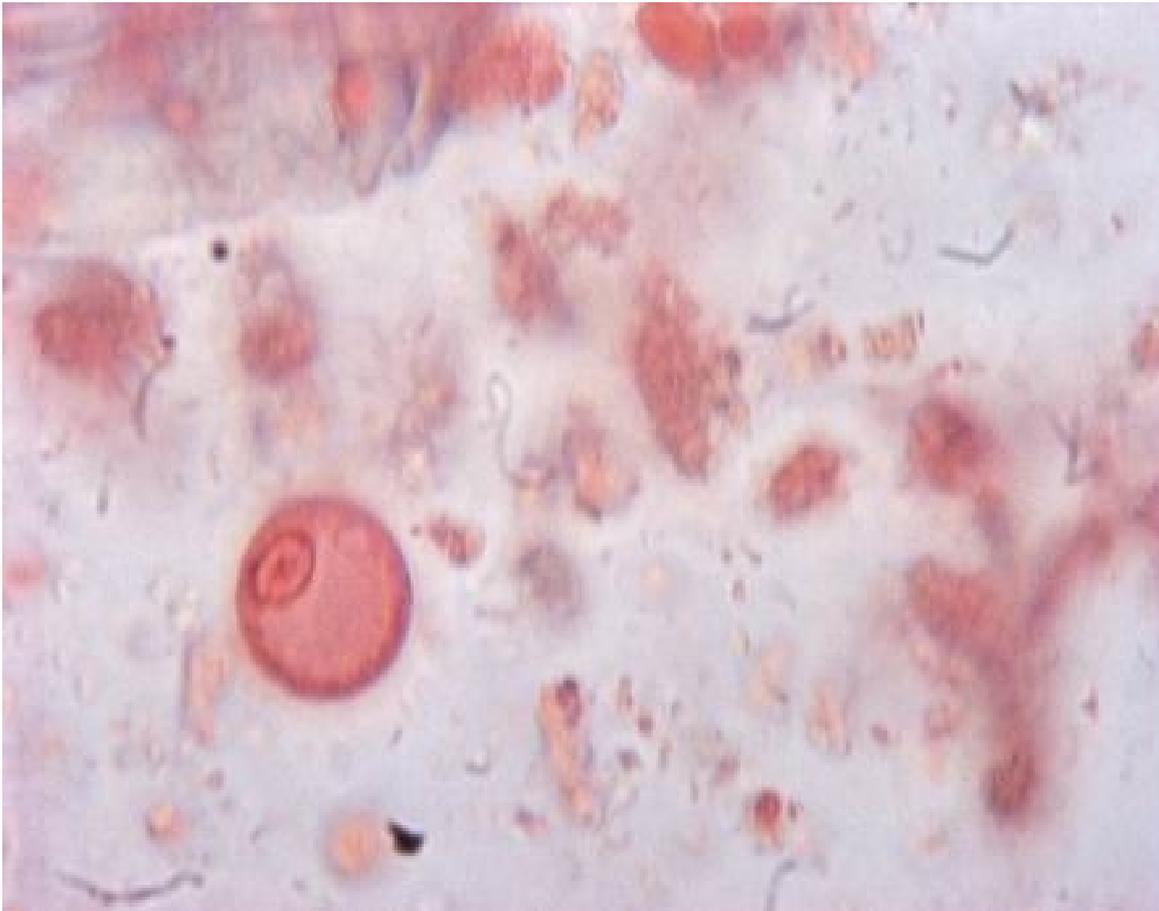


Photo n° 3

Coloration au M.I.F. Kyste à un noyau d'*E. histolytica* / *E. dispar* avec une grande vacuole.
Obj. X 100.

Causes d'échecs

- Si le mélange est préparé longtemps à l'avance, il se forme un précipité et la coloration se fait mal. Pour les prélèvements à domicile, donner au malade deux tubes, l'un contenant le Lugol et l'autre la solution mère M.F.. Le malade fait lui-même le mélange en versant la solution mère M.F. dans le Lugol et y met le prélèvement.
- La quantité de selle est trop élevée : la dilution étant au 1/10, il faut qu'après la sédimentation, le dépôt de selles corresponde à ce rapport. Si l'on met trop de selles (cas des selles dures par exemple), il n'y a pas assez de colorant. Un mélange non homogène donne les mêmes résultats : certaines amibes sont bien colorées et d'autres pas. Il vaut mieux mettre moins de selles que trop.
- Le Lugol perd rapidement son pouvoir colorant : avec une vieille solution la coloration se fait mal.
- Les selles ne sont pas fraîches : ceci n'a aucune importance pour les kystes, mais les protozoaires vivants doivent être colorés immédiatement : les détails morphologiques sont ainsi plus nets et la fixation peut les surprendre en attitude de locomotion avec les pseudopodes ou les formes caractéristiques.



Photo n° 4

Coloration au M.I.F. en tube, examinée immédiatement. Prépondérance de l'iode. Kyste d'*E. histolytica* / *E. dispar*, deux noyaux visibles. Obj. X 100.

Résultats de la coloration

Lorsque l'on examine la préparation à la fin de la sédimentation :

- le liquide surnageant est brun,
- les formes végétatives d'amibes et de flagellés sont jaune clair, ou brun clair. Les noyaux de *Dientamoeba fragilis* ne sont pas très bien colorés,
- les kystes sont incolores sur fond rouge, ce qui en facilite la recherche,
- les masses chromatiniennes des noyaux, les corps sidérophiles sont incolores et apparaissent par réfringence,
- la membrane nucléaire est par contre colorée en brun noir,
- les hématies libres ou phagocytées sont rouge vif,
- les levures par contre sont rose pâle ou rose saumon,
- les cristaux de Charcot Leyden sont bien conservés.

Par la suite, l'iode disparaît progressivement et est remplacée par l'éosine, les kystes se colorent en rose au bout d'un temps plus ou moins long tandis que les formes végétatives perdent leur coloration brune très rapidement. Notons que la coloration acajou des vacuoles iodophiles des kystes disparaît en quelques heures. Mais les noyaux restent très nets et l'identification aisée.



Photo n° 5

Coloration au MIE, en tube, examinée tardivement. Prépondérance de l'éosine. Deux kystes d'*Ent. coli* à huit noyaux, cinq visibles dans le petit et deux dans le grand. Obj. X 100.

FIXATION ET COLORATION PERMANENTE DES AMIBES PAR L'APV-TRICHOME

Introduction

GOLDMAN en 1947 (34) a proposé la fixation des frottis fécaux par une solution à base d'Alcool PolyVinylique (APV) et de sublimé qui permet une longue conservation des lames stockées et leur coloration ultérieure par divers procédés.

Réactifs

L'ALCOOL POLYVINYLIQUE (APV) est un polymère synthétique de l'alcool vinylique, soluble dans l'eau, et qui se présente sous l'aspect d'une poudre ou de grains blancs. La viscosité de la solution dépend de la concentration d'APV et du degré de polymérisation de l'alcool. Les films plastiques transparents, obtenus après séchage, résistent à l'alcool, l'éther, le xylol, l'acétone et un certain temps à l'eau. Ils sont en outre perméables à tous les colorants usuels.

L'APV, qui nous a donné les meilleurs résultats est le 90-50, de viscosité assez faible donnant des films très résistants.

LE SUBLIMÉ = CHLORURE MERCURIQUE = $HgCl_2$ est utilisé ici comme principal fixateur, c'est un oxydant acide qui précipite énergiquement les protéines surtout celles du noyau. Ces propriétés sont exaltées par l'acide acétique, qui rend le fixateur plus pénétrant. C'est un fixateur de premier ordre, qu'il est nécessaire d'éliminer complètement des tissus dès que la fixation est terminée, afin d'éviter la formation de cristaux. Cela est réalisé par l'iode. Le chlorure mercurique est un sel très toxique (46).

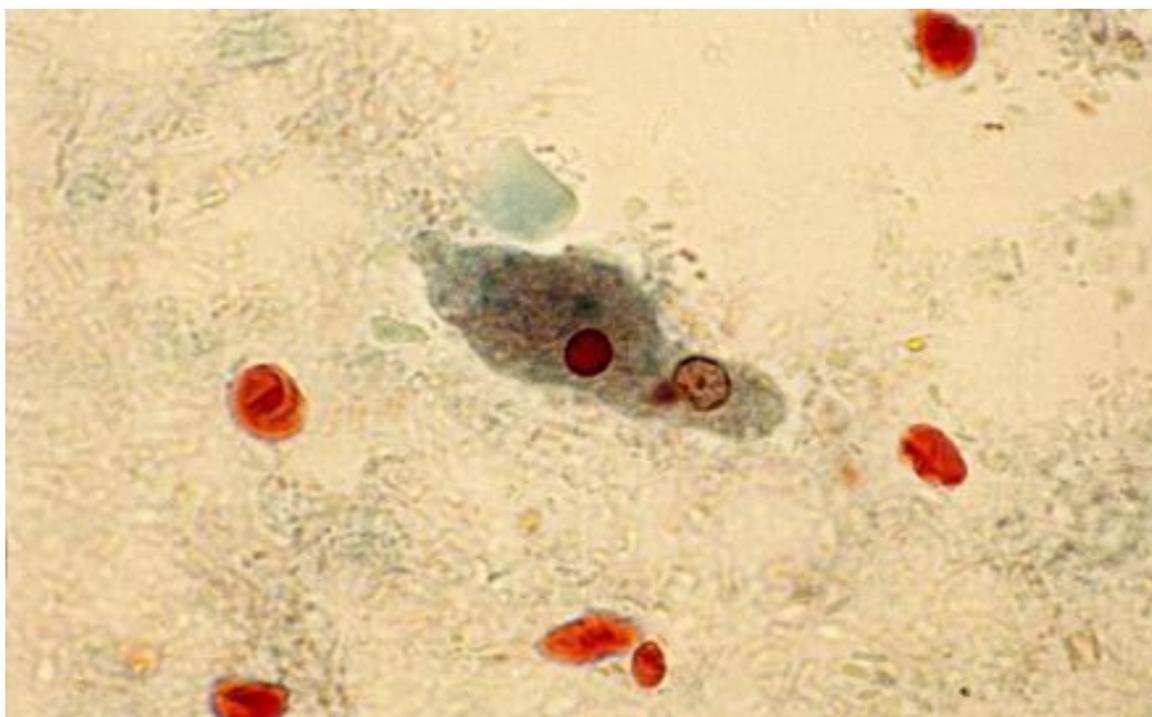


Photo n° 6

Coloration A.P.V. trichrome. Forme végétative hématophage d'*E. histolytica*. Obj. X 100.

Préparation de la solution d'APV

(2 ; 28)

Préparer d'abord une solution aqueuse saturée à froid de HgCl₂. Pour cela, on dissout d'abord à chaud 10 % de ce sel et on laisse refroidir, il se forme alors des cristaux, On décante le liquide clair surnageant au fur et à mesure des besoins. Conservation indéfinie.

Solution de Schaudinn :

- 2 volumes de solution aqueuse de chlorure mercurique (HgCl ₂) à saturation (= sublimé)	}	93,5 ml
- 1 volume d'alcool éthylique à 95 %		

Glycérol 1,5 ml

Acide acétique glacial 5 ml

Le mélange des trois réactifs précédents est à préparer à température du laboratoire

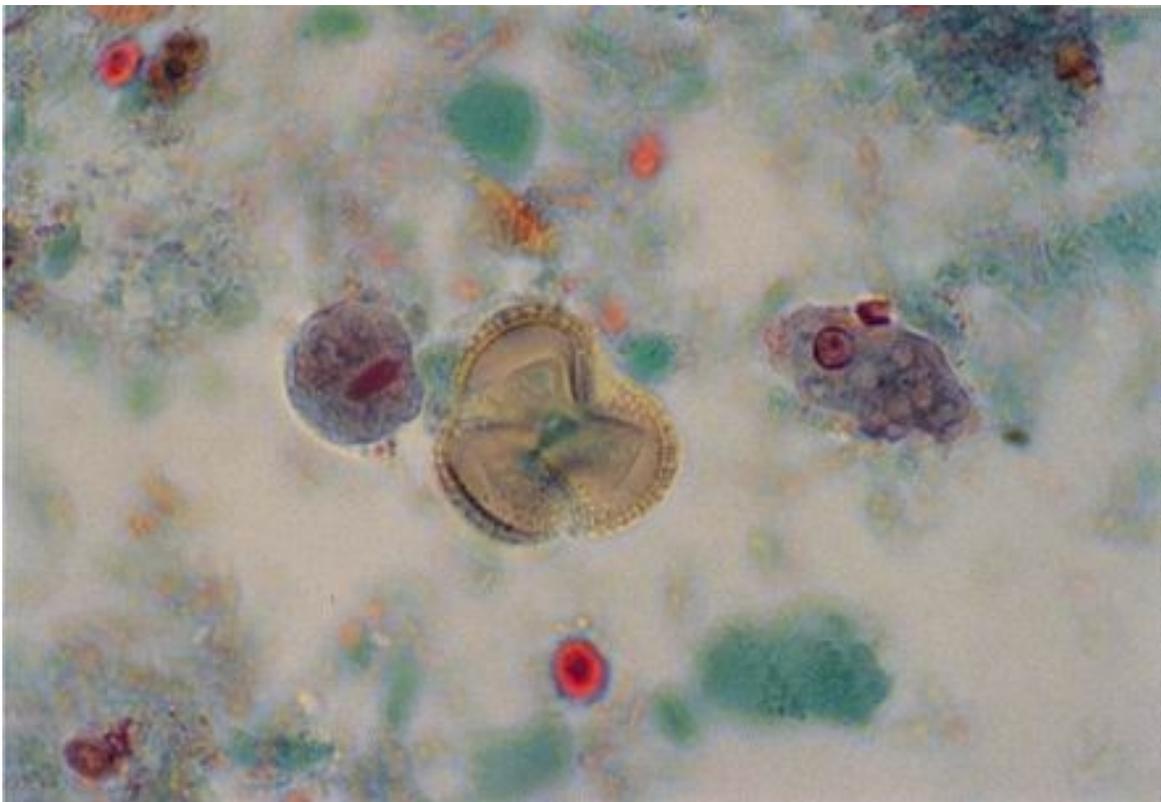


Photo n° 7

Coloration A.P.V. trichrome. Présence dans le même champ d'une forme végétative d'*E. histolytica* /*E. dispar* et d'un kyste dont seul le corps sidérophile rouge est visible. Au centre un grain de pollen de brocoli. Obj. X 100.

Ajouter progressivement 5 g d'APV. Pour dissoudre, faire chauffer à 75° C au bain-marie (attention à l'alcool inflammable) avec agitation, ce qui facilite la préparation d'une solution claire.

N.B. :

- la solution d'APV est prête à l'emploi dès sa préparation ;
- un léger trouble apparaît parfois après refroidissement, qui ne gêne pas l'emploi ;
- la conservation est très bonne, au moins un an ;
- aucun objet métallique ne doit entrer en contact avec cette solution, le sublimé est corrosif ;

Possibilité de remplacement du chlorure mercurique.

Pour des raisons de protection de la nature, a été cherché un substitut au chlorure mercurique très toxique :

- on peut employer le sulfate de cuivre à la place du chlorure mercurique, mais on obtient alors, une moins bonne morphologie des protozoaires intestinaux (31).

Garcia (31) a plus récemment étudié le sulfate de zinc pour remplacer le chlorure mercurique. La morphologie des protozoaires fixés par le sulfate de zinc n'est pas toujours équivalente pour les détails nucléaires et cytoplasmiques à celle obtenue avec le chlorure mercurique : dans un certain nombre de cas, 9 sur 261 soit 3,7 %, le diagnostic de formes pathogènes n'a pas été fait avec cette coloration.

Les auteurs concluent néanmoins : « sur la base de ces constatations l'APV zinc est un substitut viable de l'APV chlorure mercurique, APV employé pour les frottis colorés par le trichrome » ;

- la solution S.A.F. (37 ; 45) peut également être utilisée. Dans ce cas, la solution d'alcool iodé dans le premier temps de la coloration est inutile.

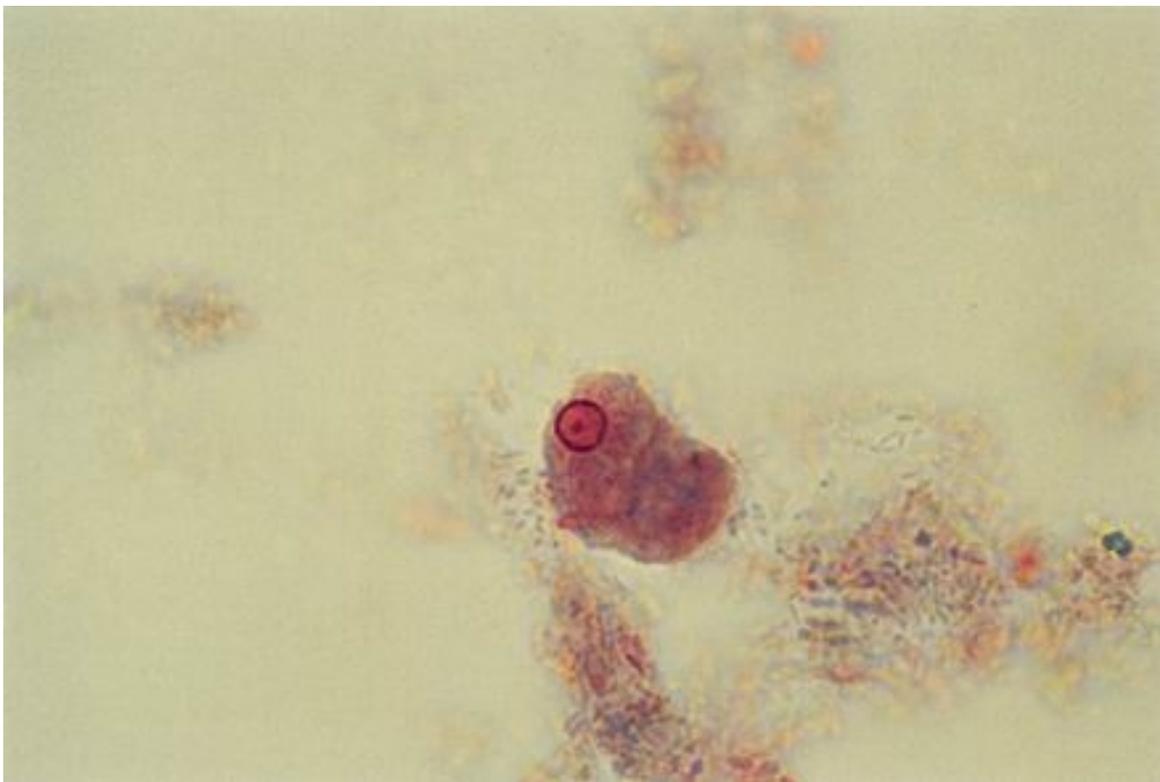


Photo n° 8 - Coloration A.P.V. trichrome. Forme végétative d'*E. histolytica* / *E. dispar*. Obj. X 100.

Préparation des frottis

Les frottis doivent être assez minces pour permettre l'étude des formes végétatives sans superposition gênante.

- Préparation directe : sur une lame porte-objet, mettre la valeur d'une petite goutte de selles et trois fois ce volume de solution d'APV. Mélanger avec un petit agitateur (ou une pipette Pasteur), étaler en couche mince sur environ le tiers de la lame.

- En tube à hémolyse : mélanger un volume de selle, à trois volumes de solution d'APV. On peut alors préparer des frottis immédiatement, ou d'une manière différée, les F.V. d'amibes se conservent ainsi de nombreux mois, les frottis colorés au trichrome se conservant des années.

Les résultats sont meilleurs lorsque la selle est fixée très rapidement dans l'A.P.V. après son émission, Goldman et Brooke (1953) ont trouvé plus de formes végétatives des différentes amibes et de flagellés quand une goutte de selle était mélangée à de l'APV immédiatement après l'émission des selles que par examen direct fait dans les mêmes conditions.

La préparation du mélange APV-selles doit toujours être faite sur des selles très fraîches, dans l'heure qui suit leur émission. Passé ce délai, les F.V d'amibes s'altèrent et deviennent de plus en plus difficiles à identifier.

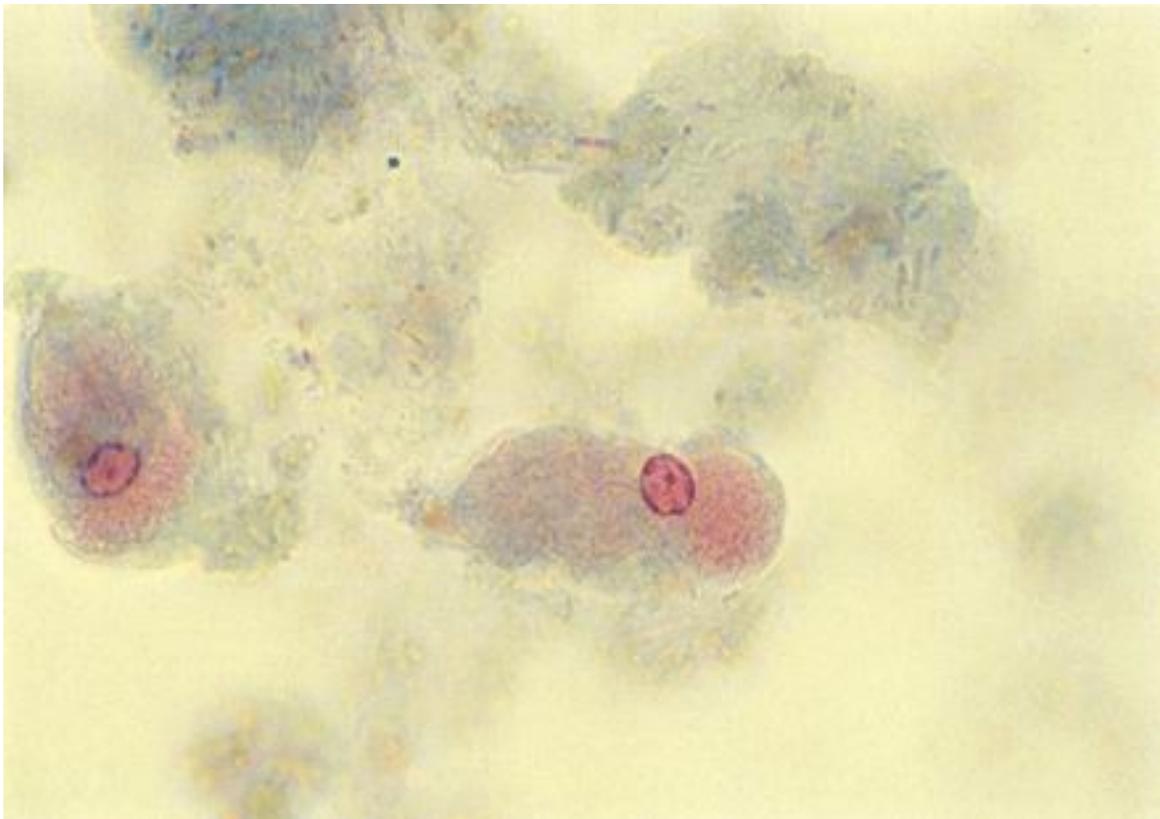


Photo n° 9

Coloration A.P.V. trichrome. Forme végétative d'*E. histolytica*. Obj. X 100.

Coloration trichrome

La méthode utilisée pour colorer les frottis fixés par l'APV est le trichrome de Gomori adapté par Wheatley (46) à la coloration des F.V d'amibes et de flagellés. Elle utilise le chromotrope 2R comme colorant de la chromatine. Elle ne nécessite pas de mordantage, ni de différenciation.

Préparation de la solution de coloration de GOMORI (36)

- chromotrope 2R	0,6 g
- vert lumière SF ou Fast Green de préférence	0,3 g
- acide phosphotungstique	0,7 g
- acide acétique	1 ml
- eau bidistillée	100 ml

Très bonne conservation.

Après un certain nombre d'utilisations, la coloration faiblit et la solution de coloration doit être renouvelée.

Mode opératoire : la coloration est faite en tubes de Borrel ou en boîtes de Laveran.

- Mettre les frottis dans l'alcool à 70 %, contenant suffisamment d'iode pour avoir une coloration ambrée, pendant 10 minutes (ce temps peut être raccourci à 3 minutes).
- Alcool à 70 % 2 minutes.
- Alcool à 50 % 2 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Solution de coloration de Gomori 30 minutes.
- Passer quelques secondes dans un bain d'alcool à 90 % contenant 0,5 % d'acide acétique.
- Rincer dans l'alcool à 95 % (30 secondes environ).
- Alcool absolu 1 minute.
- Xylène 5 minutes.
- Monter dans un baume synthétique (Permout®).

N.B. : le séchage accidentel du frottis entre deux bains n'influe pas le résultat final de la coloration.

ÉTALEMENT ET FIXATION DE SELLE

Étalement

Sur la lame porte-objet, déposer une petite goutte de selles liquides ou de glaire. Avec le bord d'une lamelle ou une allumette, on fait un étalement mince en zigzag afin d'obtenir des épaisseurs différentes. Il faut confectionner plusieurs lames pour chaque selle (3 au minimum).

NE PAS LAISSER SÉCHER. Fixer immédiatement.

Bailenger recommande dans tous les cas, glaires y comprises, de délayer la parcelle fécale avec une petite goutte d'une solution aqueuse d'alginate de sodium (0,5 à 2 p. 100) qui, au contact des fixateurs acides, forme une pellicule gélifiée adhérente au support et de réaliser l'étalement à l'aide d'une lamelle, maintenue entre les doigts de la main droite, que l'on amène au contact de la lame, en avant de la goutte fécale. Celle-ci diffuse le long du bord de la lamelle à laquelle on imprime un mouvement de translation *lent et uniforme*, en la maintenant inclinée à 45° sur la lame.

Fixation



Plonger la lame humide dans l'un des trois fixateurs suivants :

Bouin picroformol (solution aqueuse) (Bouin 1897)

Solution aqueuse saturée d'acide picrique	15 volumes
Formol du commerce à 40 p. cent	5 volumes
Acide acétique cristallisable	1 volume

Cette solution doit être fraîchement préparée pour bien fixer.

Fixation pendant 15 minutes au moins.

Avant de colorer : enlever l'excès d'acide picrique par deux bains d'alcool à 90 %, puis un bain d'alcool à 70 %, dans lequel on peut conserver les lames quelques jours. Puis laver à l'eau courante pour enlever tout l'alcool.

Picroformol acétique

Formol du commerce à 40 p. cent	1 volume
Eau	3 volumes
Acide picrique	à saturation

Au moment de l'emploi, ajouter 5 p. 100 en volume d'acide acétique cristallisable.

L'avantage de ce fixateur tient à sa plus grande richesse en acide picrique et à sa plus grande facilité de préparation. Laisser en contact pendant trente minutes ; laver par deux bains successifs d'alcool à 90 %, puis à l'eau courante.

Duboscq-Brasil (1905) = Bouin alcoolique

Alcool à 80 %	150 ml
Formol du commerce à 40 p. 100	60 ml
Acide acétique cristallisable	15 ml
Acide picrique	1 g

À préparer au moment de l'emploi. Cette solution fixe mieux les kystes. Durée de fixation 30 minutes, puis plonger directement dans l'alcool à 90 %. Préparer les lames comme précédemment en vue de la coloration.

COLORATION PAR L'HÉMATOXYLINE FERRIQUE

L'hématoxyline fait partie du groupe des colorants naturels, sa préparation se fait par extraction à l'éther du bois de Campêche (*Hematoxylon campechianum*). Elle se présente sous forme de cristaux incolores ou légèrement jaunâtres, solubles dans l'eau chaude, l'alcool, l'éther directement. Elle ne possède pas de pouvoir de coloration, mais elle s'oxyde facilement en hémateïne qui est le principal colorant des différentes solutions d'hématoxyline. Cette oxydation se produit en présence d'air et de lumière c'est la maturation.

L'hématoxyline ferrique colore électivement le noyau des amibes, qui est leur partie la plus caractéristique.

Il y a différents procédés de coloration par l'hématoxyline ferrique notamment celui de Heidenhain, et celui de Weigert. Le premier est une méthode indirecte et régressive, tandis que le deuxième est une méthode progressive.

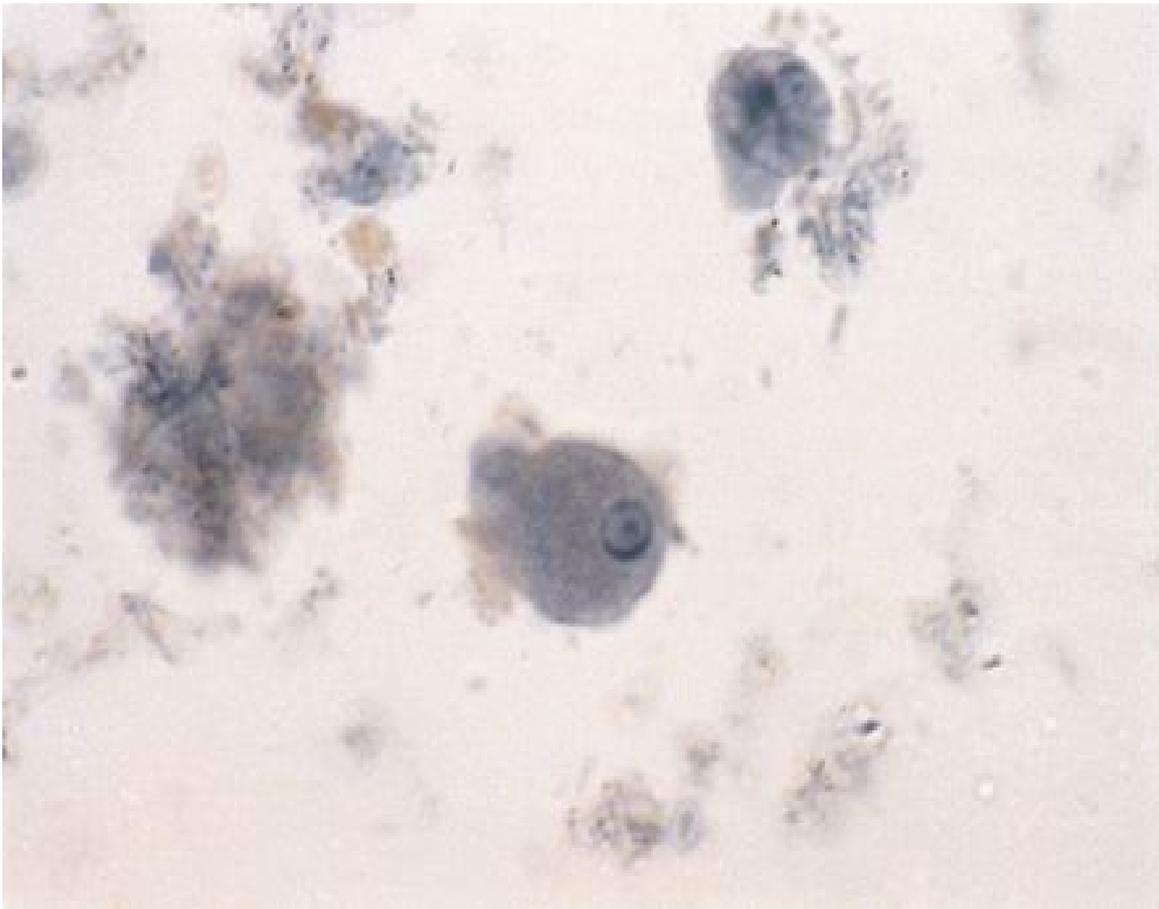


Photo n° 10

Coloration à l'hématoxyline ferrique (Heidenhain). Forme végétative d'*E. histolytica* / *E. dispar*
Obj. x 100.

HÉMATOXYLINE FERRIQUE DE HEIDENHAIN (1892)

Il s'agit d'une technique histologique : pendant toute sa durée la préparation ne doit pas sécher.

Réactifs

Préparer les deux réactifs suivants :

1 ° Mordant. - Solution aqueuse à 3 p. 100 d'alun de fer (sulfate double d'ammonium et de sesquioxyde de fer).

Pour préparer la solution d'alun de fer. Il ne faut employer que des cristaux violets bien clairs : s'ils présentent une teinte jaunâtre ; ils sont altérés et doivent être rejetés. Pour avoir sûrement du bon alun de fer, il ne faut pas de petits cristaux, ni de l'alun de fer pulvérulent ; mais exiger de gros cristaux qui se conservent parfaitement en bocaux bien bouchés. Au moment de faire la solution, on racle avec un scalpel ou on pulvérise au mortier la quantité nécessaire et on obtient ainsi une dissolution immédiate. Le liquide, qui est jaunâtre, doit être absolument limpide. Il ne faut pas préparer à l'avance une grande quantité importante de solution, car elle ne se conserve pas. Faire la solution à froid.

2° Colorant - Solution aqueuse d'hématoxyline à 1p. 100, préparée en mélangeant 10 ml de solution d'hématoxyline à 10 p. 100 dans l'alcool à 90 %, avec 90 ml d'eau distillée.

Il existe des variantes à cette solution colorante.

La solution d'hématoxyline est d'autant meilleure qu'elle est plus ancienne. Elle devient noire, par suite de l'immersion des coupes imprégnées d'alun de fer, mais cela ne présente pas d'inconvénient. H.F. Shortt a indiqué un procédé très simple pour préparer une solution d'hématoxyline immédiatement mûre. On dissout lentement à ébullition 1 gramme d'hématoxyline en cristaux dans 95 ml d'eau distillée. Quand la dissolution est complète, on ajoute 5 ml d'acide phénique liquide. Après refroidissement le liquide est prêt pour l'usage.

Étalement et fixation de selle (voir p. 20)

Mode opératoire

Voici la marche générale du procédé. On opère avec une batterie de cylindres de Borrel.

1 ° Mordancer les frottis ou les coupes dans l'alun de fer pendant trente minutes à douze heures.

2° Laver rapidement à l'eau distillée.

3° Colorer dans la solution d'hématoxyline pendant trente minutes à vingt-quatre heures. La préparation doit prendre une coloration noire encre de Chine.

On accélère beaucoup le mordantage et la coloration dans l'étuve à 50°.

4° Laver rapidement à l'eau distillée.

5° Différencier dans l'alun de fer. Il faut prendre un liquide différent de celui qui sert à mordancer. La concentration peut être la même ou plus faible (1 p. 100), s'il y a intérêt à ralentir le processus pour le suivre plus exactement. En effet, il est indispensable de retirer les coupes de temps en temps, pour contrôler la différenciation : on les lave rapidement à l'eau distillée et on les examine au microscope avec un grossissement approprié.

Si la différenciation est trop poussée, la préparation n'est pas perdue. Il suffit de la colorer de nouveau dans le bain d'hématoxyline.

6° Après différenciation, laver soigneusement à l'eau distillée, colorer si on le juge utile par un colorant plasmatique (voir colorants acides), puis déshydrater et monter au baume.

Le temps consacré au mordantage et à la coloration diffère beaucoup, il est fonction du résultat souhaité. Pour une simple coloration nucléaire topographique, il suffit d'un mordantage et d'une coloration de trente minutes à une heure, tandis que, pour les différenciations cytologiques, les bains doivent être prolongés pendant douze et même vingt-quatre heures. Dans le premier cas, la coloration obtenue est bleue, tandis que dans le second, elle est parfaitement noire.

La différenciation peut varier dans de très larges limites ; on la pousse plus ou moins loin, suivant les parties qu'on veut mettre en évidence. C'est là à la fois l'avantage et l'écueil de la méthode de Heidenhain ; elle permet au biologiste exercé de différencier les plus fins détails cytologiques, mais elle expose le débutant à de graves erreurs d'interprétation. En effet, non seulement le résultat obtenu varie suivant la durée de la coloration et de la différenciation, mais encore il ne faut pas prendre tous les corpuscules sidérophiles pour des inclusions nucléaires ou cytoplasmiques, ni tirer des conclusions erronées d'une différenciation incomplète ou trop poussée. Il faut savoir aussi que l'épaisseur des frottis influe beaucoup sur le résultat final de la différenciation. Par conséquent, dans une même préparation, les noyaux ne seront pas tous au même point : les uns seront trop différenciés, les autres pas assez et il faudra savoir choisir ceux qui se présentent à l'état voulu, pour le détail à mettre en évidence.

Dans une préparation bien réussie, les structures nucléaires ressortent en noir intense sur un fond incolore ou à peine coloré. La coloration est à la fois très énergique et très précise ; au point de vue optique, elle présente donc des avantages considérables.

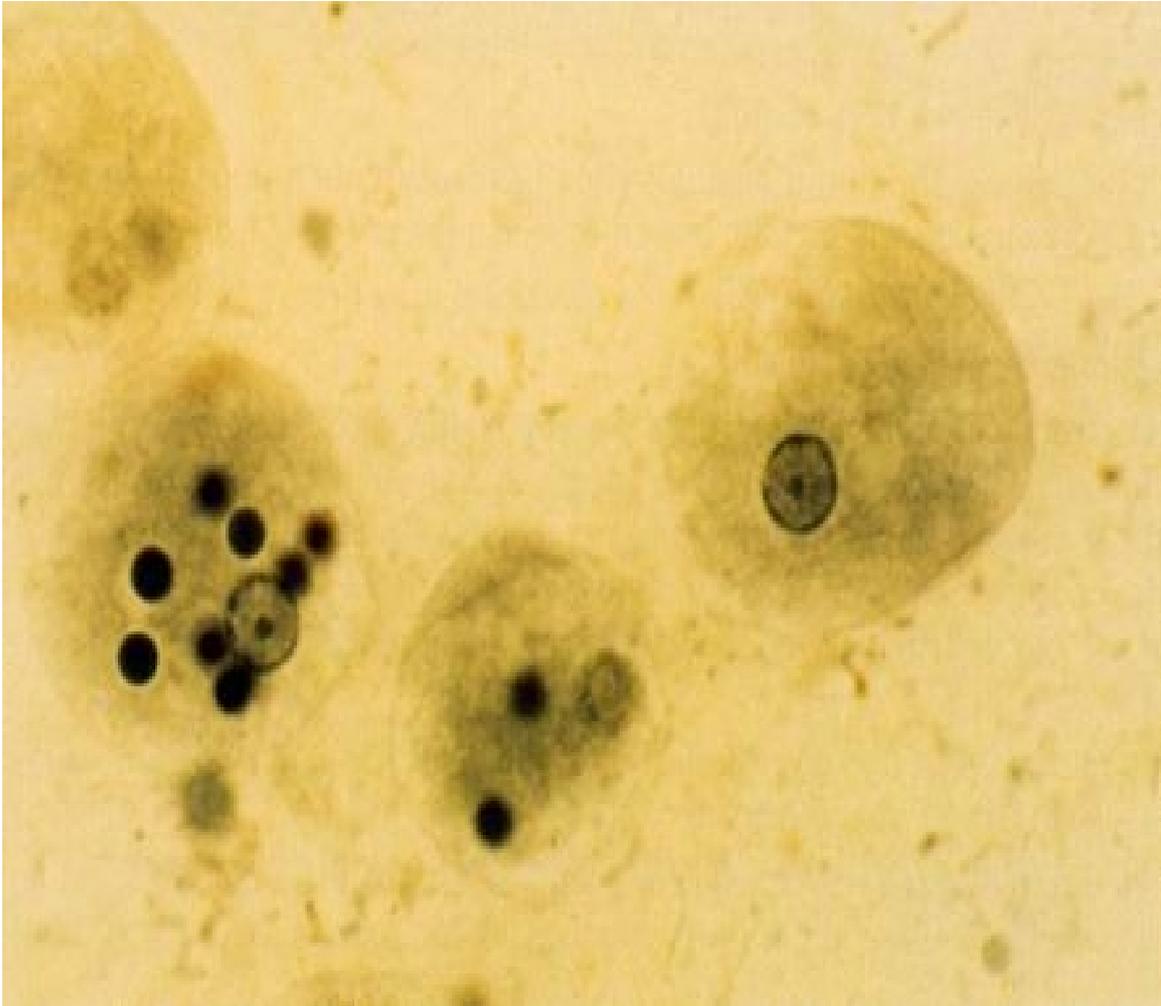


Photo n° 11

Coloration à l'hématoxyline ferrique (Heidenhain). Trois formes végétatives d'*E. histolytica* dont deux contiennent des hématis. Obj. X 100. (Préparation W.B. Boeck, 1924, malade K).

COLORATION AU NOIR CHLORAZOL (33; 38)

En 1960, Kohn a mis au point une coloration rapide des protozoaires, coloration récemment modifiée par Gleason et Healy et étudiée par L. Lamy en France.

Cette technique a l'avantage de réunir dans une seule opération la fixation, la coloration et la différenciation des protozoaires. Les résultats seraient comparables à ceux de l'hématoxyline ferrique.

Réactifs

- Colorant

Noir chlorazol (Noir formique Geigy = Noir Erié) 5 g

- Préparer une solution de base

Alcool éthylique 90 % 170 ml

Alcool méthylique 160 ml

Acide acétique glacial..... 20 ml

Phénol liquide..... 20 ml

Acide phosphotungstique à 1 % 12 ml

Eau distillée q.s.p..... 1 000 ml

N.B. On peut préparer une quantité moindre de colorant en divisant les quantités par 2, pour 500 ml par exemple ou par 10 pour préparer 100 ml.

Préparation de la solution de fixation et de coloration

Mettre les 5 g de Noir chlorazol dans un mortier. Broyer pendant au moins 3 minutes. Ajouter un peu de solution de base. Broyer à nouveau de manière à former une pâte lisse. Ajouter encore la solution de base par petite quantité. Broyer à chaque fois pendant plusieurs minutes.

Recommencer avec le sédiment comme précédemment, jusqu'à ce que tout le colorant soit dissout.

Laisser sédimenter. Recueillir le surnageant clair dans une bouteille d'un litre.

Laisser sédimenter à nouveau 24 heures et mûrir 4 à 6 semaines, on obtient alors un liquide noir cerise qu'on filtre avant usage.

Mode opératoire

La technique convient pour les frottis et pour les coupes histologiques. (voir p. 26) Faire des étalements minces de selles (voir p. 20). Les plonger humides dans le colorant. Le colorant peut être utilisé pur ou dilué avec le liquide de base soit moitié-moitié, soit 2 volumes de colorant pour un volume de liquide de base. Il faut, pour chaque nouveau colorant, déterminer la dilution et le temps de coloration optimum. A titre indicatif : coloration pendant 2 à 4 heures (éventuellement pendant une nuit) à la température du laboratoire dans une solution pure ou diluée aux 2/3.

A la fin de la coloration, les retirer, les laver, les déshydrater et les monter au baume.

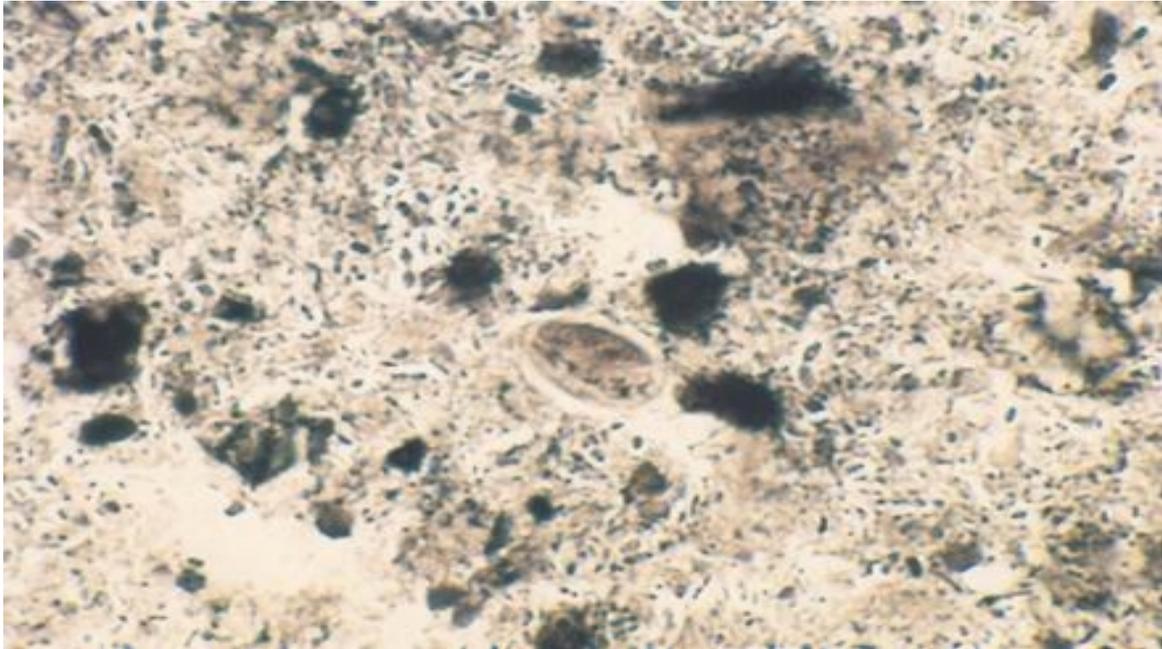


Photo n° 12

Coloration au noir chlorazol (Kohn). Kyste ovulaire de *Giardia intestinalis*. Obj. X 100.

Résultats

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

La coloration est plus belle avec les selles fraîches.

Le fond de la préparation est gris-vert clair lorsque le frottis est mince. Il est plus ou moins rouge si le frottis est épais.

Chez les protozoaires : les noyaux et caryosomes, les corps sidérophiles et la membrane cellulaire vont du vert clair au noir,

Les hématies vont du rose au rouge foncé. Les fibres musculaires sont également colorées en rouge.

Les levures et bactéries sont par contre vert foncé-noir.

Peuvent être colorés avec cette technique

Toutes les amibes et leurs kystes : *Entamoeba histolytica*, *E. hartmanni*, *Ent. coli*, *E. gingivalis*, *Endolimax*, *Iodamoeba*.

Les Flagellés: *Dientamoeba*, *Enteromonas*, *Chilomastix*, *Pentatrichomonas*, *Giardia*.

Les coupes d'intestin avec amibes, *Balantidium*, Coccidies.

À noter également que les coupes avec helminthes, par exemple des schistosomes, donnent de très bons résultats.

MÉTHODE DE BAILENGER et FARAGGI

Violet cristal - Fuchsine

C'est une technique de réalisation facile.

Réactifs

Violet cristal	0,5 g
Fuchsine basique	0,1 g
Alcool à 95 %	20 ml
Phénol cristallisé fondu	4 ml
Après dissolution, ajouter :	
Eau distillée	100 ml

Ce réactif, maintenu en **flacon hermétiquement clos** et à l'abri de la lumière, est de bonne conservation. Prélever le liquide dans les couches supérieures du réactif contenu dans un flacon maintenu au repos.

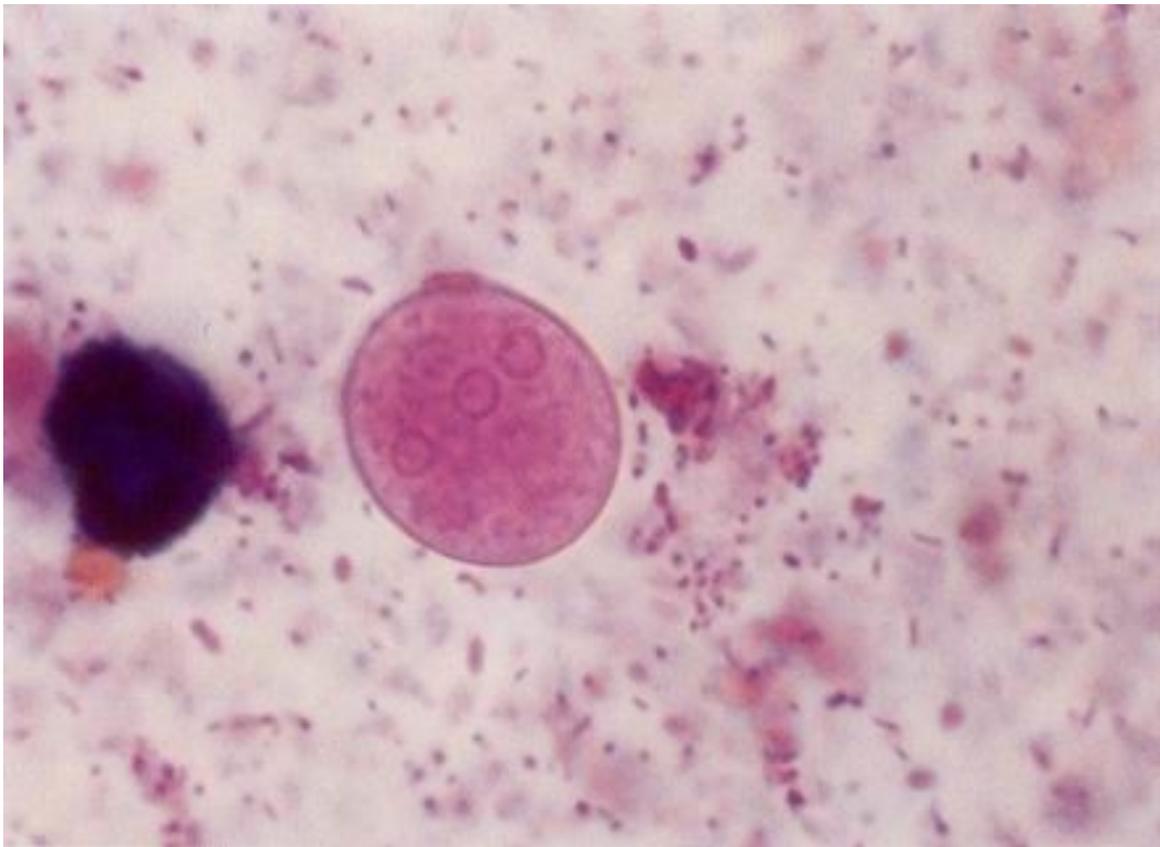


Photo n° 13

Coloration de Bailenger et Faraggi. Un kyste d'*Entamoeba coli* à huit noyaux dont trois bien visibles. Obj. X 100.

Mode opératoire

- Déposer, sur une lamé porte-objet une goutte de la préparation fécale ou du culot d'enrichissement.
- Avec le coin de la lamelle, lui mélanger une petite goutte du réactif, prélevée avec une pipette Pasteur.
- Recouvrir d'une lamelle 22 X 22.
- Examiner à l'objectif à immersion après avoir déposé une goutte d'huile sur la lamelle.

N.B. La coloration est immédiate. La rapidité, avec laquelle est atteint son optimum, dépend toutefois de la quantité du réactif. Il est conseillé d'employer une goutte de volume très réduit, ce qui a le double avantage de ne pas diluer la préparation fécale et de fournir une coloration lentement progressive, sans altération des parasites dont l'identification reste possible pendant plusieurs jours, si on a pris la précaution de luter la préparation (vernis à ongles ou, mieux, colle type Scotch).

Résultats

La coloration est aussi facile et aussi bonne avec les kystes qu'avec les trophozoïtes. Le cytoplasme et les bâtonnets cristalloïdes se colorent en rouge. Les structures nucléaires et les rudiments flagellaires ressortent en noir.

Les noyaux des trophozoïtes de *Dientamoeba fragilis* ne se colorent pas avec ce réactif.

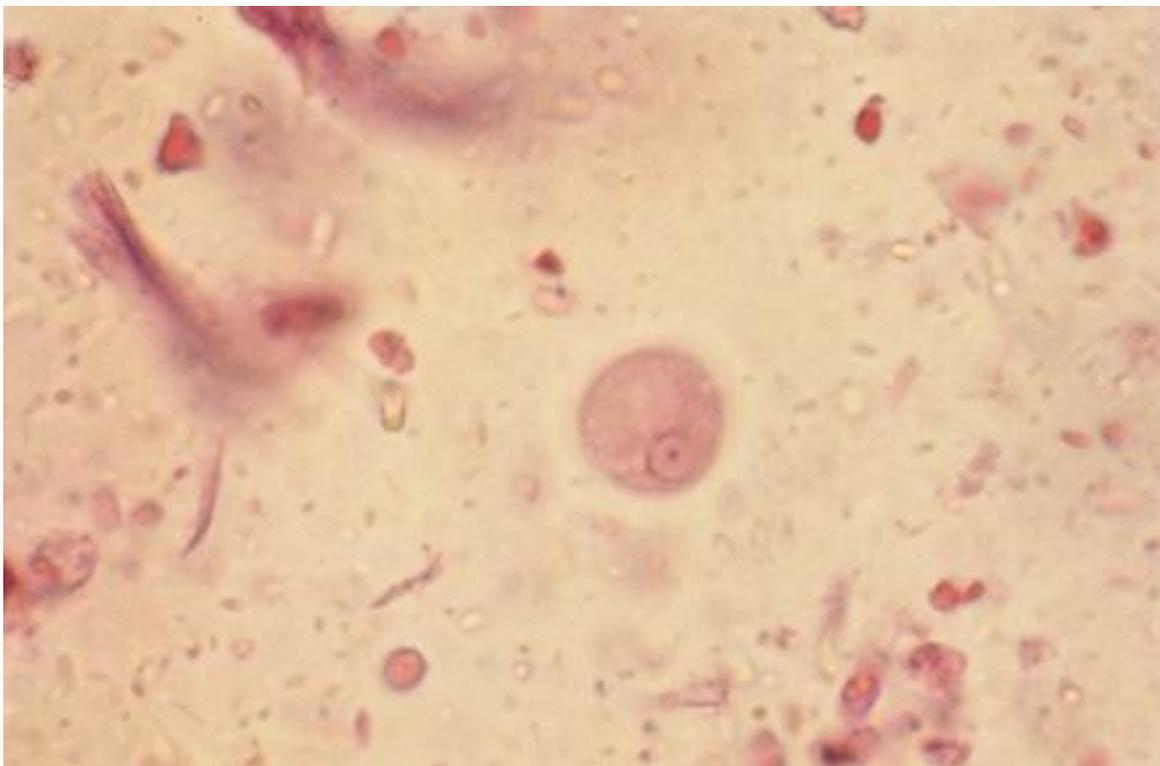


Photo n° 14

Coloration de Bailenger et Faraggi. Kyste à un noyau d'*E. histolytica* / *E. dispar* mesurant 11 μm , avec une importante vacuole. Obj. X 100.



Photo n° 15
Selle fixée au S.A.F. Junod. Forme végétative d'*Ent* col. Colorée au Lugol. Obj. X 100

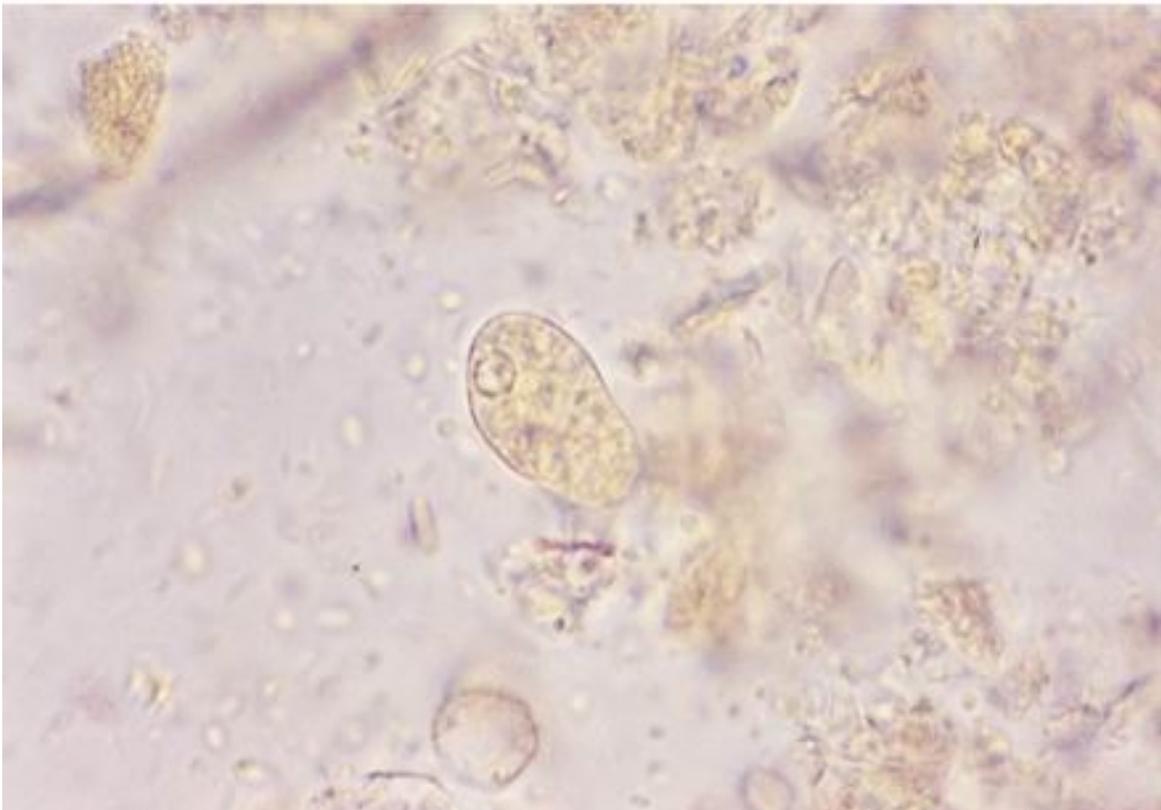


Photo n° 16
Selle fixée au S.A.F. Junod. Forme végétative d'*E. histolytica* / *E. dispar*. Sans coloration.
Obj. X 100.

FIXATION DES TROPHOZOÏTES ET DIFFÉRENCIATION DES STRUCTURES NUCLÉAIRES, JUNOD 1972.

Solution de fixation: (S.A.F.)

Acétate de sodium cristallisé.....	15 g
Acide acétique	20 ml
Aldéhyde formique.....	40 ml
Eau distillée q.s.p.....	1 000 ml

On utilise une suspension tamisée de selles fraîches (5 à 10 g dans 30 à 60 ml de CINA à 9 p. mille): Centrifuger 2 minutes à 2 000 tours/minute ; jeter le liquide surnageant, le remplacer par la même quantité de solution acéto-acétique formolée dans laquelle le culot est soigneusement remis en suspension.

Il s'agit là du premier temps d'une technique essentiellement destinée à la concentration des trophozoïtes d'amibes.

TECHNIQUES DE COLORATIONS DIVERSES

- Technique de BURROWS (29)

Fixation : solution de phénol dans du CINA à 8,5 p. mille à laquelle on ajoute de l'alcool éthylique et du formol.

Colorant : Thionine et azur A dans l'eau distillée.

Résultats : coloration simultanée des kystes et des formes végétatives.

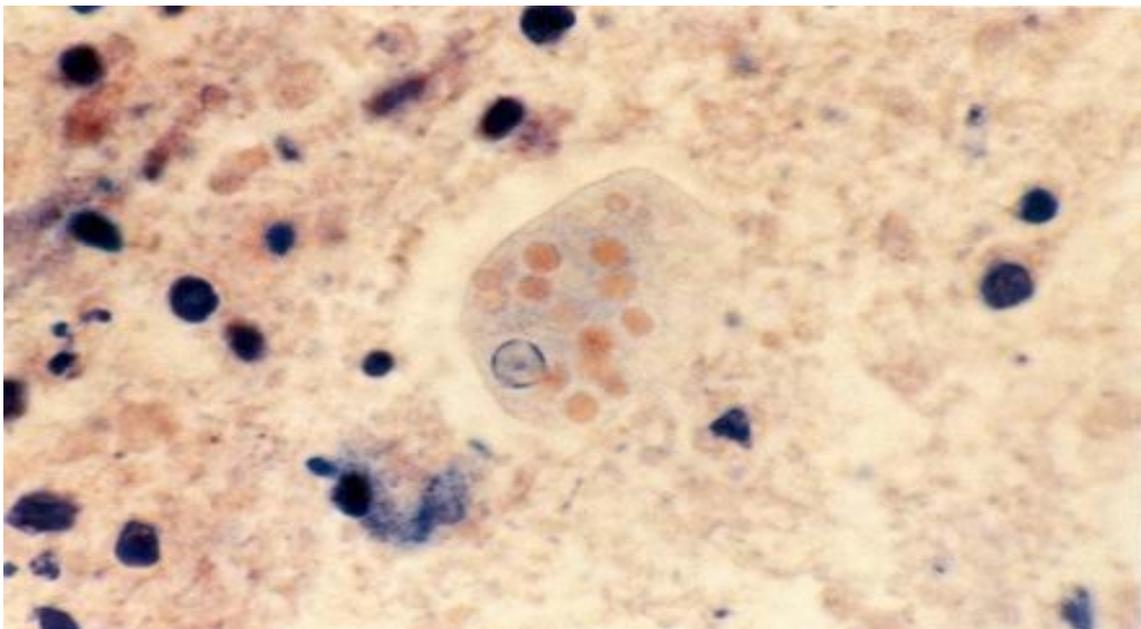


Photo n° 17 - Coloration de Delafield. Forme végétative d'*E. histolytica* ayant phagocyté de nombreuses hématies. Obj. X 100. (Préparation B.W. Boeck, 1924, chat 105 infesté avec les selles du malade K).

- Technique de CAPET et GOIGOU (30)

Coloration par l'hématoxyline rapide après fixation au dioxane (et à l'oxyde de mercure).

- Technique de MALLORY

Il existe plusieurs méthodes de Mallory (21) utilisant la coloration par l'hématoxyline :

Méthode Delafield :

- l'adaptation de la méthode de Delafield, employant une solution :

Cristaux d'hématoxyline 4 g

Alcool à 95 % 25 ml

Solution aqueuse saturée d'alun ammoniacal ferrique
après 3 jours de maturation, filtrer et ajouter :

Glycérine 100 ml

Alcool à 95 % 100 ml

- la méthode utilisant l'acide phosphotungstique.

Ces méthodes ont subi différentes adaptations par différents auteurs. Elles sont peu employées pour la coloration des amibes.

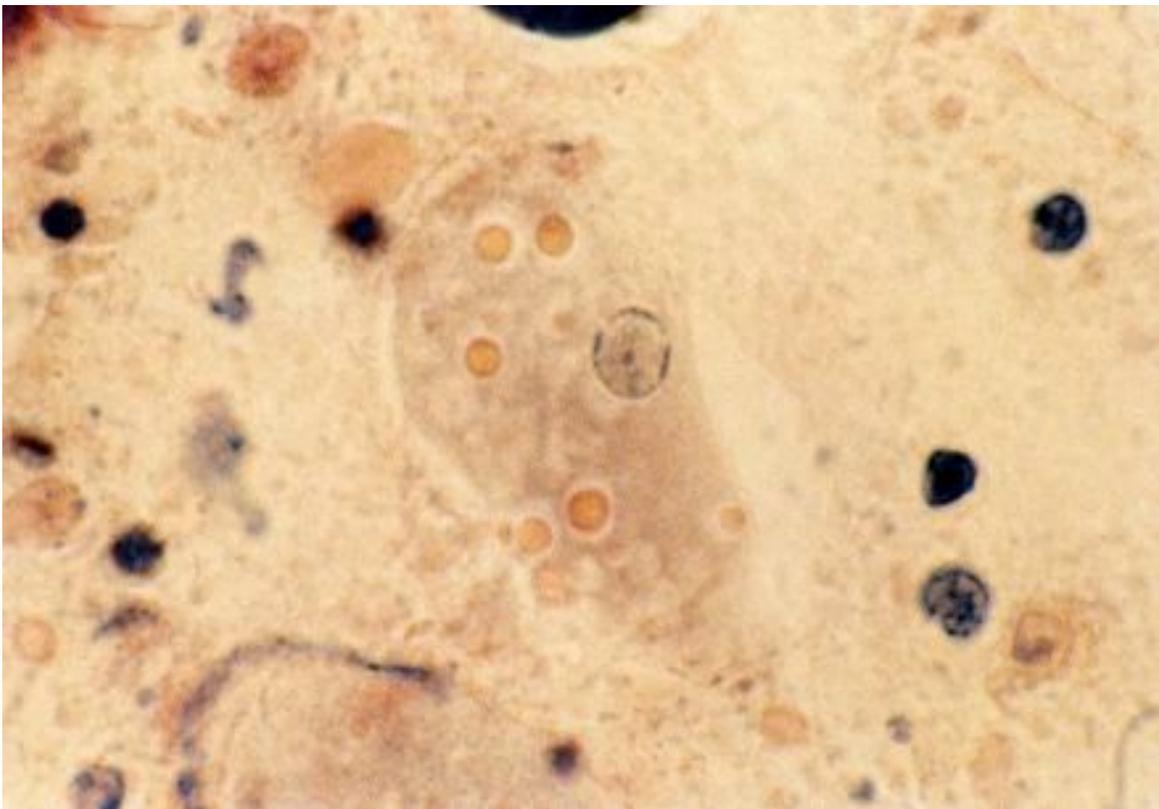


Photo n° 18

Coloration de Delafield. Grande forme végétative d'*E. histolytica* ayant phagocyté quelques hématies. Noyau de grande taille (Préparation B.W. Boeck, 1924, chat 105 infesté avec les selles du malade K). Obj. X 100.

COLORATION DES KYSTES

Les techniques de coloration précédemment décrites sont en général utilisées pour les formes végétatives et les kystes. Les deux techniques suivantes ne le sont pratiquement que pour les kystes.

LUGOL

Le Lugol bactériologique, dit **SIMPLE** est à 0,5 % d'iode. Il était appelé liquide de Gram par M. Nicolle.

Pour l'examen direct on utilise le Lugol à 1 % d'iode, dit Lugol **DOUBLE**,

Iode en paillettes.....	1 g
Iodure de potassium.....	2 g
Eau distillée	100 ml

L'iode se dissout bien dans une solution d'iodure de potassium très concentrée. Pour préparer le Lugol on dissout donc d'abord l'iodure de potassium dans très peu d'eau. On ajoute petit à petit l'iode en agitant afin d'obtenir une bonne dissolution. On ajoute alors le reste de l'eau. Filtrer.

Le Lugol se conserve en flacon brun, à l'abri de la lumière. Il ne garde son pouvoir colorant que pendant un mois environ. Il faut donc porter la date sur le flacon, le préparer en petite quantité à la fois, et le renouveler régulièrement. Le Lugol stabilisé au P.V.P. a une meilleure conservation.

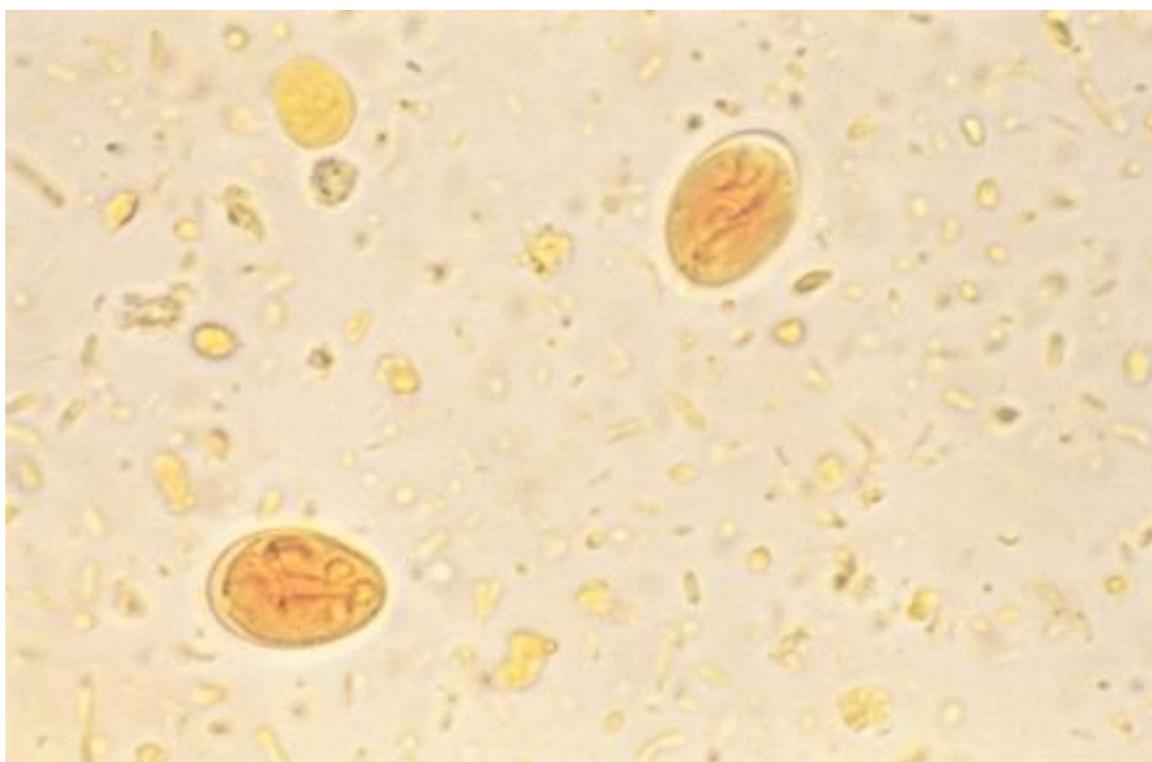


Photo n° 19
Coloration au Lugol. Kystes de *Giardia intestinalis*. Obj. X 100.

On utilise le Lugol comme liquide de dilution pour l'examen direct des selles et la coloration de divers éléments. La coloration donne de meilleurs résultats avec les selles fraîches qu'avec les selles fixées au formol.

Cette coloration permet :

- d'étudier les kystes de protozoaires, amibes et flagellés : la vacuole iodophile est colorée en brun acajou, les noyaux deviennent visibles ;
- d'étudier la digestion des féculents : l'amidon mal digéré se colore en bleu ou violet noir ; l'amidon bien digéré est rose ;
- de rechercher la flore iodophile, colorée elle aussi en bleu noir.

Lorsqu'on désire colorer les kystes obtenus après concentration, il est conseillé d'utiliser du Lugol simple de bactériologie, afin d'obtenir une coloration mieux contrastée. D'Antoni a proposé une solution contenant 1 % d'iodure de potassium et 1,5 % d'iode cristallisé qui ne présente pas d'avantages significatifs sur la solution de Lugol double.

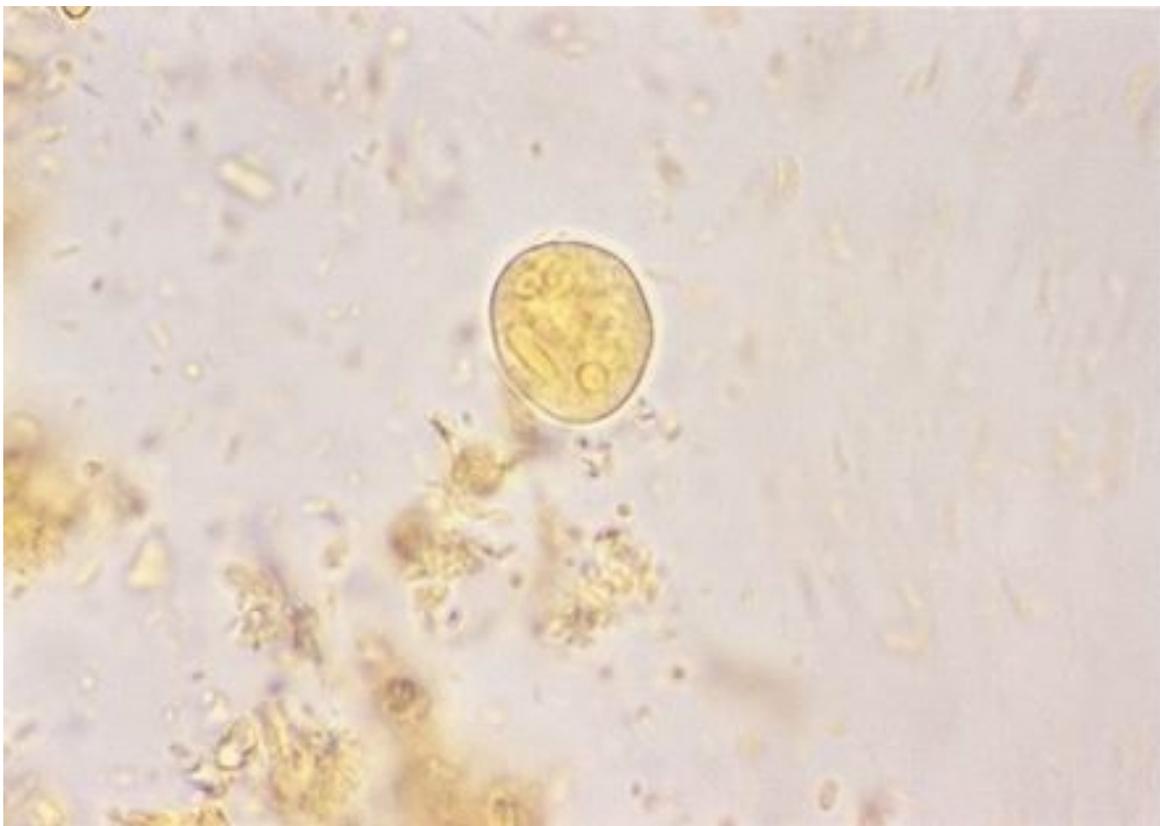


Photo n° 20

Coloration au Lugol. Kyste d'*E. histolytica* / *E. dispar*. Trois noyaux et un corps sidérophile sont visibles. Obj. X 100.

COLORATION DE P. SARGEAUNT (44)

Recherche des corps chromatoides = corps sidérophiles = cristoalloïdes après concentration des selles par la méthode de Ridley.

Colorant

Vert Malachite	0,2 g
Acide acétique glacial.....	3 ml
Alcool éthylique à 95 %	3 ml
Eau distillée QSP.....	100 ml

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Dissoudre le vert malachite dans l'alcool, ajouter l'acide acétique et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

Bonne conservation à température du laboratoire.

Mode opératoire : mélanger une goutte du culot de concentration à une goutte de colorant sur une lame porte-objet, recouvrir d'une lamelle.

Résultat : le contour des kystes est facile à repérer, les membranes nucléaires et les centrosomes sont colorés en vert clair, les corps chromatoides en vert foncé.

Note : cette méthode ne peut pas être employée directement sur les selles, ou après l'emploi de n'importe quelle méthode de concentration, comme celle de Faust. L'action préalable de l'éther sur les kystes semble nécessaire.

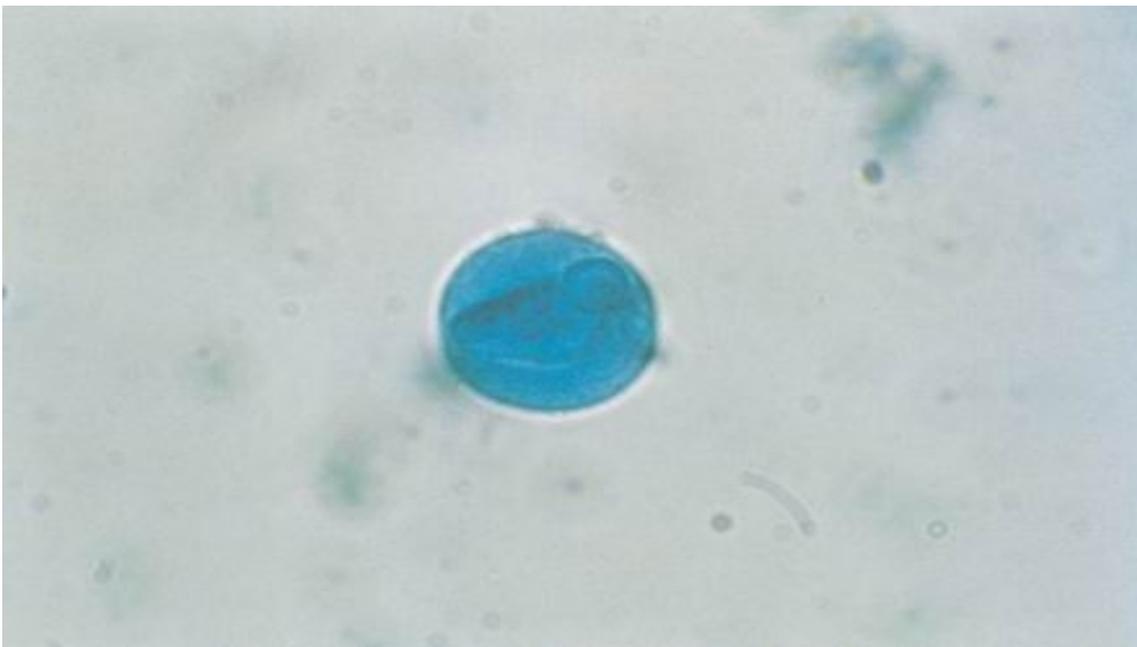


Photo n° 21

Coloration de Sargeaunt. Kyste d'*E. histolytica* / *E. dispar* à un noyau. Corps sidérophiles bien visibles. Obj. X 100. (Préparation P. Sargeaunt).

RÉACTIFS

Nous donnons ci-dessous quelques éléments, non exclusifs permettant de faciliter l'obtention de réactifs.

FORMOL

Le formol est la solution aqueuse d'un gaz, le formaldéhyde.

Le formaldéhyde a trois isomères composé d'une molécule (formaldéhyde), deux molécules (paraformaldéhyde) ou trois molécules (trioxyméthylène).

La solution claire de formol contient les deux premières formes et à basse température la troisième forme qui cristallise et donne un sédiment blanchâtre (Smith, 1905).

En outre, le formol du commerce contient presque toujours une quantité plus ou moins considérable d'acide formique, qui nuit beaucoup à la fixation.

Il est donc toujours préférable d'employer du formol neutre : on l'obtient en saturant l'acide formique par la soude décinormale et en vérifiant la neutralité avec du papier pH.

Le formol du commerce est souvent stabilisé par addition de méthanol.

Dilution: les solutions commerciales sont en général à 37 ou 40 %, on les considère comme des solutions pures, et quand on utilise une solution à 10 %, cela veut dire que 10 ml de solution du commerce à 37 ou 40 %, sont ajoutés à 90 ml d'eau.

Utilisation : pour la conservation des parasites, œufs et kystes de protozoaires, on utilise une dilution à 10 % dans une solution de CINa à 9 p. mille, neutralisée.

C'est un fixateur très pénétrant, se combinant aux protéines.

ALUN DE FER, Fer II ammonium sulfate, sel de Mohr, ammonium fer (II) sulfate hexahydrate - Merck.

A.P.V. en solution - SERFIB

CHLORAZOL BLACK E = Noir de Chlorazole E, en poudre - SIGMA.

FORMOL Solution à 10 % tamponnée - R.A.L.

GOMORI TRICHROME colorant - SERFIB

HEMALUN DE MAYER - R.A.L.

HEMATÉINE POUDRE - R.A.L.

HEMATOXYLINE STABILISÉE Solution - R.A.L.

LIQUIDE DE BOUIN AQUEUX - R.A.L.

LIQUIDE DE BOUIN Alcoolique, fixateur de Duboscq-Brazil - R.A.L.

LIQUIDE DE LUGOL - R.A.L.

LIQUIDE DE LUGOL STABILISÉ AU P.V.P. - R.A.L.

TEINTURE DE MERCUROTHIOLATE (Technique M.I.F.) solution - R.A.L.

COLORANT KOP- COLOR FUMOUE

PARA-SELLES - FUMOUE

PARASITOCROME PLUS - B.M.O.S.A.

Adresses :

B.M.D. S.A.

Artipose 25 - Bd de Beaubourg
B.P. 103 - Croissy Beaubourg
77423 MARNE LA VALLÉE Cedex 2
Tél. : 01.64.62.10.12 - Fax : 11.64.62.09.66

C.M.L.

1, rue des Palis
B.P. 30
77792 NEMOURS Cedex
Tél : 01.64.45.42.42 - Fax : 01.64.78.14.69

Gassalem

26, rue Pasteur
94450 LIMEIL BREVANES
Tél. : 01.45.98.17.39 - Fax : 01.45.99.28.61

Laboservice Nord

52, rue du Maréchal Foch
59136 WAVRIN
Tél. : 03.20.58.89.39 - Fax : 03.20.58.23.20

Labornord

ZI du Fort
4, rue de la Cruppe
B.P. 648
59650 VILLENEUVE D'ASO
Tél. : 03.20.61.79.80 - Fax : 03.20.33.15.75

Laboratoires Fumouze Division Diagnostics

Le Malesherbes -110/114 rue Victor Hugo
92300 LEVALLOIS PERRET
Tél. : 01.49.68.41.00 - Fax : 01.49.68.41.42

Laboratoires Merck-Clévenot S.A.

Division Réactifs
5 à 9, rue Anquetil
F-94736 NOGENT-SUR-MARNE
Tél. : 01.43.94.54.00 - Fax : 01.48.76.58.15 ou 01.48.76.57.86

OSI

B.P. 2
78996 ELANCOURT
Tél. : 01.30.13.24.00 - Fax : 01.30.13.24.24

Prolabo

54 rue Roger Salengro
94126 FONTENAY-SOUS-BOIS Cedex
Tél. : 01.45.14.87.55 - Fax : 01.45.14.87.66

Sayag

2, av. du Pacifique

B.P. 335

91958 COURTABOEUF

Tél. : 01.69.86.25.25 - Fax : 01.69.86.25.25

Serfib

Unité de Production

10, rue G. Eiffel

Z.A. des Conquérants

59130 LAMBERSART

Tél. : 03.20.22.87.47 - Fax : 03.20.22.88.34

Sigma-Aldrich Chimie

L'Isle D'Abeau Chesnes

B.P. 701

38297 SAINT QUENTIN FALLAVIER CEDEX

Tél. n° Vert: 08.00.31.24.67

Appel gratuit

DIVISION DES FORMES VÉGÉTATIVES D'AMIBES



Pages

- DIVISION DES FORMES VÉGÉTATIVES D'AMIBES

- Division cellulaire en général..... 39
- Division des formes végétatives d'*Entamoeba histolytica* 39
- Division des formes végétatives des autres amibes de l'Homme 48
- Application des notions sur la division des amibes au diagnostic microscopique courant.... 52

LA DIVISION CELLULAIRE

Elle comprend d'une manière générale six étapes (Bruce)

La **mitose** est constituée par les cinq premières étapes :

- LA PROPHASE: c'est le point du cycle au cours duquel les chromosomes condensés deviennent visibles.
- LA PRÉMÉTAPHASE : correspond à la rupture de l'enveloppe nucléaire.
- LA MÉTAPHASE : les chromosomes sont alignés sur la plaque équatoriale.
- L'ANAPHASE: au cours de laquelle se produit le clivage de chaque chromosome au niveau du centromère, les chromosomes se séparent en deux groupes égaux et sont tirés vers les pôles,
- LA TÉLOPHASE : avec décondensation des chromosomes. La membrane nucléaire se reforme autour de chaque groupe de chromosomes pour constituer les deux noyaux fils.

La **cytodiérèse** où le cytoplasme achève sa division selon un sillon de division est la sixième et dernière étape.

Entre deux mitoses successives, c'est à dire pendant l'**interphase**, les cellules doivent normalement doubler leur masse avant de se diviser.

LA DIVISION DES FORMES VÉGÉTATIVES D'*ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*

La division des formes végétatives d'*Entamoeba histolytica* et des amibes en général, comporte des différences importantes par rapport aux données précédentes.

Cette division a été étudiée en culture, en microscopie optique et en microscopie électronique (11 ; 49 ; 51 ; 52 ; 53 ; 54 ; 55 ; 57).

Toutes les phases de division d'*E. histolytica* se font à l'intérieur de la membrane nucléaire (53), contrairement à celle de la mitose en général.

La distribution de l'A.R.N. et à un moindre degré de l'A.D.N. apparaît opposée à ce qu'elle est dans d'autres cellules eucaryotes.

L'A.R.N. est synthétisé ou accumulé dans la chromatine périphérique ce qui fait considérer que les amas de chromatine périphérique sont des nucléoles (10 au maximum), situés sous la membrane nucléaire. (48 ; 52).

Le caryosome qui fut également nommé centre cinétique, endosome et nucléole, n'est pas un nucléole mais le Microtubule Organizing Center (= M.T.O.C.). Dans la suite de notre description nous continuerons néanmoins à utiliser le terme caryosome en raison de l'usage établi.

Les chromosomes sont au nombre de six (53). Les granules péri- caryosomiens sont les chromosomes ce qui explique leur présence inconstante, il en est de même des rayons qui partent du caryosome et qui correspondent aux microtubules de l'appareil mitotique.

PHASES DU CYCLE DE DIVISION D'*ENTAMOËBA HISTOLYTICA*

L'interphase : l'amibe pendant cette interphase va doubler de volume avant de se diviser en deux pendant la mitose (photos n° 23 et n° 24). L'A.D.N. est principalement condensé et localisé dans la partie interne de la membrane nucléaire.

La prophase : c'est l'étape la plus longue, le matériel chromatinien périphérique du noyau se condense (photo n° 22). Autour du caryosome des condensations correspondant aux chromosomes (= granules péri-caryosomiens = granules achromatiques) apparaissent, disposés en couronne autour du caryosome (photos n° 25 et n° 26). Entre les chromosomes et le caryosome existe un halo clair (52) (photo n° 26).

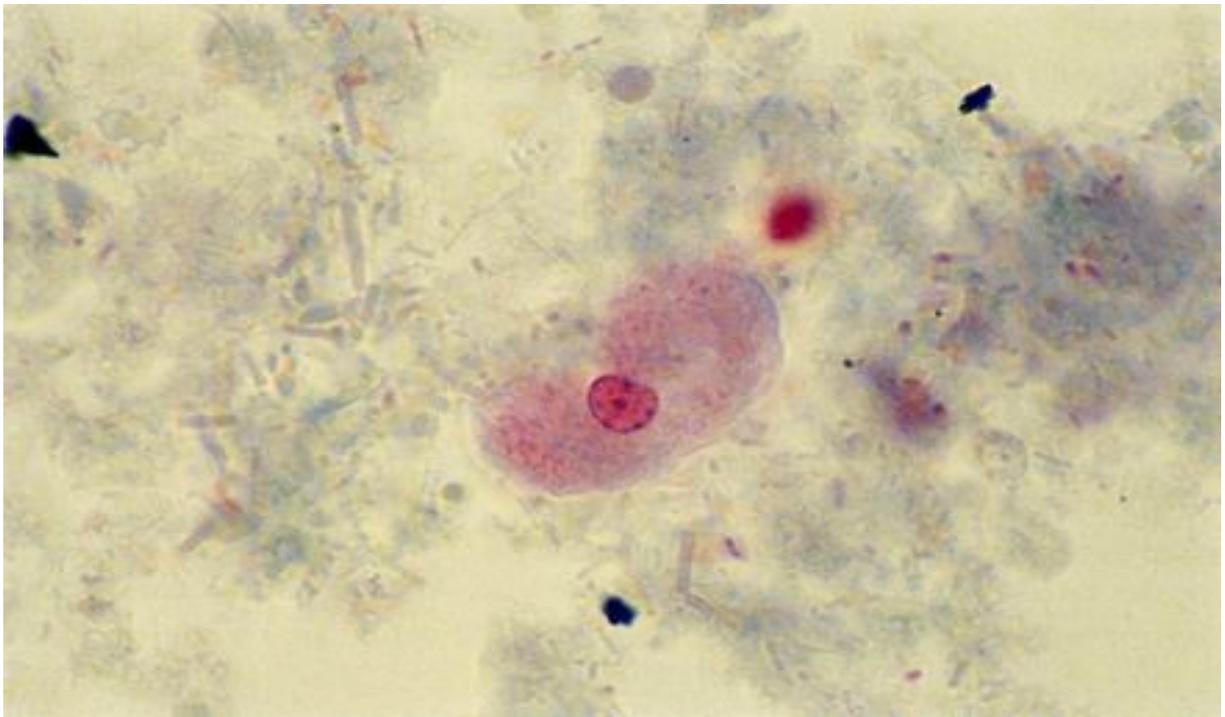


Photo n° 22

Prophase. Forme végétative d'*Entamoeba histolytica*. Dans le noyau présence de quatre nucléoles périphériques = amas de chromatine périphérique et de chromosomes = granules péri-caryosomiens. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

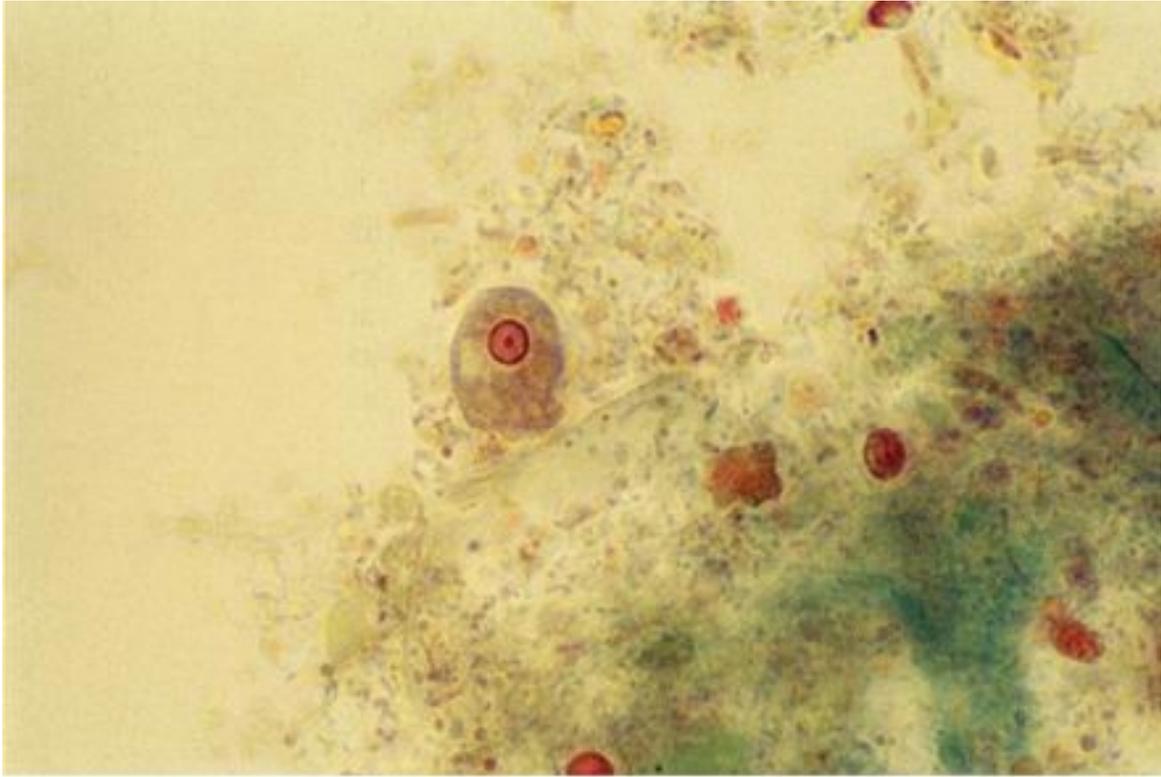


Photo n° 23- Interphase. *Entamoeba histolytica* ou *Entamoeba dispar* de petite taille/ forme végétative venant de se diviser. A.P.V. trichrome obj. X 100.

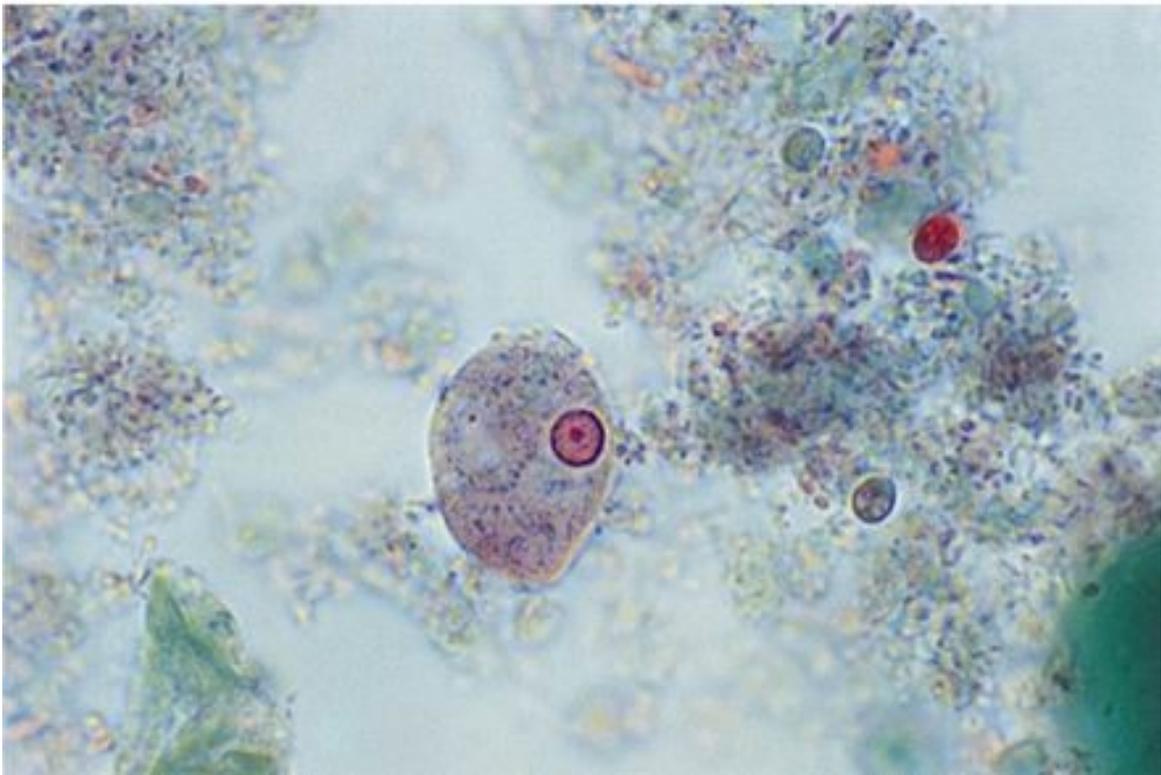


Photo n° 24 - Interphase. *Entamoeba histolytica* ou *Entamoeba dispar* de grande taille, mûre pour la division. Épaississement chromatinié et granules péricaryosomiens = chromosomes, sont apparus. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

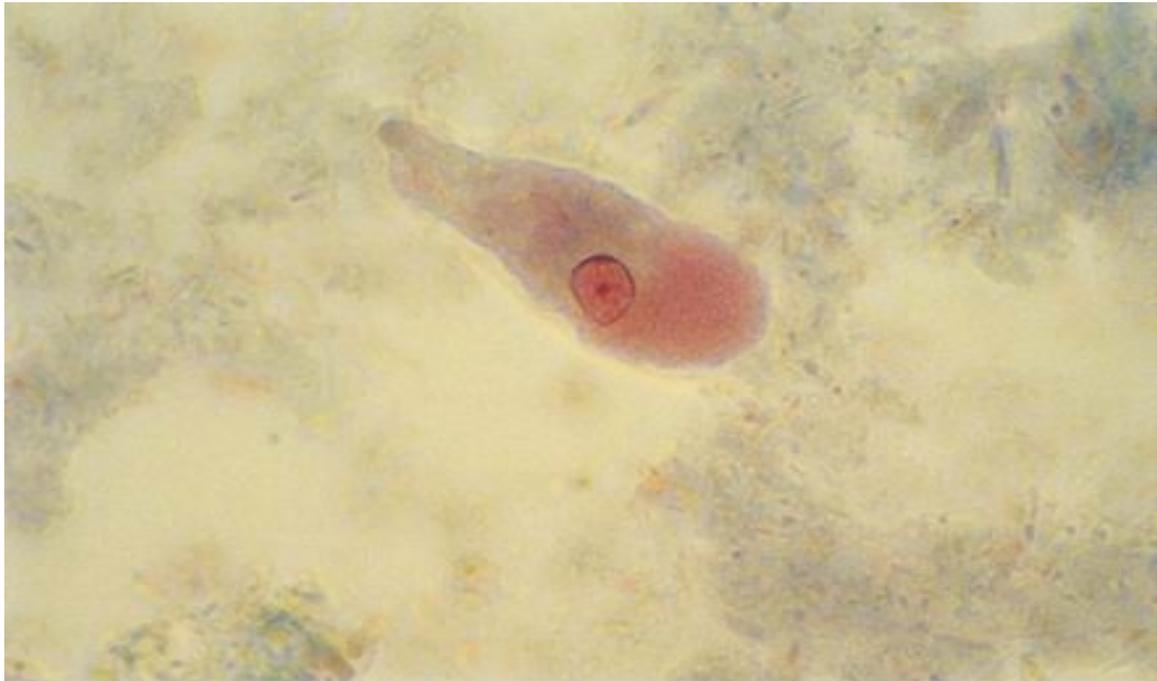


Photo n° 25- Prophase. Forme végétative d'*Entamoeba histolytica*. Présence dans le noyau d'une couronne de chromosomes = granules péri-caryosomiens et d'un gros amas de chromatine à la périphérie interne du noyau = nucléole. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

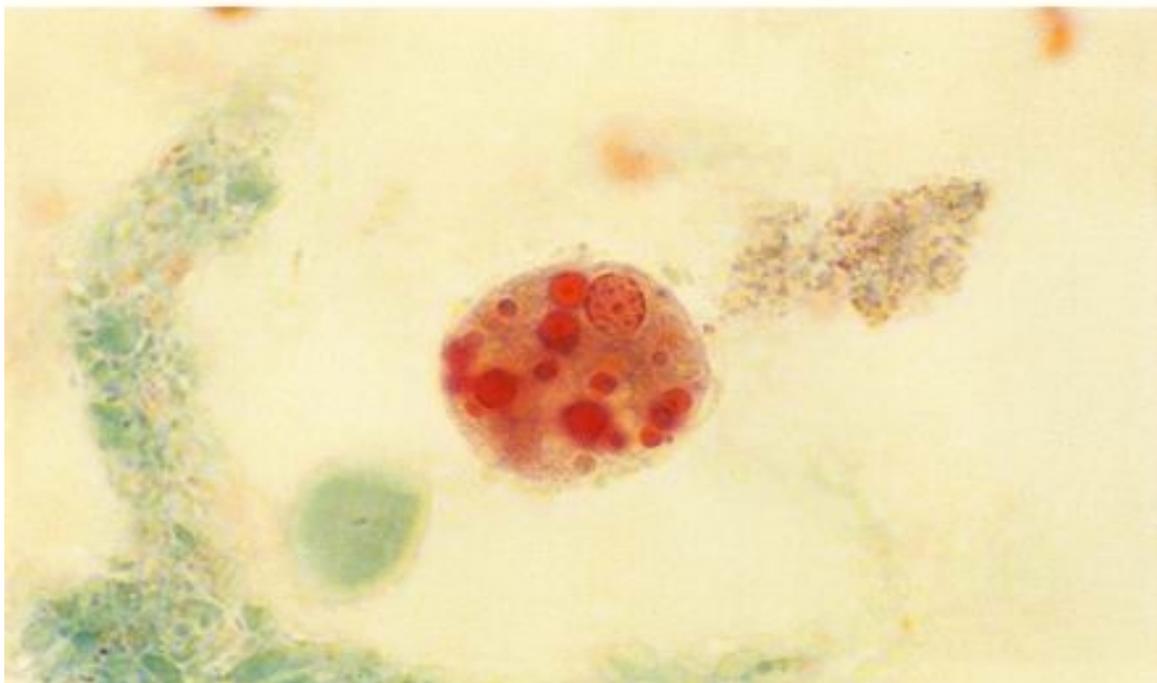


Photo n° 26 - Prophase. Forme végétative d'*Entamoeba histolytica* hématophage. Présence d'une couronne de chromosomes = granules péri-caryosomiens avec un halo un peu plus clair entre eux et le caryosome. Amas de chromatine à l'intérieur de la membrane nucléaire = nucléoles. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

L'anaphase : durant cette phase l'amibe s'immobilise, ne forme que de petits pseudopodes périphériques, et s'arrondit. Il apparaît un ou deux bourgeons (photo n° 27) le noyau qui a grossi, devient ovoïde et s'allonge. Ces modifications nucléaires ne correspondent donc pas à un noyau « abîmé » « déformé » ou « mal conservé ».

On distingue alors deux groupes de chromosomes aux deux extrémités du noyau. A la fin de cette phase les chromosomes disparaissent.

Les deux noyaux fils, qui sont moins volumineux que le noyau d'origine, commencent à se séparer (photo n° 28). Il se produit alors une constriction médiane de la membrane nucléaire qui donne ainsi naissance à deux noyaux fils. Parfois, les deux noyaux apparaissent reliés par un filament.

Avec la prophase ce stade représente la plus grande partie du temps de la division nucléaire.

La métaphase : la métaphase d'*E. histolytica* est une étape très rapide (52), rarement observée et même pour certains auteurs absente.

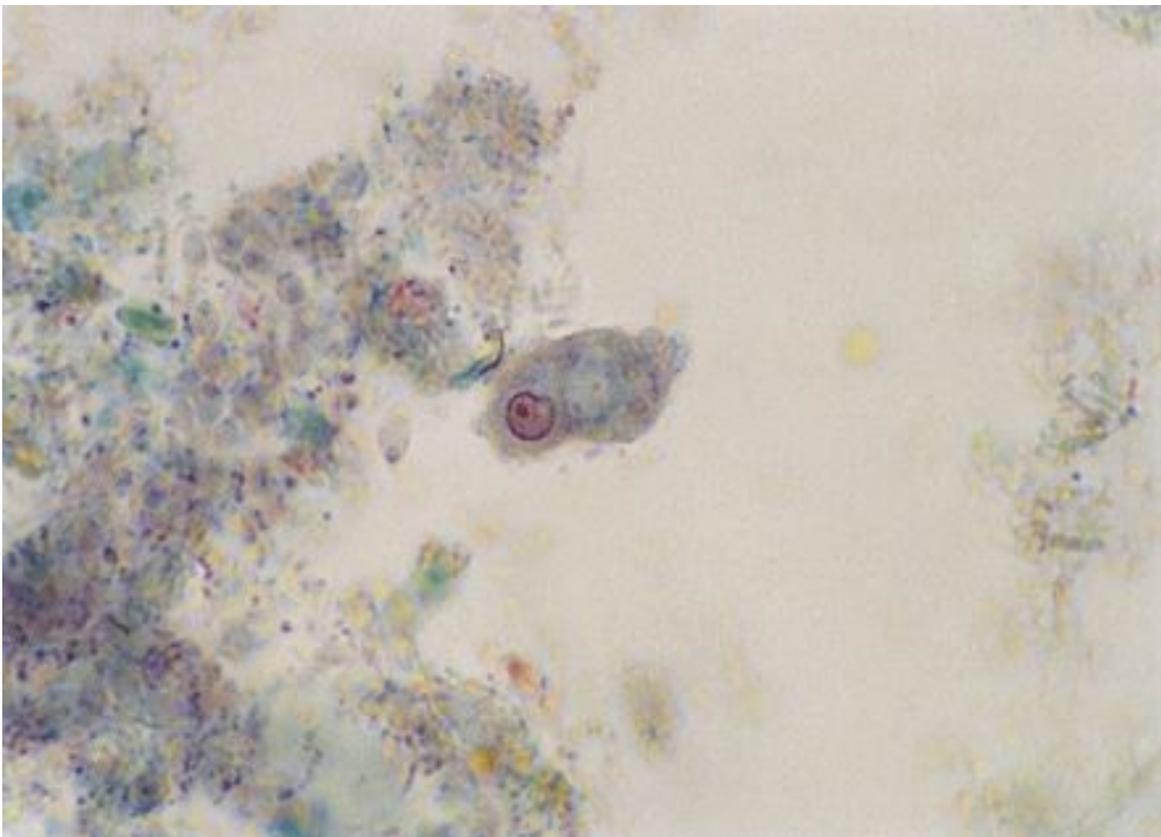


Photo n° 27

Anaphase. Noyau bourgeonnant de forme végétative d'*Entamoeba histolytica* ou *Entamoeba dispar*. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

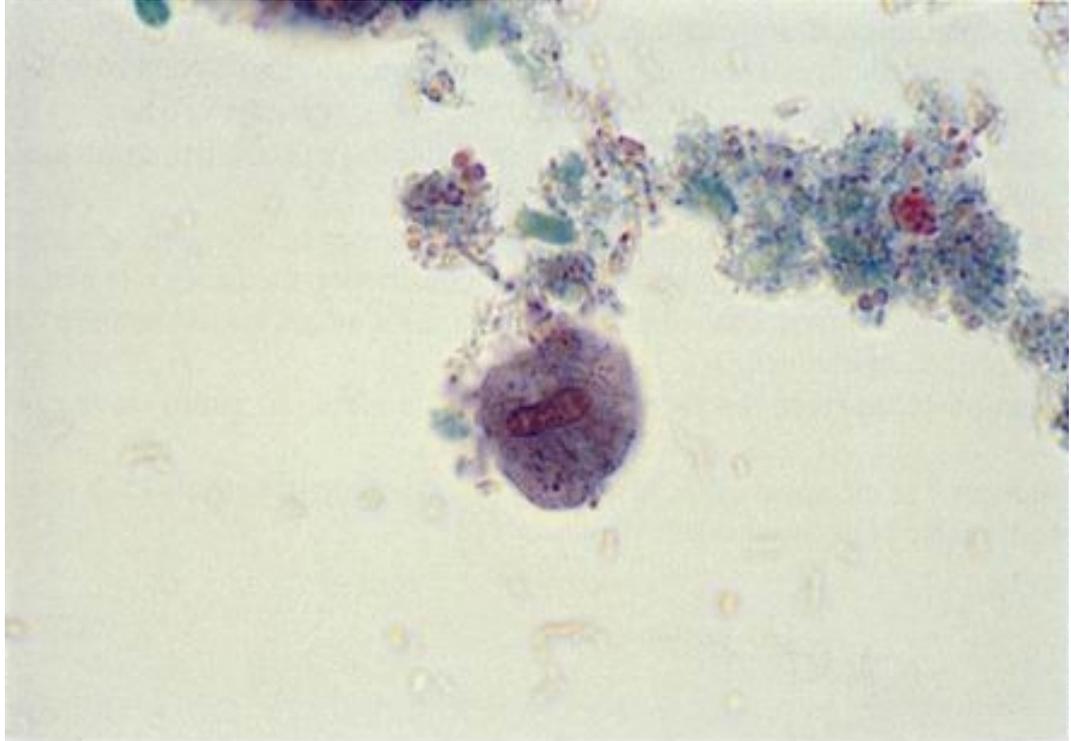


Photo n° 28 - Anaphase. Forme végétative d'*Entamoeba histolytica* ou *Entamoeba dispar*. Début de division: noyau ovoïde, allongé avec début de rétrécissement médian. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

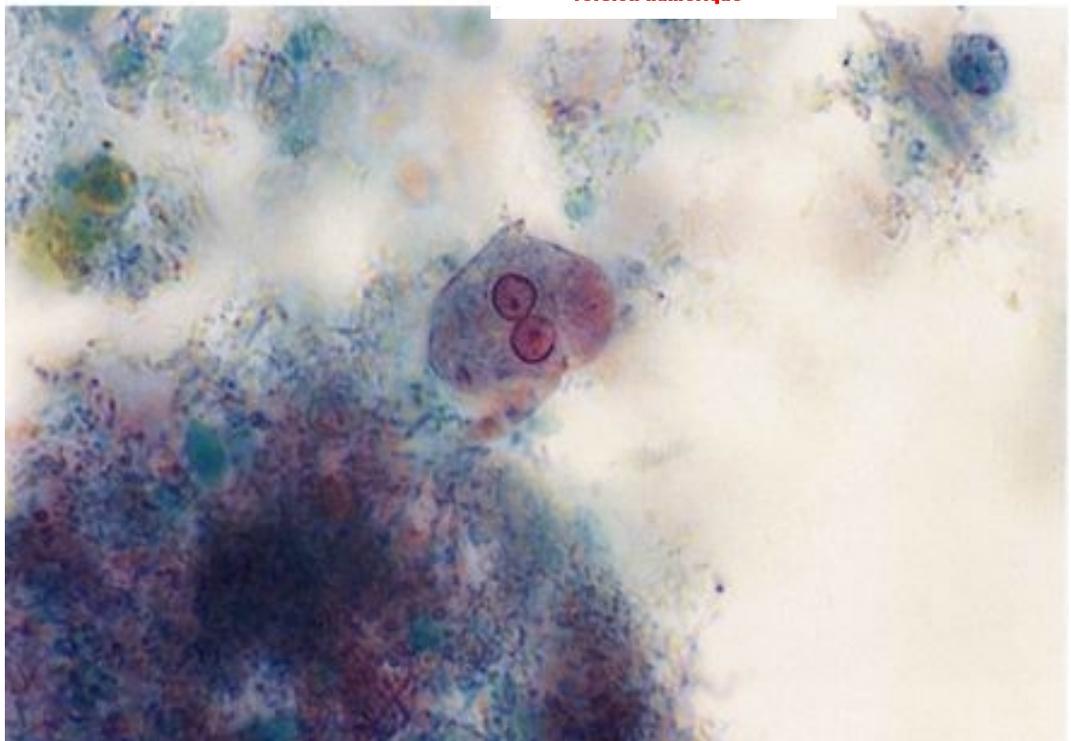


Photo n° 29 - Télaphase. Forme végétative d'*Entamoeba histolytica* ou *Entamoeba dispar*. Noyau venant de se diviser. Présence de chromosomes et nucléoles. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

La télophase : pendant la télophase la membrane nucléaire unique se dissout pour se reconstituer autour de chaque noyau fils. Par la suite se produit une recondensation nucléaire, c'est à dire un épaississement de la chromatine périphérique (photos n° 29 et n° 30).

Au début de ce stade le caryosome ou centre cinétique, disparaît, pour réapparaître par la suite dans chaque noyau fils (photos n° 30 et n° 31).

Il est a noter que le type de mitose d'*Entamoeba histolytica* (fuseau qui diverge vers les pôles) est également celui de *Leishmania tropica*.

Les deux noyaux sont pendant cette phase dans un seul cytoplasme (photo n° 32).

La cytotdiérèse : le cytoplasme se sépare en deux avec un noyau dans chaque nouvelle amibe (photos n° 33 et n° 34).

Au total la division de la forme végétative d'*E. histolytica* aura duré environ 120 minutes.

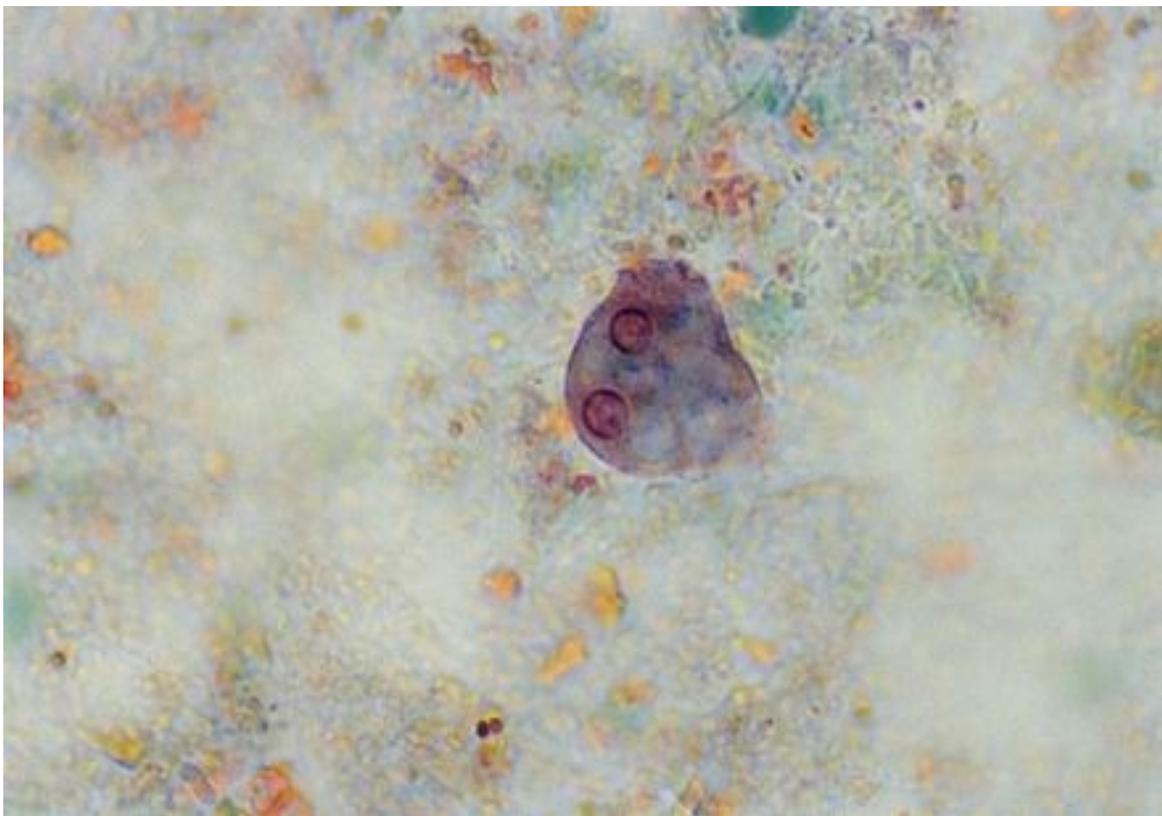


Photo n° 30

Télophase. Forme végétative d'*Entamoeba histolytica* ou *Entamoeba dispar*. Deux noyaux bien séparés avec persistance de la membrane cytoplasmique. Présence de chromosomes et nucléoles. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

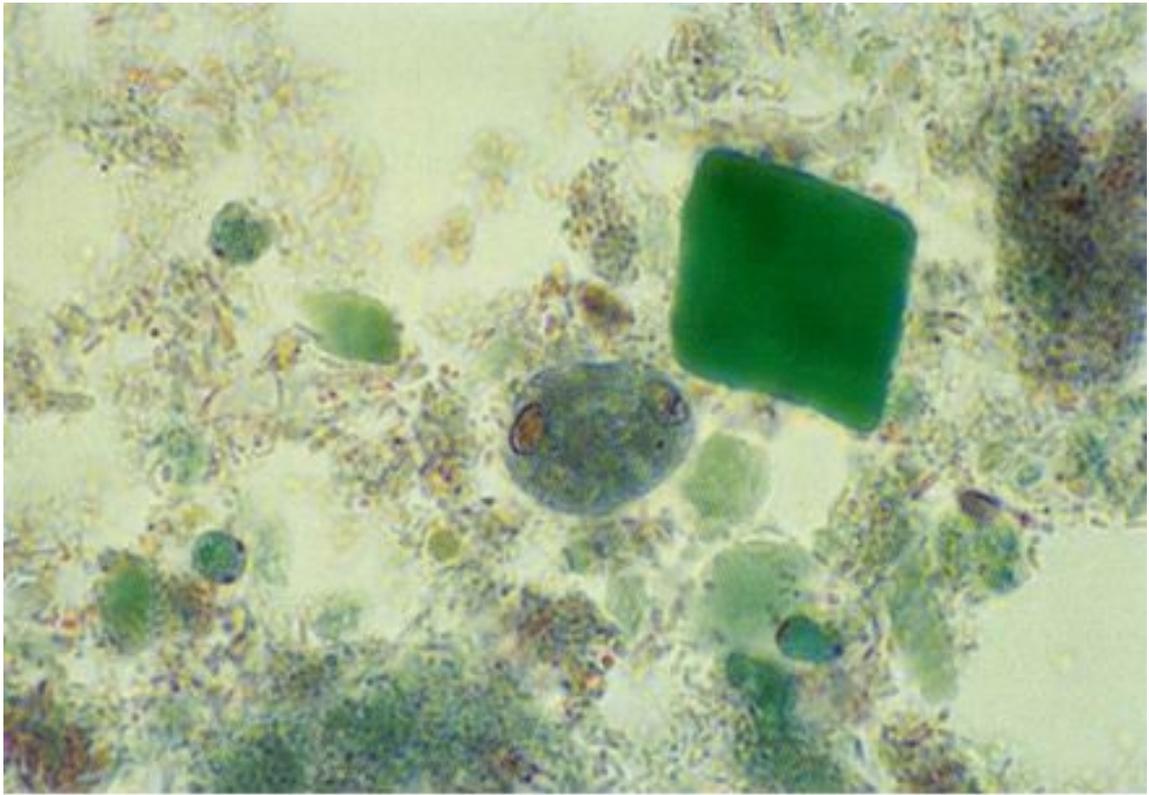


Photo n° 31- Télophase. Forme végétative d'*Entamoeba histolytica* ou *Entamoeba dispar*. Deux noyaux bien séparés : entre eux on aperçoit les fibres parallèles du fuseau séparant les noyaux. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

CAHIER **BIOFORMA**
DE
Formation
version numérique

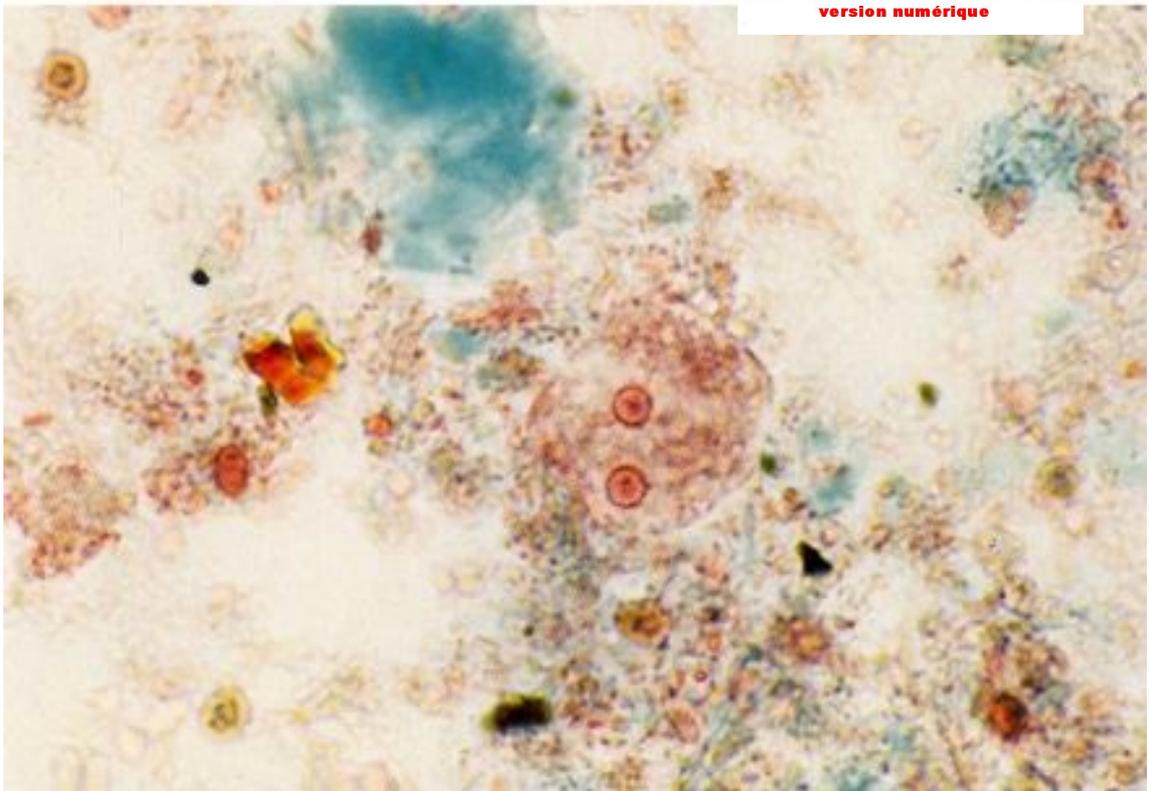


Photo n° 32 - Télophase. Forme végétative d'*Entamoeba histolytica* ou *Entamoeba dispar*. Deux noyaux bien séparés. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

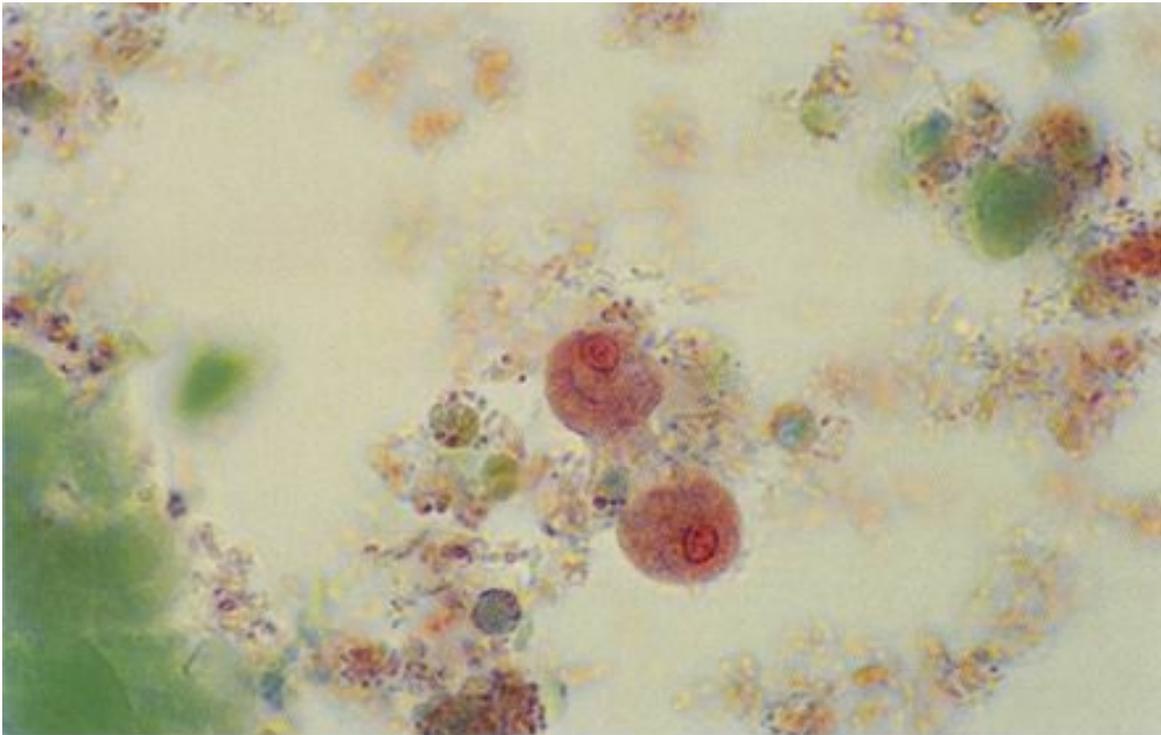


Photo n° 33 - Cytodiérèse. Forme végétative d'*Entamoeba histolytica* ou *Entamoeba dispar*. Division du cytoplasme en cours avec persistance d'un important pont entre les deux amibes. A.P.V. trichrome. Obj. X 100

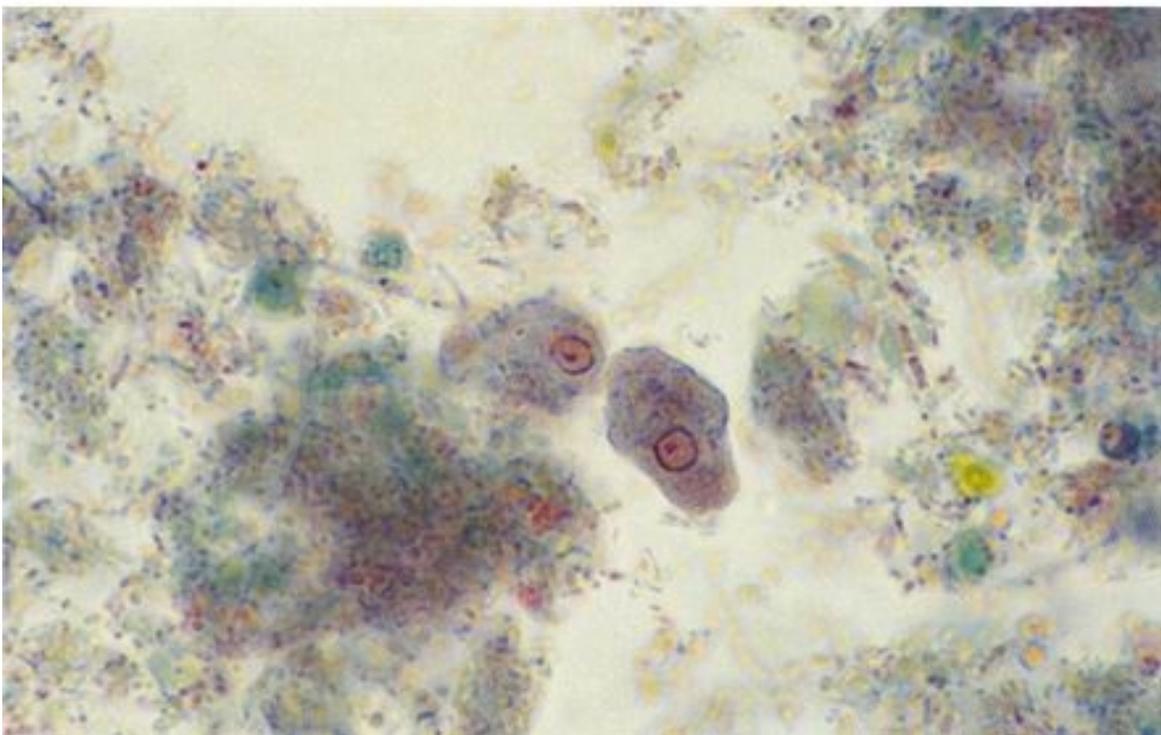


Photo n° 34 - Cytodiérèse. Forme végétative d'*Entamoeba histolytica* ou *Entamoeba dispar*. Fin de la division du cytoplasme, on aperçoit un petit pont entre les deux amibes. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

LA DIVISION DES FORMES VÉGÉTATIVES DES AUTRES AMIBES DE L'HOMME

Peu d'études ont été faites concernant leur division (51). Des aspects correspondant probablement à des formes en voie de division peuvent cependant être observées, en particulier après coloration par le trichrome.

On retrouve pour les formes végétatives d'*Entamoeba hartmanni* (photo n° 35) d'*Entamoeba coli* (photo n° 36) et d'*Endolimax nanus* (photo n° 37) des aspects similaires à ceux décrits pour *Entamoeba histolytica*.

Dientamoeba fragilis : rattaché aux flagellés, possède dans 20 à 80 % des cas des formes à deux noyaux souvent reliés entre eux par un filament, faisceau extranucléaire microtubulaire. La division nucléaire a été étudiée par Brug (50) après coloration à l'hématoxyline de Heidenhain.

Cet aspect correspond à un arrêt de la division au stade de télophase.

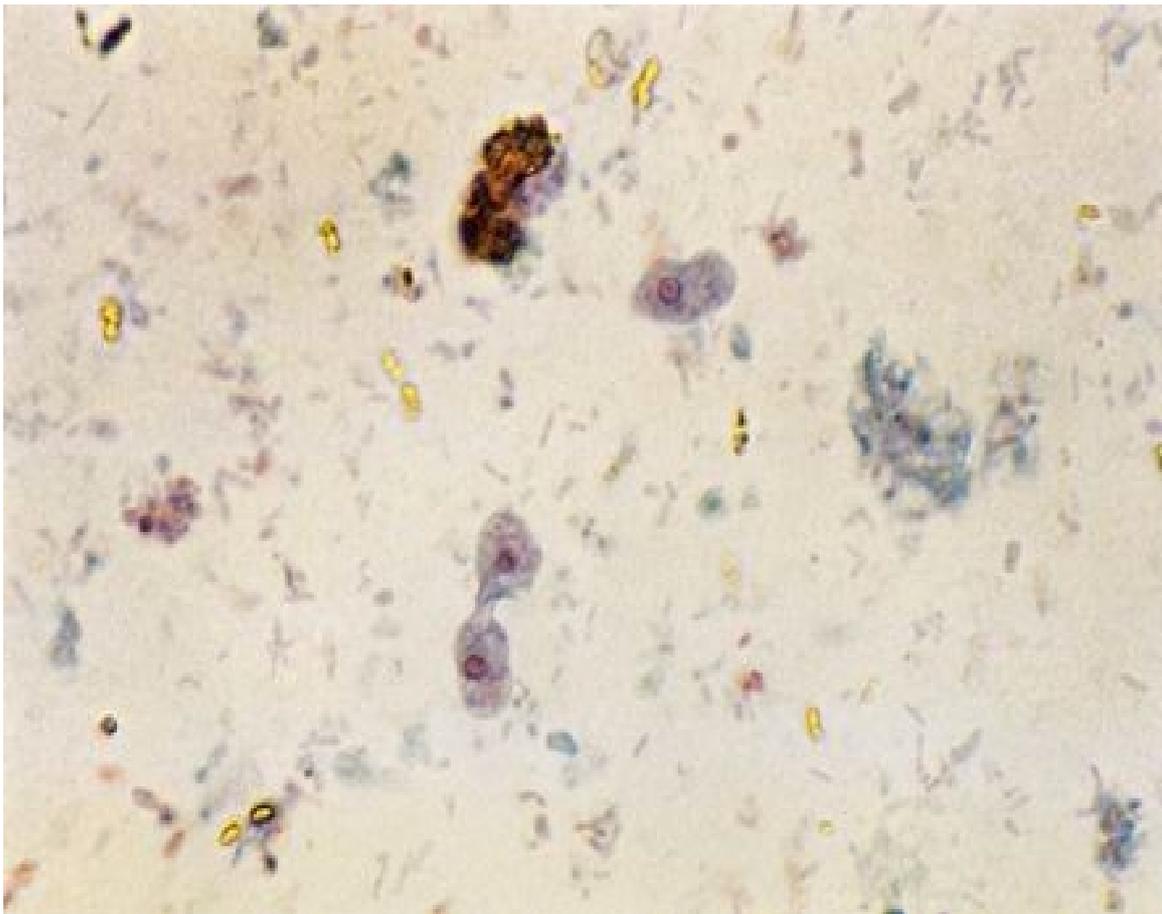


Photo n° 35

Cytodiérèse. Formes végétatives d'*Entamoeba hartmanni*. L'une présente une division du cytoplasme en cours avec persistance d'un pont entre les deux amibes. A.P.V. trichrome
Obj. X 100.

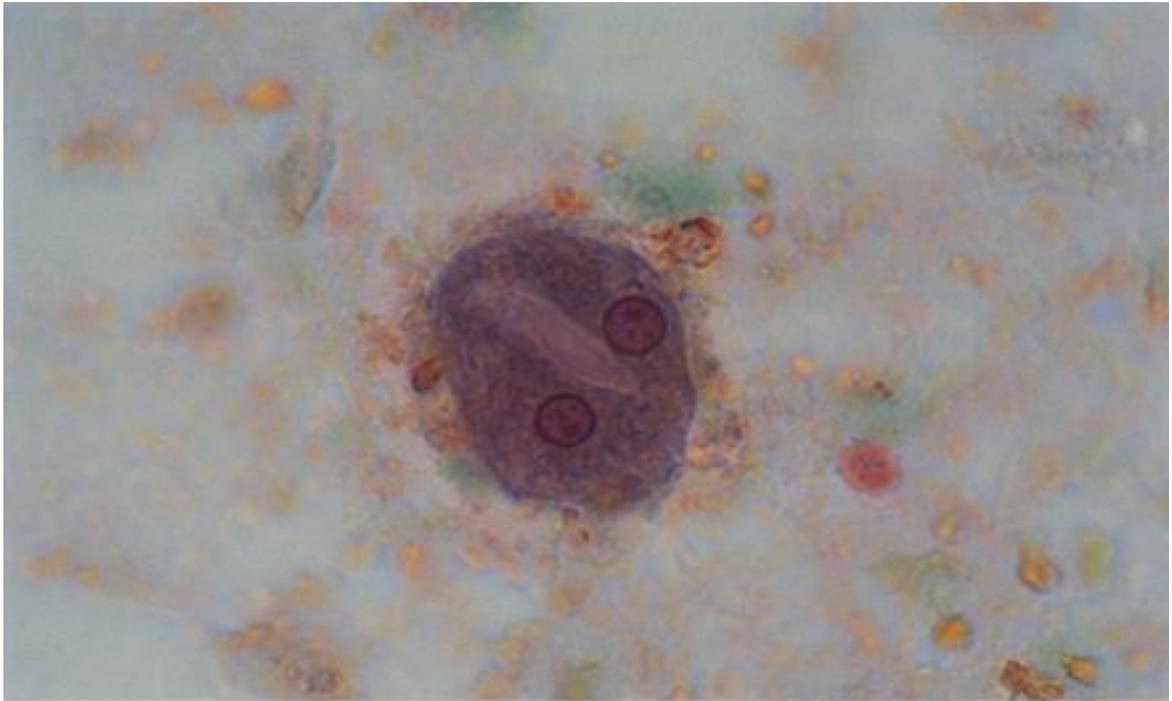


Photo n° 36 - Téléphase. Forme végétative d'*Entamoeba coli*. Deux noyaux bien séparés avec persistance de la membrane cytoplasmique. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

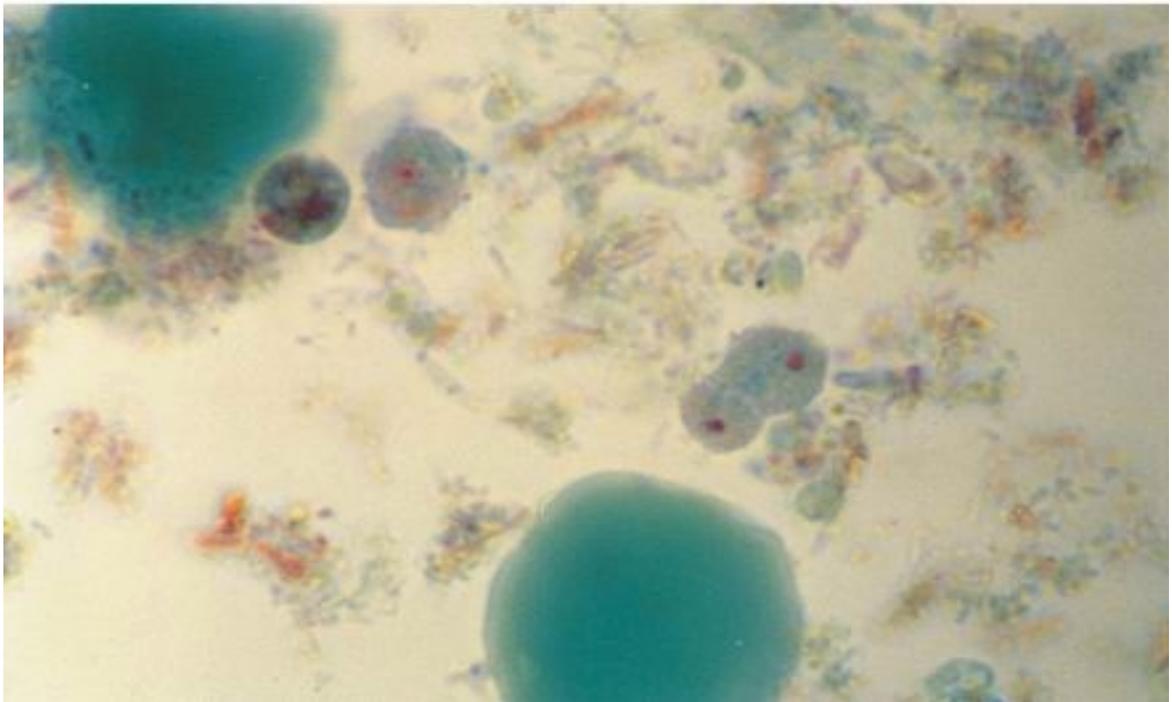


Photo n° 37 - Début de cytotdiérèse. Forme végétative d'*Endolimax nanus*. Deux noyaux bien séparés avec amorce de la division du cytoplasme. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

Iodamoeba butschlii : On peut observer des formes végétatives au stade de télophase avec deux noyaux séparés. (photos n° 38)

La chromatine périphérique peut être vue sous l'aspect de petits amas, correspondant probablement à des nucléoles. (photo n° 39)

Les noyaux des formes végétatives contiennent habituellement des granulations dites achromatiques car se colorant mal avec certains colorants, en particulier le M.I.F., également appelées granules péricaryosomiens, semblant correspondre aux chromosomes (photo n° 40). Ces granulations ne sont en règle générale pas visibles pour *Endolimax nanus*. Cette différence constitue en pratique un élément de diagnostic différentiel pour ces deux amibes de type limax.

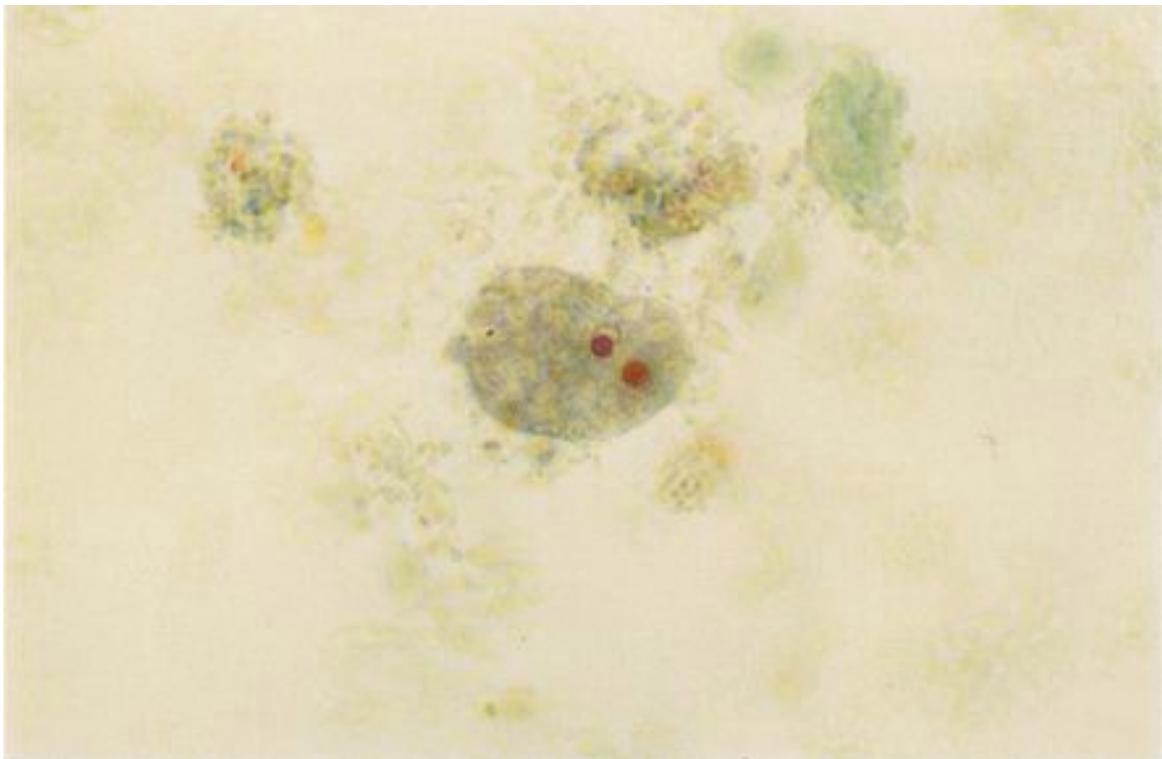


Photo n° 38

Télophase. Forme végétative de *Iodamoeba butschlii*. Deux noyaux bien séparés ou l'on aperçoit les granules péri-caryosomiens = chromosomes. A.P.V. trichrome Obj. X 100.

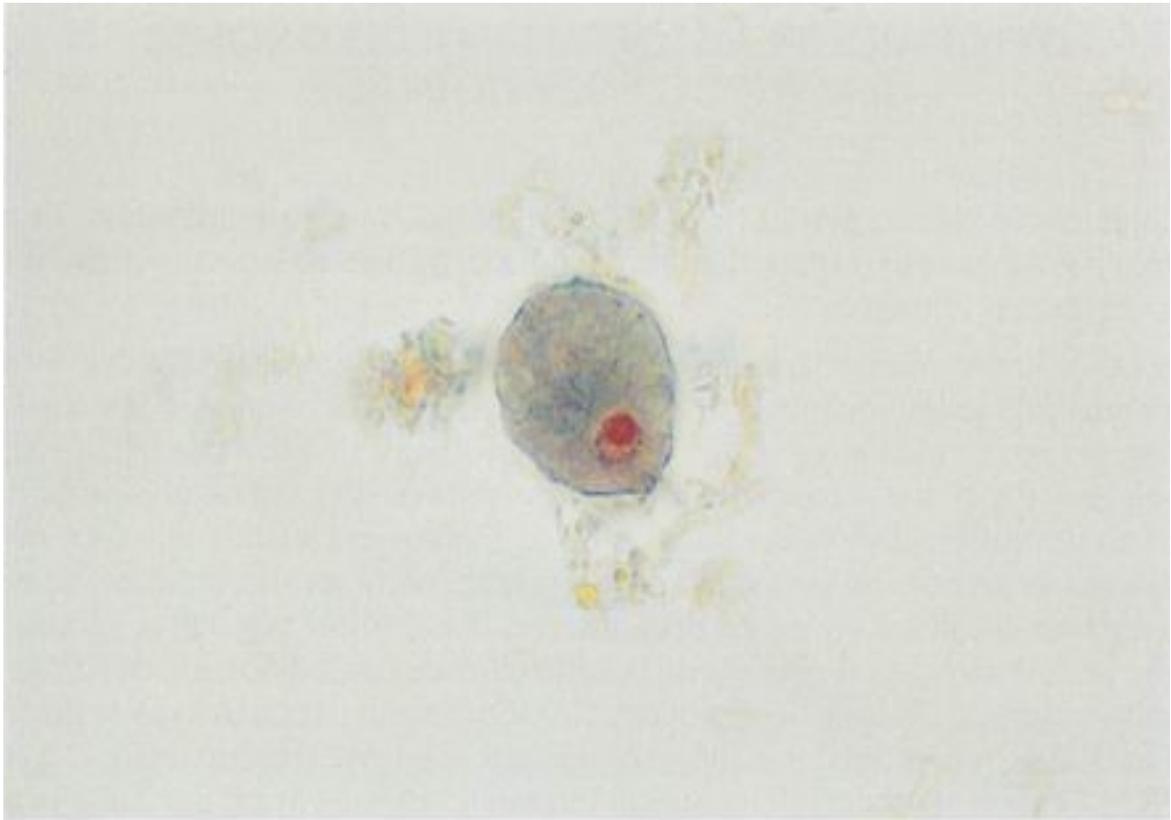


Photo n° 39 - Anaphase. Forme végétative *Iodamoeba butschlii*. Petits amas au niveau de la membrane chromatinienne. A.P.V. trichrome. Obj. X 100.

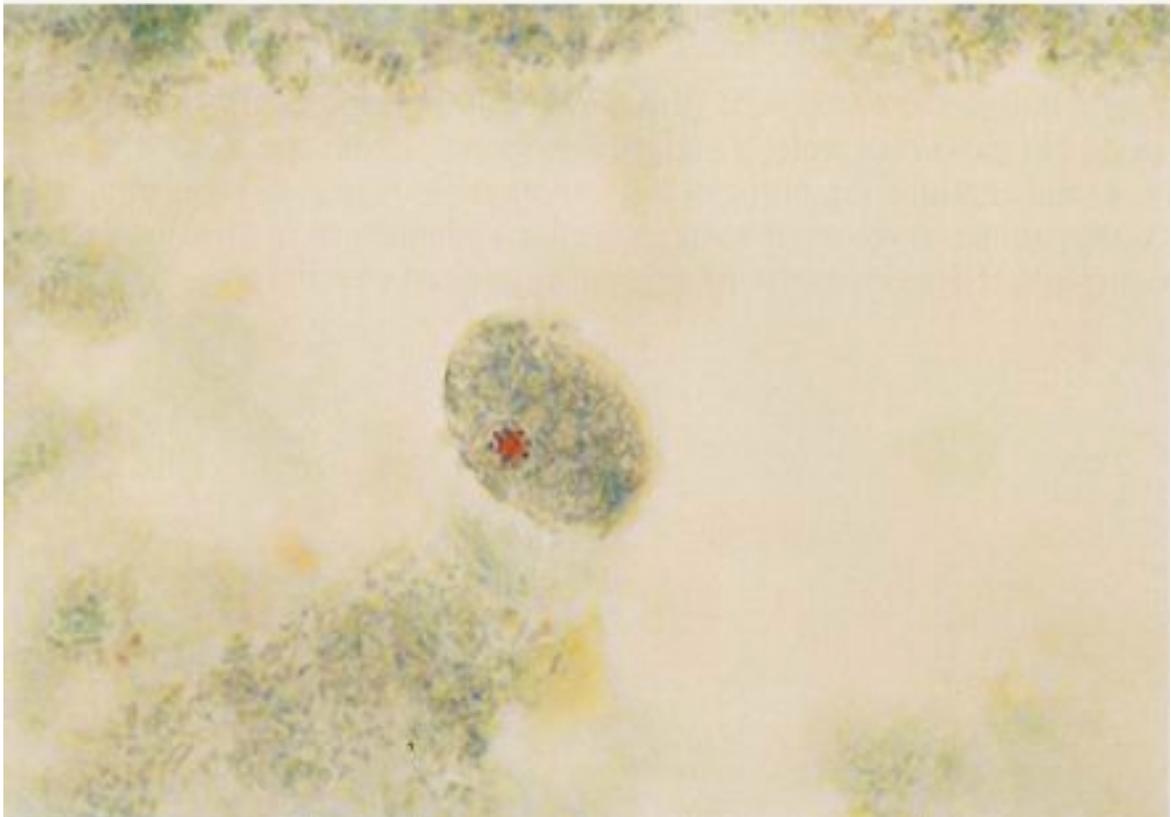


Photo n° 40 - Anaphase. Forme végétative *Iodamoeba butschlii*. Granules péricaryosomiens (= chromosomes) se projetant au niveau de l'espace clair entre la membrane chromatinienne et le caryosome. A.P.V. trichrome. Obj. X 100.

APPLICATION DES NOTIONS SUR LA DIVISION D'*ENTAMOEBEA HISTOLYTICA* AU DIAGNOSTIC MICROSCOPIQUE COURANT

Le doublement de volume pendant l'interphase explique les grandes variations de taille observées pour une même espèce d'amibe, s'ajoutant au rôle de la locomotion pour les formes végétatives allongées.

L'observation attentive en microscopie optique, après fixation par l'APV et coloration au Trichrome, de selles contenant des formes végétatives d'*Entamoeba histolytica* ou *E. dispar*, permet de bien observer les stades finaux de division tels que la télophase et la cytodierèse. Par contre, l'étude des premières phases de division est plus difficile. La description des différentes phases de division de l'amibe est intéressante d'un double point de vue - le premier est purement scientifique, quant au second, il permet de mieux comprendre les différences que l'on peut observer d'une forme végétative à l'autre sur un même prélèvement, qu'il s'agisse de la taille et/ou de la morphologie de son noyau. Pendant son cycle de division, le noyau en activité pourra dans certains cas se présenter à l'œil de l'observateur avec une morphologie qui n'est pas toujours celle classiquement décrite et que volontiers l'on pourrait interpréter comme ayant une taille particulièrement grande ou un noyau atypique, dégénéré, mal fixé, etc., alors qu'en réalité cela correspond souvent à l'une ou l'autre des phases de division des formes végétatives.

Pour Schaffer et Lamy, il n'y aurait pas nécessairement de synchronisation entre la division du noyau et celle du cytoplasme. C'est peut-être la raison pour laquelle on observe d'une façon non exceptionnelle des formes végétatives à deux noyaux, aussi bien chez *E. histolytica* que chez *Ent. coli*, *I. butschlii* et *E. nanus*.

Les cycles mitotiques d'*Entamoeba histolytica* sont très rapprochés et comme la prophase en est l'étape la plus lente, les noyaux en prophase sont une forme fréquemment observée ce qui explique l'importance des variations de forme, de taille et même l'absence de caryosome. Il en est de même pour les variations de la chromatine périphérique = nucléole et des chromosomes = granules pericaryosomiens.

AMIBES GÉNÉRALITÉS

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

pages

- AMIBES GÉNÉRALITÉS

- Type Entamibe et Type Limax 54
- Comment distinguer une forme végétative d'un kyste 55
- Figure 1 : aspect comparatif et taille des formes végétatives d'amibes 56
- Prévalence des amibes et flagellés 58
- Résistance des amibes 59

Il existe chez l'homme 3 genres comprenant 8 espèces d'amibes.

La détermination des amibes est plus difficile que celle des flagellés et exige une double étude :

- étude morphologique générale à frais ;
- étude de la structure générale du noyau, en particulier après coloration.

La morphologie du noyau permet de les diviser en deux groupes pour le microscopiste :

- le noyau de type « Entamibe » présent chez les amibes du genre *Entamoeba* ;
- le noyau de type « Limax » présent chez les amibes du genre *Pseudolimax* et *Endolimax*.

TYPE « ENTAMIBE »

Genre *Entamoeba* : noyau constitué par une membrane périphérique tapissée d'une couche de chromatine, et pourvu d'un caryosome petit, ou assez petit, central ou excentré, contrairement à celui des deux genres suivants.

- | | |
|---|---------------------------|
| 1) <i>Entamoeba histolytica</i> | Forme végétative et kyste |
| 2) <i>Entamoeba dispar</i>
correspond à une espèce non pathogène souvent morphologiquement identique à <i>E. histolytica</i> . | Forme végétative et kyste |
| 3) <i>Entamoeba moshkovskii</i>
correspond à une espèce non pathogène morphologiquement identique à <i>E. histolytica</i> . | Forme végétative et kyste |
| 4) <i>Entamoeba hartmanni</i> | Forme végétative et kyste |
| 5) <i>Entamoeba coli</i> | Forme végétative et kyste |
| 6) <i>Entamoeba polecki</i> | Forme végétative et kyste |

TYPE « LIMAX »

Le regroupement sous cette dénomination des genres *Pseudolimax* et *Endolimax* est surtout faite en raison de données morphologiques.

Genre *Pseudolimax* : noyau avec membrane nucléaire très mince et volumineux caryosome central entouré de granules achromatiques, encore appelés granules péricaryosomiens, correspondant aux chromosomes.

7) *Iodamoeba butschlii*

Forme végétative et kyste

Genre *Endolimax* : noyau avec membrane nucléaire mince, et caryosome volumineux, parfois excentré.

8) *Endolimax nanus*

Forme végétative et kyste

Il est à noter que nous n'étudions que les amibes de l'Homme. Il en existe de très nombreuses espèces chez les animaux, comme par exemple *Entamoeba ranarum* chez la grenouille et le têtard, qui ressemble beaucoup à *E. histolytica* et a parfois été utilisée pour l'enseignement (68).

MOBILITÉ

Il est important de différencier la mobilité vraie d'une amibe isolée émettant des pseudopodes, de la fausse mobilité d'éléments divers, en particulier leucocytes et cellules intestinales, entraînés par des « courants » dans une préparation microscopique liquide.

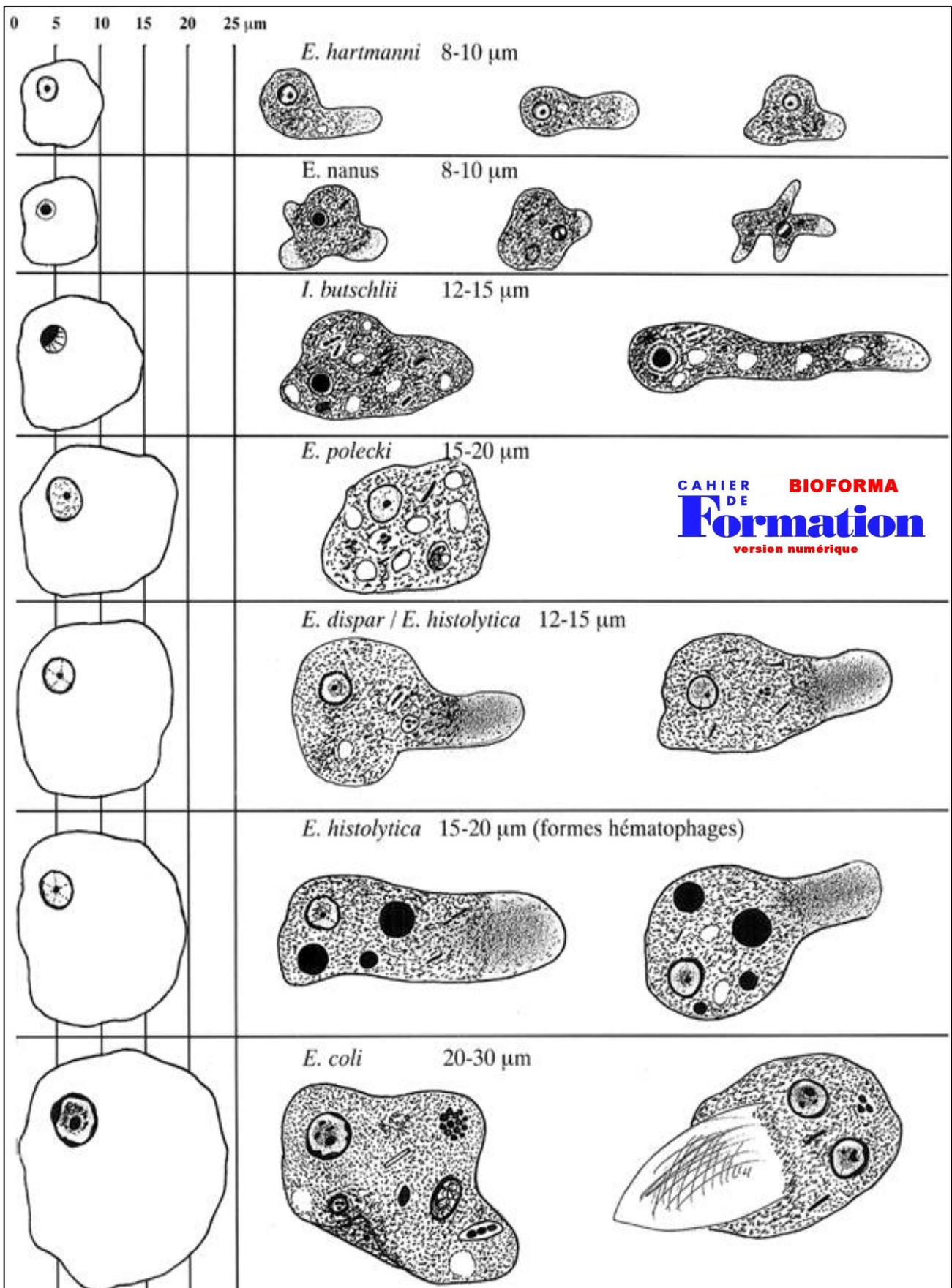
COMMENT DISTINGUER UNE FORME VÉGÉTATIVE D'UN KYSTE

A l'état frais, le problème ne se pose presque pas, la forme végétative étant vivante est mobile grâce à ses pseudopodes pour les amibes. Lorsque ces protozoaires tendent à s'immobiliser, il faut bien rechercher leurs organes de locomotion, souvent à l'immersion - pour les Dientamibes en particulier.

Comme elles doivent se nourrir, ces formes végétatives sont remplies de vacuoles digestives, plus ou moins bourrées d'inclusions alimentaires selon le parasite : *Entamoeba coli* par exemple est la plus vorace alors que *Entamoeba histolytica* ne renferme pas de débris.

Le cytoplasme de l'amibe est rempli de granulations plus ou moins fines, et renferme quelquefois un parasite appelé SPHAERITA. (photos n° 100 ; 186)

Le contour de la forme végétative n'est jamais très net et très réfringent, surtout chez l'amibe, puisque celle-ci doit émettre des pseudopodes à partir de la partie externe hyaline de son cytoplasme ou ectoplasme, la partie granuleuse étant l'endoplasme.



CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Figure 1 : Formes végétatives d'amibes

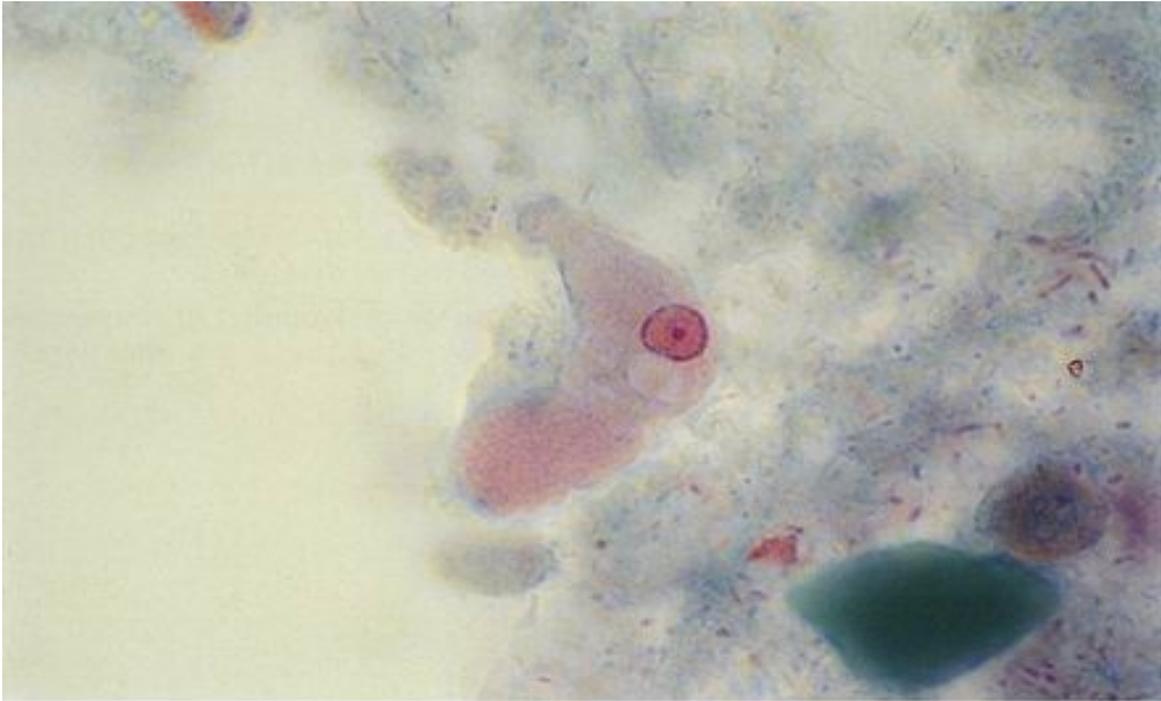


Photo n° 41

Noyau de type « entamibe », avec membrane périphérique tapissée d'une couche de chromatine et un assez petit caryosome. *E. histolytica*. Coloration trichrome. Obj. X 100.

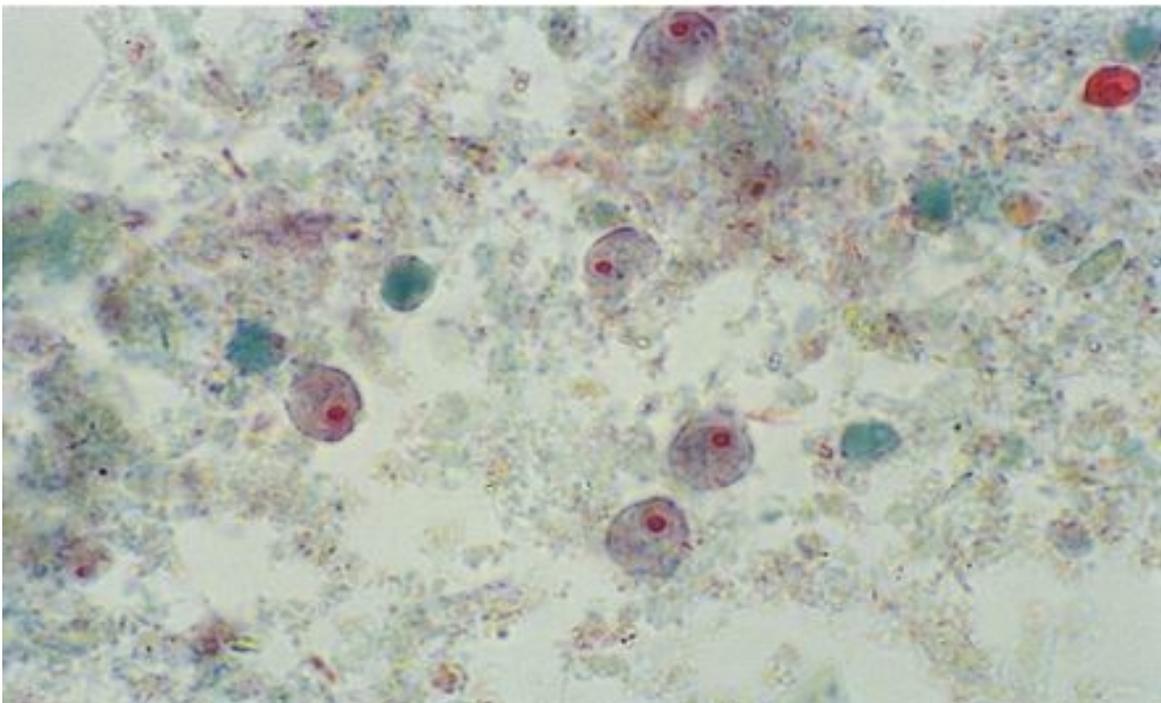


Photo n° 42

Noyaux de type « limax » avec membrane nucléaire mince et caryosome volumineux. *Endolimax nanus*. Coloration trichrome. Obj. X 100.

A l'opposé de tous ces caractères le kyste :

- n'est pas mobile
- n'a pas de vacuoles digestives avec inclusions alimentaires, mais une ou quelquefois plusieurs vacuoles de glycogène iodophiles.
- est hyalin, optiquement vide à frais en général, sans aucune granulation (sauf après concentration ayant abîmé les kystes)
- ne contient pas de *Sphaerita*, mais assez fréquemment des cristalloïdes de forme et de taille variables selon l'espèce, et donc d'un grand intérêt diagnostic.
- caractère primordial du kyste qui est une forme de résistance : la coque externe épaisse, lisse, nette, donnant au kyste une réfringence spéciale et « un reflet nacré bleu comparable à l'orient d'une perle ».

Tableau 1 : Prévalence des protozoaires intestinaux exprimés en pourcentage
Rousset 1994 (1) - Ho Thi Sang (2) 1965

Origine	Français non voyageurs (1)	Français voyageurs (1)	Maghrébins (1)	Africains (1) noirs	Antillais (1)	Enfants (2)	Adultes (2)
Nombre de Personnes →	2 308	1 781	1 533	1 581	1 546	250	5 000
Espèces							
<i>E.histolytica</i>	0,3	1,3	5,5	8,3	1	2,4	3,6
<i>Ent. coli</i>	3,4	4,8	11,4	23,3	3,8	12,8	14,4
<i>E. hartmanni</i>		0,6	2,3	3,9	0,6		1
<i>E. nanus</i>	1,9	3,3	11,2	18,7	7	4,8	11,9
<i>L butschlii</i>	0,1	0,7	2,4	2,9	0,6	0,8	0,7
<i>D. fragilis</i>	4	5,4	10	4,5	4,9	22,4	14,8
<i>G. intestinalis</i>	6	4,7	4,2	3,3	1,4	16	9,7
<i>C. mesnili</i>	0,2	0,3	2,3	2,2	0,1	0	1,9
<i>Penta trichomonas hominis</i>		0,1	0,1	0,2	0,1	0,8	0,5
<i>Enteromonas hominis</i>		0,5	0,7	1,5		0	0,7
<i>Retortamonas intestinalis</i>		0,1				0	0,3
<i>Blastocystis hominis</i>	19	25,7	32	41,3	29,2		

LA PREVALENCE des amibes et flagellés intestinaux figurant dans le tableau I doit tenir compte de plusieurs facteurs d'adaptation :

- il s'agit de la prévalence lors de recherches microscopiques dans les selles pour des patients envoyés en consultation, et non pas d'études systématiques dans une population donnée ou d'un échantillon tiré au sort ;
- les chiffres qui y figurent sont relativement anciens. Depuis, ils ont évolué à la baisse, surtout dans les pays occidentaux, où le niveau d'hygiène s'est considérablement amélioré :
 - lavage des mains après défécation plus fréquent ;
 - élimination dans les égouts des matières fécales, avec souvent des modalités d'épandage beaucoup moins favorables à la conservation des kystes (et des œufs) que celle du temps où les selles humaines étaient utilisées comme engrais dans le jardin.

RÉSISTANCE DES AMIBES

Formes végétatives :

Les formes végétatives sont peu résistantes. Elles s'immobilisent et même se lysent assez vite, en quelques heures en général.

C'est pour cela qu'on préconise :

- la réactivation pour avoir les amibes bien vigoureuses du coecum ;
- le prélèvement des selles au laboratoire et l'examen immédiat afin d'étudier leur mobilité souvent caractéristique.

Kystes :

La résistance des kystes est intéressante d'un triple point de vue :

- pour le coprologue, afin de préciser les conditions d'un examen parasitologique, en particulier les délais pour faire l'examen ;
- pour connaître les risques de contamination professionnelle ;
- pour l'épidémiologiste car seule la forme kystique permet la transmission de l'amibiase.

La durée de survie des kystes est déterminée par deux techniques simples : la coloration par l'éosine ou la culture. Les résultats varient selon les auteurs et les conditions expérimentales : température, humidité, nature du milieu (tableau II).

La durée de survie des kystes, jugée d'après leur non colorabilité par l'éosine, à une température comprise entre 12°C et 22°C a été trouvée de 153 jours pour *E. histolytica*, 244 jours pour *Ent. coli*, 32 jours pour *G. intestinalis* et 187 jours pour *C. mesnili* (60).

La létalité par une chaleur maintenue pendant 5 minutes à été observée (61) à une température de 68°C pour *E. histolytica*, 76°C pour *Ent. coli*, 64°C pour *I. butschlii*, *E. nanus* et *G. intestinalis* et 72°C pour *C. mesnili*.

À 30°C environ, la conservation de la vitalité des kystes d'*E. histolytica* dans le sol est d'au moins 8 jours (plus longtemps que dans l'eau), ce qui montre également la possibilité de transmission de la maladie par des éléments végétaux contaminés (77).

Tableau II : Survie des kystes d'*E. histolytica* étudiée par culture (81)

Température	Durée de survie dans des selles non diluées	Durée de survie dans des selles diluées avec de l'eau distillée
0 à - 6 °C	1 à 4 jours	1 à 3 jours
+ 2 à + 6 °C	20 à 40 jours	20 à 63 jours
+ 25 °C	3 à 4 jours	2 à 6 jours
+ 37°C	24 heures	24 à 48 heures
		<u>En milieu de culture</u>
+ 41 °C		12 heures
+ 43 °C		3 heures
+ 45 °C		2 heures
+ 47°C		25 minutes
+ 48 °C		15 minutes
+ 49°C		7 minutes
+ 50°C		5 minutes

Ces durées de survie sont des durées minimum pour le coprologue, pendant lesquelles la morphologie est sûrement conservée. La meilleure température de conservation est donc celle du réfrigérateur (mais il n'en est pas de même pour tous les parasites) et ensuite la température du laboratoire.

Pour l'épidémiologiste, une température de 25 à 37 °C, correspondant à celle des mains, permet une survie des kystes de 1 à 4 jours.

Rappelons que les kystes sont soumis aux périodes négatives, d'où l'intérêt de la réactivation.

ÉTUDE DES FORMES VÉGÉTATIVES D'AMIBES

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Pages

-	ÉTUDE DES FORMES VÉGÉTATIVES D'AMIBES	
•	Morphologie générale des formes végétatives d'amibes	62
•	Comment étudier une forme végétative d'amibe à frais	62
•	Formes végétatives d' <i>Entamoeba histolytica</i>	64
•	Schéma de différentes formes végétatives d' <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	67
•	Forme végétative d' <i>Entamoeba dispar</i>	78
•	Forme végétative et kyste d' <i>Entamoeba moshkovskii</i>	94
•	Forme végétative d' <i>Entamoeba hartmanni</i>	96
•	Forme végétative d' <i>Entamoeba coli</i>	101
•	Schéma de différentes formes végétatives d' <i>Entamoeba</i>	102
•	Forme végétative d' <i>Entamoeba polecki</i>	113
•	Forme végétative d' <i>Endolimax nanus</i>	117
•	Forme végétative d' <i>Iodamoeba butschlii</i>	121

MORPHOLOGIE GÉNÉRALE DES FORMES VÉGÉTATIVES D'AMIBES

Le cytoplasme de l'amibe est composé de deux parties plus ou moins distinctes selon les espèces :

- endoplasme, interne et granuleux ;
- ectoplasme, externe et hyalin d'où partent les pseudopodes ou faux-pieds servant à la locomotion.

Dans l'endoplasme il y a des vacuoles digestives, qui se présentent comme un vide clair, contenant ou non des inclusions alimentaires les plus diverses : bactéries, amidon, levures, autres parasites... L'endoplasme contient également le noyau qui est rarement visible à frais.

COMMENT ÉTUDIER UNE AMIBE À FRAIS

Taille : se mesure sur une amibe immobile et arrondie. C'est une notion importante pour l'identification, mais les limites ne sont pas toujours nettement tranchées entre les espèces voisines.

FORME ET MOBILITÉ À LA TEMPÉRATURE DU LABORATOIRE

La mobilité des amibes dépend :

- de la consistance des selles ;
- du temps écoulé entre l'émission des selles et l'examen direct.

Au début, les amibes saisies par le froid de la lame ou de la platine du microscope s'immobilisent. Elles s'habituent petit à petit à la température ambiante et se mettent en mouvement. On étudie alors les pseudopodes :

- nombre de pseudopodes émis à la fois ;
- taille, forme, transparence ;
- rapidité ou lenteur de leur émission ;
- devenir, mouvement sur place, progressif, directionnel.

MOBILITÉ APRÈS RÉCHAUFFEMENT

On peut porter les amibes à 37°

- soit avec une étuve de Foot dans laquelle on met le microscope (Brumpt 1925), rarement utilisée maintenant ;
- soit avec une ampoule électrique à rayons infrarouges qui réchauffe la platine du microscope et la préparation ;
- soit en mettant la lame montée 5 minutes à l'étuve à 37 °C, et en l'examinant immédiatement après au microscope.

ASPECT DU CYTOPLASME

- Existe-t'il un endoplasme et un ectoplasme bien nets ?
- Taille des granulations : fines ou grossières.
- Présence ou non de vacuoles, nombre et taille de celles-ci.

Inclusions : hématies, levures, bactéries, gros débris...

- Parasites : présence ou non de Sphaerita qui alourdissent l'amibe et l'empêchent d'avoir sa mobilité habituelle.

NOYAU

- Visibilité ou non à frais : s'il est visible son aspect peut conduire à un diagnostic de présomption.

Après coloration : il faut étudier la structure du noyau : taille, épaisseur de la membrane nucléaire, chromatine périphérique, taille et place du caryosome...



Photo n° 43
Forme végétative d'*Entamoeba coli* à frais. Obj. X 100.

ENTAMOEBA HISTOLYTICA / ENTAMOEBA DISPAR
(= ENTAMOEBA DYSENTERIAE)
FORME VÉGÉTATIVE

Kyste : p. 132

Tableau III : Formes végétatives d'*Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar*
Résultats des tests du Contrôle National de Qualité en Parasitologie de France

Date d'envoi	Nombre de réponses	Richesse*	Résultats conformes	Deuxième réponse en %**	Troisième réponse en %**
02/1984	1 077	40 (+ kystes) Solution : Acéto-acétique formolée	40% (1)	<i>Entamoeba coli</i> 8,2	<i>Iodamoeba butschlii</i> 3,1
01/1985	1 075	1 (+ kystes) Coloration: M.I.F.	23,9% (2)	<i>Entamoeba coli</i> 3,8	<i>Dientamoeba fragilis</i> 2,1
10/1989	1 073	5 Coloration : trichrome	53,1%	<i>Entamoeba coli</i> 20,1	<i>Endolimax nanus</i> 2
01/1990	1 140	5 Coloration : trichrome	73,8%	<i>Entamoeba coli</i> 6,5	<i>Entamoeba hartmanni</i> 1,1
03/1991	1088	50 (+ kystes) Coloration : trichrome	51,6% (3)	<i>Endolimax nanus</i> 1,3	<i>Entamoeba hartmanni</i> 1,1
11/1992	1183	2 (+ kystes) Coloration : trichrome	60,4% (4)	<i>Entamoeba coli</i> 26,1	<i>Endolimax nanus</i> 8,9

* La richesse moyenne = nombre de champs Obj. X 40 nécessaires pour trouver un parasite.

** Parasites absents dans la selle.

(1) Associé avec des kystes de *Giardia intestinalis*.

(2) Associé avec des kystes d'*Endolimax nanus*.

(3) Associé avec des formes végétatives d'*Entamoeba histolytica*.

(4) Associé avec des formes végétatives de *Iodamoeba butschlii*, d'*Entamoeba hartmanni*, des formes végétatives de *Giardia intestinalis* et des kystes d'*Entamoeba histolytica*.

La taille d'*E. histolytica*, ainsi que celle de son noyau varient considérablement selon le stade de division et sa mobilité (voir p. 39).

ÉTUDE À FRAIS

Abondance : c'est la forme la plus facile à reconnaître et à voir. Dans les selles glairo-sanguinolentes (crachats rectaux) de la dysenterie aiguë il en existe par centaines dans un champ microscopique, dans les glaires non diluées, écrasées simplement entre lame et lamelle, souvent hématophages.

Mais attention, en dehors de ces glaires où les amibes pullulent on peut ne rien trouver dans d'autres parties des glaires ou dans les parties fécales.

Taille : très variable, 12 jusqu'à 30-40 μm . Ce sont souvent les plus grandes en taille qui sont hématophages mais pas toujours.

Forme et mobilité : les amibes hématophages sont souvent très fragiles, et supportent mal la déshydratation. Celles contenues dans les glaires purulentes sont dégénérées et ressemblent aux macrophages, dans un amas de leucocytes en voie de lyse.

Les amibes des glaires transparentes se réchauffent vite à la température du laboratoire. Elles émettent alors un petit pseudopode hyalin, transparent. L'amibe remplit presque aussitôt son pseudopode en y coulant son endoplasme : on ne voit plus de pseudopode à partir de ce moment. L'amibe s'en va alors dans une direction déterminée, en coulant, comme une limace. Elle peut rester ainsi mobile pendant très longtemps (une heure par exemple) si elle est à l'abri de la déshydratation et à une température suffisante.

Cytoplasme

Le cytoplasme est finement granuleux, contenant des vacuoles de petite taille et peu visibles.

On ne voit pas de bactéries ni autres inclusions, sauf chez les amibes plus ou moins dégénérées chez lesquelles les vacuoles sont plus grandes et où l'on peut trouver quelques bactéries ou levures.

Toutes les amibes dans une selle de dysenterie aiguë ne contiennent pas des hématies, à l'inverse dans une selle de diarrhée, les amibes peuvent être hématophages.

Une amibe peut contenir de 1 à 30-40 hématies. Ces hématies ont gardé leur couleur rouge ; elles sont plus ou moins digérées si bien qu'elles sont de toutes les tailles.

Il n'est pas du tout difficile de reconnaître les hématies dans une amibe. Il y en a toujours quelques-unes libres dans le champ microscopique et il suffit de régler l'éclairage du microscope de manière à ce que leur couleur apparaisse le plus nettement et les comparer avec les inclusions présentes à l'intérieur de l'amibe.

E. histolytica peut également phagocyter des levures, *Candida albicans*, leur mobilité est alors réduite (80).

Toutefois, dans le désir d'identifier des amibes hématophages on est parfois tenté de prendre les petites vacuoles claires et vides des amibes pour des hématies surtout si le microscope non doté d'un écran bleu est éclairé à la lumière artificielle jaune.

Noyau

Le noyau n'est pas visible à frais, chez les amibes bien vivantes. On peut le voir chez les amibes en voie de lyse, ayant perdu leur réfringence, ou chez les amibes mortes. En pratique, la présence d'hématies dans une amibe suffit à poser le diagnostic d'*E. histolytica*, puisqu'il existe exceptionnellement des *Entamoeba coli* hématophages et cela même quand il y a en même temps d'autres formes végétatives non hématophages d'*E. histolytica*. L'association *E. histolytica* et *E. dispar* est exceptionnelle. Il faut aussi se méfier des cellules macrophages ayant ingéré des globules rouges dans les dysenteries bacillaires ou les recto-colites-hémorragiques (79).

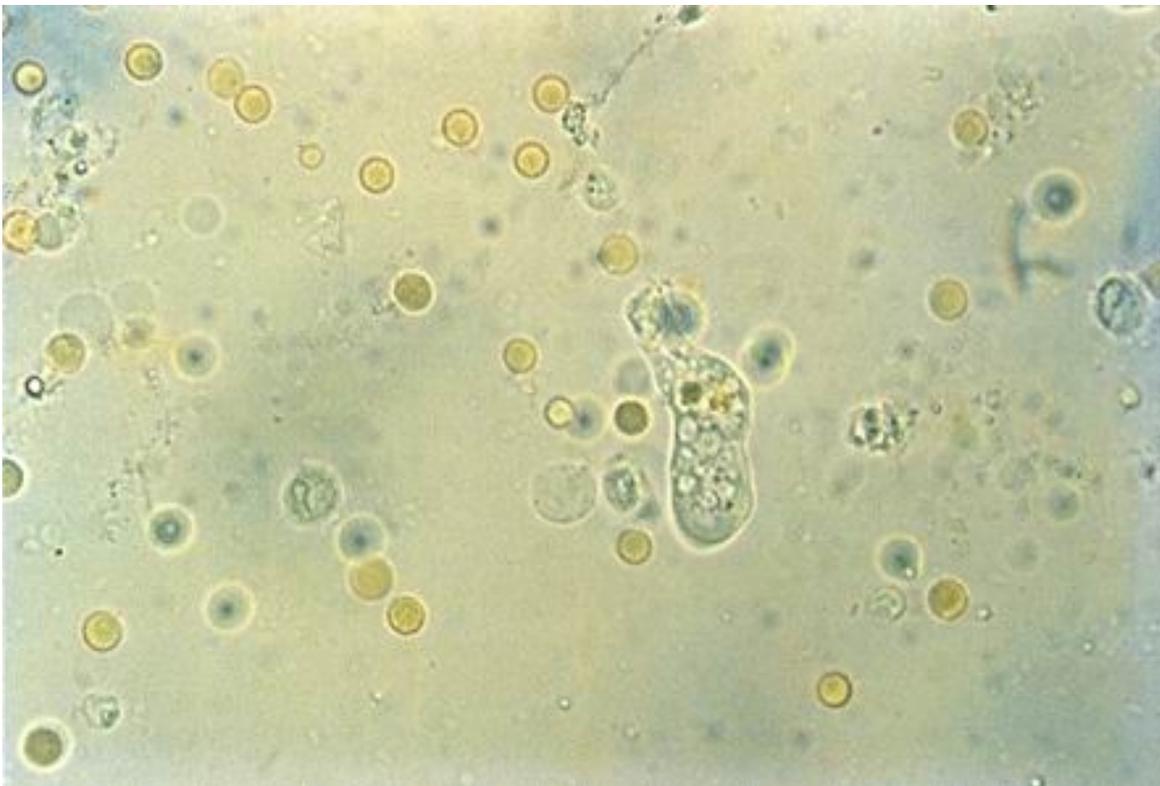


Photo n° 44

Forme végétative d'*Entamoeba histolytica* hématophage dans une selle glairo-sanglante. Examen à frais. Obj. X 40.

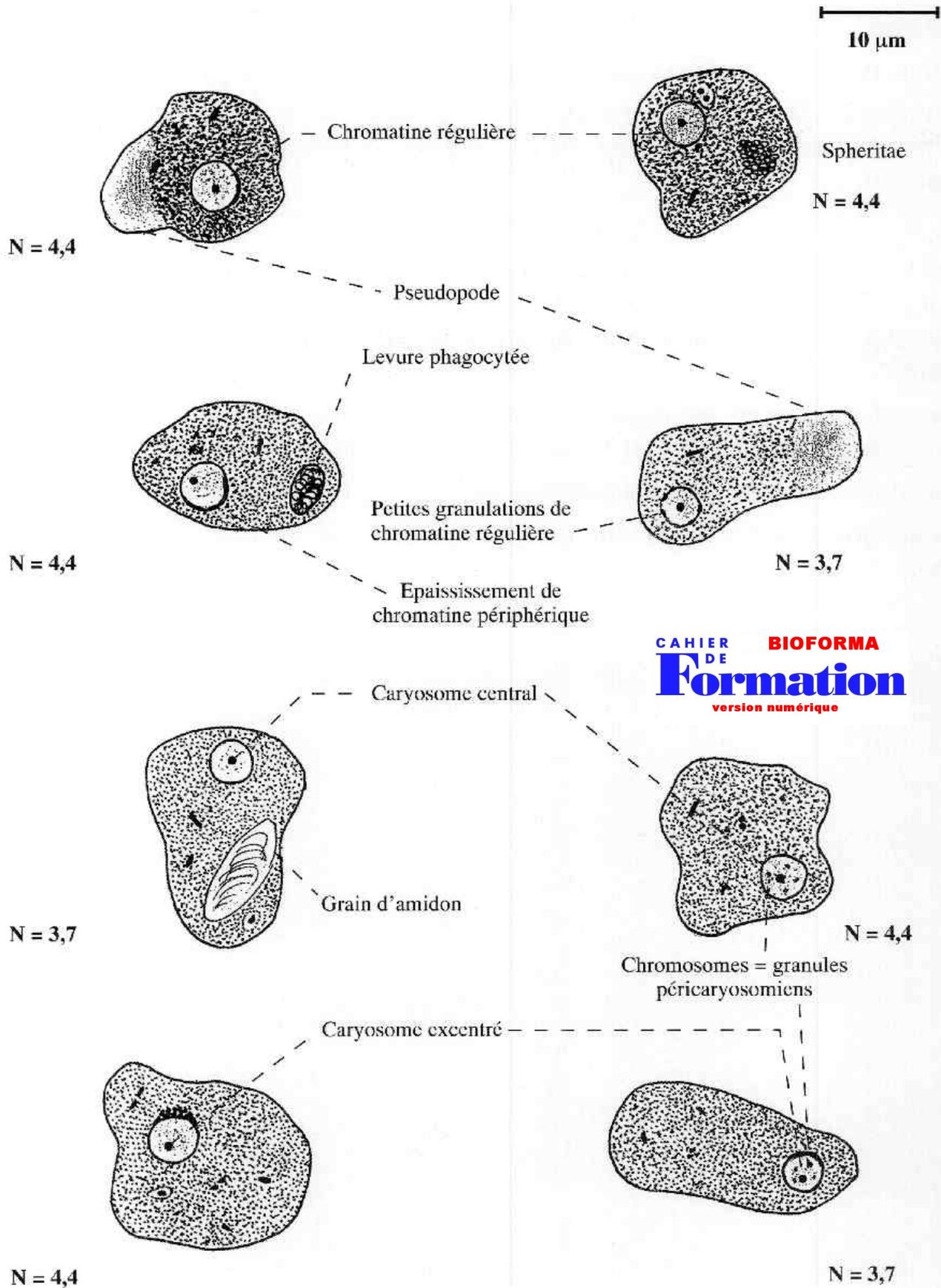


Figure 2 : Formes végétatives d'*Entamoeba histolytica* / *E. dispar*

ÉTUDE DU CYTOPLASME ET NOYAU APRÈS COLORATION AU M.I.F.

Cytoplasme

La fixation au M.I.F. conserve les pseudopodes et la forme allongée en limace.

La coloration au M.I.F. colore les hématies en rouge vif, ce qui les rend très faciles à voir. Il ne faut néanmoins pas prendre les levures qui se colorent aussi en rouge pour des hématies.

Noyau

Taille et aspect : le noyau mesure de 3 à 7-8 μm selon la taille de l'amibe, il est vésiculeux.

Structure : la membrane nucléaire est fine, tapissée d'une couche de chromatine périphérique formée de grains fins et régulièrement disposés.

Le caryosome est central ou subcentral, petit.

Les granulations chromatiques autour du caryosome ne sont pas visibles avec cette coloration.

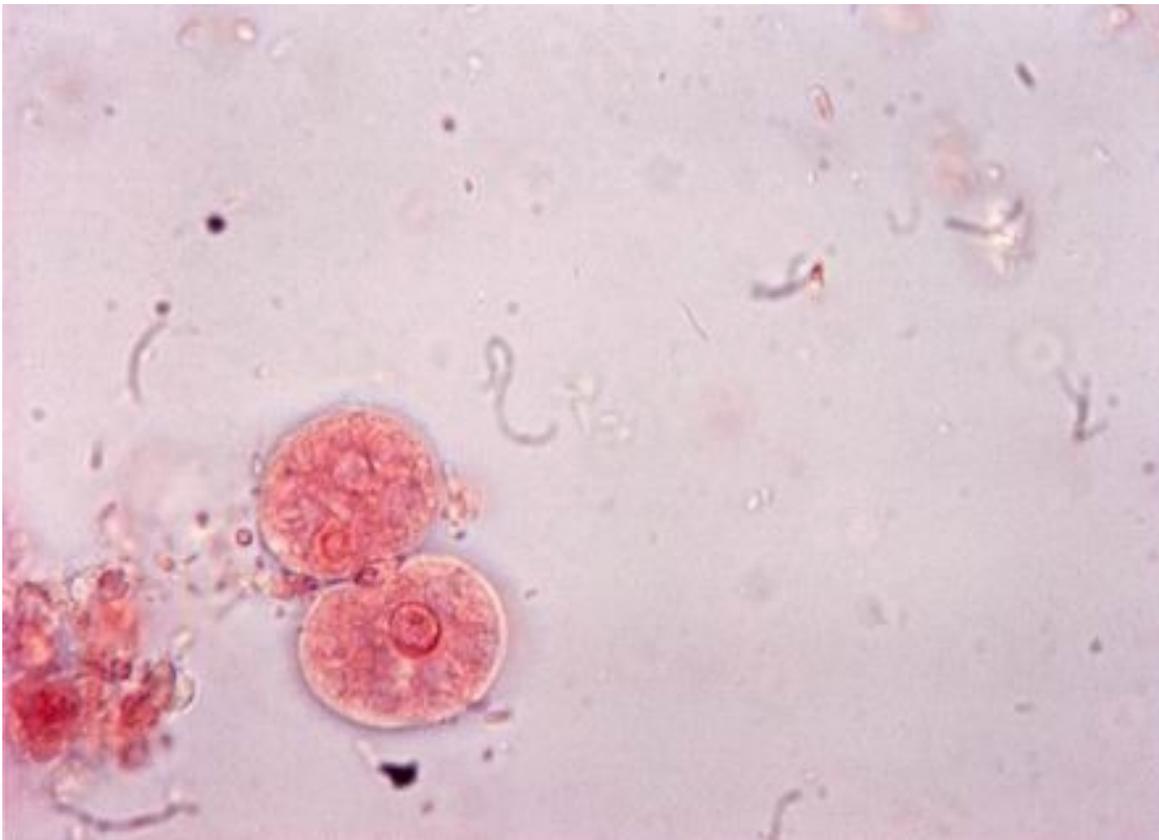


Photo n° 45

Formes végétatives d'*E. histolytica* / *E. dispar*. Coloration M.I.F. Obj. X 100.

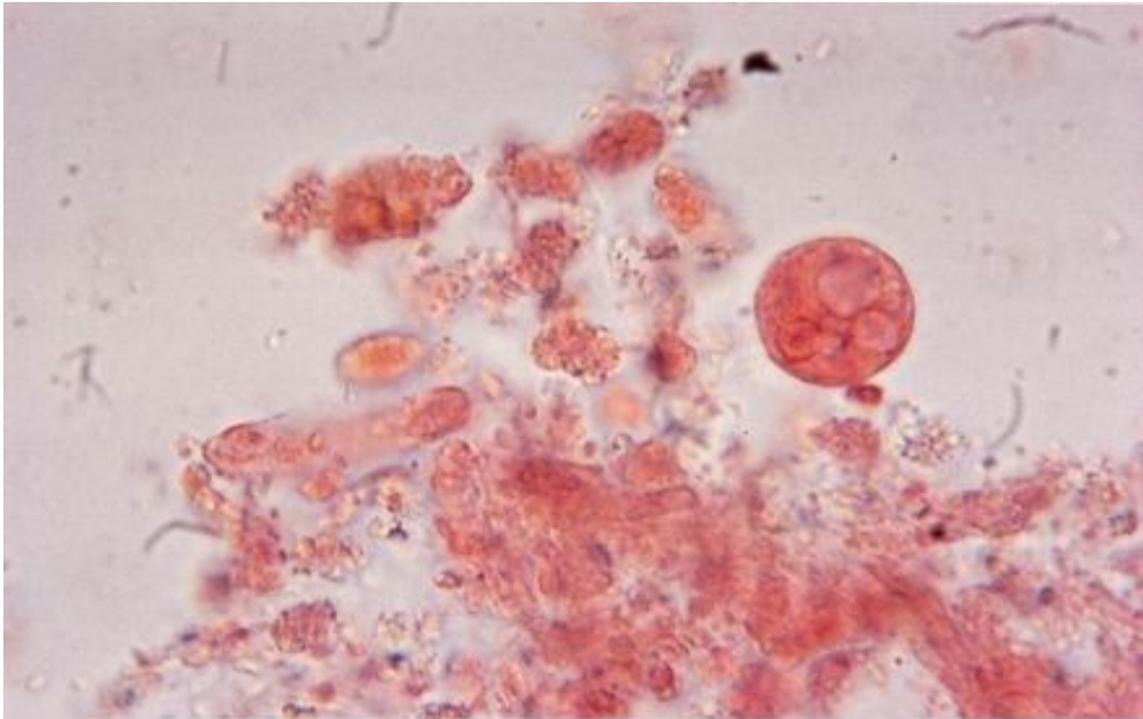


Photo n° 46
Forme végétative d'*E. histolytica* / *E. dispar* vacuolisée. Coloration M.I.F. Obj. X 100.

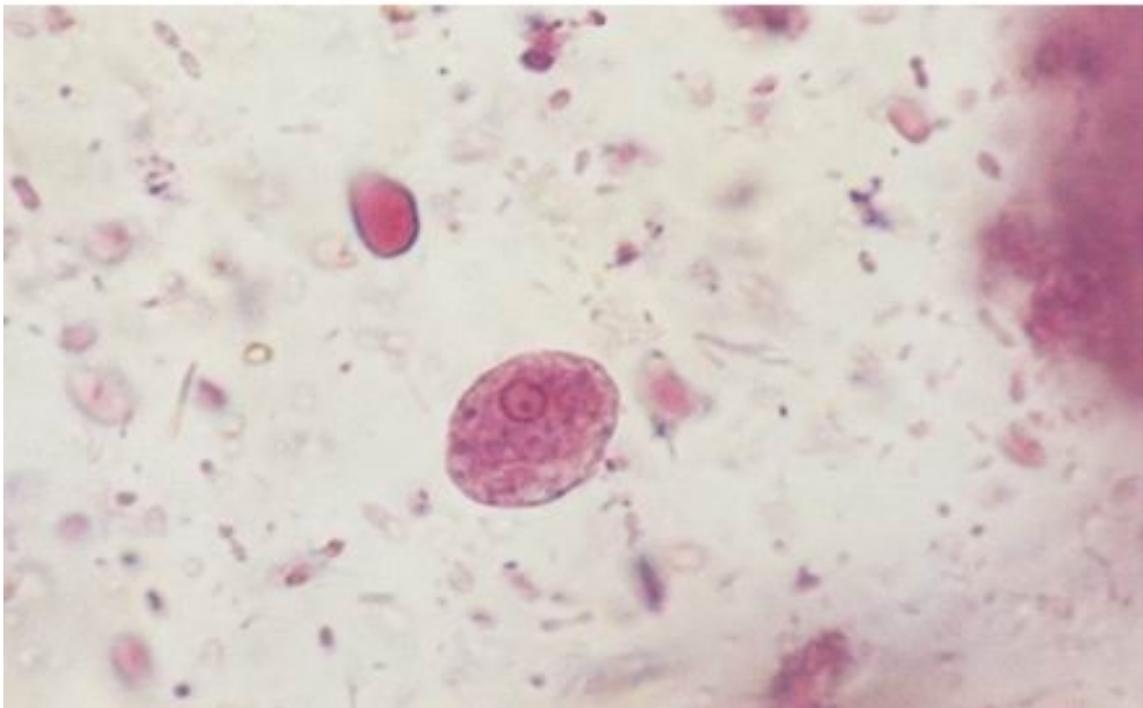


Photo n° 47
Forme végétative d'*E. histolytica* / *E. dispar*. Coloration Bailenger. Obj. X 100.

COLORATION A.P.V. - TRICHROME

Dimensions : diamètre moyen 12 μm , minimum 7,4 μm , maximum 22 μm .

Aspect général : forme arrondie, parfois allongée quand l'amibe est fixée en mouvement. Pseudopode moins coloré que le reste de l'amibe, sans inclusion, bien différencié du corps de la F.V.

Cytoplasme : le cytoplasme est finement granuleux, contenant des vacuoles de petite taille et peu visibles. On y voit peu de bactéries ou autres inclusions, assez souvent des *Sphaeritae*, sauf chez les amibes dégénérées où les vacuoles sont plus grandes et contiennent quelques bactéries ou levures.

Noyau

Taille et aspect : 4 μm en moyenne, varie selon la taille de l'amibe, minimum 3 μm , maximum 5,2 μm selon le stade de division de l'amibe.



Photo n° 48

Entamoeba histolytica forme hématophage. Phagocytose de 2 hématies. Coloration trichrome.
Obj. X 100.

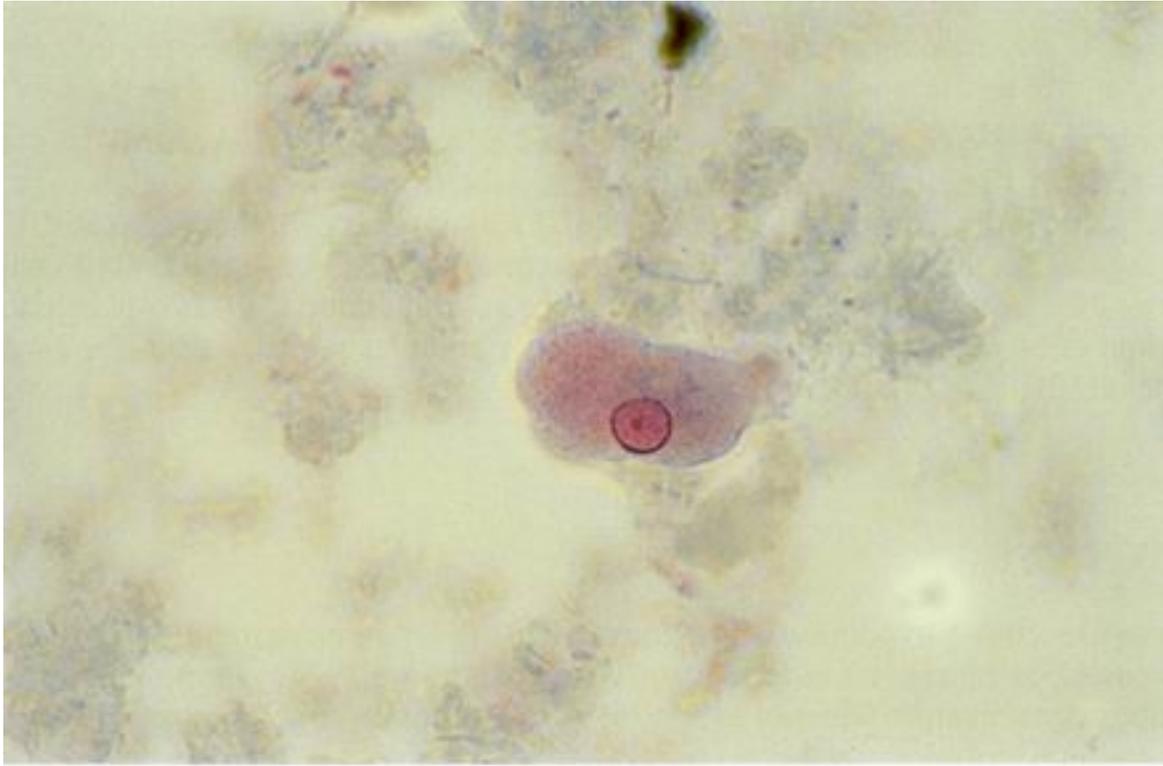


Photo n° 49

Entamoeba histolytica d'assez petite taille provenant d'une division récente, caryosome légèrement excentré, chromatine périphérique fine et régulière. Coloration trichrome. Obj. X 100.

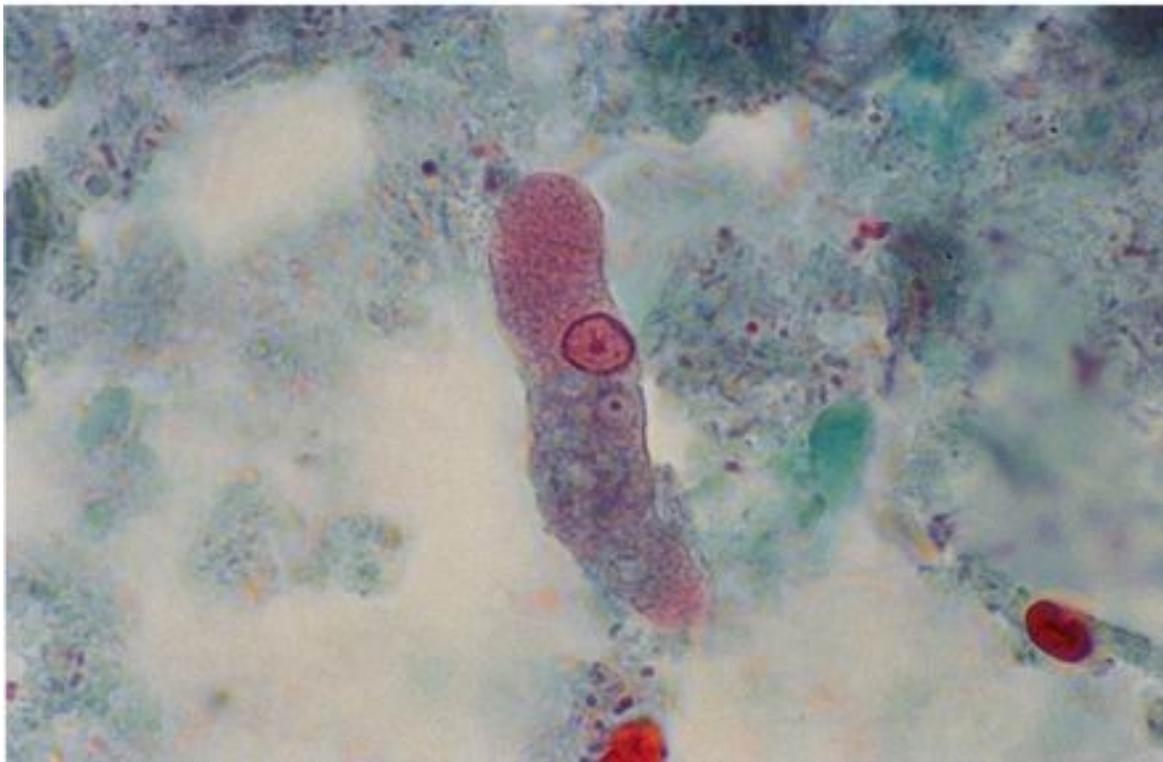


Photo n° 50

Entamoeba histolytica. Forme végétative de très grande taille, avec pseudopode allongé, cytoplasme présentant quelques vacuoles digestives. Noyau avec épaissement chromatinién périphérique (= nucléoles). Coloration trichrome. Obj. X 100.

Structure : la membrane nucléaire est mince, délimitée intérieurement par une couche de fins granules de chromatine, disposés régulièrement au contact l'un de l'autre (13).

Le caryosome est central dans 58 % des noyaux et subcentral ou excentré dans 42 % des cas (78). A l'objectif X 40 il peut paraître punctiforme. A l'immersion c'est une tache de petite taille, comparativement à celui d'*Entamoeba coli*. Il est constitué d'une fine masse de chromatine de 0,5 à 1 µm de diamètre, parfois 3 ou 4 grains sont visibles. La chromatine est entourée par une aréole claire achromatique (13). L'espace entre le caryosome et la membrane peut contenir de petits granules péricaryosomiens (= chromosomes) (13).

FORME NAINE

Burrows (6) a émis l'hypothèse d'une forme naine d'*Entamoeba histolytica* différente d'*Entamoeba hartmanni* en se basant sur les mensurations du noyau et du cytoplasme des amibes d'un malade. Gleason et al. (78) après études morphologiques de la souche d'*Entamoeba histolytica* et d'*Entamoeba hartmanni* arrivent à la conclusion « la création d'une nouvelle "race" ou souche basée sur ces critères ténus n'apparaît pas justifiée ».

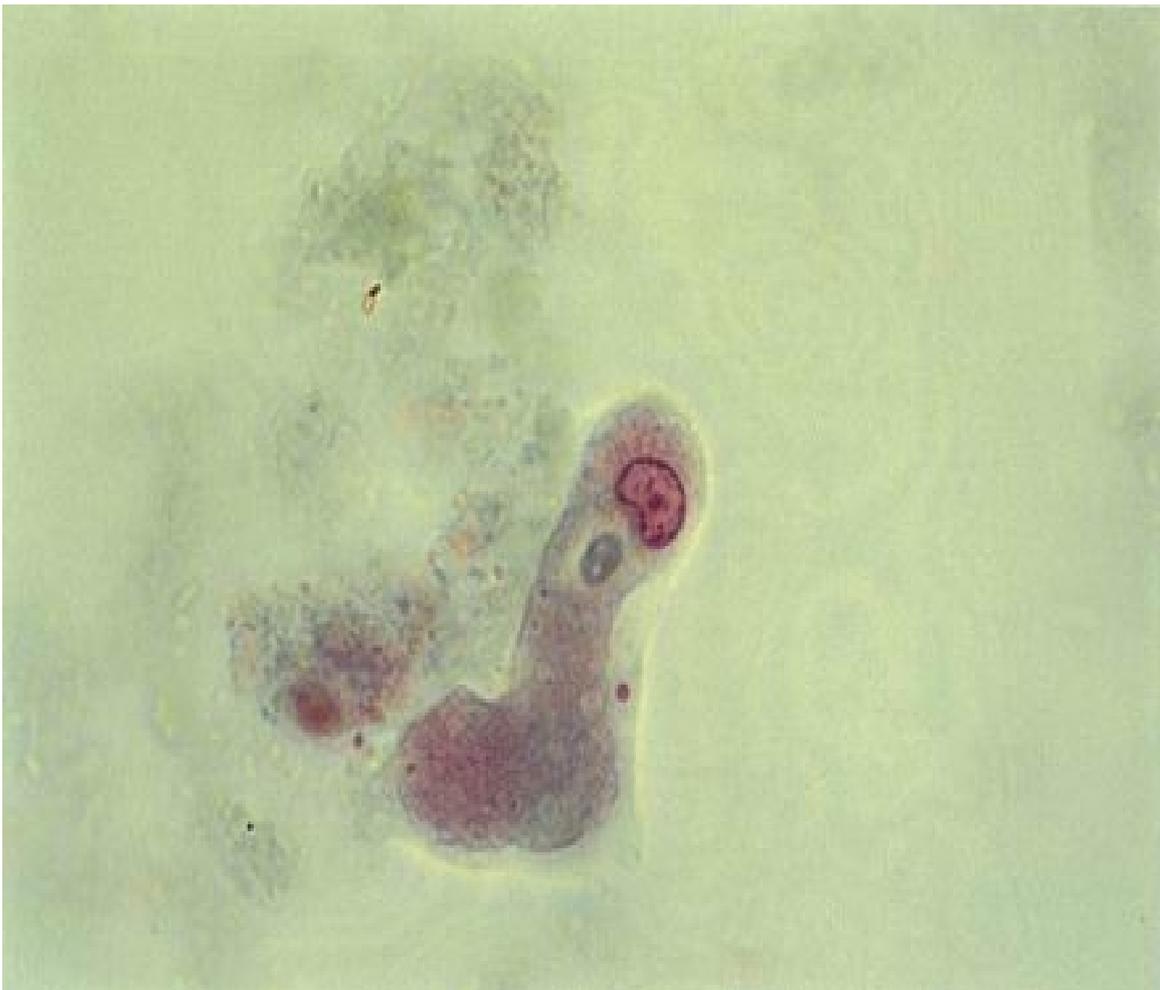


Photo n° 51

E. histolytica de grande taille avec un pseudopode. Noyau en cours de division, ovoïde, déformé. Présence de chromosomes (= granules péricaryosomiens). Coloration trichrome. Obj. X 100.

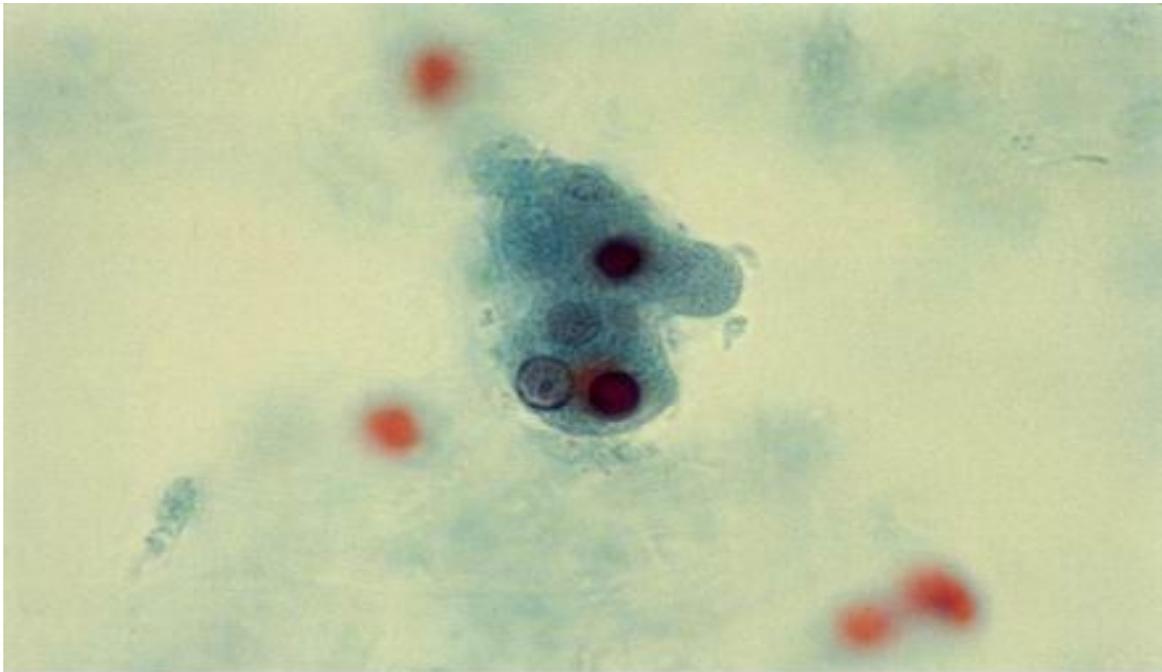


Photo n° 52

E. histolytica hématophage de grande taille, émettant deux pseudopodes. Caryosome nucléaire légèrement excentré. Coloration trichrome. Obj. X 100.

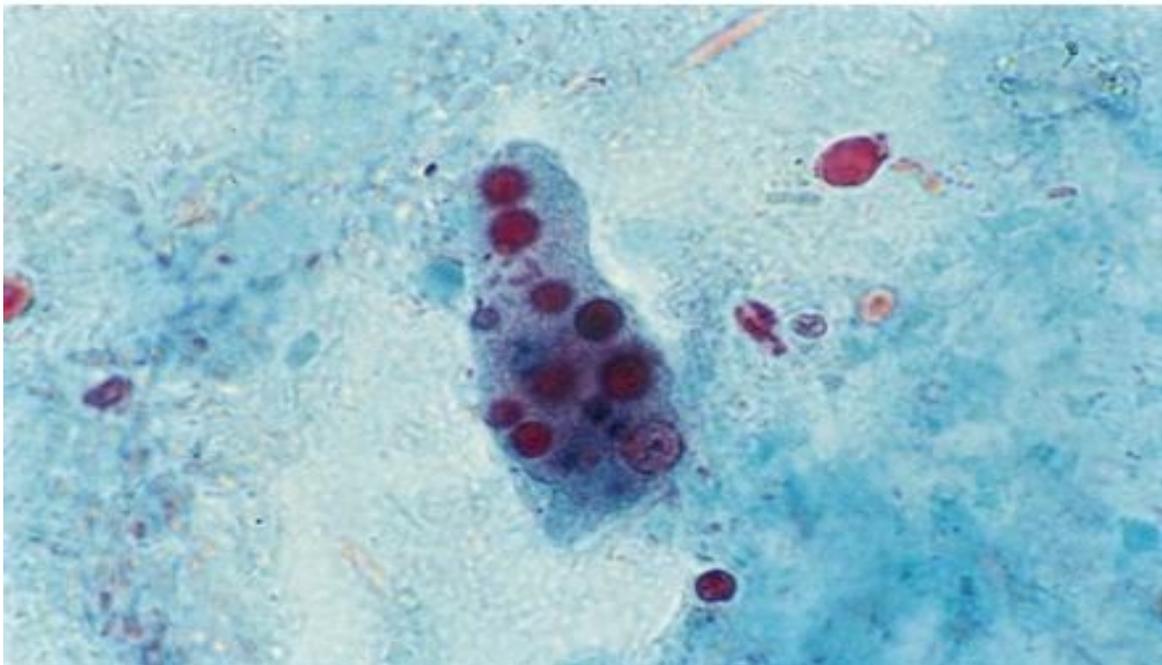


Photo n° 53

Entamoeba histolytica forme hématophage. Forme végétative de grande taille ayant phagocyté une dizaine d'hématies. Coloration trichrome. Obj. X 100.



Photo n° 54

Entamoeba histolytica. Une amibe hématophage, avec un noyau à chromatine périphérique fine et présence de granules péricaryosomiens (= chromosomes). La deuxième non hématophage avec 3 amas de chromatine périphérique (= nucléoles) nets. Coloration trichrome. Obj. X 100.

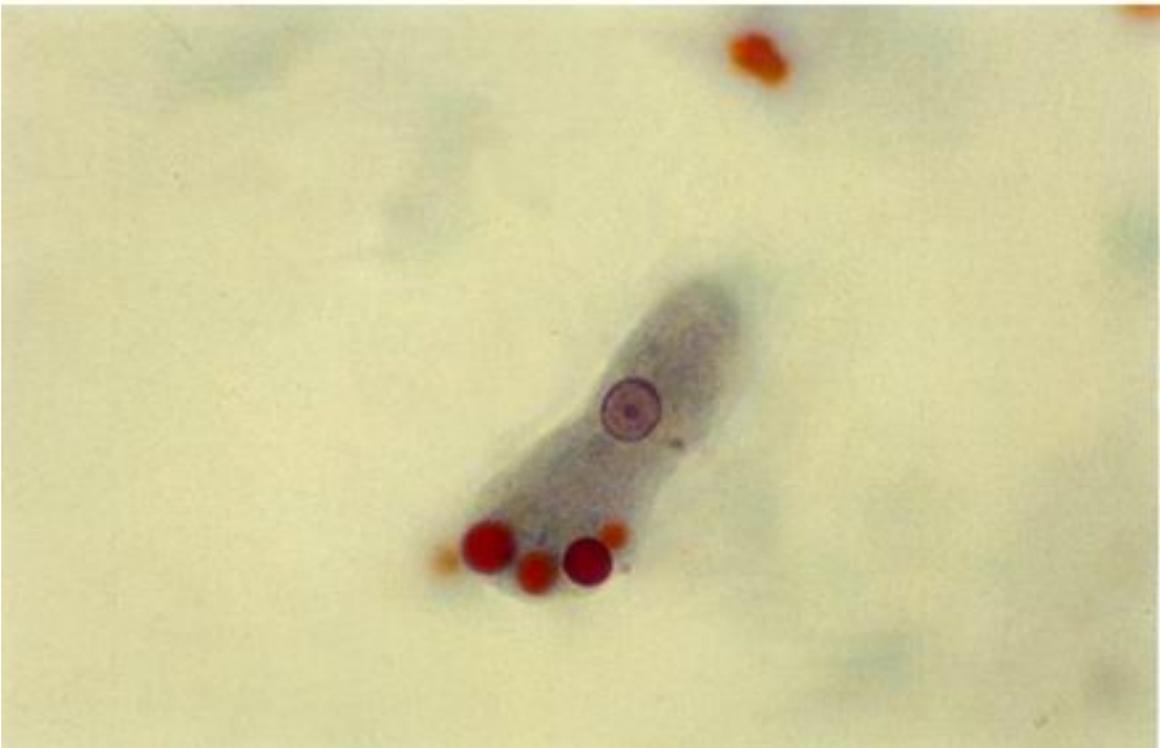


Photo n° 55

Entamoeba histolytica forme hématophage. Amibe ayant ingéré des hématies se trouvant à différents stades de digestion. Caryosome en tache. Coloration trichrome. Obj. X 100.

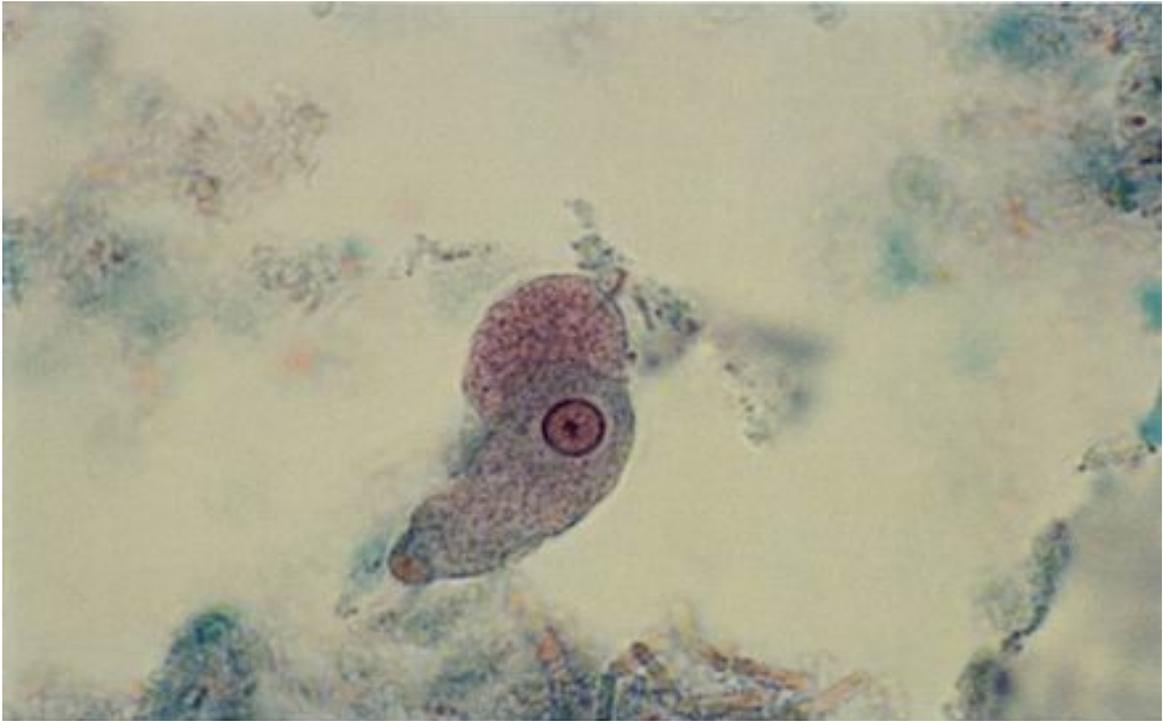


Photo n° 56

Entamoeba histolytica. Forme végétative de grande taille en mouvement, avec un pseudopode, noyau présentant un caryosome de grande taille. Coloration trichome. Obj. X 100

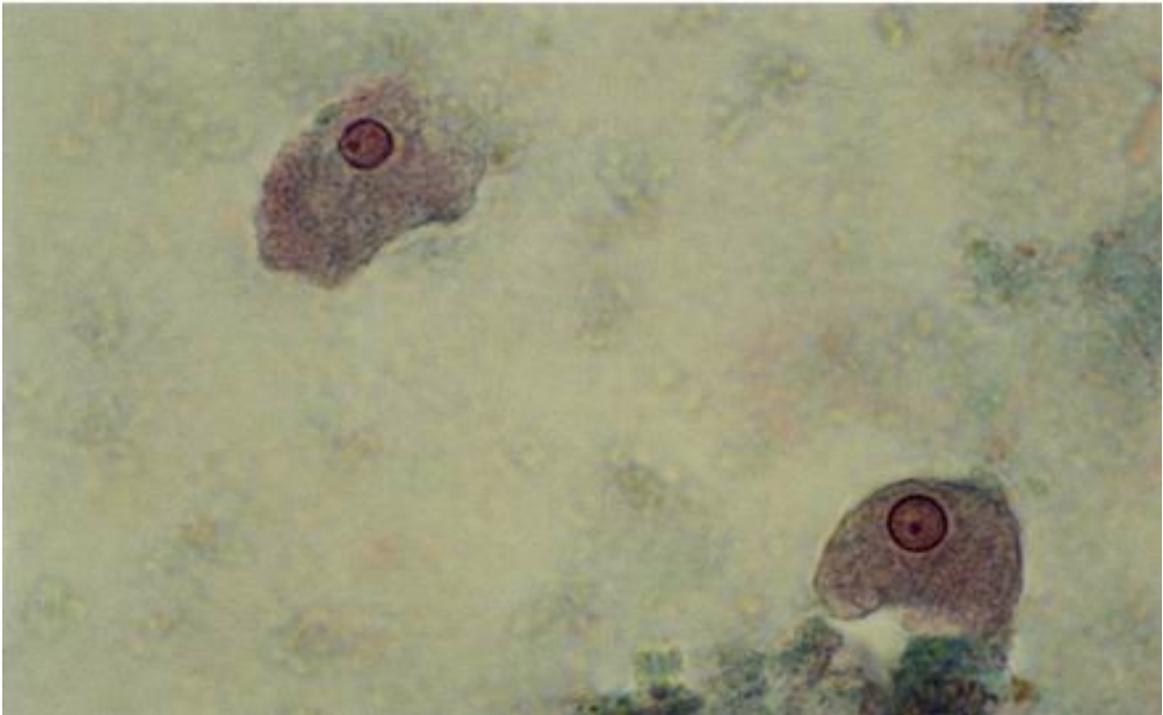


Photo n° 57

Entamoeba histolytica. Deux formes végétatives, noyau avec caryosome excentré. Coloration trichrome. Obj. X 100.

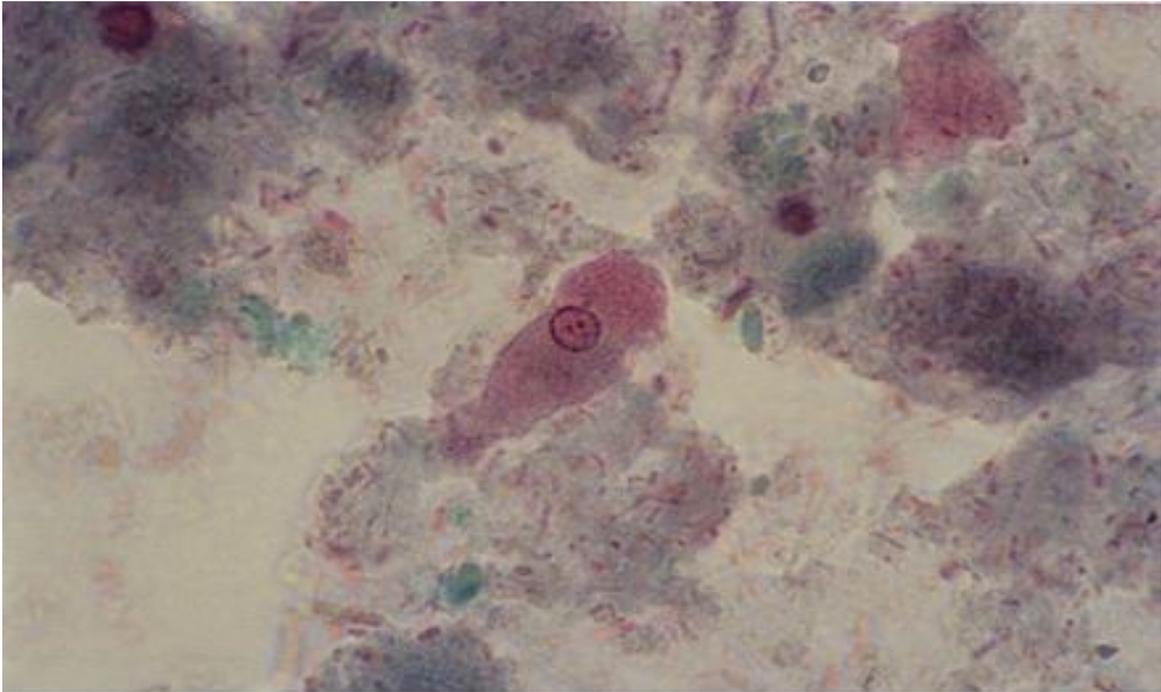


Photo n° 58

Entamoeba histolytica. Forme végétative émettant un pseudopode, noyau avec caryosome excentré. Coloration trichrome. Obj. X 100.

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

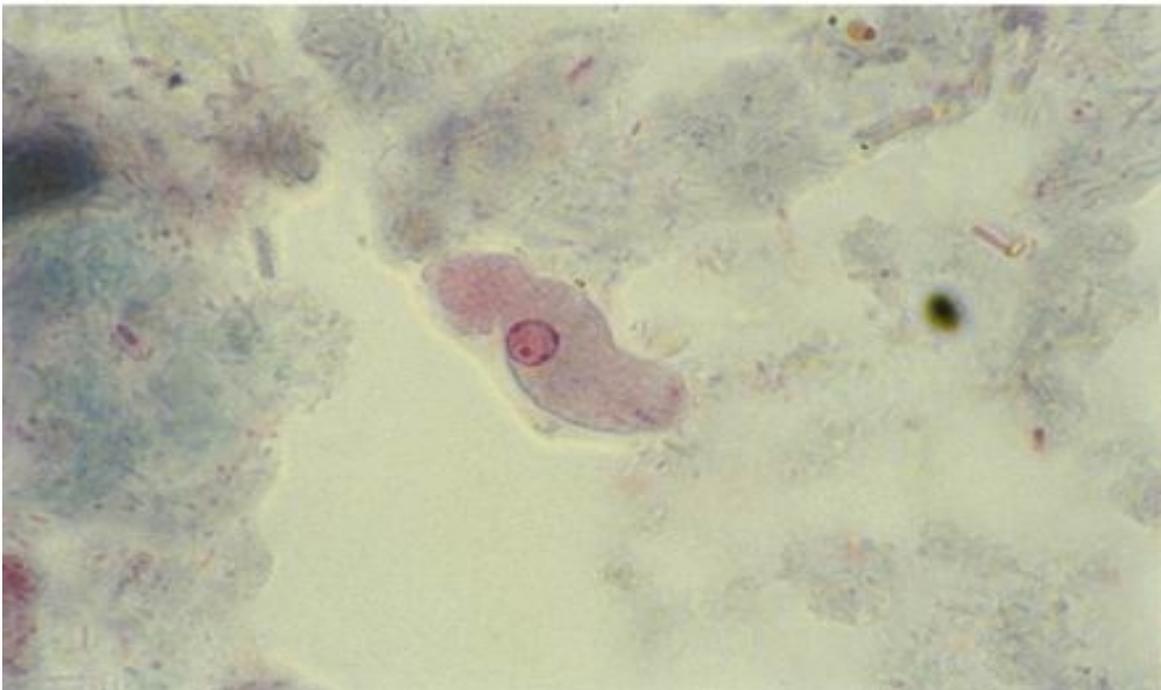


Photo n° 59

Entamoeba histolytica. Forme végétative d'assez petite taille avec le caryosome du noyau également petit, 3 masses chromatiniennes (= nucléoles), à la périphérie. Coloration trichrome. Obj. X 100.



Photo n° 60

Entamoeba histolytica forme hématophage. Amibe de grande taille, saisie par la fixation alors qu'elle émet un pseudopode, ayant ingéré une hématie. Chromatine périphérique du noyau présentant de nombreux épaissements (= nucléoles). Coloration trichrome. Obj. X 100.

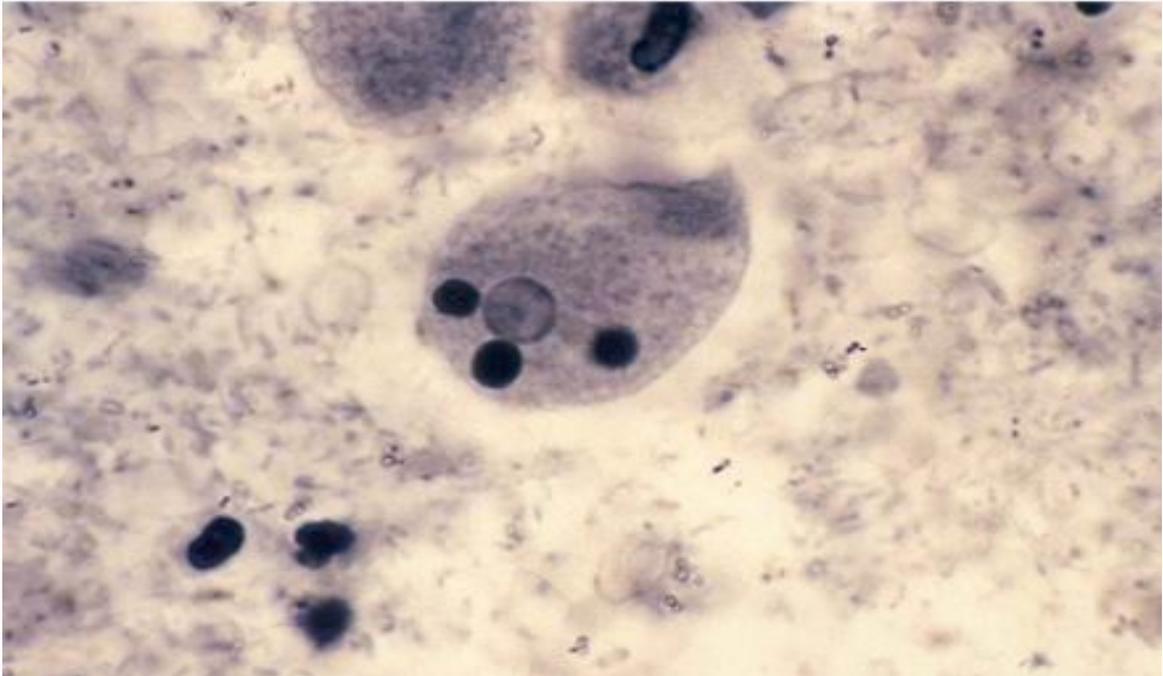


Photo n° 61

Entamoeba histolytica forme hématophage, ayant ingéré 3 hématies. Coloration hématoxyline ferrique. Obj. X 100. Préparation E. Brumpt.

ENTAMOEBA DISPAR **FORME VÉGÉTATIVE ET KYSTE**

Il s'agit d'un important problème de coprologie parasitaire : l'espèce *Entamoeba dispar* n'est pas pathogène, mais ses caractères morphologiques sont pratiquement identiques à ceux d'*Entamoeba histolytica*, qui est très pathogène.

Entamoeba dispar fut découvert, et ainsi nommée par Émile Brumpt en 1925. Dans les années 1980 différents travaux, en particulier ceux de Sargeant sur les isoenzymes vinrent étayer l'existence de ces deux espèces différentes. Il fallut attendre 1993, c'est à dire 68 ans, pour que deux auteurs Américains, spécialistes de l'amibiase confirment cette découverte.

En France, en 1994, la confirmation qu'il s'agissait de deux espèces différentes « suscita encore une polémique » (94). Nous présentons ici d'abord, d'importants extraits de la communication princeps d'Emile Brumpt en 1925 à l'Académie Nationale de Médecine.

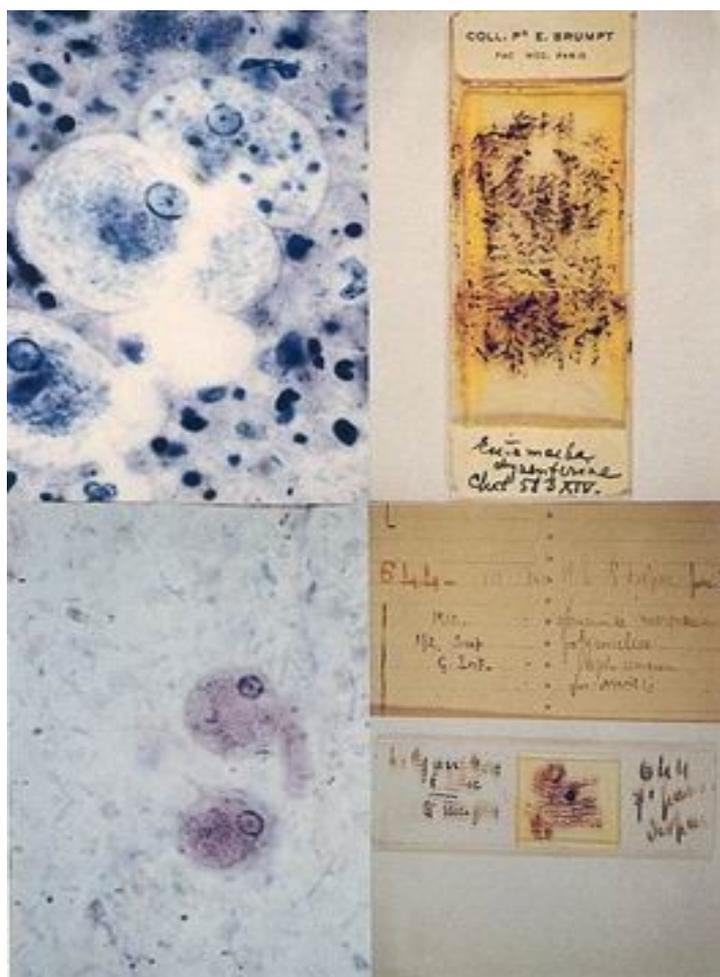


Photo n° 62

Deux préparations d'E.Brumpt d'*Entamoeba dysenteriae* (= *E. histolytica*) et d'*E. dispar*, datant des années précédentes à 1925 avec des photos d'amibes correspondantes faites en 1993 à partir ces lames.

e ⊕

*Étude sommaire de l' « Entamoeba dispar » n. sp.
Amibe à kystes quadri nucléés, parasite de l'homme,*

par M. E. BRUMPT.

Cette note préliminaire a simplement pour but d'attirer l'attention des médecins sur l'existence d'une amibe, confondue généralement jusqu'à ce jour avec l'amibe dysentérique. Il est certain que c'est cette amibe, et non pas *l'Entamoeba dysenteriae*, qui se rencontre si fréquemment dans les selles des sujets sans passé dysentérique, dans la plupart des pays du globe.

Depuis la découverte des kystes à quatre noyaux de l'amibe dysentérique vraie, par Quincke et Roos en 1893, puis par Huber en 1903, tous les auteurs ayant publié des statistiques coprologiques dans les divers pays du monde ont établi leur pourcentage, parfois très élevé, d'amibes dysentériques, d'après la constatation de kystes quadri nucléés dans les selles des individus, bien portants ou non, qu'ils examinaient. Il a été ainsi établi qu'en Angleterre environ 5 p. 100 de la population totale héberge des kystes de l'amibe dysentérique, en France plus de 4 p. 100, en Californie 26,5, en d'autres points des États-Unis de 5 à 10, au Venezuela 30, à Buenos Aires 24,5. L'étude des statistiques montre que les kystes à quatre noyaux sont aussi fréquents dans les selles des gens habitant les régions où la dysenterie amibienne est une rareté que dans celle où cette maladie est très fréquente.

Or, bien que les observations de Martini (1908), de H. Vincent et de Noc (1909) et les expériences de Walker et Sellards (1913) aient démontré l'existence de porteurs d'amibes dysentériques sans symptômes cliniques, il n'en restait pas moins à expliquer pourquoi l'amibe se montrait dysentérogène pour l'homme une fois sur quatre aux Iles Philippines, une fois sur dix ou sur vingt sujets exposés à la contamination, en Macédoine, au Maroc, en divers points du Sénégal, de l'Inde ou de l'Indochine, alors

« En Angleterre, où près de deux millions de semeurs de kystes à quatre noyaux existent, un ou deux cas autochtones seulement s'observent chaque année.

Ces faits épidémiologiques, si surprenants et si insolites, deviennent beaucoup plus faciles à comprendre si l'on veut bien admettre, ainsi qu'il résulte de quelques expériences faites par Sophei Shimura en 1918 et par moi cette année, que l'amibe, si répandue partout, est non dysentérique, peut-être même non pathogène pour l'homme, et qu'elle doit être considérée comme une espèce différente de l'amibe dysentérique, la fréquence de cette dernière n'étant nullement fonction de celle des kystes à quatre noyaux...

Entamoeba dispar n. sp. - À l'état frais entre lame et lamelle, à une température de 15 à 20°, l'amibe est arrondie, sans ectoplasme net, vacuolaire et sans noyau visible ; elle est beaucoup moins réfringente que ses kystes, prenant naissance un peu moins brusquement que chez *E. dysenteriae*, et se déplace assez rapidement...

On ne rencontre jamais de globules rouges dans les vacuoles alimentaires et les formes des cultures refusent de les phagocyter...

À l'état de repos, sous sa forme arrondie, cette amibe mesure dans les selles humaines de 10 à 20 µm ; elle peut atteindre une longueur de 25 µm et une largeur de 5 à 6 µm pendant la locomotion...

Leurs dimensions varient, après coloration, de 7 à 15 µm pour les formes végétatives... Le protoplasme montre de grandes vacuoles renfermant des microbes et des levures, mais jamais d'hématies...

Les kystes à quatre noyaux sont tout à fait comparables à ceux de *Entamoeba dysenteria*. Ils mesurent, à l'état frais, de 10 à 14 µm...

Chez le chat les amibes pullulent à la surface de la muqueuse du gros intestin et parfois dans les derniers centimètres de l'intestin grêle ; elles pénètrent, comme les amibes dysentériques, jusqu'à la *muscularis mucosae* qu'elles ne semblent jamais traverser par un processus nécrotique si habituel dans la dysenterie amibienne...

Le foie des 38 jeunes chats infectés n'a pas montré d'abcès ou de lésions pouvant être rapportés à l'action des amibes...

Rôle pathogène. - Chez le sujet porteur d'*E. dispar* qui a permis de faire les expériences signalées dans ce travail, aucun trouble intestinal n'a été observé et aucune modification physiologique favorable ou défavorable n'a été observée durant les périodes...

Le diagnostic différentiel de l'amibe que nous venons de décrire et d'étudier expérimentalement est très difficile morphologiquement. Au cours de sa vie parasitaire chez l'homme, nous ne pouvons la distinguer de l'amibe dysentérique que par un caractère négatif : l'absence de grandes formes mobiles, hématophages ou non, même après de violentes purgations et une série d'examens microscopiques...

En dehors de l'absence de la grande forme végétative et de la coloration moins facile de l'*E. dispar*, nous sommes obligé d'avouer que la morphologie ne peut, dans l'état actuel de la question, nous donner aucun critère absolu de diagnostic...

Je dirai également que la présence de kystes amibiens à quatre noyaux dans les selles d'individus atteints de troubles intestinaux divers ne justifie pas généralement le pénible traitement antidysentérique à l'émétine ».

FIN DE CITATION

Lors de la séance du 29 juin 1926 de la société de Pathologie Exotique, Émile Brumpt faisait une présentation de pièces sur l'individualité d'*E. dispar* (82).

L'excellente qualité de conservation de ces préparations nous ont permis de réaliser les photos qui suivent et qui montrent la grande valeur de cette présentation de 1926 qui constitue le meilleur enseignement possible d'*E. dispar*. Nous mettons en parallèle les photos du même grossissement et de même nature pour *E. dispar* et *E. histolytica*.

Néanmoins, à l'époque, cette communication fut discutée, en particulier par M. Mesnil (82) :

« Les faits statistiques qu'invoque notre collègue Brumpt à l'appui de sa thèse peuvent, je crois, s'interpréter autrement en faisant intervenir un rôle favorisant de la flore intestinale dans la dysenterie amibienne.

L'amibe, ainsi conservée chez les porteurs sains, n'en est pas moins, de par son origine, une *Ent. dysenteriae*, et elle se comporte pourtant comme une *Ent. dispar*. »

FIN DE CITATION



Photo n° 63

Entamoeba dispar. Chat 643 autopsié quelques heures après sa mort. Coupe d'intestin coloré à l'hématoxyline éosine. Écriture et lame d'Émile Brumpt.

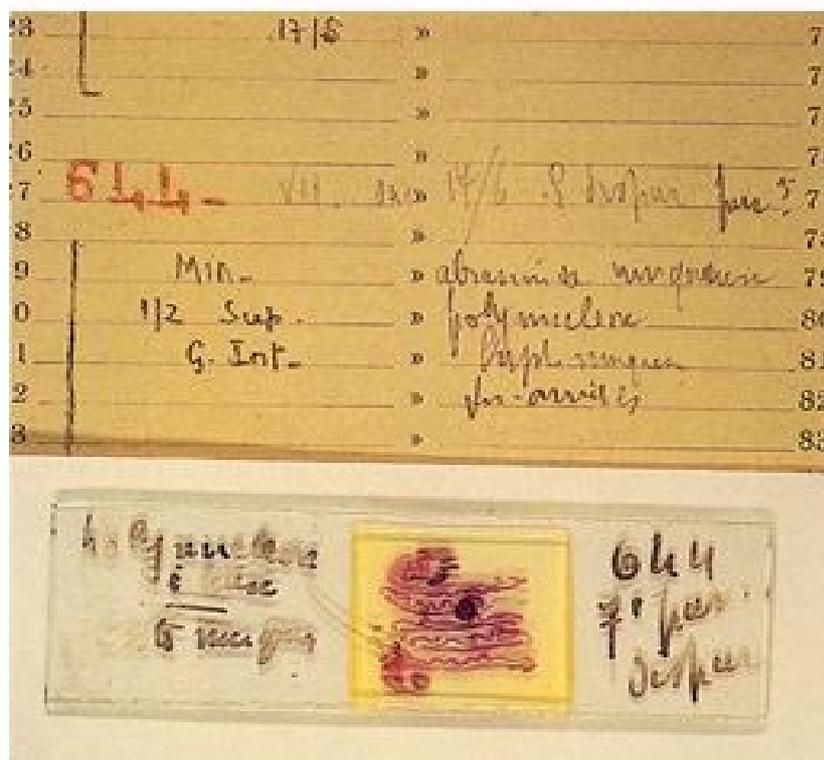


Photo n° 64

Entamoeba dispar. Chat 644 7^{ème} passage sur chat. Coupe de la moitié supérieure du gros intestin coloré à l'hématoxyline éosine. Abrasion de la muqueuse, polynucléose. Écriture et lame d'Émile Brumpt.

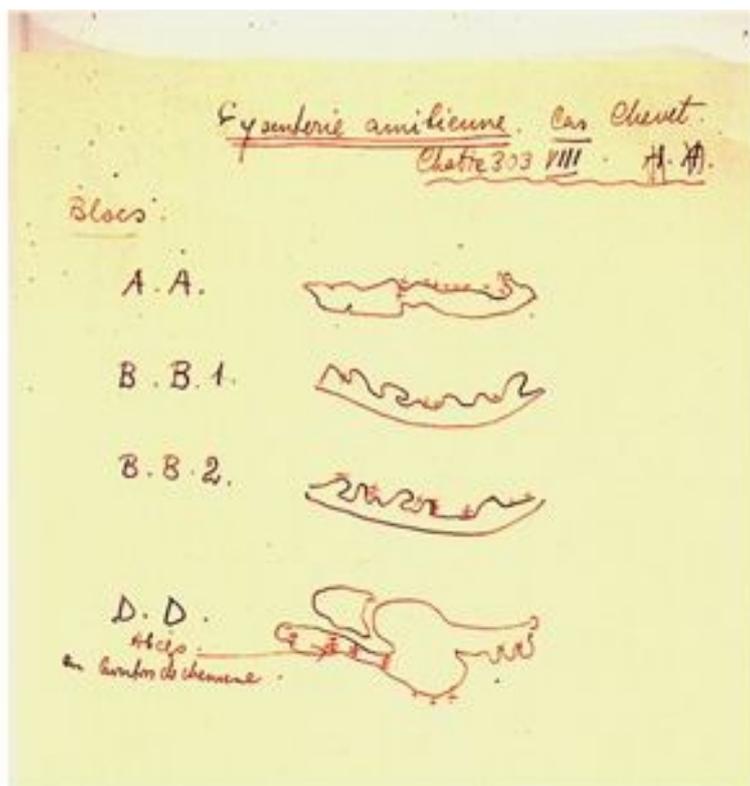


Photo n° 65
 Chatte 303. Coupe d'intestin. Dysenterie amibienne *Entamoeba histolytica*. Schéma d'Émile Brumpt indiquant l'emplacement d'un abcès en bouton de chemise. Cas Chevet.

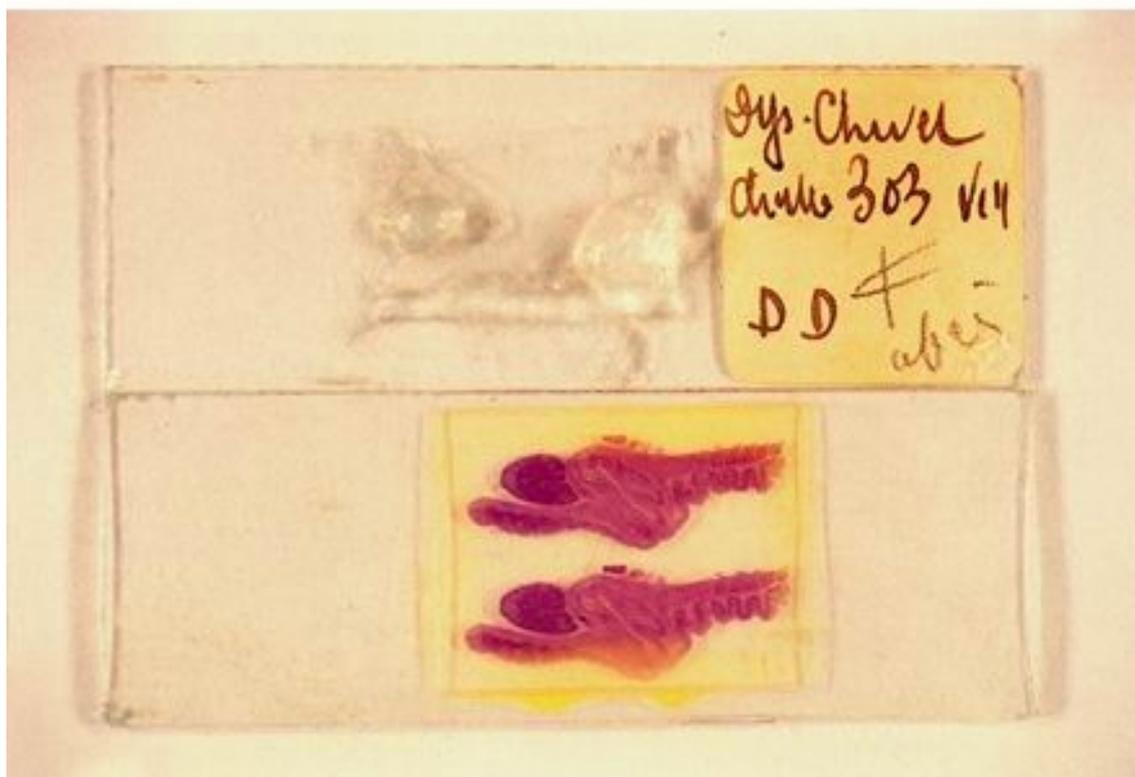


Photo n° 66
 Chatte 303. Dysenterie amibienne coupe d'intestin. Cas Chevet *Entamoeba histolytica*. Coloration hématoxyline éosine. Écriture et lame d'Émile Brumpt.

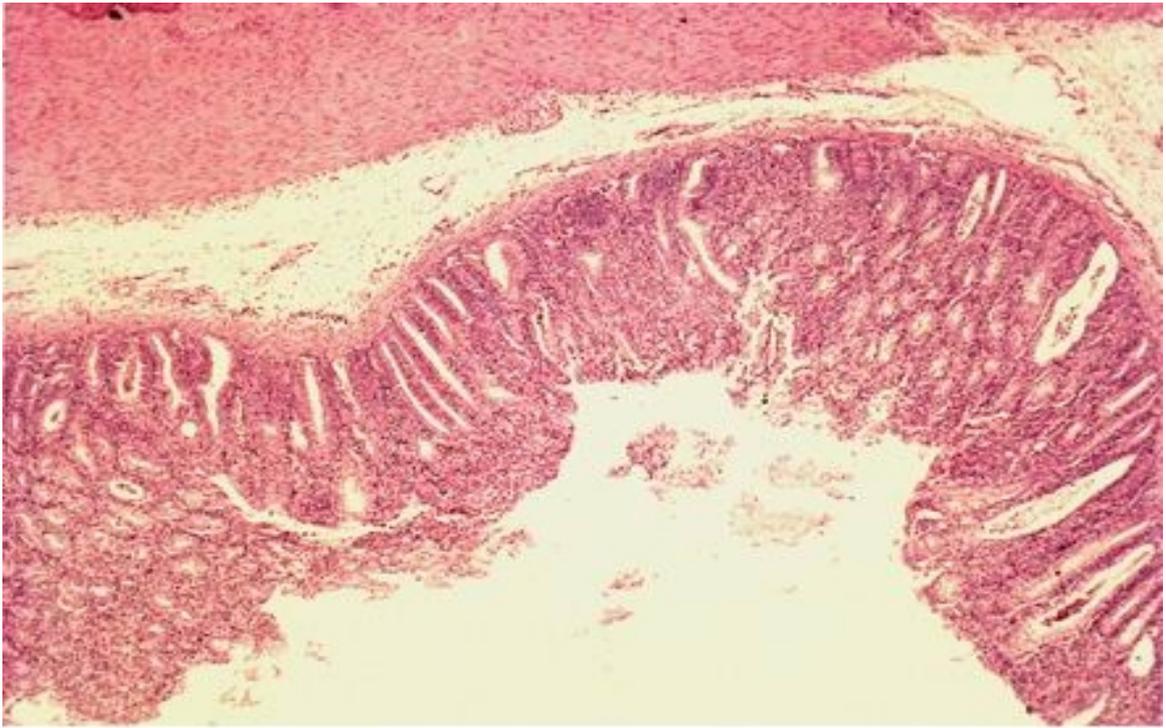


Photo n° 67

Chat 644. *Entamoeba dispar*. Réaction inflammatoire avec légère érosion de la muqueuse. Coloration hématoxyline éosine. Obj. X 4. Préparation Émile Brumpt.

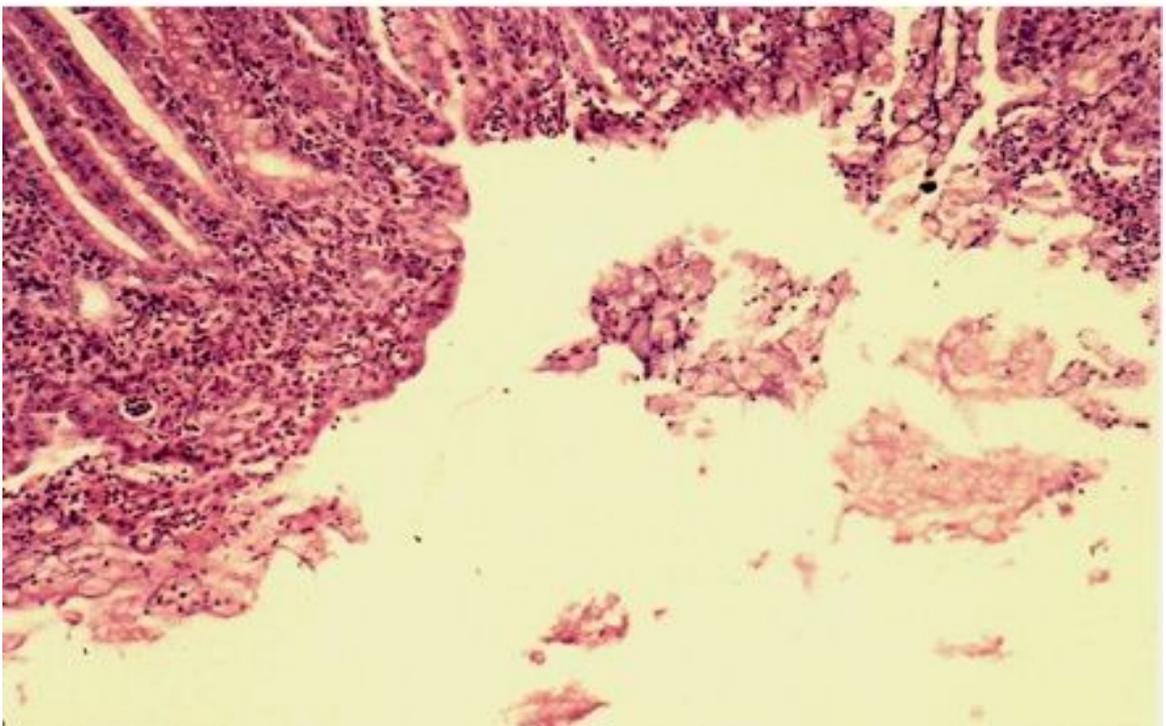


Photo n° 68

Chat 644. *Entamoeba dispar*. Infiltration par des polynucléaires neutrophiles. Présence de formes végétatives d'amibes sur la muqueuse et d'un amas à l'intérieur de l'intestin. Coloration hématoxyline éosine. Obj X 10. Préparation Émile Brumpt.

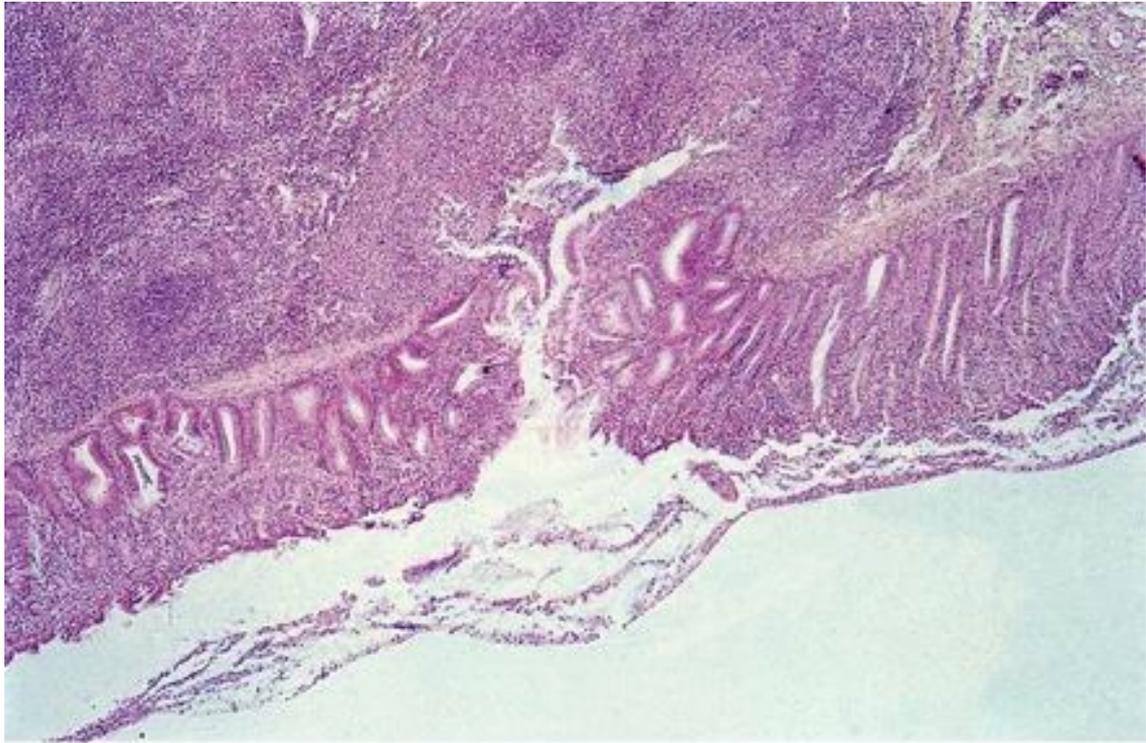


Photo n° 69

Chatte 303 (décédée). *Entamoeba histolytica*. Cas Chevet. Abscès en bouton de chemise. Coloration à l'hématoxyline éosine. Obj. X 4. Préparation Émile Brumpt.

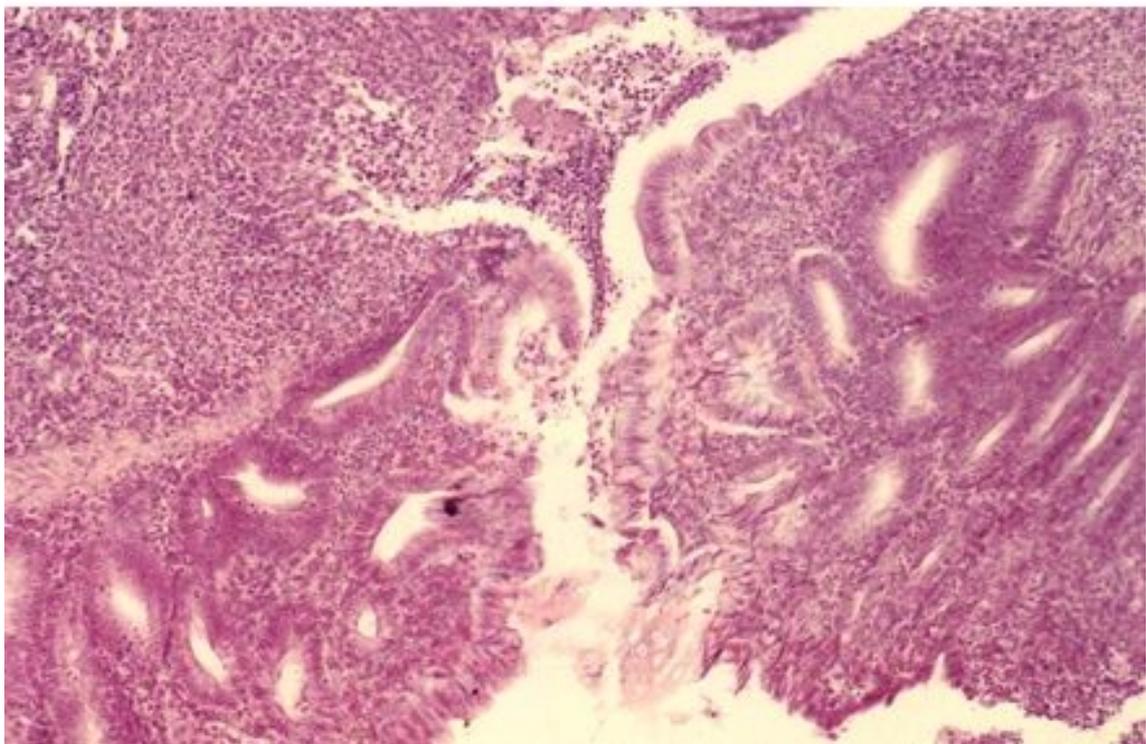


Photo n° 70

Chatte 303 (décédée). *Entamoeba histolytica*. Cas Chevet. Très importante infiltration de polynucléaires neutrophiles. Coloration à l'hématoxyline éosine. Obj. X 10. Préparation Émile Brumpt.

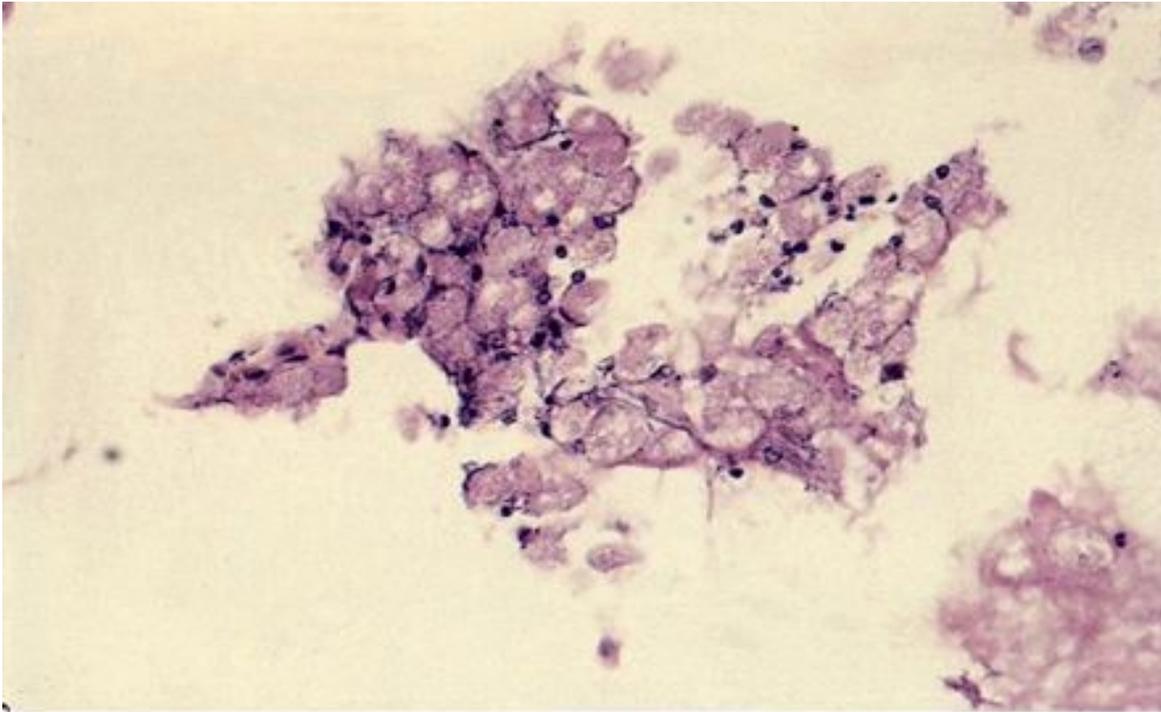


Photo n° 71

Entamoeba dispar. Chat 644. Amas de formes végétatives d'amibes. Obj. X 25. Préparation Émile Brumpt

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

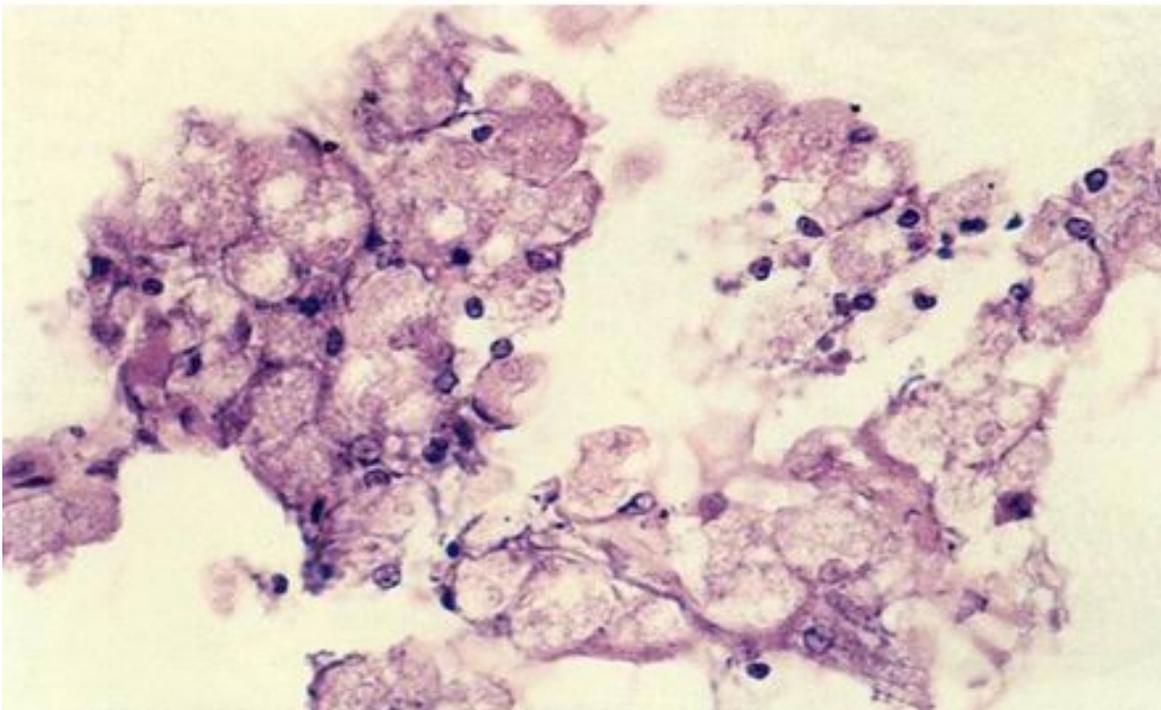


Photo n° 72

Entamoeba dispar. Chat 644. Nombreuses formes végétatives d'amibes. Pour certaines d'entre-elles on voit le noyau et le caryosome central. Aucune n'est hématophage. Obj. X 40. Préparation Émile Brumpt.

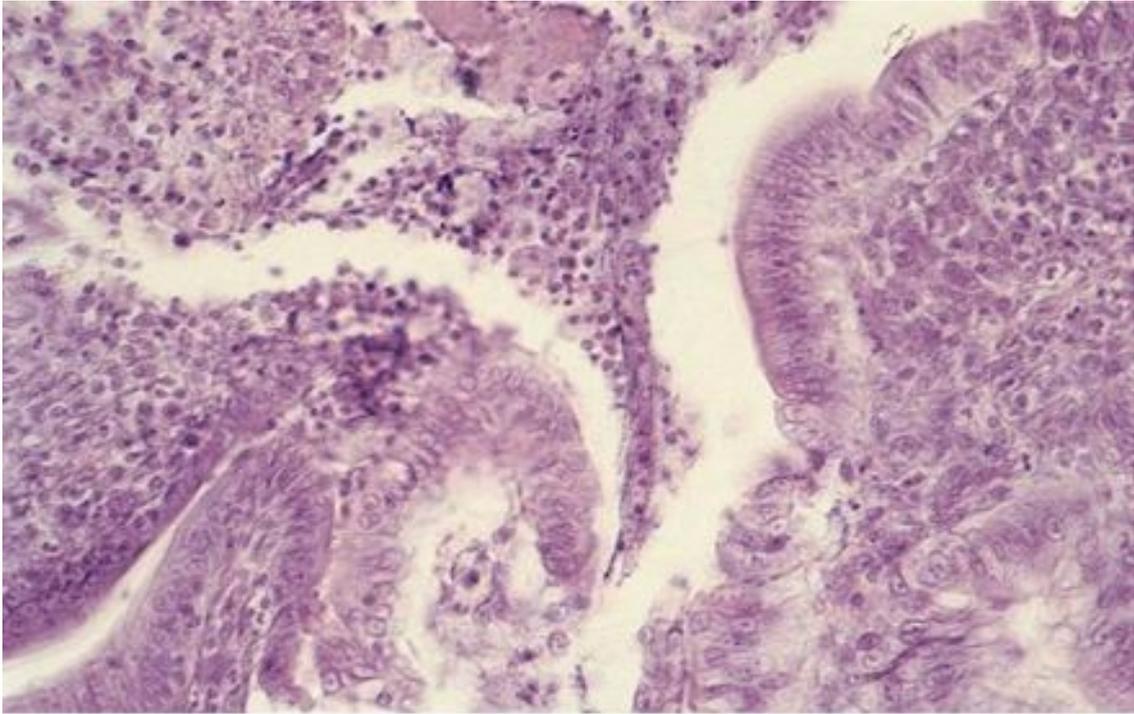


Photo n° 73

Chatte 303. *Entamoeba histolytica*. Cas Chevet. Abscès en bouton de chemise, très importante infiltration de polynucléaires neutrophiles. Nombreuses formes végétatives d'amibes dans la muqueuse dont on aperçoit pour certaines le noyau. Coloration à l'hématoxyline éosine. Obj. X 25. Préparation Émile Brumpt.

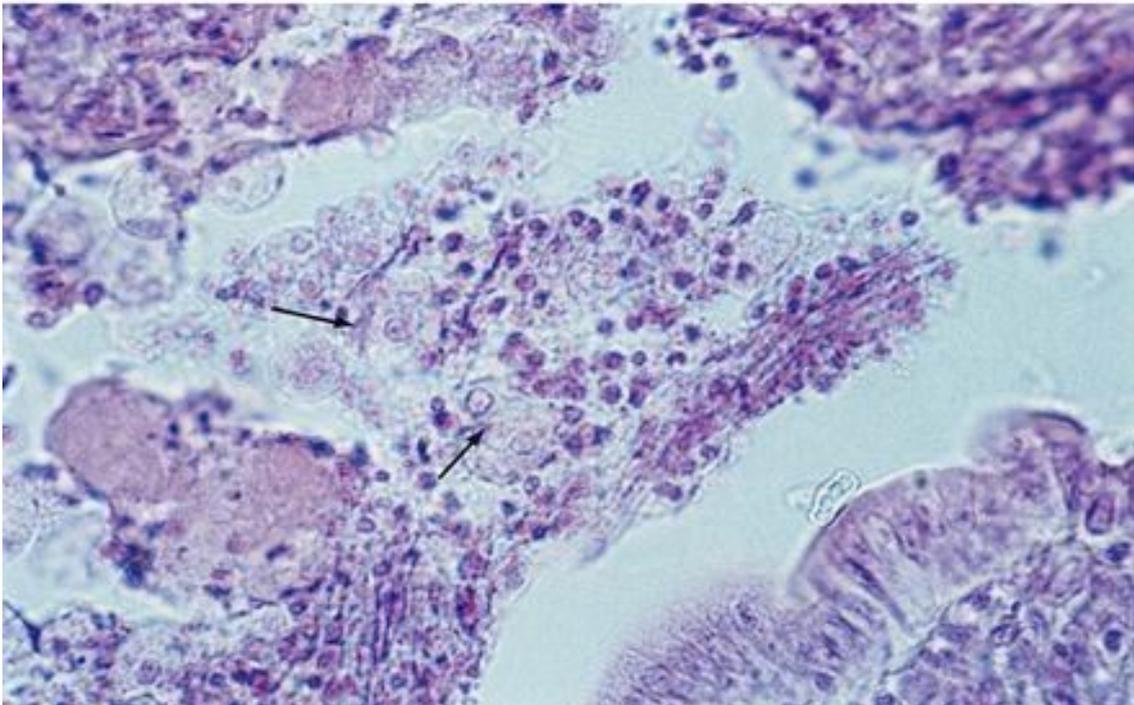


Photo n° 74

Chatte 303. *Entamoeba histolytica*. Cas Chevet. Formes végétatives dont on voit pour certaines le noyau et le caryosome. Plusieurs sont hématophages. Coloration à l'hématoxyline éosine. Obj. X 40. Préparation d'Émile Brumpt.

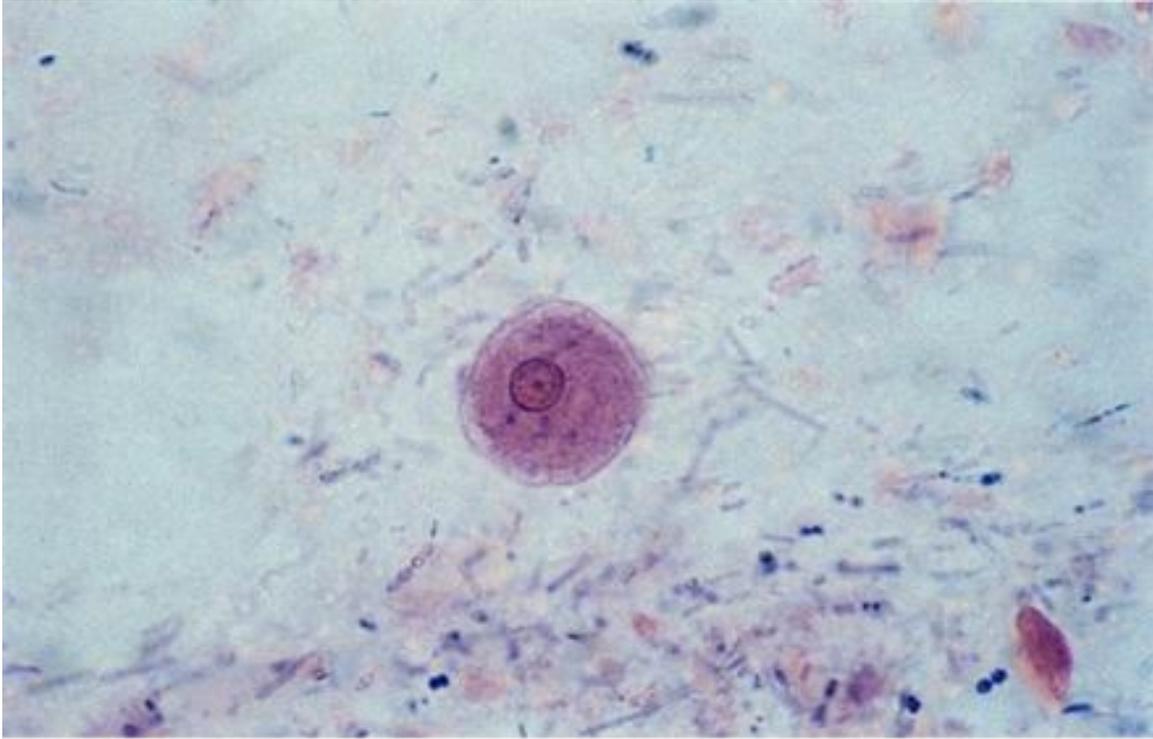


Photo n° 75

Selle Chat 132. *Entamoeba dispar* (Cas Cassagnol). Forme végétative, chromosomes péricaryosomiens visibles. Comparer la taille par rapport à celle d'*Entamoeba histolytica*.. Obj. X 100. Préparation Émile Brumpt.

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
 version numérique

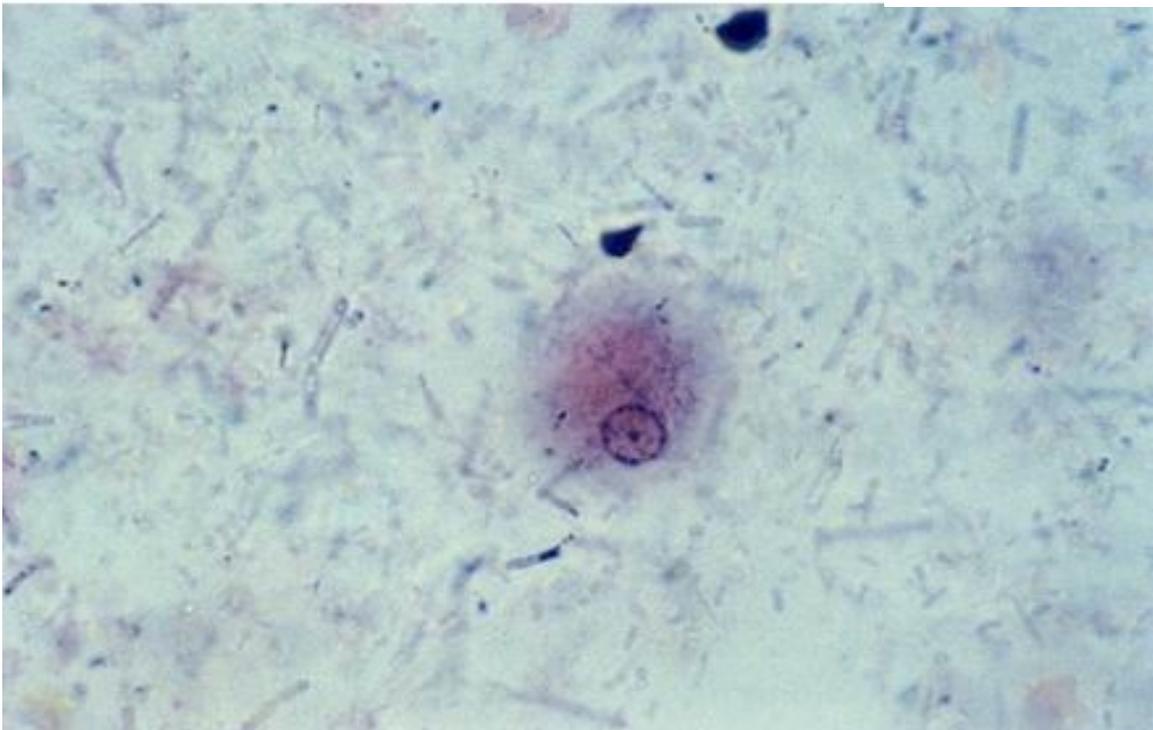


Photo n° 76

Selle Chat 132. *Entamoeba dispar* (Cas Cassagnol). Forme végétative avec épaissements chromatiniens de la membrane périphérique. Obj. X 100. Préparation Émile Brumpt.

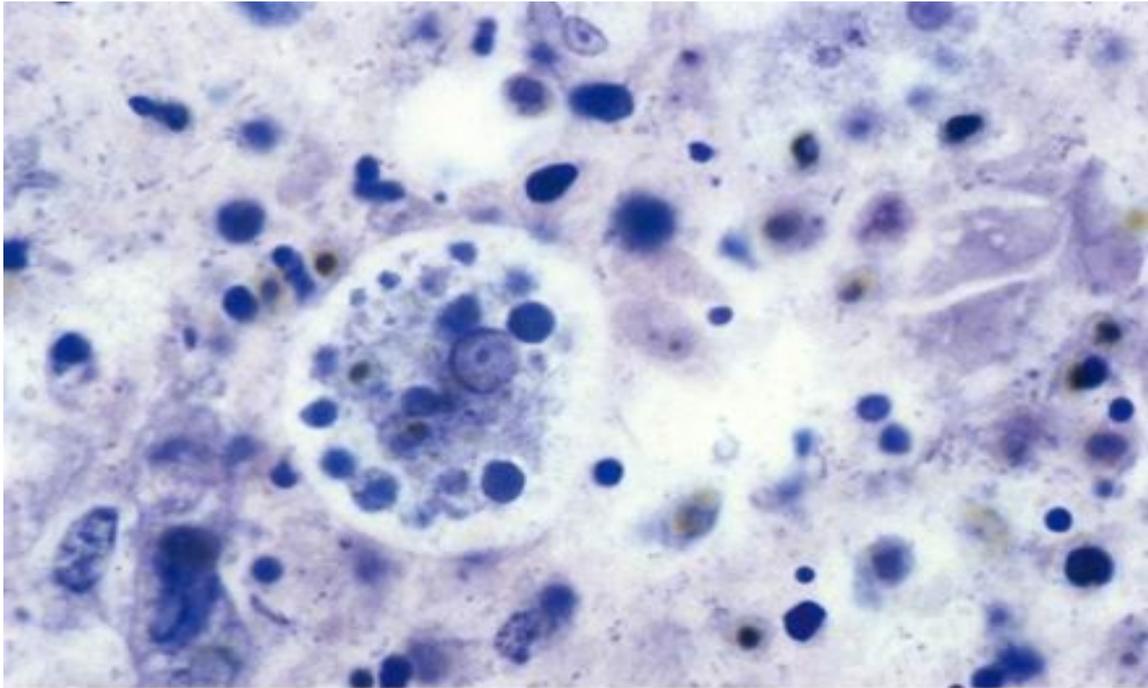


Photo n° 77

Selle Chat 583. *Entamoeba histolytica*. Forme végétative hématophage. Comparer la taille par rapport à celle d'*Entamoeba dispar*. Obj. X 100. Préparation Émile Brumpt.

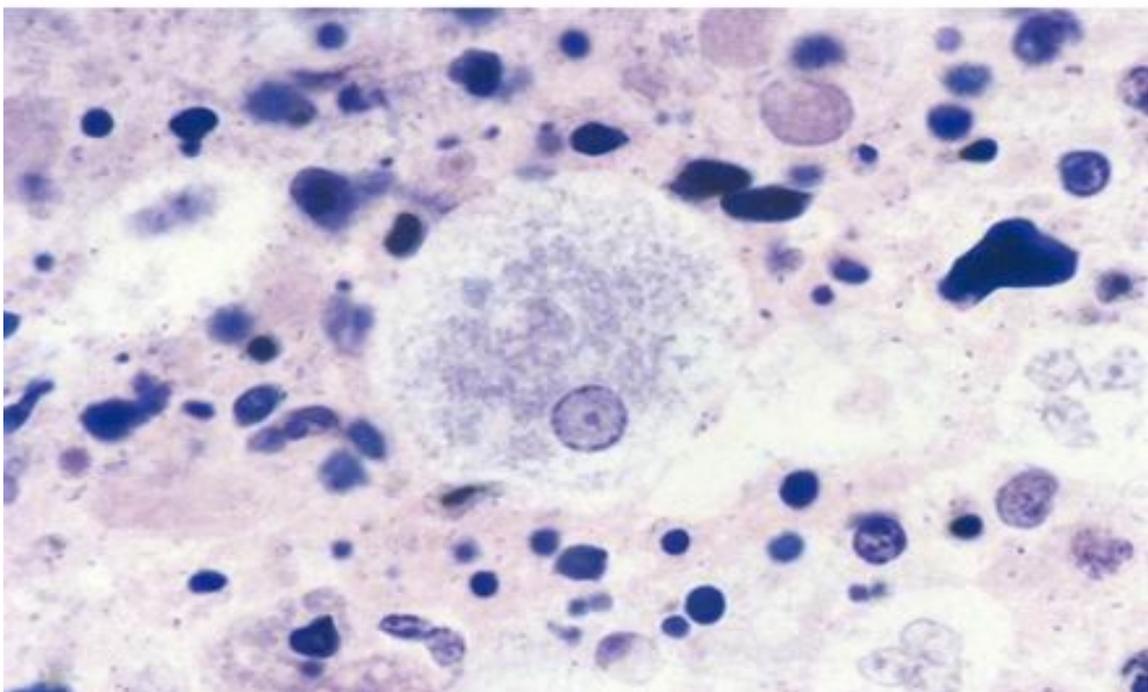


Photo n° 78

Selle chat 583. *Entamoeba histolytica*. Forme végétative non hématophage. Obj. X 100. Préparation Émile Brumpt.

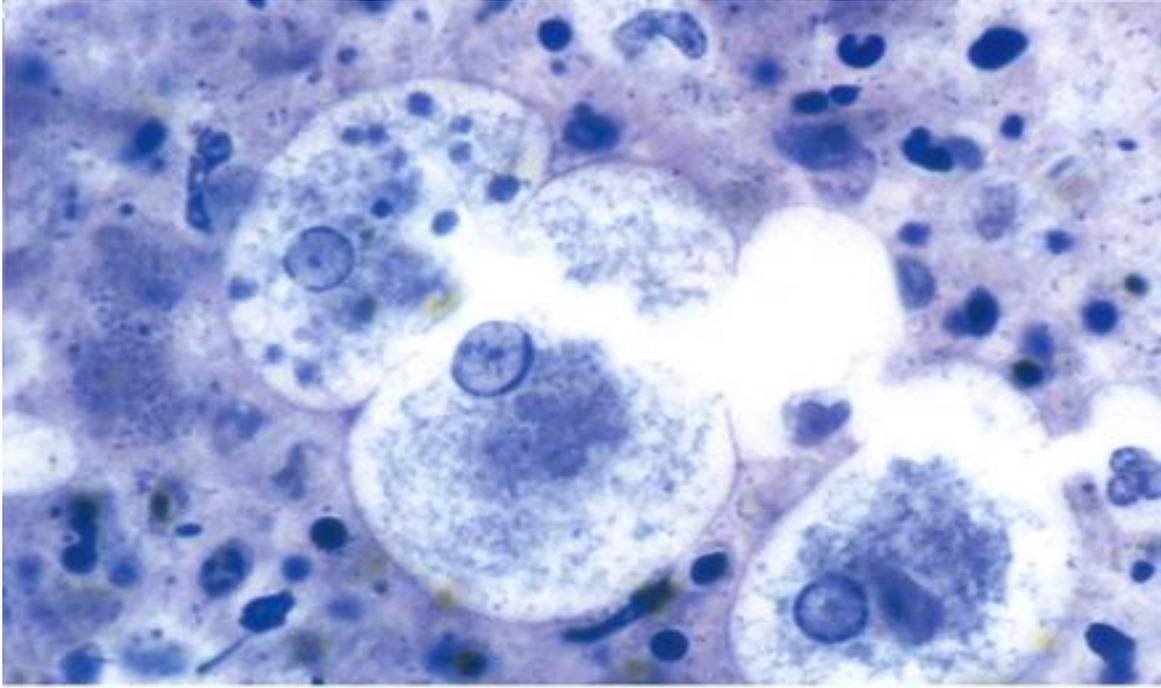


Photo n° 79

Selle chat 583. *Entamoeba histolytica*. Trois formes végétatives dont une hématophage, épaisissements chromatiniens importants de la membrane nucléaire. Obj. X 100. Préparation Émile Brumpt.

CAHIER **BIOFORMA**
DE
Formation
version numérique

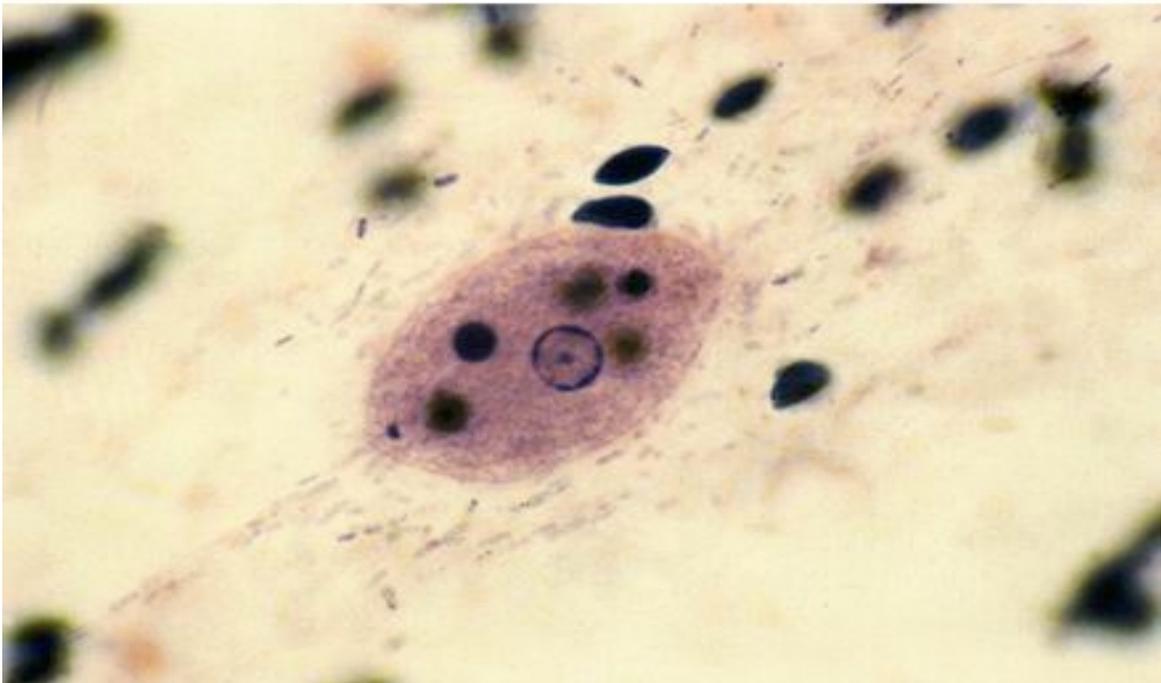


Photo n° 80

Selle humaine 580. *Entamoeba histolytica* hématophage. Obj. X 100. Préparation Émile Brumpt.

Ce fut à partir de 1978 que les travaux sur les zymodèmes des amibes de P. G. Sargeant (99 ; 103), ancien technicien du service de santé de la Royal Navy, devenu chercheur à la London School of Hygiène and Tropical Medicine, remirent à flot *E. dispar*.

LES ZYMODÈMES

L'analyse conjointe de différents isoenzymes permet de caractériser des souches ou des espèces de natures différentes par cet ensemble d'isoenzymes : le zymodème.

Technique (99)

CULTURE: elle est faite en milieu de Robinson (98).

La récolte est réalisée quand le nombre d'amibes atteint au moins 50 000, habituellement après la troisième subculture de 48 heures.

CONTRÔLE : une culture de 48 heures sans amibes est traitée comme les cultures test.

LYSAT : la couche d'amidon contenant les amibes est prélevée sur la pente, avec du liquide surnageant et centrifugée 15 minutes à 350 (g) pour concentrer les amibes. Le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension dans un grand volume d'eau distillée contenant les agents stabilisateurs des enzymes. La lyse est obtenue par congélation à - 25 °C, suivie de décongélation. Le lysat est centrifugé à 30 000 (g) pendant 30 minutes à 5 °C.

Le surnageant est conservé sous forme de billes d'environ 20 µl dans l'azote liquide (-196°C).

L'ELECTROPHORESE est réalisée en utilisant une différence de potentiel de 16 V cm pendant 3 heures.

RÉSULTATS

Les marqueurs de pathogénicité sont l'absence de bande alpha en même temps que la présence de la bande bêta pour la phosphoglucomutase. La bande de forte migration pour l'hexokinase = HK confirme ces résultats. La seule exception est le zymodème XIII qui manque de bande HK de forte migration (99 ; 100 ; 101 ; 102 ; 103 ; 108).

Ces travaux ont permis de déterminer 24 zymodèmes différents dont 10 pathogènes, provenant tous de sujets ayant une amibiase tissulaire, que ce soit une dysenterie amibienne avec amibes hématophages ou une hépatite amibienne dues à *E. histolytica*. Il s'agit en particulier des zymodèmes II, VI, VII, XI, XII et XIX. Les zymodèmes non pathogènes correspondant à *E. dispar*, quant à eux, ne proviennent que d'amibes hébergées par des porteurs sains.

Le changement possible de zymodème in vitro a été envisagé. Différents travaux, et notamment celui de T.E. Jackson et coll. (89), n'ont pas pu le reproduire, même en présence de *Crithidia sp.* (91). Le passage d'une espèce à l'autre n'est pas habituel, et ne peut être envisagé que dans le cadre général et long de l'évolution des espèces.

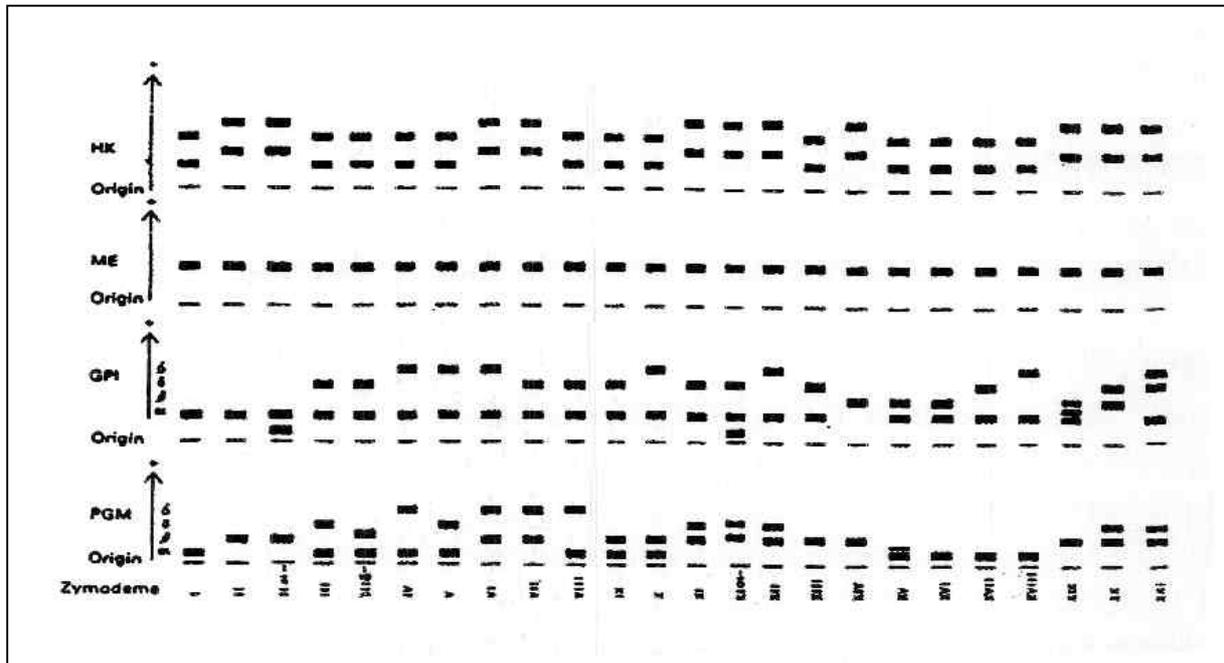


Figure 3 : Diagramme (d'après Sargeant) de 21 zymodèmes d'*E. histolytica* et *E. dispar*
 HK = hexokinase, ME = Malate oxidoreductase,
 GPI = glucose phosphate isomerase, PGM = phosphoglucomutase.

LES PREUVES DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Plus récemment, ce sont les différentes techniques de la biologie moléculaire qui ont confirmé la validité de l'espèce *E. dispar* non pathogène. Plusieurs anticorps monoclonaux ont été préparés, les uns réagissant avec *E. dispar*, les autres avec *E. histolytica* seulement (97 ; 106). Certains de ces anticorps monoclonaux ont été préparés contre une substance, l'adhésine, qui permet la fixation des amibes aux cellules coliques, première étape avant leur effet cytolytique et leur action phagocytaire.

Des sondes ADN ou ARN ont également été réalisées, qui permettent de différencier aussi les deux espèces d'amibes (86 ; 107).

Sur le plan génétique la distance entre des souches d'amibes pathogènes et d'autres non pathogènes a été déterminée à 2,2 % : cette distance est supérieure à celle existant génétiquement entre la souris et l'homme (87).

SÉROLOGIE

Sur 33 porteurs sains d'amibes de zymodème non pathogène, 1 seul (3 %) a donné une réaction d'immunofluorescence nettement positive. Pour 1 malade atteint d'amibiase dysentérique et 37 cas d'amibiase hépatique à *E. histolytica* avec zymodème pathogène, la sérologie est positive respectivement dans 94 % et 97 % des cas. (89).

La sérologie amibienne de 95 porteurs sains d'amibes ayant un zymodème non pathogène est négative dans tous les cas. (110).

IDENTIFICATION D'ENTAMOEBEA HISTOLYTICA ET ENTAMOEBEA DISPAR PAR RECHERCHE DES ANTIGÈNES DANS LES SELLES

Les anticorps monoclonaux réalisés contre *E. histolytica* d'une part, et *E. dispar* d'autre part ont reçu une importante application pratique : la recherche des antigènes correspondants dans les selles et aussi l'identification de ces deux espèces d'amibes. L'étude initiale faite sur 141 malades, au moyen d'anticorps monoclonaux, au Bangladesh, comparativement à la culture et à l'étude des zymodèmes, a montré une sensibilité de 97 % et une spécificité de 89 %, résultats bien supérieurs à ceux constatés dans le diagnostic microscopique d'*E. histolytica* / *E. dispar*. (voir p. 88)

La recherche dans un échantillon de selles par un test ELISA (*E. histolytica* test®*), utilisant un anticorps polyclonal spécifique de la galactose d'*E. histolytica*, est maintenant disponible.

L'étude du test *E. histolytica* a montré une très bonne sensibilité et spécificité.

EN CONCLUSION

Les amibes hématophages sont en règle générale de l'espèce *E. histolytica*.

Les amibes *E. dispar* dans leur forme végétative ont l'aspect de type « minuta ». La coexistence des deux espèces chez quelques individus est possible (91).

Le diagnostic au microscope optique ne peut pas différencier les deux espèces (sauf en cas de présence d'amibes hématophages), et le diagnostic basé sur cette technique doit reporter l'espèce comme *E. histolytica* / *E. dispar* (87 bis ; 91).

* Laboratoires Fumouze - Division diagnostics, 110-114, rue V.-Hugo - 92300 Levallois-Perret.
Tél. : 01.49.68.41.00 - Fax : 01.49.68.41.42

ENTAMOEBEA MOSHKOVSKII

FORME VÉGÉTATIVE ET KYSTE

Entamoeba moshkovskii a été isolée par Tshalalaia des égouts de Moscou en 1941. Elle fut par la suite trouvée dans les eaux d'égout de nombreux autres pays. Elle n'est pas différenciable morphologiquement d'*E. histolytica*.

Entamoeba histolytica souche Laredo, isolée des selles d'un habitant de Laredo, fut rattachée à *E. histolytica* et considérée comme une variante atypique. Cette souche se cultive très bien à température du laboratoire et est donc très utilisée pour les travaux de recherche sous la dénomination *E. histolytica*, souche Laredo.

Différentes études montrèrent de grandes similitudes entre *E. moshkovskii* et *E. histolytica* souche Laredo (114). Par exemple l'étude de leurs isoenzymes a montré une similitude de leurs profils et par contre un aspect bien différent entre *E. moshkovskii* et *E. histolytica* « souche Laredo » d'une part et *E. histolytica* « régulière » authentifiée d'autre part (118).

Les tests de thermo-résistance, ainsi que la culture en milieux hypotoniques sont également similaires (119).

La démonstration finale concluant à l'identité de la souche Laredo et de la souche d'*E. moshkovskii* a été faite en 1991 par Clark C.G. et Diamond L.S. lors d'une étude employant la P.C.R.

Entamoeba moshkovskii

Amibe non pathogène pour l'homme, mais pouvant être présente dans ses selles. Voisine d'*Entamoeba invadens*, elle peut infester les serpents (115). Elle ressemble également à *E. ranarum* de la grenouille (112 ; 116)

Répartition géographique

E. moshkovskii a été trouvée dans les eaux d'égout de 14 pays d'Amérique du Nord et du Sud, d'Europe, d'Asie et d'Australie (119). Elle peut donc être considérée comme cosmopolite.

Forme végétative (111 ; 116)

La forme végétative semblable à celle d'*E. histolytica* - *E. dispar*, n'est pas hématophage.

Kyste : il a la même morphologie que celui d'*E. histolytica* - *E. dispar* avec présence de corps sidérophiles. Leur viabilité est de 10 mois à 4°C en anaérobiose.

Culture : se réalise facilement à la température du laboratoire, ce qui constitue le meilleur critère de différenciation d'avec *E. histolytica*. *E. moshkovskii* peut également se développer à + 10 °C ainsi que dans des solutions hypotoniques où des kystes se forment éventuellement (117). La culture axénique en présence de mucus gastrique est aussi possible (113).



Photo n° 81

Entamoeba moshkovskii. Forme végétative. Noyau de même structure qu'*E. histolytica*.
Contraste interférentiel.

ENTAMOEBA HARTMANNI

FORME VÉGÉTATIVE

Kyste: p. 141



Cette espèce d'amibe a été découverte par Van Prowazek en 1912 chez une mulâtresse des Iles Hawaï mais fut alors décrite d'une manière imprécise.

Une souche de cette amibe a pu être transmise à un homme volontaire sans provoquer aucun trouble. Le chat est réfractaire et le chien peut être irrégulièrement infesté par *E. hartmanni* (123).

Entamoeba hartmanni est reconnue comme espèce autonome et valable, c'est une amibe commensale du colon de l'Homme.

Cette amibe du fait de sa petite taille et des difficultés de la colorer à l'hématoxyline ferrique peut être confondue avec *Endolimax nanus*, aussi petite et presque aussi mobile. La coloration facile et rapide au M.I.F. ainsi que la coloration au Trichrome après fixation par l'A.P.V. permettent d'identifier *E. hartmanni*.

ÉTUDE A FRAIS

Taille: de 3 à 7 μm , au maximum 15 μm .

Mobilité : comme *Entamoeba histolytica*.

Cytoplasme : contenant de petites vacuoles et peu d'inclusions en relation avec la faible taille de l'amibe.

Sphaerita toujours possible.

Noyau : non visible à frais.

L'amibe est extrêmement petite et il est en pratique très difficile de se rendre compte et de voir nettement des différences qui deviennent subtiles à cette échelle.

COLORATION AU M.I.F.

La coloration au M.I.F. est très utile car elle permet de mettre en évidence un noyau de type « Entamibe » chez ces tous petits éléments ce qui évite de les confondre avec *Endolimax nanus* de taille comparable.

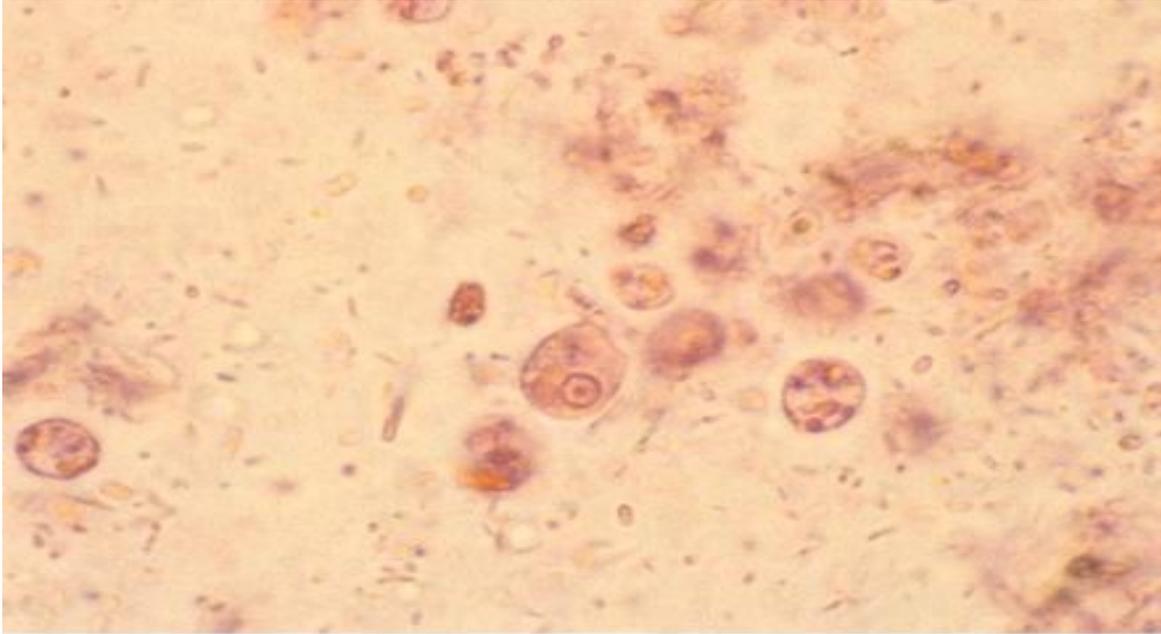


Photo n° 82 – *E. hartmanni*. Forme végétative. Coloration M.I.F. Obj. X 100.

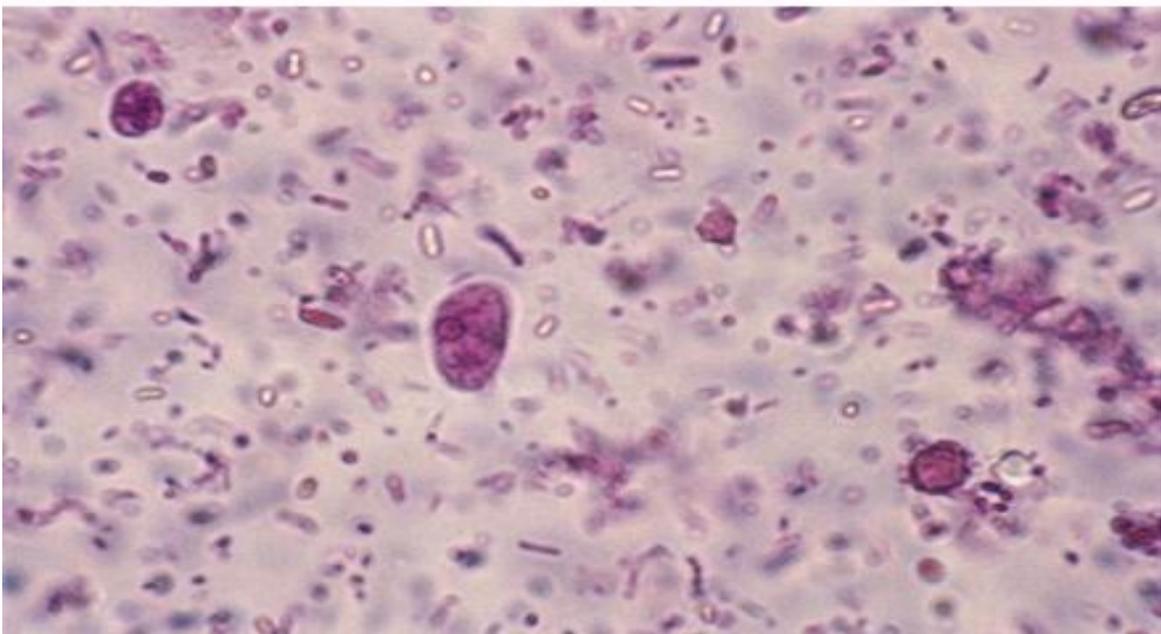


Photo n° 83 -*E. hartmanni*. Forme végétative. Coloration Bailenger. Obj. X 100. 97

COLORATION TRICHROME (ou hématoxyline ferrique)

Dimension : diamètre moyen 6 μm , minimum 2,2 μm , maximum 14 μm .

En culture les F.V. sont un peu plus grandes que dans les selles (122).

Aspect général : pseudopodes souvent nombreux et orientés dans plusieurs directions donnant parfois l'aspect d'un « élément de puzzle » typique à cette espèce.

Cytoplasme : avec de petites vacuoles et peu d'inclusions l'aspect général est « propre ».

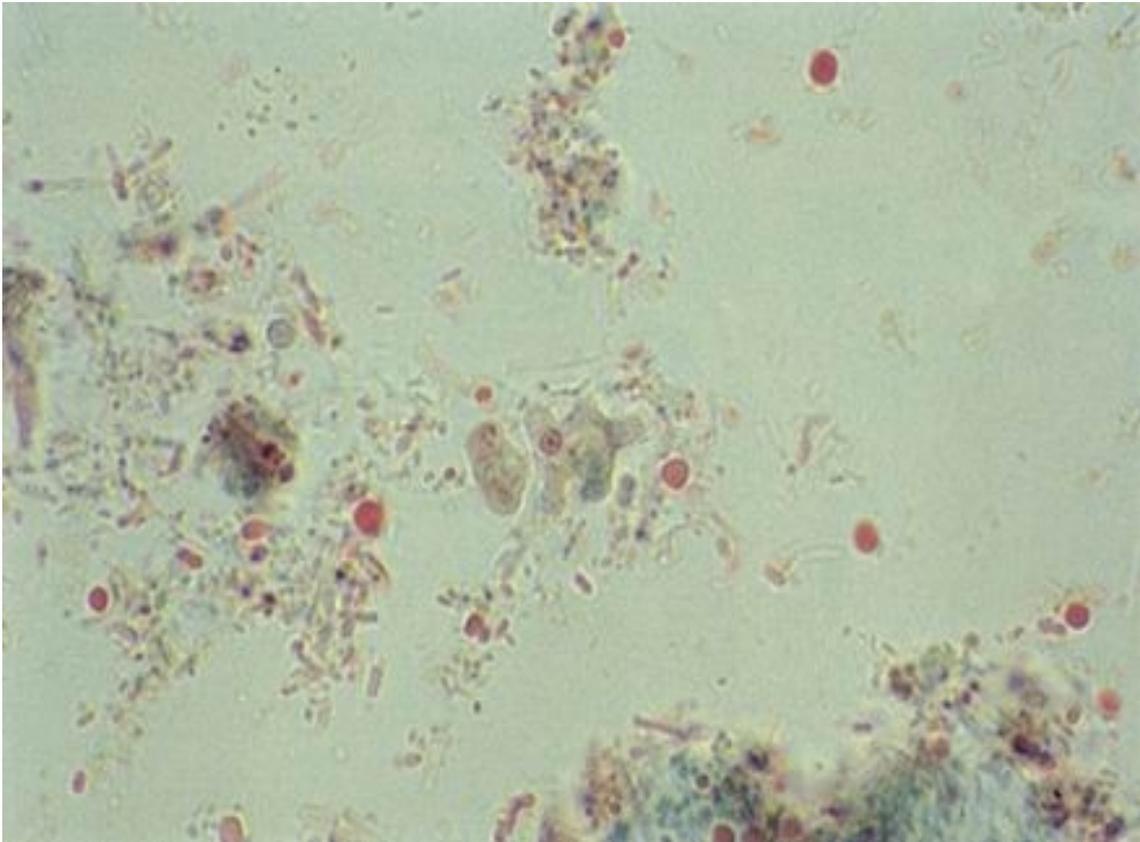


Photo n° 84

E. hartmanni. Forme végétative émettant des pseudopodes dans plusieurs directions, avec un aspect général de « puzzle » caractéristique. Coloration trichrome. Obj. X 100.

Noyau : taille : de 2 à 5 μm . Le caryosome est central dans 58 % des noyaux et subcentral ou excentré dans 42 %, comme pour *E. histolytica* (78).

L'étude du rapport du diamètre du noyau avec celui du cytoplasme a été faite (78), et n'a pas montré l'existence d'un rapport nucléo-cytoplasmique caractéristique comparativement à *E. histolytica*, en particulier en raison des importantes variations de ce rapport pour une même souche d'amibes en relation avec le stade de division.

Au total, le meilleur critère diagnostic d'*E. hartmanni* par rapport, en particulier à *E. histolytica*, est sa petite taille en général inférieure à 12 μm (78) et même à 10 μm (121 ; 122) ainsi que la petite taille de son noyau. Pour le problème des formes naines d'*E. histolytica* voir p. 72.

Il peut exister un gros amas de chromatine périphérique pour *E. hartmanni*, moins souvent présent pour *E. histolytica* (122).

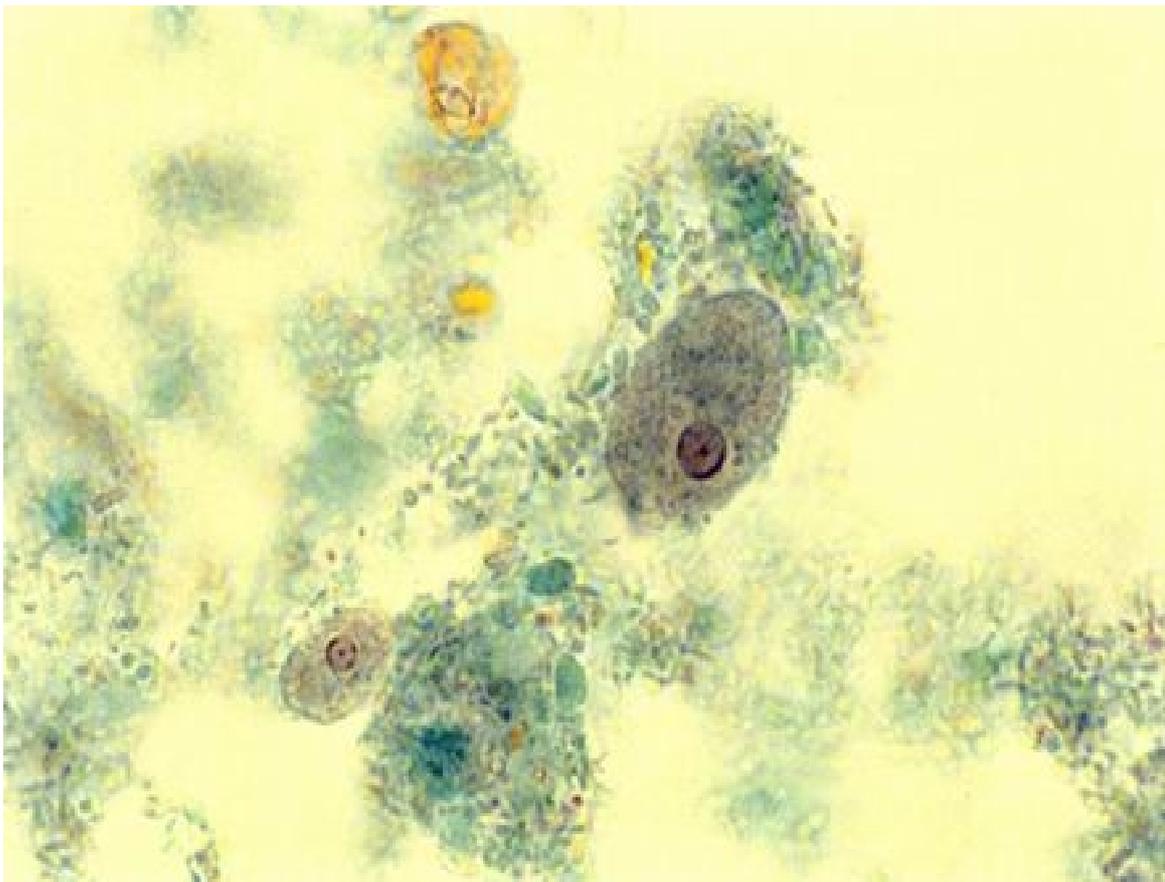


Photo n° 85

E. hartmanni et *E. histolytica*. Formes végétatives de tailles très différentes. Coloration trichrome. Obj. X 100.

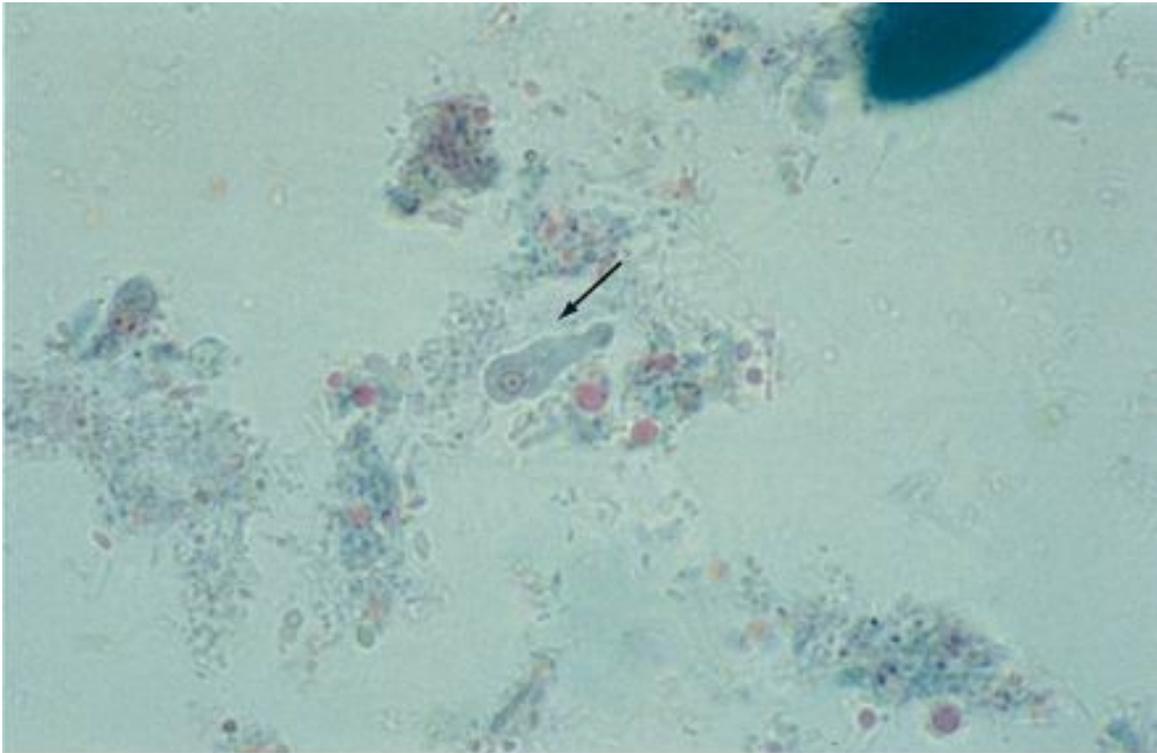


Photo n° 86

E. hartmanni. Forme végétative émettant un long pseudopode. Coloration trichrome. Obj. X 100.

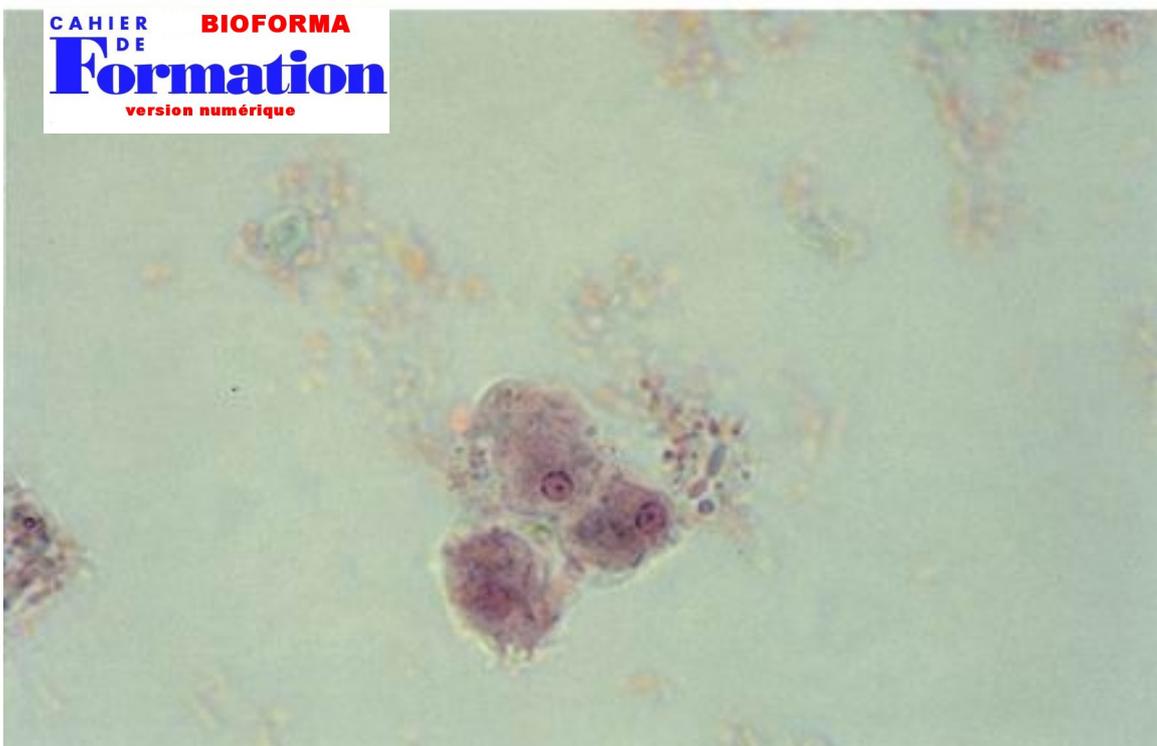


Photo n° 87

E. hartmanni. Trois formes végétatives de différentes tailles. Coloration trichrome. Obj. X 100.

ENTAMOEBA COLI

FORME VÉGÉTATIVE

Kyste : p. 144

Ent. coli est une amibe commensale de l'Homme.

Tableau IV: Formes végétatives d'*Entamoeba coli*
Résultats des tests du Contrôle National de Qualité en Parasitologie de France

Date d'envoi	Nombre de réponses	Richesse*	Résultats conformes	Deuxième réponse en %**	Troisième réponse en %**
11/1980	1 383	15 (+ kystes) Coloration : M.I.F.	30,3 %	<i>Entamoeba histolytica</i> 6	Amibes diverses 1,2
11/1981	1 441	5 (+ kystes) Coloration : M.I.F.	35,4 %	<i>Entamoeba histolytica</i> 13,5	Protozoaires divers 2,3
11/1991	1 088	25*** Coloration : trichrome	22,2 % (1)	<i>Endolimax nanus</i> 4,6	<i>Entamoeba hartmanni</i> 2,5
06/1994	1 199	2,5 Fixation : acéto- acétique formolée	45,8 %	<i>Entamoeba histolytica</i> 41,1	<i>Entamoeba polecki</i> 3,2
01/1995	1 182	15 (+ kystes) Coloration : M.I.F.	34,2 %	<i>Entamoeba histolytica</i> 2,5	<i>Entamoeba dispar</i> 1,3

* La richesse moyenne = nombre de champs Obj. X 40 nécessaires pour trouver un parasite.

** Parasites absents de la selle.

*** La richesse moyenne = nombre de champs Obj. X 100 nécessaires pour trouver un parasite.

(1) Associé avec des formes végétatives d'*Entamoeba histolytica*.

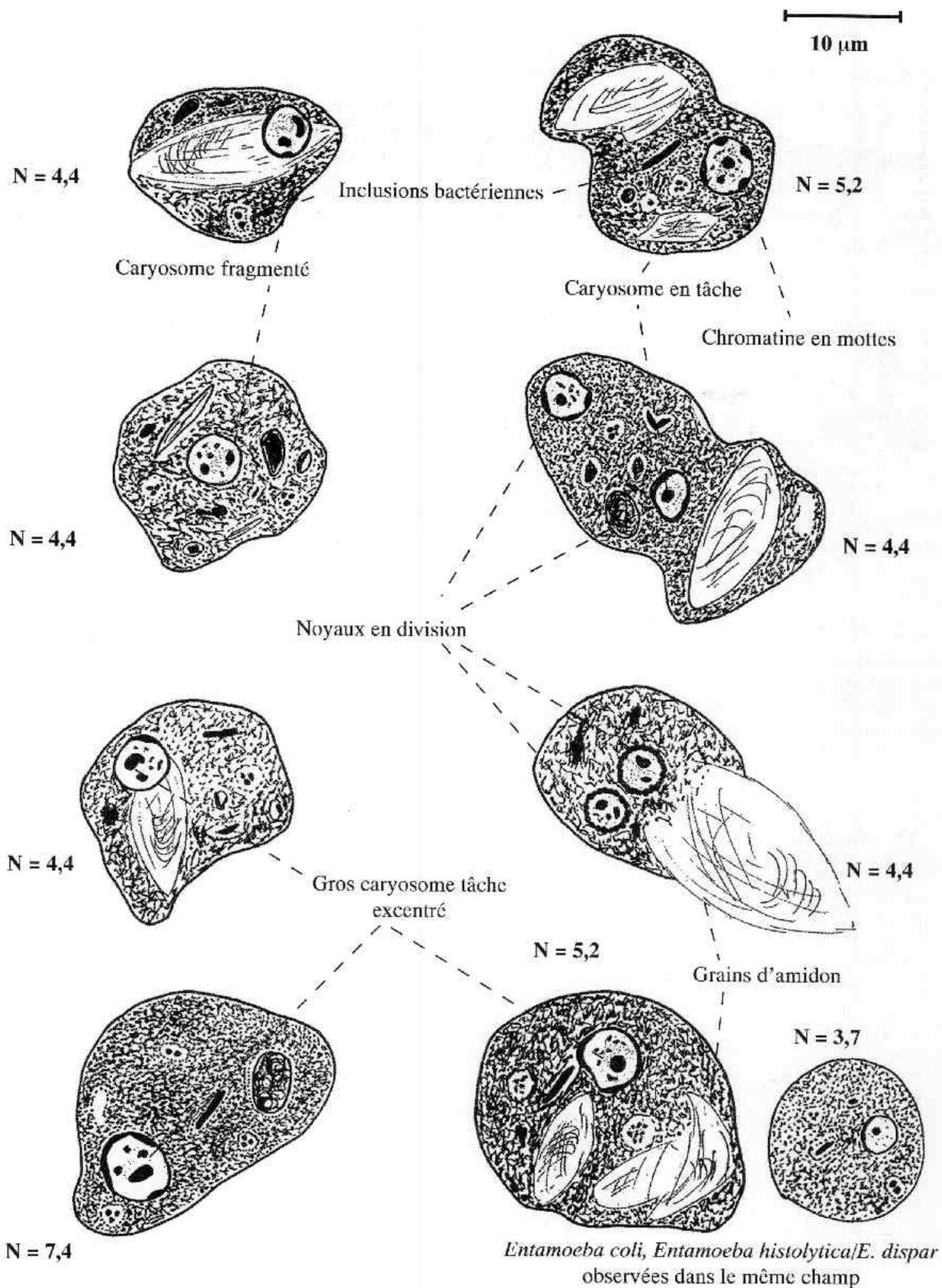


Figure 4 : Formes végétatives d'*Entamoeba coli*

Dessinées à partir de frottis fixés par A.P.V., colorés par le Trichrome de Wheatley. N = diamètre du noyau en µm..

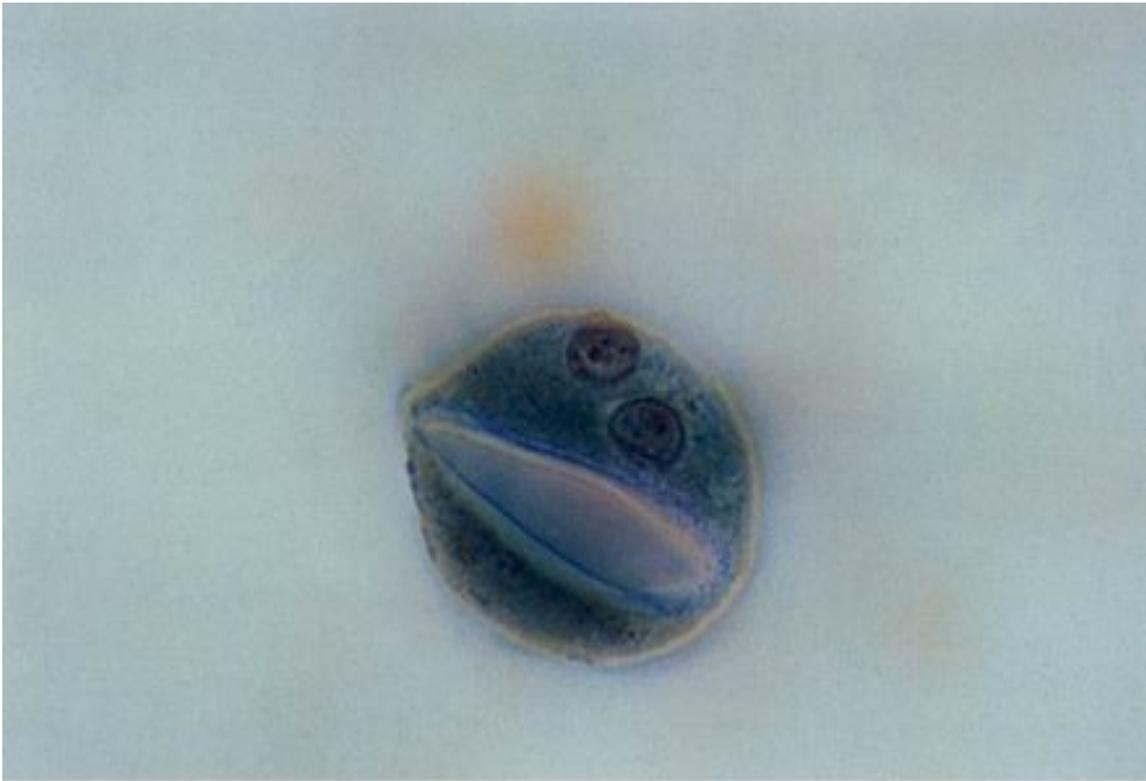


Photo n° 88 - *Entamoeba coli*. Forme végétative en voie de division avec deux noyaux, ayant ingéré un grain d'amidon. Coloration trichrome. Obj. X 100.

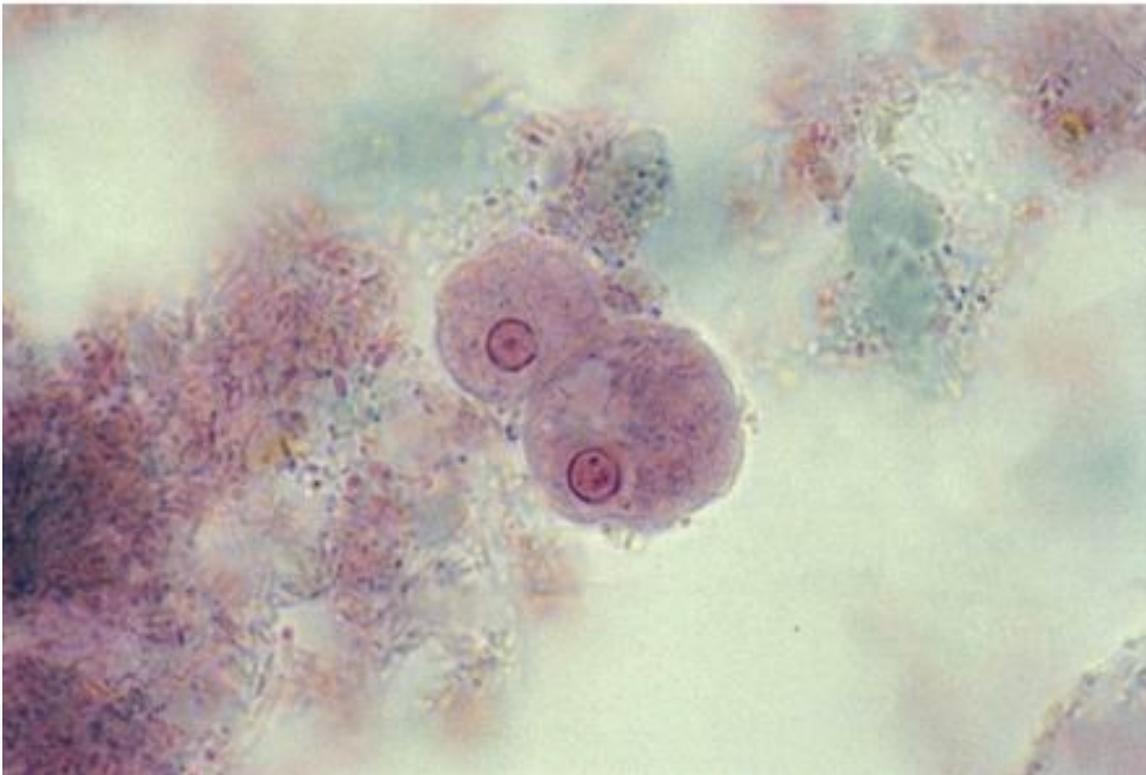


Photo n° 89 - *Entamoeba coli*. Forme végétative d'assez grande taille, vacuoles cytoplasmiques marquées, caryosome nucléaire fragmenté et *Entamoeba histolytica* / *E. dispar* forme végétative de petite taille (*minuta*). La chromatine périphérique des deux noyaux est dans ce cas d'égale épaisseur. Coloration trichrome. Obj. X 100.

ÉTUDE À FRAIS

Taille : la plus grosse amibe couramment rencontrée 20-30 µm, jusqu'à 40 µm de diamètre.

Mais il existe :

- a) des formes naines plus petites, de la taille d'*Entamoeba histolytica*.
- b) des amibes ayant perdu une partie de leur cytoplasme qui sont alors très petites, sans noyau ou avec un noyau relativement grand.

Forme et mobilité

En général immobiles, arrondies, très réfringentes. Cependant, les amibes des cultures et des selles diarrhéiques peuvent être aussi mobiles qu'*E. histolytica*.

Les *Ent. coli* de petite taille sont aussi assez mobiles sans toutefois atteindre celle d'*E. histolytica*.

Pseudopodes : à base large, courts assez transparents, tranchant sur l'endoplasme granuleux. L'émission des pseudopodes est en général lente, et il y en a un à la fois.

On peut aussi observer l'émission rapide de petits pseudopodes arrondis, en grand nombre en même temps (3 à 5) comme pour *Entamoeba histolytica* ou *Iodamoeba butschlii*.

Devenir des pseudopodes : l'amibe rentre son pseudopode unique, reste arrondie un instant, puis en émet lentement un autre à une autre place et ainsi de suite. Il en résulte un mouvement « sur place », l'amibe ne quittant pas le milieu du champ microscopique où on l'a mise.

Plus rarement *Entamoeba coli* coule son endoplasme dans son pseudopode et avance. Mais bientôt elle remplit un autre pseudopode situé dans un autre endroit du corps : il en résulte un mouvement anarchique, sans aucune direction déterminée.

Rappelons que les *Entamoeba coli* des cultures ou des selles diarrhéiques peuvent être aussi mobiles que les amibes dysentériques, avec mouvement rapide dans une direction déterminée.

APRÈS RÉCHAUFFEMENT

Entamoeba coli ne supporte pas une chaleur au-dessus de 37°C. Si l'on surchauffe un peu, les amibes s'arrondissent puis brusquement éclatent. Ce sont ces expulsions spontanées de cytoplasme qui nous valent quelquefois l'apparition de petites amibes absolument impossibles à identifier si nous ignorons leur mode de formation.

Cytoplasme

Dans l'amibe mobile l'endoplasme est assez distinct de l'ectoplasme qui n'est pas aussi transparent que chez *Entamoeba histolytica*.

L'endoplasme grossièrement granuleux est rempli de grosses vacuoles souvent bourrées d'inclusions: grains d'amidon, grosses bactéries, levures, mais aussi de petits parasites : kystes de *Giardia intestinalis* et d'*Entamoeba histolytica* ou même des formes végétatives de diverses espèces d'amibes. Il est souvent parasité par *Sphaerita* (124).

Noyau

Souvent visible à frais, avec la paroi nucléaire caractéristique, en collier de perle.

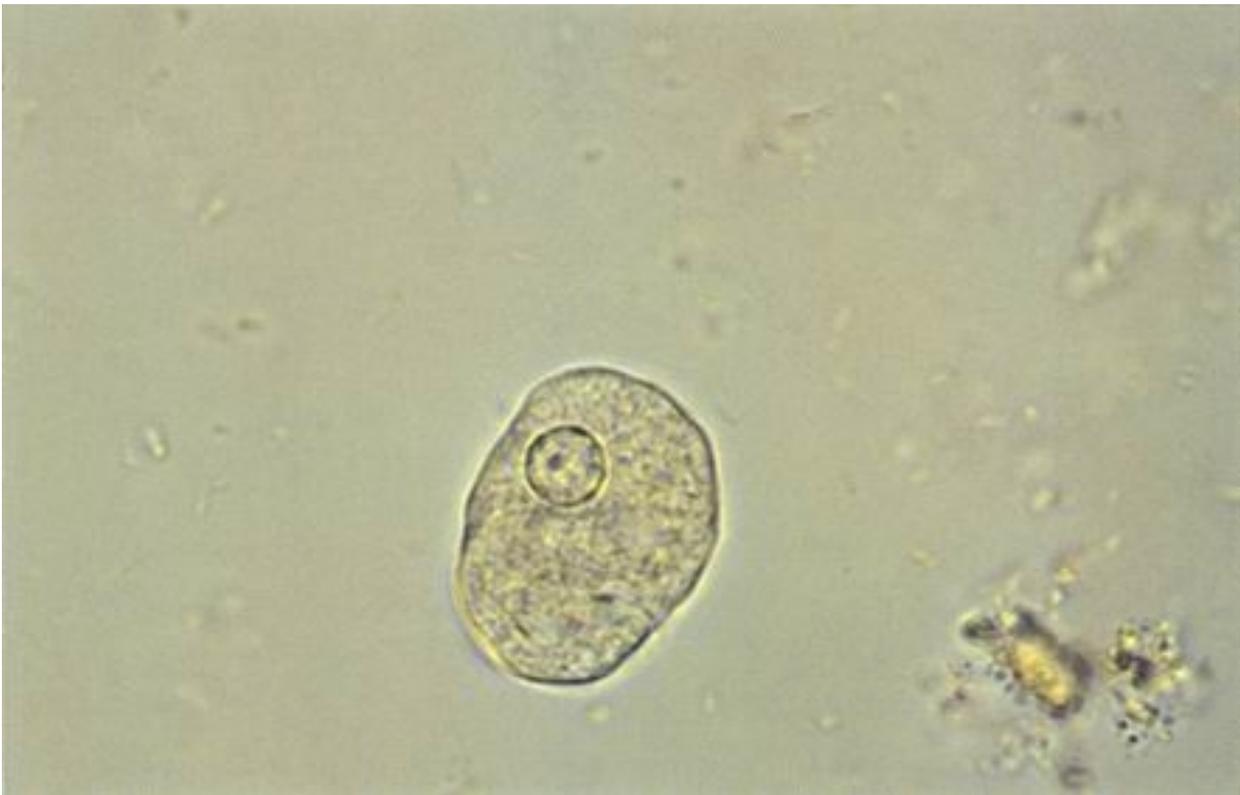


Photo n° 90

Entamoeba coli. Forme végétative non colorée, fixée (S.A.F.) Obj. X 100.

ÉTUDE DU NOYAU APRÈS COLORATION AU M.I.F.

Taille et aspect : 5 à 7 μm de diamètre, aspect vésiculeux.

Structure : structure générale des noyaux d'Entamibes, mais différente par quelques détails qu'il faut savoir apprécier.

Membrane nucléaire : épaisse tapissée à l'intérieur d'une couche de chromatine périphérique formée de granulations grossières (pour *Entamoeba histolytica* : membrane mince, chromatine périphérique à granulations fines).

Caryosome : gros, en tache, excentré, souvent entouré d'un halo clair difficile à colorer par le M.I.F.

Présence fréquente de granulations chromatiques (= chromosomes) autour du caryosome.

Le diagnostic différentiel entre *Entamoeba coli* et *Entamoeba histolytica* est d'autant plus difficile, à ce point de vue, que les amibes dysentériques en fonction du stade de division peuvent avoir une chromatine périphérique grossière, et que les amibes en cours de division ont un caryosome de grande taille ou formé de plusieurs amas (voir les figures p. 102).

Cette espèce n'est pas pathogène, mais son diagnostic différentiel avec *Entamoeba histolytica* est capital pour éviter un traitement inutile, et plus encore un diagnostic erroné d'amibiase intestinale qui empêcherait de porter le diagnostic réel des troubles intestinaux (cancer du colon par exemple).



Photo n° 91- *Entamoeba coli*. Forme végétative. Vacuoles cytoplasmiques, nombreuses bactéries et débris phagocytés, gros caryosome nucléaire. Coloration M.I.F. Obj. X 100.



Photo n° 92 - *Entamoeba coli*. Forme végétative émettant un pseudopode. Caryosome excentré. Début de coloration par le M.I.F. ou prédomine l'action de l'iode. Obj. X 100.



Photo n° 93 - *Entamoeba coli*. Forme végétative. Coloration prolongée par le M.I.F. ou prédomine l'action de l'éosine. Obj. X 100.



Photo n° 94
Entamoeba coli. Forme végétative de grande taille avec nombreuses vacuoles. Coloration Lugol.
Obj. X 100.

CAHIER **BIOFORMA**
DE
Formation
version numérique

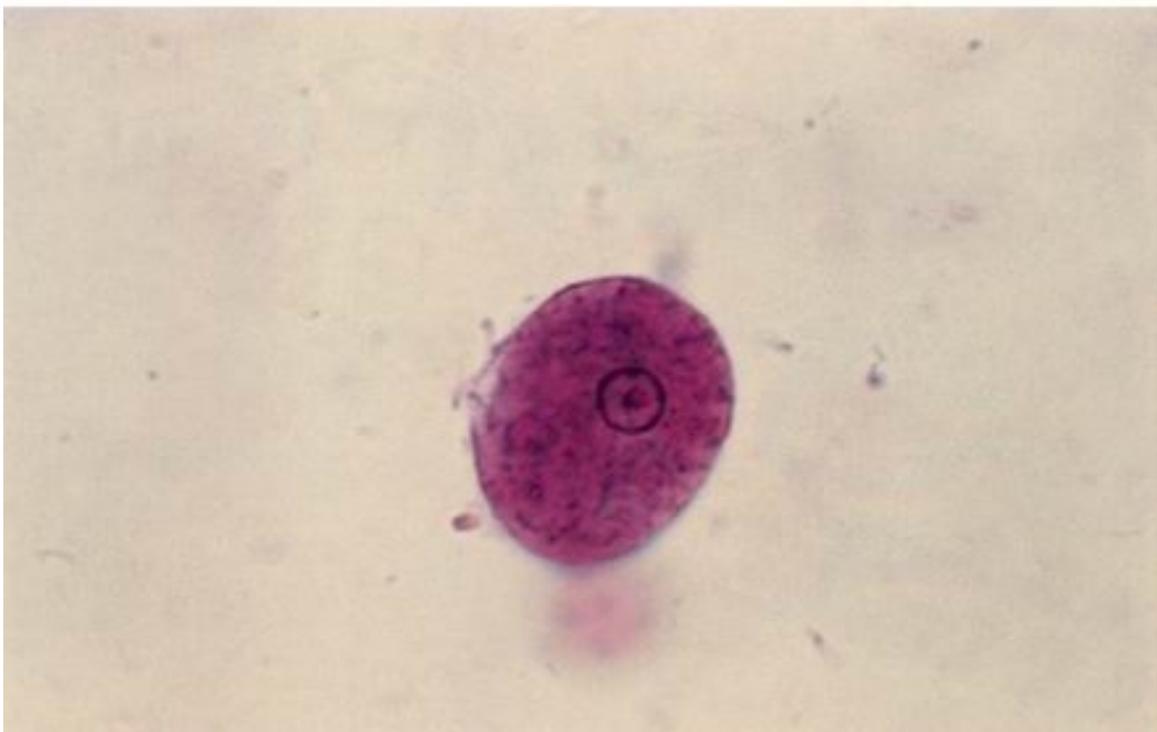


Photo n° 95
Entamoeba coli. Forme végétative. Caryosome central de grande taille. Coloration Bailenger.
Obj. X 100

COLORATION TRICHROME

Dimensions : diamètre moyen 16,5 μm , minimum 7,4 μm , maximum 35 μm donc taille souvent supérieure à celle d'*E. histolytica*.

Aspect Général : souvent arrondie. La fixation rapide par l'A.P.V. permet de saisir les amibes en mouvement avec des pseudopodes, courts, à base large, rarement nombreux comme chez *E. histolytica*.

Cytoplasme : dans l'amibe en mouvement l'endoplasme est assez distinct de l'ectoplasme, qui n'est pas aussi transparent que chez *E. histolytica*.

L'endoplasme est grossièrement granuleux rempli de grosses vacuoles souvent bourrées d'inclusions (voir M.I.F).

En règle générale le cytoplasme ne contient pas d'hématies, mais dans les cas exceptionnels où existe chez le malade une cause d'hémorragie intestinale des F.V. d'*Ent. coli* peuvent devenir hématophages (126).

Le cytoplasme est plus fortement coloré que celui des autres amibes.

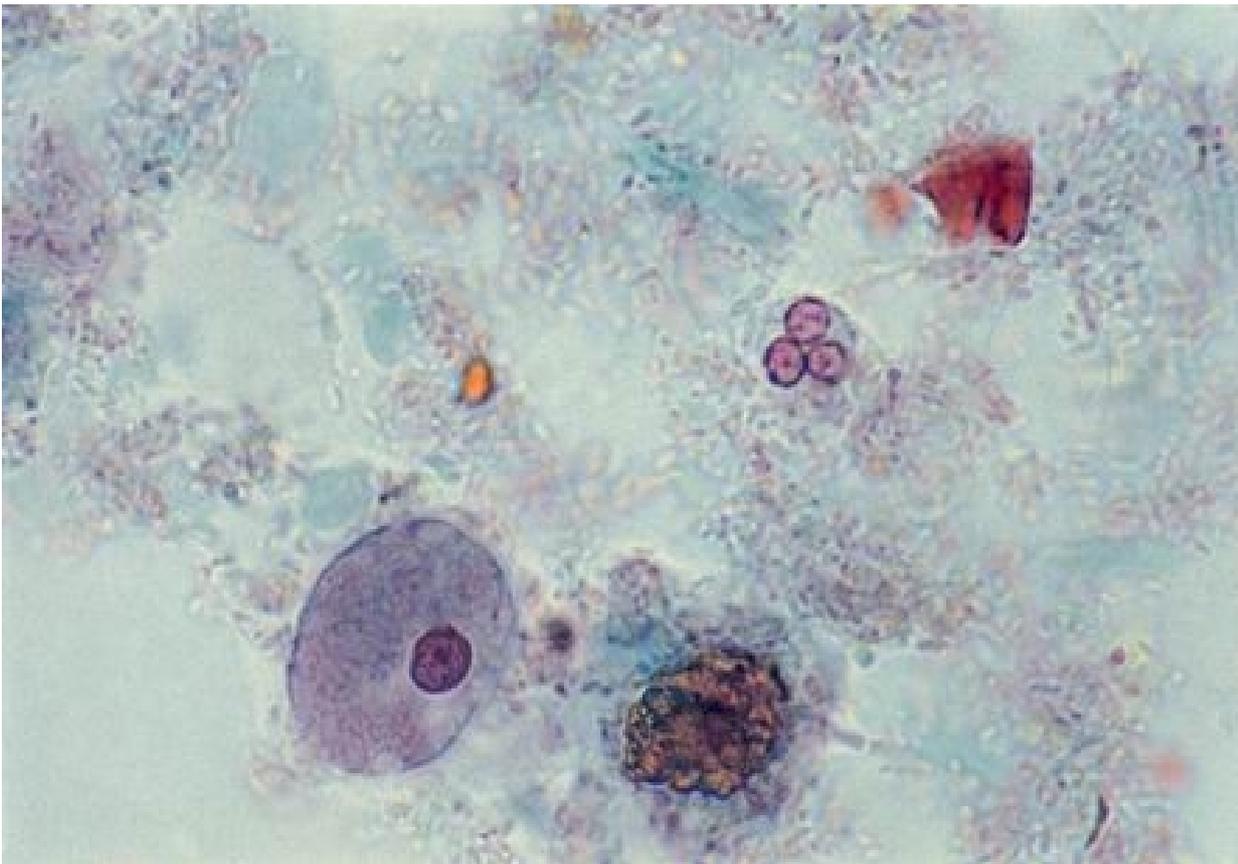


Photo n° 96

Entamoeba coli. Forme végétative. Présence d'un polynucléaire altéré à trois lobes nucléaires : au milieu de ceux-ci un élément de « type caryosomique » prêtant à confusion avec un noyau d'entamibe.



Photo n° 97

Entamoeba coli. Forme végétative de très grande taille ayant ingéré un grain d'amidon. Caryosome excentré. Coloration trichrome. Obj. X 100.

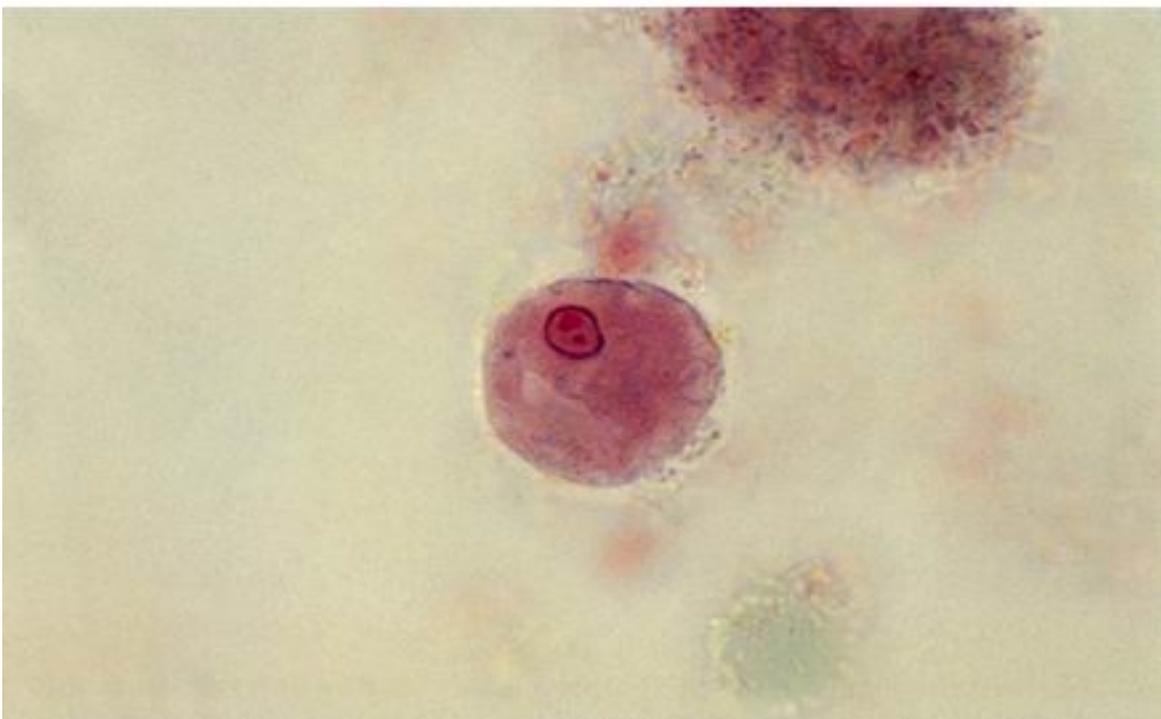


Photo n° 98

Entamoeba coli. Forme végétative de petite taille. Caryosome fragmenté. Coloration trichrome. Obj. X 100.

Noyau

Taille et aspect : moyenne 5,5 μm , minimum 4,4 μm , maximum 7,4 μm . Aspect vésiculeux.

Structure : la structure générale est celle des noyaux d'entamibes, mais en diffère par quelques détails caractéristiques.

Membrane nucléaire épaisse tapissée à l'intérieur d'une couche de chromatine périphérique formée de granulations plus grosses que celles d'*E. histolytica* et souvent irrégulières.

Caryosome : gros, en tache, généralement excentré, souvent entouré d'un halo clair prenant mal les colorants, parfois difficile à voir ou même absent, il est souvent fragmenté en plusieurs masse.

Granulations chromatiques (= chromosomes) autour du caryosome très fréquentes.

Les différences entre les caractères nucléaires d'*E. histolytica* et d'*Ent. coli* ne sont pas toujours aussi tranchées (voir MIE).

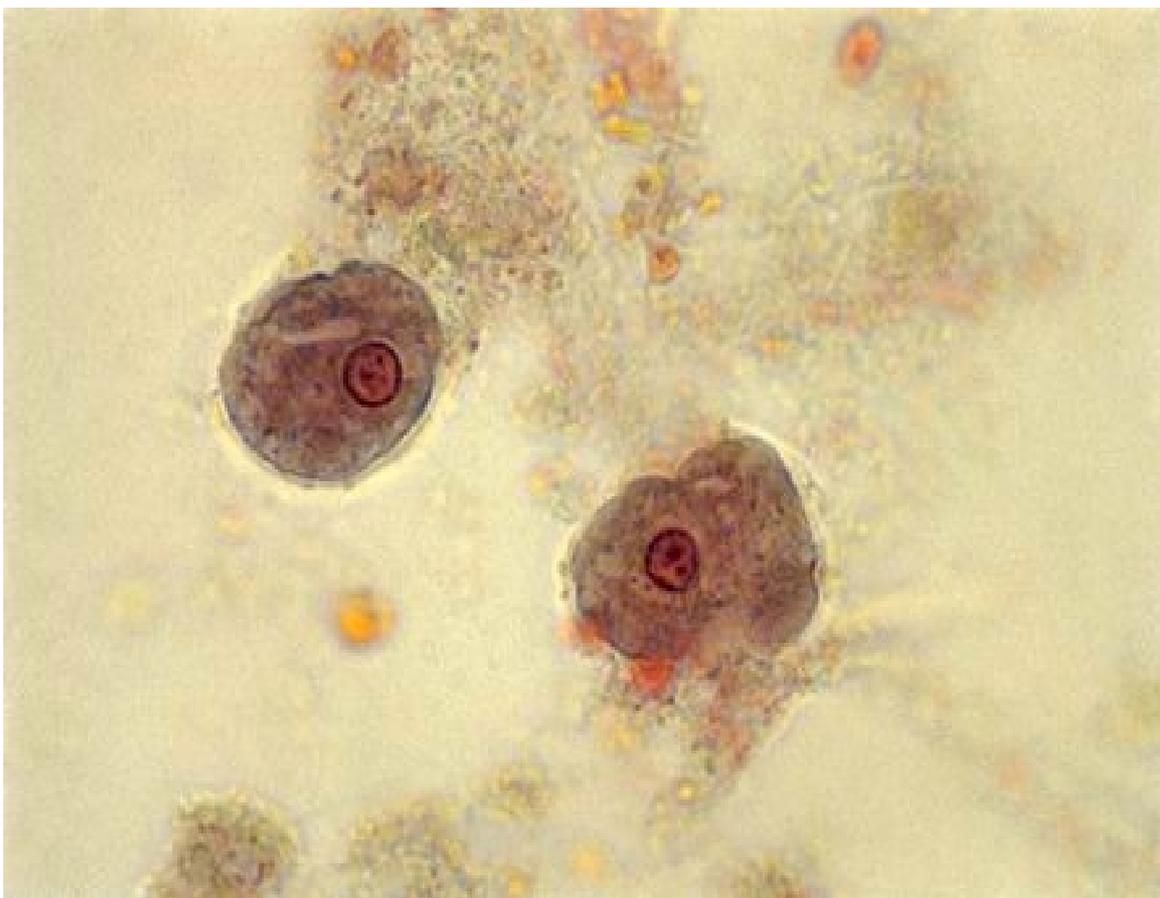


Photo n° 99

Entamoeba coli. Formes végétatives. La plus petite a un noyau avec un caryosome excentré et des granules péri-caryosomiens (= chromosomes), dans le cytoplasme présence d'un petit grain d'amidon. La plus grande avec un pseudopode, a un noyau avec un caryosome fragmenté. Coloration trichrome. Obj. X 100.

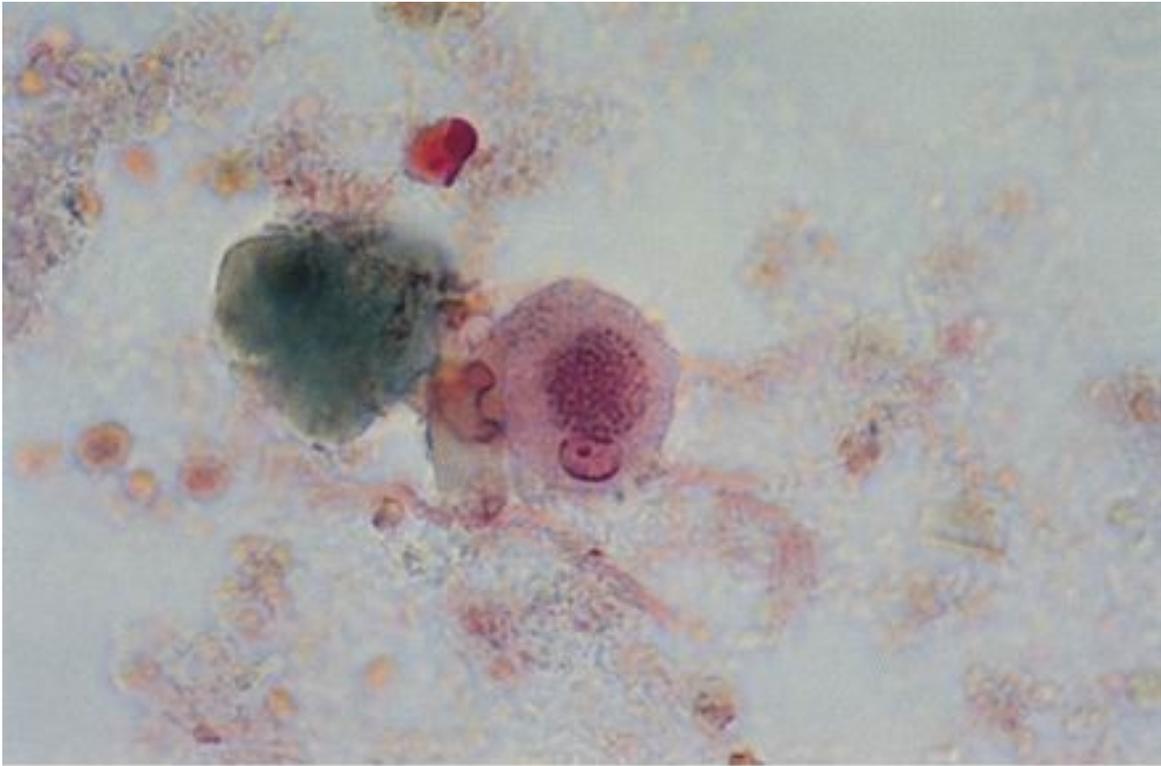


Photo n° 100
Entamoeba coli. Forme végétative avec Spherita. Coloration trichrome. Obj. X 100.

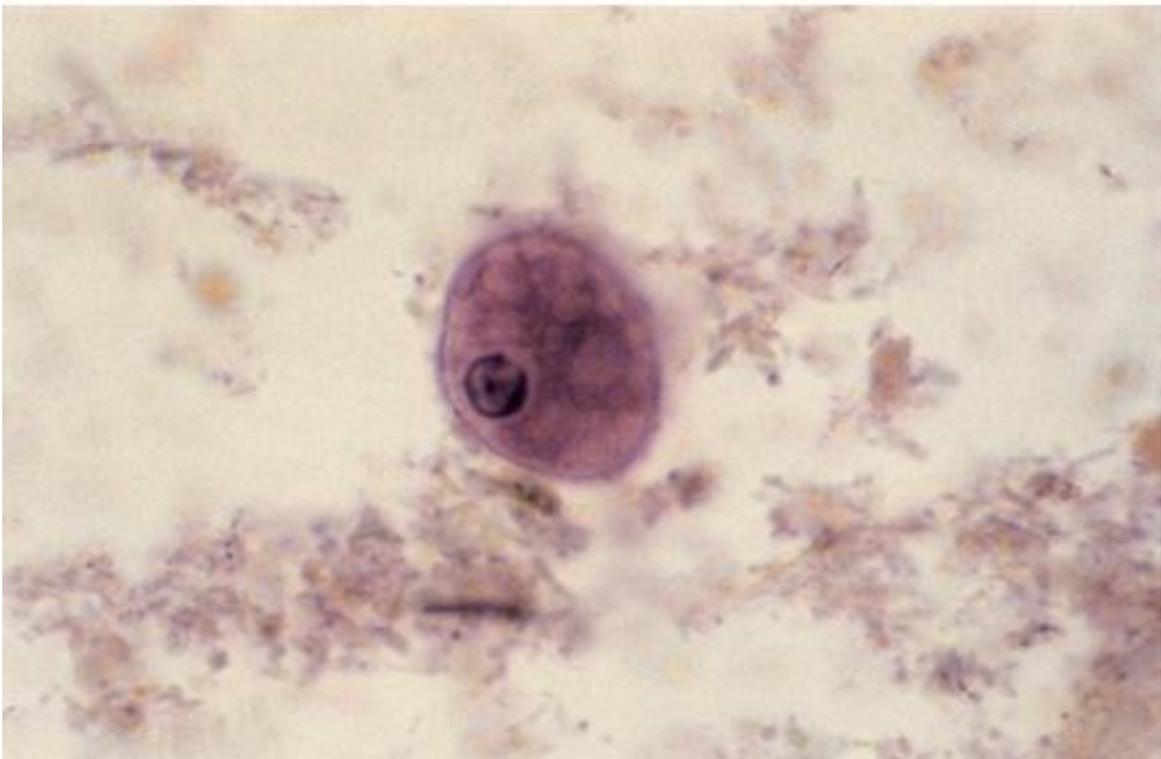


Photo n° 101
Entamoeba coli. Forme végétative. Cytoplasme avec nombreuses vacuoles. Noyau avec importants épaissements péri-chromatiniens (nucléoles), grand caryosome. Coloration hématoxyline ferrique. Obj. X 100.

ENTAMOEBIA POLECKI **FORME VÉGÉTATIVE**

Kyste : p. 155

C'est une amibe normale du porc et du singe. Elle est cosmopolite et a été pour la première fois découverte chez l'Homme par Prowazek en 1912. *Entamoeba suis* et *Entamoeba chattoni* sont considérées comme des synonymes (132).

Il faut attendre 1949 pour voir la publication de deux autres cas humains (132). Parmi les cas non publiés en France, citons :

- un cas vu par Bailenger, à Bordeaux ;
- trois cas vus par Ho Thi Sang et Petithory, à Paris, chez des patients originaires d'Algérie et du Cameroun;
- un cas vu à la Cité Universitaire de Paris par Barbier, aussi chez un camerounais. En France, ont en outre été publiés un cas chez un français de la région de Brest où les élevages de porcs sont nombreux (136). Quatorze cas ont été observés en France chez des réfugiés du Sud-Est asiatique (12 cambodgiens et 2 vietnamiens (130)).

Le pays où le plus grand nombre de cas ont été décrits est la Nouvelle Guinée (131), faisant envisager une transmission inter-humaine. Deux cas ont été observés à Taiwan (127), un cas au Pakistan (135), trois cas au Vénézuéla (129). Sept cas aux U.S.A. (128 ; 134). Dans un cas observé en Égypte (133), *E. polecki* persista au moins 33 mois. Il semble qu'*E. polecki* soit beaucoup plus fréquent qu'on ne le pense et Burrows estime qu'elle doit être souvent prise pour *E. histolytica*. Habituellement, sa présence ne s'accompagne d'aucune manifestation.

L'infestation humaine s'observe dans les pays où il y a élevage de porc et en particulier chez les personnes qui sont à leur contact.

ÉTUDE À FRAIS

Les formes végétatives sont moins souvent observées que les kystes dans les selles.

Taille : 10 à 25 µm, moyenne 16-18 µm.

Mobilité : semblable à celle d'*Ent. coli* en général : pseudopodes arrondis et lents.

Noyau : membrane nucléaire mince.

La chromatine périphérique est fine et régulièrement répartie, parfois perlée ou irrégulière.

Le caryosome est central ou excentré, sa taille est variable souvent petit et net, parfois se présente sous la forme d'une tache ronde diffuse.

Le nucléoplasme est souvent plus foncé que le cytoplasme.

Au total, l'aspect général du noyau est très voisin de celui d'*E. histolytica*. L'identification d'*E. polecki* n'est souvent possible qu'en présence de ses kystes caractéristiques : kystes à un seul noyau possédant de nombreux corps sidérophiles (voir p. 157).

CULTURE

Elle est possible sur milieu de Dobel et Laidlaw (130).

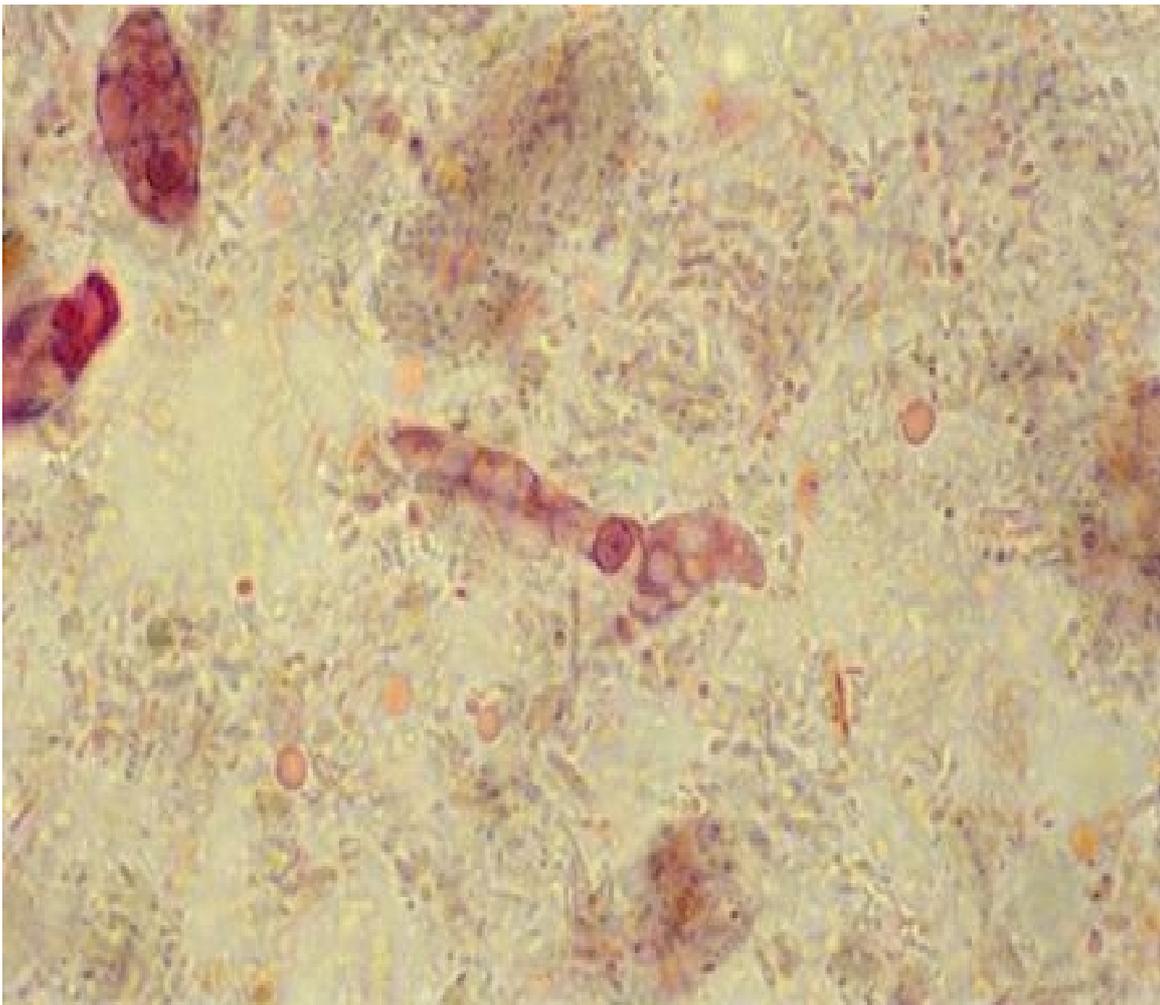


Photo n° 102

Entamoeba polecki. Deux formes végétatives avec nombreuses vacuoles. L'une des deux, est de grande taille, avec un très long pseudopode. Coloration trichrome. Obj. X 100.

Mais dans les selles de purgation les amibes peuvent avoir momentanément la mobilité d'*E. histolytica*.

Résistance : amibe peu résistante en général : s'immobilise et se lyse vite, parfois même plus rapidement qu'*Ent. coli*. Mais elle peut aussi rester des heures vivante et active.

Cytoplasme : la distinction est nette entre endoplasme et ectoplasme. Comme pour *E. histolytica*, l'endoplasme et l'ectoplasme restent distincts après l'immobilisation de l'amibe. L'amibe est bourrée de grosses vacuoles alimentaires remplies d'inclusions grossières, tout comme *Ent. coli*. Le cytoplasme ne contient jamais d'hématies.

Noyau : peu visible à frais, sur l'amibe bien vivante.

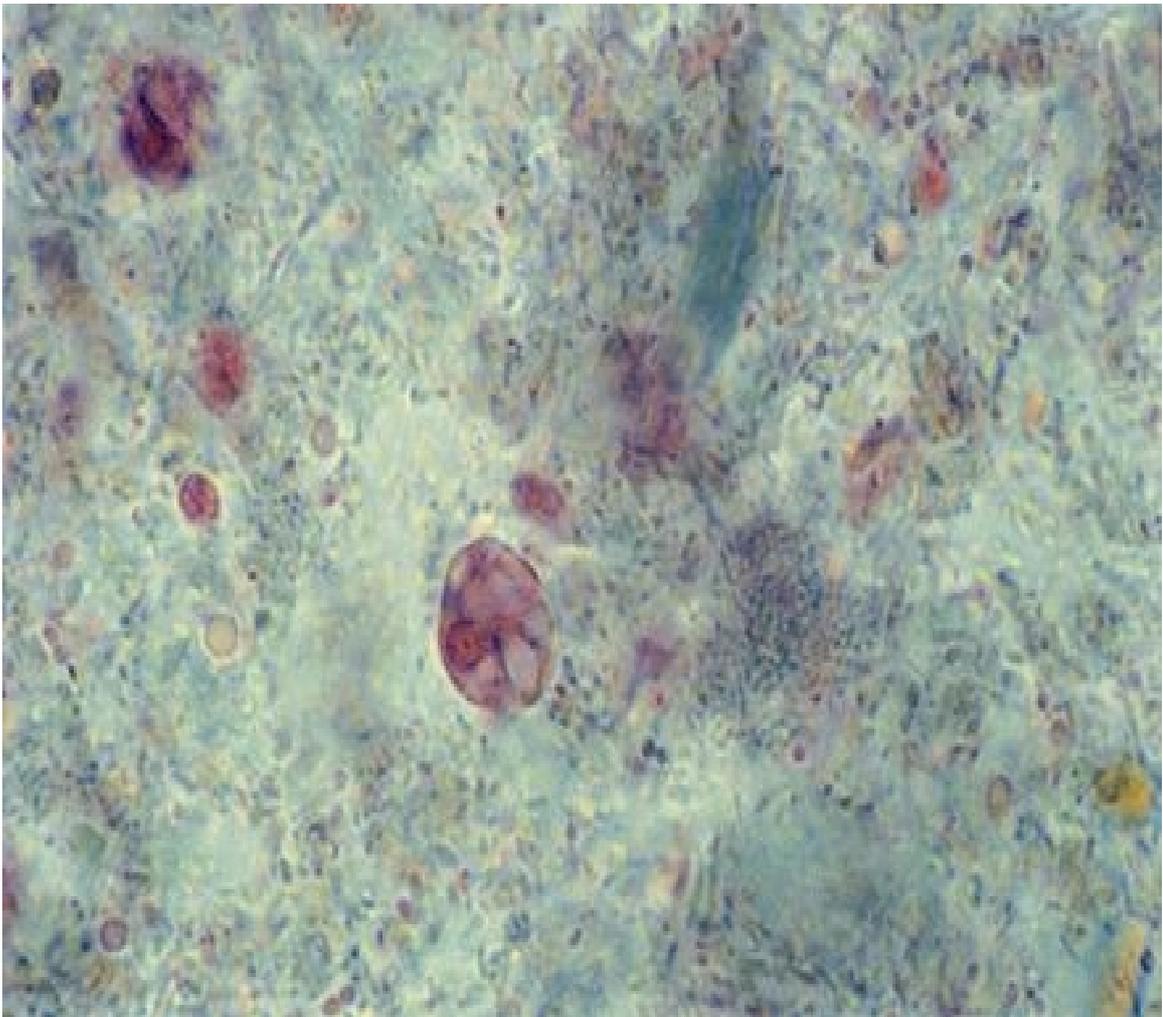


Photo n° 103

Entamoeba polecki. Forme végétative. Nombreuses vacuoles cytoplasmiques. Coloration trichrome. Obj. X 100.

ÉTUDE DU NOYAU COLORÉ À L'HÉMATOXYLINE

Taille : occupe le 1/4 ou un peu moins du 1/3 de l'amibe arrondi ou légèrement ovulaire.

Structure : membrane nucléaire mince, chromatine périphérique fine et uniformément répartie comme pour *E. histolytica*.

Nucléoplasme plus foncé que le cytoplasme : c'est un élément caractéristique. Caryosome central ou excentrique petit, même plus petit que chez *E. histolytica*, rarement compact ou diffus (amibe en division).

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

COLORATION TRICHOME

Taille : mêmes dimensions qu'à frais.

Aspect général : formes végétatives habituellement rondes avec des pseudopodes peu nombreux, larges, arrondis.

Cytoplasme : il présente deux éléments assez particuliers

- vacuoles grosses, très nombreuses ;
- inclusions alimentaires en particulier bactéries et levures, très nombreuses, mais jamais d'hématies.

La différence entre l'endoplasme rempli de vacuoles et l'ectoplasme clair est nette.

Noyau : taille : 2,5-4,5 μm .

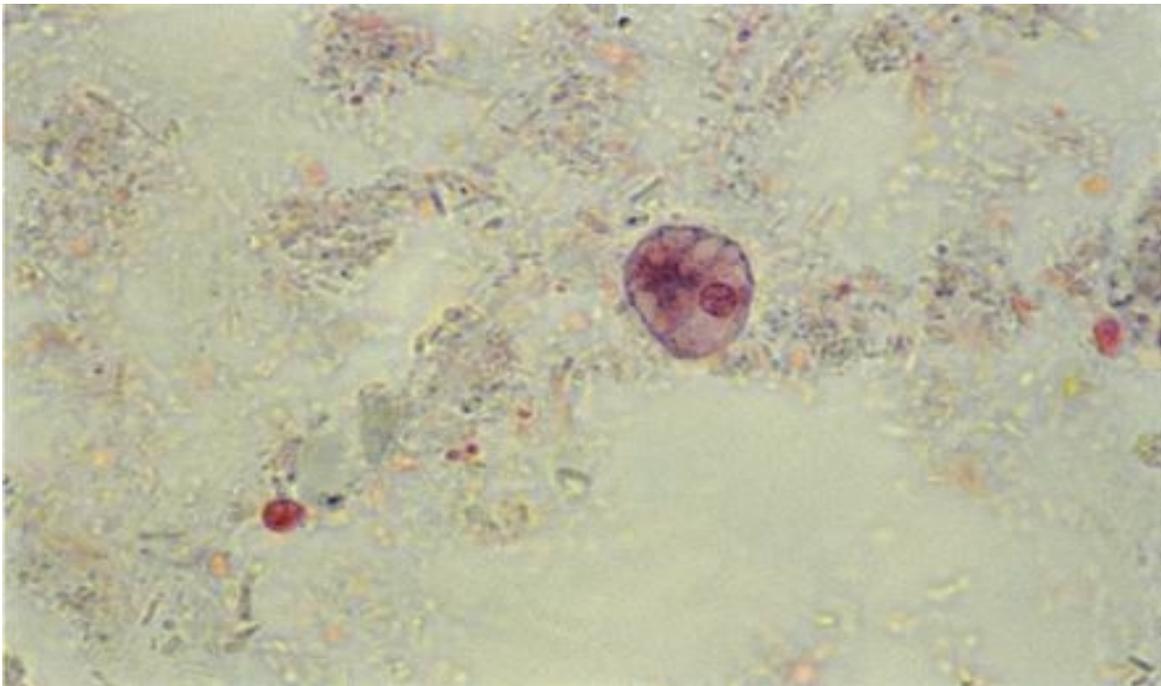


Photo n° 104

Entamoeba polecki. Forme végétative avec nombreuses vacuoles et éléments phagocytés. Amas chromatinien périphérique (= nucléoles). Coloration trichrome. Obj. X 100.

ENDOLIMAX NANUS

FORME VÉGÉTATIVE

Kyste: p. 158

Cette espèce fut décrite chez l'Homme en 1917 par Kuenen et Swellengrebel.

Il s'agit d'une espèce non pathogène, commensale du colon, fréquente dans tous les pays du monde.

ÉTUDE À FRAIS

Taille : petite 5-12 μm , pouvant rarement atteindre 15 μm .

Forme et mobilité

Emet de nombreux pseudopodes à la fois, pseudopodes clairs, arrondis : l'amibe ressemble à une grappe de boules transparentes. Pas de déplacement progressif ou directionnel à la température du laboratoire.

Réchauffée, la forme végétative d'*E. nanus* observée dans les diarrhées ou les cultures et examinée à 37°C (étuve de Foot), s'étire, s'allonge. Chaque pseudopode devient digitiforme : l'amibe ressemble à un filament mycélien ramifié.

Résistance

C'est une amibe résistante que nous trouvons encore bien mobile 8 à 10 heures après l'émission des selles, à la température du laboratoire.

Elle semble s'accommoder assez vite de la température ambiante : lorsqu'on l'examine immédiatement après l'élimination des selles, elle est saisie par le froid et reste immobile pendant une bonne dizaine de minutes. Mais si on ne l'observe qu'environ 20 minutes plus tard, elle émet ses petites boules transparentes de façon très active. Plusieurs heures après, elle émet moins de pseudopodes, mais dès qu'on la réchauffe un peu, son activité revient immédiatement.

Cytoplasme

Petites vacuoles nettes (*Dientamoeba fragilis* a des vacuoles moins nettes). Peu d'inclusions : quelques bactéries et rarement des levures, ceci en relation avec la petite taille des amibes.

Présence de *Sphaerita* possible.

Noyau : non visible à frais.

COLORATION APRÈS HÉMATOXYLINE FERRIQUE

ÉTUDE DU NOYAU

Taille : plus petit que celui de *I. butschlii*.

Structure : membrane nucléaire mince se colorant un peu mieux que pour *I. butschlii*. Caryosome de grande taille, de forme et localisation très variable

- arrondi, central, occupant presque tout le noyau ;
- ovale, excentrique (comme certains *I. butschlii*) ;
- en croissant périphérique, pouvant parfois être confondu avec un noyau d'Entamibe. Il peut être parasité par une Nucleophaga ayant l'aspect de sphérules plus ou moins nombreuses, de 1 µm de taille, le noyau hypertrophié pouvant alors atteindre 8 µm de diamètre (138).

En principe, le noyau d'*Endolimax nanus* diffère de celui de *I. butschlii* par sa taille et par l'absence de granulations autour du caryosome (= chromosomes), qui sont bien colorées par l'A.P.V. trichrome pour *I. butschlii*. En pratique, la distinction entre ces deux espèces est délicate, et il est difficile, en l'absence de kystes, de déterminer, dans une préparation où il y a des amibes de toutes tailles, la présence seule d'*I. butschlii* ou une association d'*I. butschlii* et d'*E. nanus*.

COLORATION TRICHROME

Dimensions : moyenne 7 µm, minimum 4,4 µm, maximum 11,1 µm.

Aspect général : les pseudopodes nombreux à frais, sont plus rares après fixation par l'A.P.V. Ils sont clairs et arrondis.

Cytoplasme : petites vacuoles nettes. Les bactéries et levures ingérées sont rares. Le cytoplasme est assez « propre » contrairement à celui d'*I. butschlii*.
Sphaerita possible.

Noyau :

Taille : plus petit que celui d'*I. butschlii*.

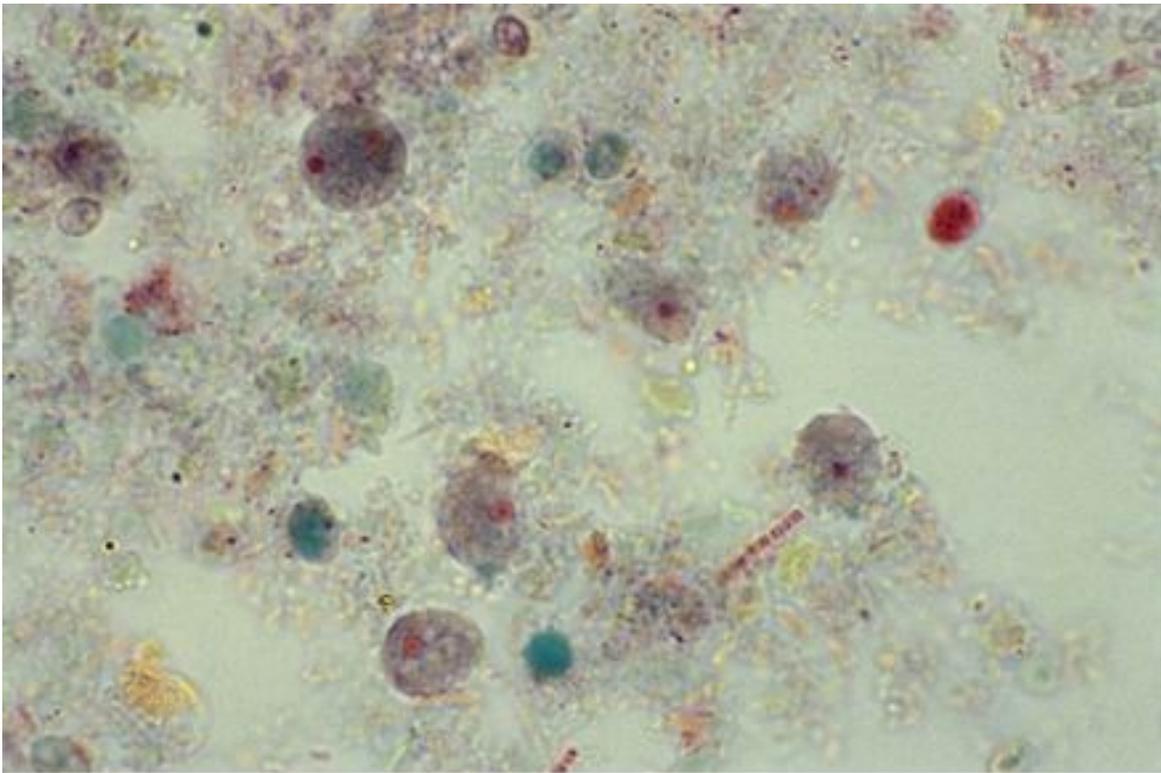


Photo n° 105

E. nanus. Nombreuses formes végétatives dont une (la plus grande) en division avec deux noyaux. Coloration trichrome. Obj. X 100.

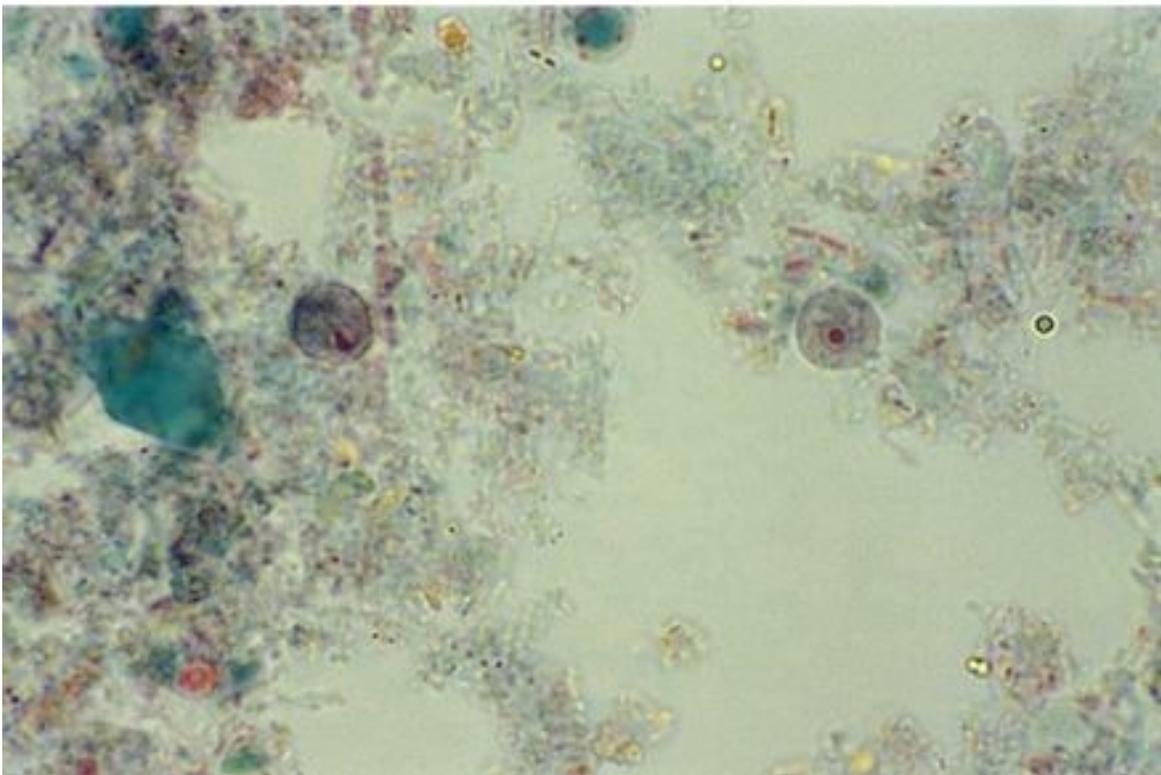


Photo n° 106

E. nanus. Deux formes végétatives, dont une avec un caryosome en forme de croissant. Coloration trichrome. Obj. X 100.

Structure : membrane nucléaire mince se colorant mal, sans granulations chromatiniennes.

Caryosome de grande taille, de forme et localisation très variable :

- le plus souvent arrondi, central, occupant presque tout le noyau ;
- parfois ovulaire ou de forme irrégulière, excentré (comme certains *I. butschlii*) ;
- souvent en croissant périphérique, tangent à la membrane ;
- parfois la chromatine est fragmentée en masses de différentes tailles, disposées le long de la membrane nucléaire avec une petite masse centrale ou subcentrale, l'aspect prêtant à confusion avec un noyau d'entamibe. Ces formes sont plus fréquentes après réactivation. (140).

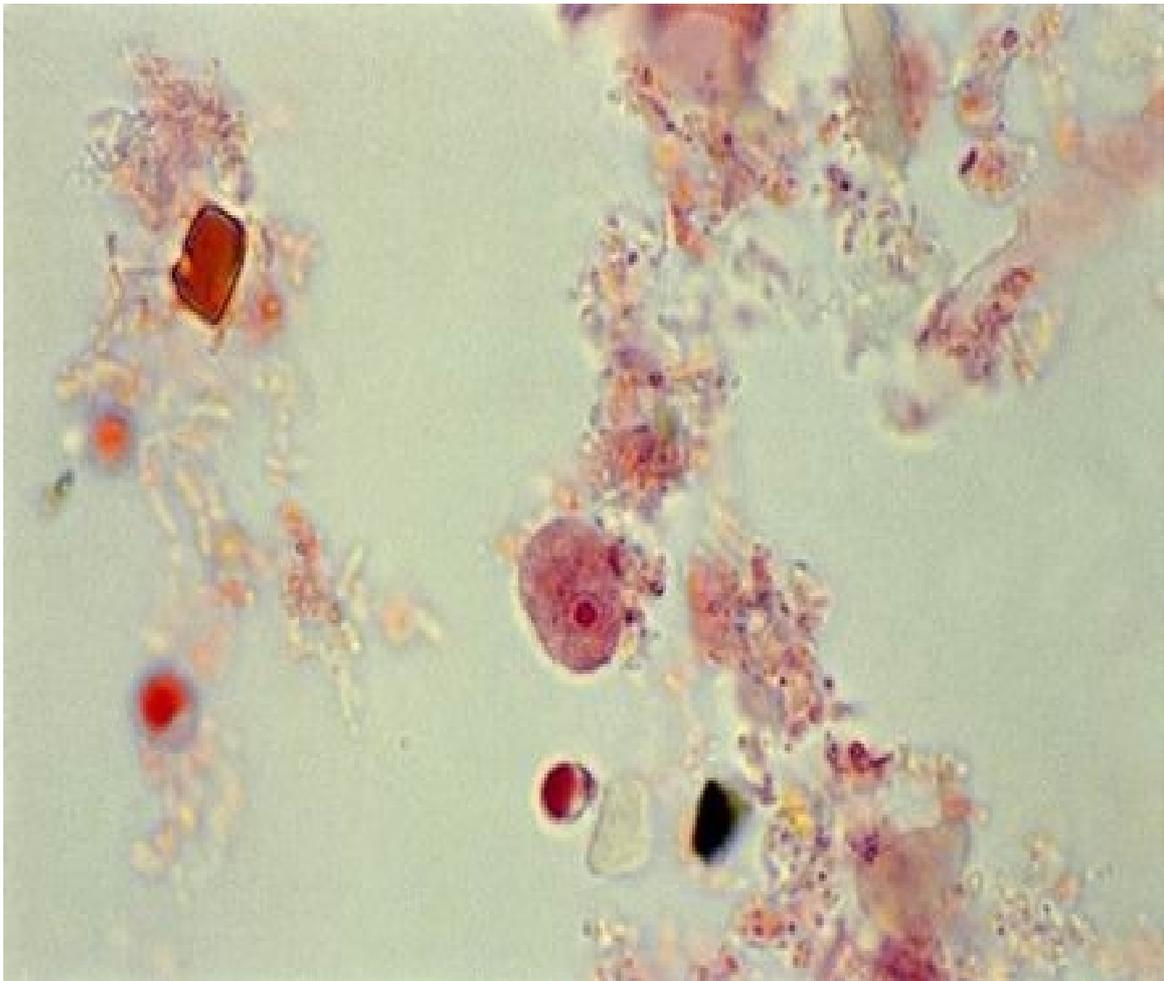


Photo n° 107

E. nanus. Forme végétative. Noyau caractéristique avec un gros caryosome arrondi, une membrane nucléaire mince. Absence de granulations péricaryosomiennes et d'épaississements de la chromatine périphérique. Coloration trichrome. Obj. X 100.

IODAMOEBA BUTSCHLII
Synonymes *Iodamoeba williamsi*, *Pseudolimax butschlii*
FORME VEGETATIVE

Kyste : p. 162

Tableau V : Formes végétatives d'*Iodamoeba butschlii*
Résultats du test du Contrôle National de Qualité en Parasitologie en France

Date d'envoi	Nombre de réponses	Richesse*	Résultats conformes	Deuxième réponse en %**	Troisième réponse en %**
11/1992	1183	1 Coloration : Trichrome	9,7% (1)	<i>Entamoeba coli</i> 26,1	<i>Endolimax nanus</i> 9,2

* La richesse moyenne = nombre de champs Obj. X 40 nécessaires pour trouver un parasite.

** Parasites absents de la selle.

(1) Associé avec des kystes et formes végétatives d'*Entamoeba histolytica*, de *Giardia intestinalis* et des formes végétatives d'*Entamoeba hartmanni*.

Cette amibe vit dans le colon, il n'y a pas de preuve de sa pathogénicité.

Fréquence : cette amibe est rarement trouvée en France lors des examens de selles, moins de 1 %, plus fréquente, 2 à 3 %, en Afrique.

Comme *Entamoeba polecki*, c'est une amibe normale du porc et de certains singes (139), mais connue depuis longtemps chez l'homme.

ÉTUDE À FRAIS

Même réfringence que l'amibe dysentérique.

Taille : 8 à 15 µm, donc un peu plus petite qu'*E. histolytica*, un peu plus grande qu'*E. nanus*.

Forme et mobilité

Dans les selles semi-fluides ou de purgation fraîchement émises à la température du laboratoire, l'amibe pousse rapidement un très long pseudopode en doigt de gant, puis elle le retire. Après, elle se contente en général de pousser de nombreux pseudopodes larges et courts, assez transparents, en boules, de façon anarchique, ne menant à aucun déplacement effectif.

Résistance

I. butschlii est peu résistante. Dans la même préparation, à côté des amibes bien vigoureuses, on en voit d'autres en voie de lyse ou complètement lysées : éléments arrondis avec une membrane externe mince, un cytoplasme complètement hyalin contenant un noyau vacuolisé dans lequel se trouve une grosse masse réfringente qui est le caryosome.

Les amibes peuvent aussi se lyser en cours d'examen, et éclater au microscope sous nos yeux en expulsant brusquement le contenu du cytoplasme. Ce phénomène prélude sans doute à l'enkystement. L'association d'amibes actives et d'amibes lysées est presque caractéristique d'*Iodamoeba butschlii*, et comme le noyau se reconnaît facilement dans ces formes lysées, l'identification de l'amibe reste facile.

Cytoplasme : nombreuses vacuoles d'importance moyenne, avec des inclusions nombreuses et diverses comme celles d'*Ent. coli* : bactéries, levures, amidon...

Présence de *Sphaerita* possible.

Noyau : rarement visible chez l'amibe active. Facilement visible et reconnaissable chez l'amibe lysée. Le gros caryosome réfringent et plus ou moins excentré dans une vacuole est le caractère essentiel du noyau de la forme végétative d'*I. butschlii*. Mais quelquefois un noyau de polynucléaire neutrophile peut être pris pour un caryosome.

ÉTUDE DU NOYAU APRÈS HÉMATOXYLINE

Taille : c'est un noyau assez gros, 4-6 μm et vésiculeux.

Structure : membrane très mince se colorant mal, si bien qu'on voit les limites du noyau en négatif, grâce au cytoplasme coloré qui s'arrête au niveau du noyau.

Le caryosome, chez la forme végétative, est une grosse masse arrondie ou ovalaire, irrégulière, en position centrale le plus souvent ou parfois excentrée.

Dans l'espace restreint situé entre la membrane et le caryosome on peut voir, des granulations péricaryosomiennes qui se colorent plus ou moins bien, et qui correspondent aux chromosomes (139).



Photo n° 108

I. butschlii. Forme végétative arrondie. Gros caryosome. Présence de granules péricaryosomiens (= chromosomes) dans le noyau. Coloration Lugol. Obj. X 100.

CAHIER **BIOFORMA**
DE
Formation
version numérique

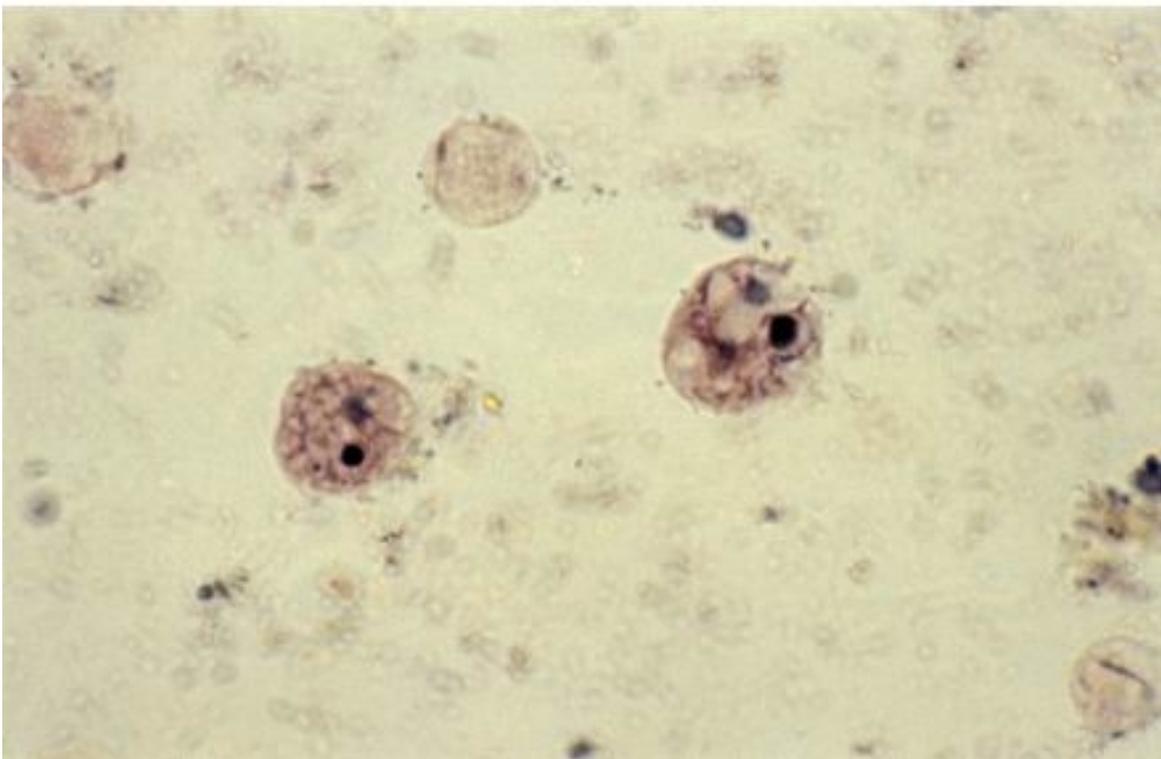


Photo n° 109

I. butschlii. Deux formes végétatives avec vacuoles. Noyaux avec de gros caryosomes. Coloration hématoxyline ferrique. Obj. X 100

COLORATION TRICHROME

Dimensions : diamètre moyen 10,2 à 13,5 µm, minimum 4,4 µm, maximum 37 µm.. L'existence de formes très longues est à souligner.

Aspect général : pseudopodes clairs. L'amibe peut se présenter avec une forme arrondie, ovulaire ou souvent très longue, ressemblant à une limace.

Cytoplasme : nombreuses vacuoles d'importance moyenne, contenant des inclusions abondantes et diverses comme *Ent. coli* : bactéries, levures, amidon. Ces inclusions, plus nombreuses que chez *E. nanus*, donnent au cytoplasme une coloration foncée.

Présence de *Sphaerita* possible.

Noyau : taille : c'est un noyau assez gros, plus gros que celui de *E. nanus*, et vésiculeux.

Structure : membrane mince, ayant l'aspect d'un fin liseré, se colorant mieux au trichrome que par les autres méthodes.

On voit souvent les limites du noyau en négatif, c'est à dire grâce au cytoplasme plus foncé qui s'arrête à la limite du noyau.

Le caryosome, dans la forme végétative se présente sous la forme d'une grosse masse arrondie ou ovulaire, irrégulière, parfois fragmentée, en position centrale le plus souvent, ou parfois excentrée, de coloration rouge brique.

Dans l'espace restreint situé entre la membrane et le caryosome on peut voir des granules péricaryosomiens, correspondant aux chromosomes (139), qui se colorent souvent bien par le trichrome.

Le diagnostic différentiel des F.V. d'*I. butschlii* et d'*E. nanus*, souvent très difficile, est facilité par le trichrome. Cependant, il reste parfois délicat, en particulier pour les petites F.V. d'*I. butschlii*. La présence fréquente de kystes associés assure alors le diagnostic.



Photo n° 110 - *I. butschlii*. Forme végétative allongée de grande taille, ayant l'aspect d'une limace. Coloration trichrome. Obj. X 100.

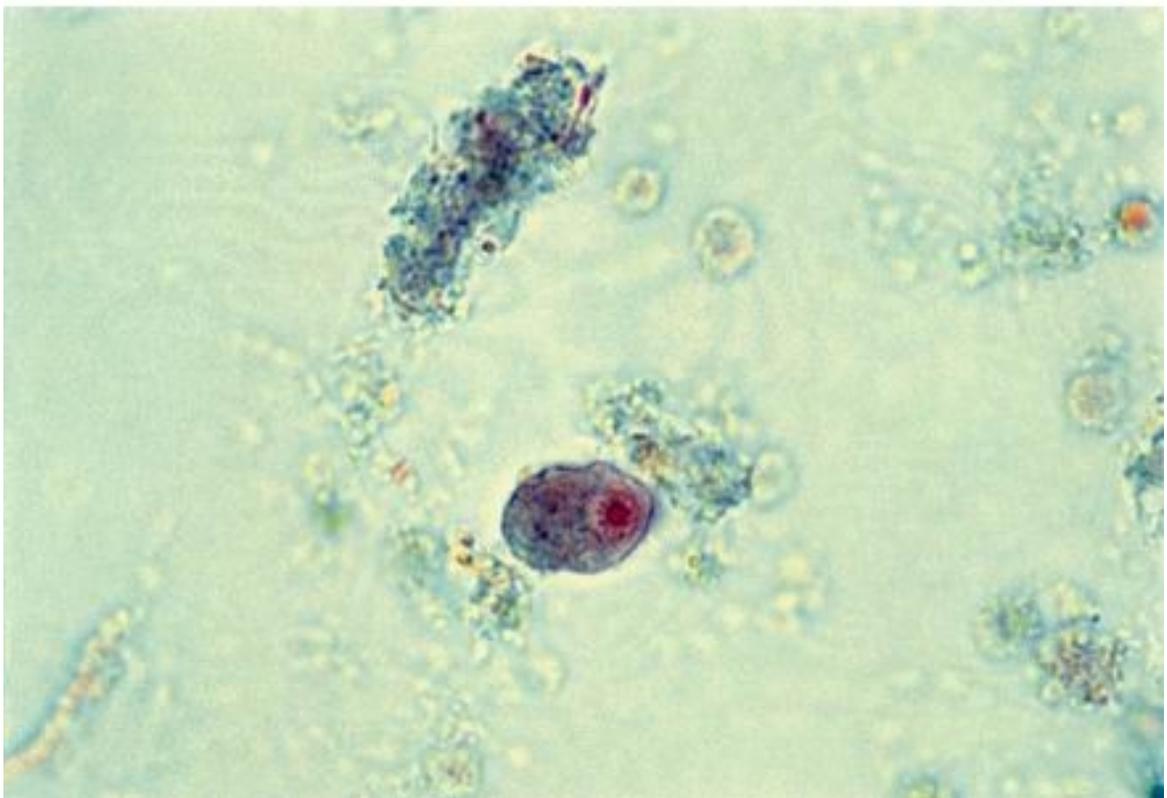


Photo n° 111- *I. butschlii*. Forme végétative. Présence de granules pericaryosomiens (chromosomes). Coloration trichrome. Obj. X 100.

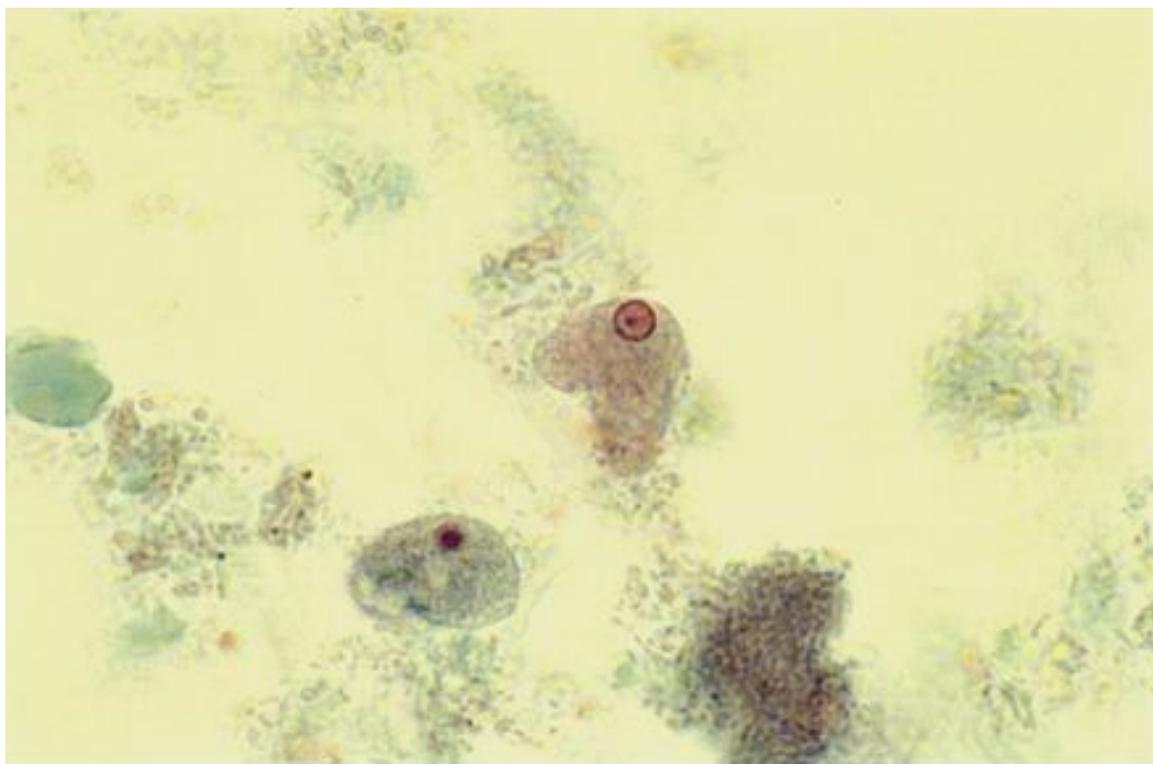


Photo n° 112 - *I. butschlii*. Deux formes végétatives. L'une plus grande, avec un pseudopode et des granulations pericaryosomiennes. Coloration trichrome. Obj. X 100.

CAHIER
DE
Formation
version numérique

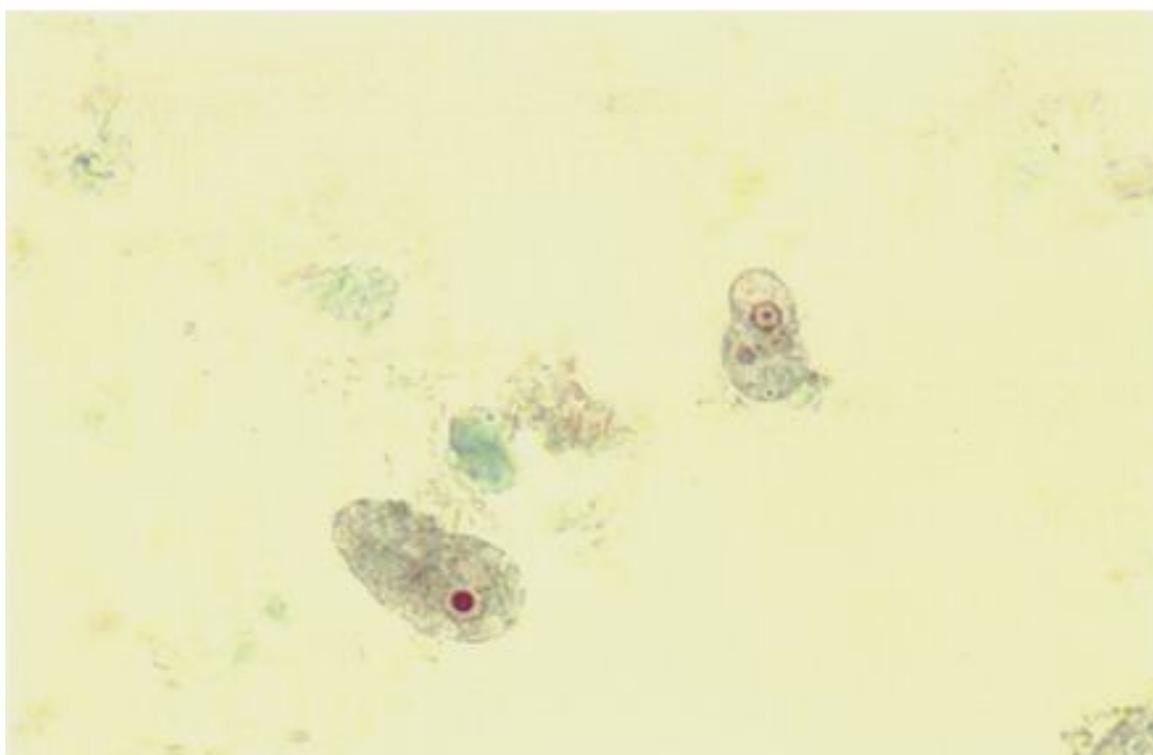


Photo n° 113 - *I. butschlii*. Forme végétative et nombreuses formes végétatives de *Giardia intestinalis*. Coloration trichrome. Obj. X 100.

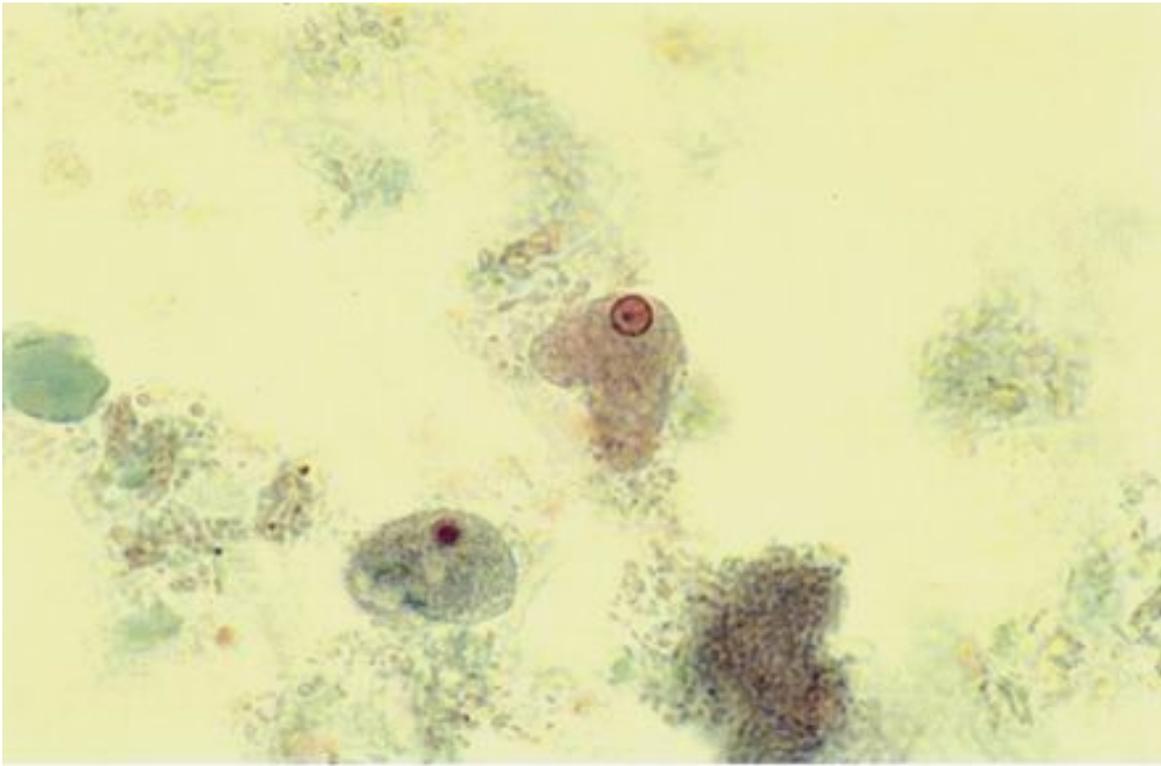


Photo n° 114

I. butschlii. Forme végétative avec un noyau de type « limax » et une forme végétative d'*E. histolytica* / *E. dispar* avec un noyau de type « entamoeba ». Coloration trichrome. Obj. X 100.

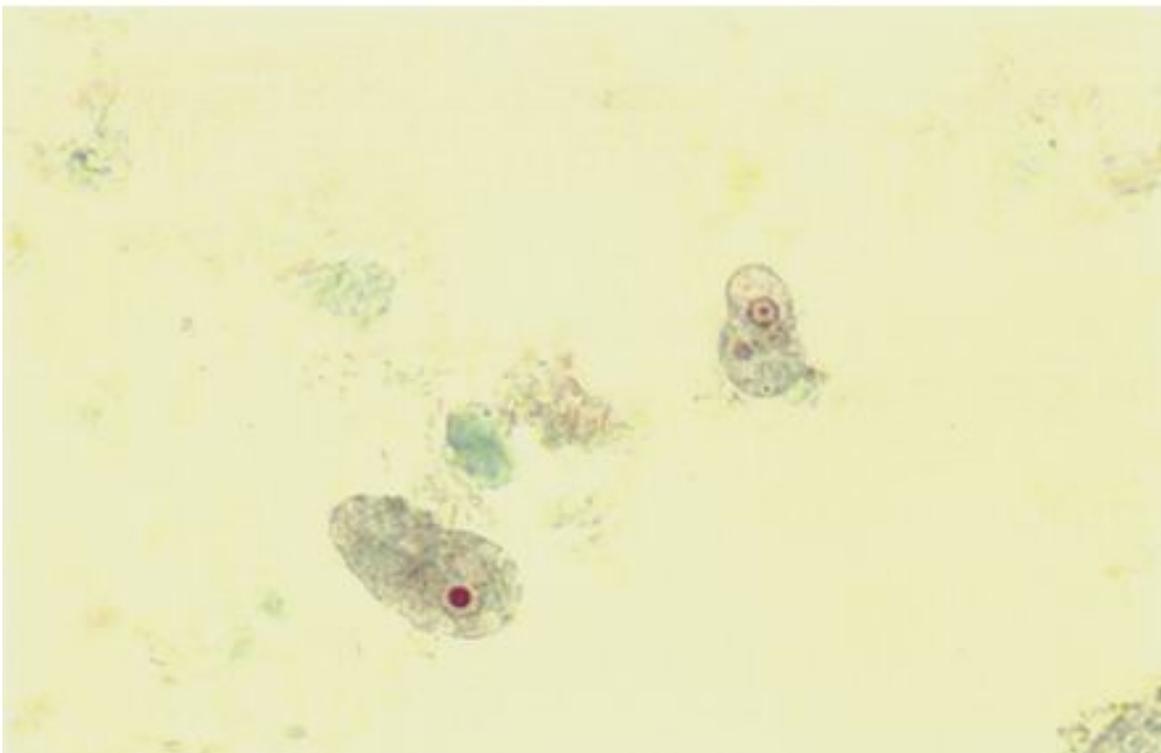


Photo n° 115

I. butschlii forme végétative et *E. hartmanni* forme végétative de taille plus petite. Coloration trichrome. Obj. X 100.

ÉTUDE DES KYSTES D'AMIBES

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Pages

- ÉTUDE DES KYSTES D'AMIBES

• Comment étudier un kyste d'amibe	129
• Schéma différents kystes d'amibes	131
• Kyste d' <i>E. histolytica</i> – <i>Entamoeba dispar</i>	132
• Kyste d' <i>Entamoeba hartmanni</i>	141
• Kyste d' <i>Entamoeba coli</i>	144
• Kyste d' <i>Entamoeba polecki</i>	155
• Kyste d' <i>Endolimax nanus</i>	158
• Kyste d' <i>Iodamoeba butschlii</i>	162

COMMENT ÉTUDIER UN KYSTE D'AMIBE

Les kystes constituent pour les amibes la forme de résistance et de dissémination. La formation des kystes dans l'intestin est irrégulière et intermittente ce qui entraîne l'existence de périodes négatives d'élimination dans les selles.

PRÉKYSTES

Avant de s'enkyster, l'amibe s'immobilise, s'arrondit. Elle évacue de son cytoplasme toutes les inclusions alimentaires et devient un peu plus petite : c'est le prékyste. Tous les prékystes se ressemblent à la taille près : ils sont immobiles, arrondis, dépourvus d'inclusions alimentaires et de vacuoles.

Ils contiennent un noyau, mais si l'on n'arrive pas à voir la structure de ce noyau, on ne peut pas identifier l'espèce correspondante.

KYSTES

Les kystes « se présentent, à un faible grossissement, sous la forme de globules réfringents, à reflet nacré bleu électrique comparable à l'orient d'une perle. Ils paraissent sertis par une bordure plus ou moins fine. Ils tranchent par leur éclat sur le reste de la préparation ».

PLAN À SUIVRE POUR ÉTUDIER UN KYSTE D'AMIBE

Le kyste sera étudié

- à frais
- après coloration (s)
- après concentration (s) éventuellement

ÉTUDE À FRAIS

Taille et **forme** seront appréciées.

Aspect : épaisseur et netteté de la paroi, et réfringence du kyste.

Contenu du kyste selon son degré de maturité.

VACUOLE : pourcentage de kystes avec vacuoles iodophiles. Nombre et taille des vacuoles.

NOYAUX: nombre et visibilité

place : mode de groupement, place par rapport à la vacuole

taille et structure de ceux-ci. Aspect du caryosome.

CRISTALLOÏDES (ou chromidies, ou corps sidérophiles parcequ'ils se colorent en noir à l'hématoxyline ferrique).

Nombre et taille.

Forme : en aiguille pointues, en saucisses, en réseau...

N.B. : selon les espèces d'amibes et la fraîcheur de la préparation les éléments précédents apparaissent plus ou moins nettement, d'où la nécessité de recourir à une coloration.

ÉTUDE APRÈS COLORATION(S)

Peuvent être utilisés principalement :

- le lugol double
- le M.I.F. qui colore le kyste grâce à l'iode présent,
- la coloration de Sargeaunt pour les cristoïdes. (voir p. 34).

La coloration à l'hématoxyline ferrique ou au trichrome ne donne pas de très bons résultats pour les kystes.

ÉTUDE APRÈS CONCENTRATION(S)

- par le Télémann-Rivas (solution acide non formolée)
- par le Bailenger
- par le Thébaud simplifié (solution acide formolée à 10 %).

RÉSISTANCE DES KYSTES (voir p. 59)

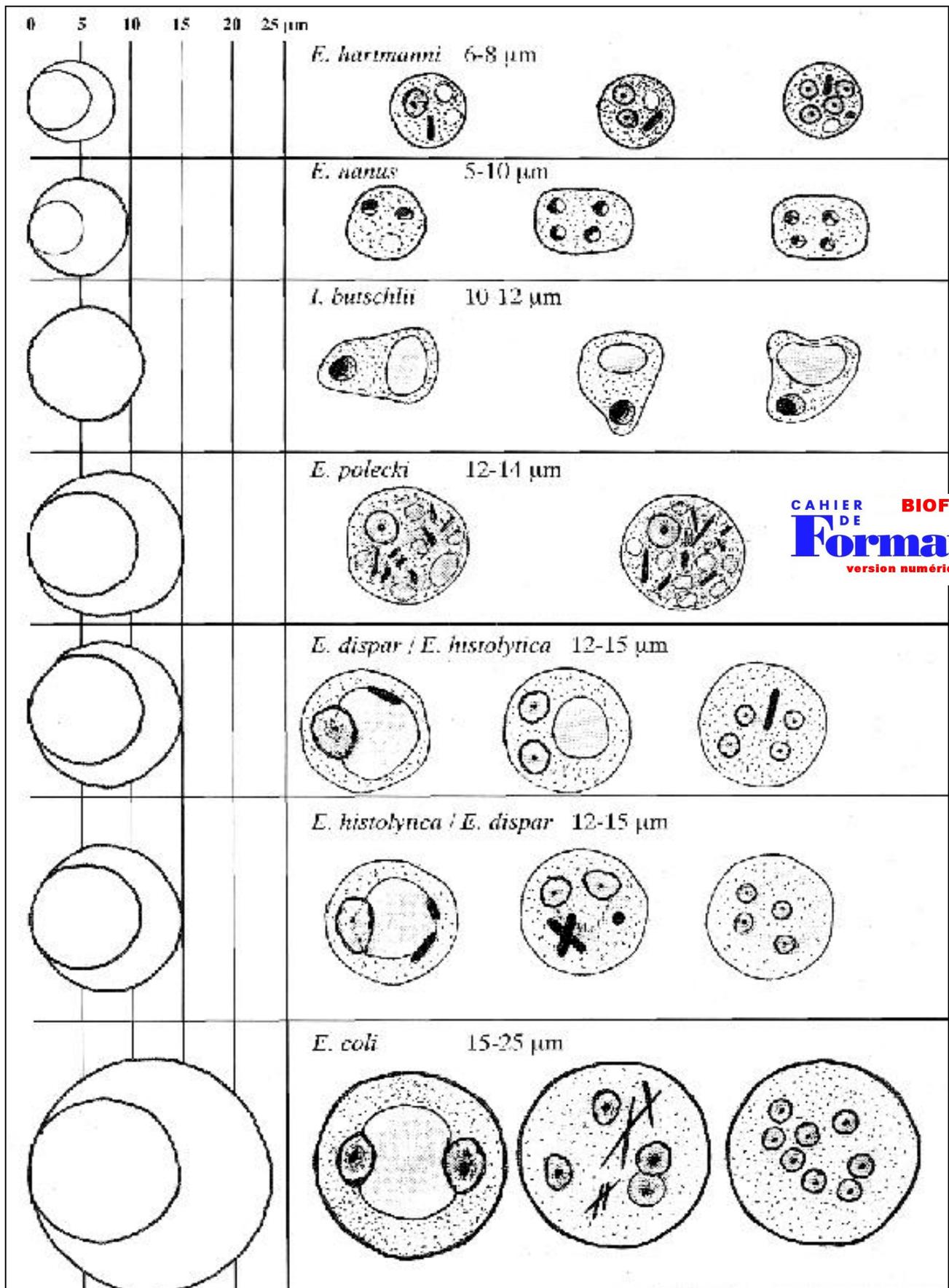


Figure 5 : Kystes d'amibes

ENTAMOEBA HISTOLYTICA

ENTAMOEBA DISPAR

KYSTE

Forme végétative : p. 132

Tableau VI : Kystes d'*Entamoeba histolytica*
(*Entamoeba dispar*)
Résultats des tests du Contrôle National de Qualité en Parasitologie de France

Date d'envoi	Nombre de réponses	Richesse*	Résultats conformes	Deuxième réponse en %**	Troisième réponse en %**
07/1980	1420	2,5	56 %	<i>Entamoeba coli</i> 25,7	<i>Entamoeba hartmannii</i> 1,4
02/1984	1077	1 (+F.V.)	72,9 % (1)	<i>Entamoeba coli</i> 35	<i>Entamoeba hartmannii</i> 2,5
06/1984	1132	5 (+F.V.)	76 %	<i>Entamoeba coli</i> 19,1	<i>Iodamoeba butschlii</i> 10,45
01/1985	1075	1 (+F.V.)	69,5 % (2)	<i>Entamoeba hartmannii</i> 6,6	<i>Entamoeba coli</i> 3,8
03/1989	1152	5	52 %	<i>Entamoeba coli</i> 24,6	Abs de parasites 4,9
13/1991	2323	1 (+F.V.)	24,5 % (3)	<i>Entamoeba hartmannii</i> 4,6	<i>Endolimax nanus</i> 2,7
11/1994	1188	2,5	33,7 %	<i>Entamoeba coli</i> 32,2	<i>Iodamoeba butschlii</i> 18,5

* La richesse moyenne = nombre de champs Obj. X 40 nécessaires pour trouver un parasite.

** Parasites absents de la selle.

(1) Associé avec des kystes de *Giardia intestinalis*.

(2) Associé avec des kystes d'*Endolimax nanus*.

(3) Associé avec des kystes et formes végétatives d'*Entamoeba histolytica* et des kystes d'*Entamoeba coli* diagnostiqués par 92,9 % des participants.

Il est à signaler que les kystes d'*E. histolytica* et d'*E. dispar* ont la même morphologie, de même que ceux d'*E. moshkovskii* et que c'est par des études complémentaires à celle du microscope optique que le diagnostic précis de ces espèces peut seulement être fait voir forme végétative d'*E. histolytica*, *E. dispar* et *E. moshkovskii*.

ÉTUDE DU KYSTE D'*E. HISTOLYTICA* / *E. DISPAR* À FRAIS

Taille et forme :

12 à 14 µm en moyenne. Les kystes jeunes sont plus grands.

Ces kystes sont arrondis en général, mais peuvent être aussi parfois ovalaires.

Contour et aspect :

Le kyste est entouré d'une double coque comme celui d'*Ent. coli*. Mais ici aussi, il est difficile de mettre cette double coque en évidence à frais. Tout ce qu'on distingue est un contour net, assez épais, réfringent. Si l'on a la chance d'avoir les deux kystes d'*Ent.*

coli et d'*E. histolytica* / *E. dispar* dans le même champ microscopique, on se rendra compte que la coque de ce dernier est moins épaisse et moins réfringente que celle du premier.

Le kyste lui-même est brillant, se détachant comme une perle sur le fond de la préparation.

Les cristoalloïdes

Il s'agit d'éléments incolores et réfringents, qu'on peut rencontrer dans un certain nombre de kystes, surtout les jeunes kystes, et qui disparaissent au fur et à mesure que le kyste mûrit.

Chez les kystes d'*E. histolytica* / *E. dispar* ils sont caractéristiques par rapport à ceux d'*Ent. coli* : ces cristoalloïdes sont en effet trapus, à extrémités arrondies, en saucisse, de longueur variable, droits ou légèrement incurvés. Ils se voient assez facilement à frais sur le fond uniforme du kyste.

Contenu du kyste selon le stade

KYSTE À 1 NOYAU :

Il ne faut pas confondre ce kyste avec celui d'*Iodamoeba butschlii* qui, lui aussi, a un seul noyau, mais de structure complètement différente.

Le kyste à 1 noyau d'*E. histolytica* / *E. dispar* peut avoir ou non une vacuole. On voit nettement le noyau d'Entamibe en activité, noyau de grande taille, occupant le 1/3 ou presque la moitié du diamètre du kyste.

Les cristoalloïdes, lorsqu'ils existent, se trouvent sur le pourtour de la vacuole.

KYSTE À 2 NOYAUX :

La vacuole peut être présente ou non. Les 2 noyaux visibles se trouvent le plus souvent côte à côte et non diamétralement opposés par rapport à la vacuole, différence importante d'avec les kystes d'*Ent. coli*.

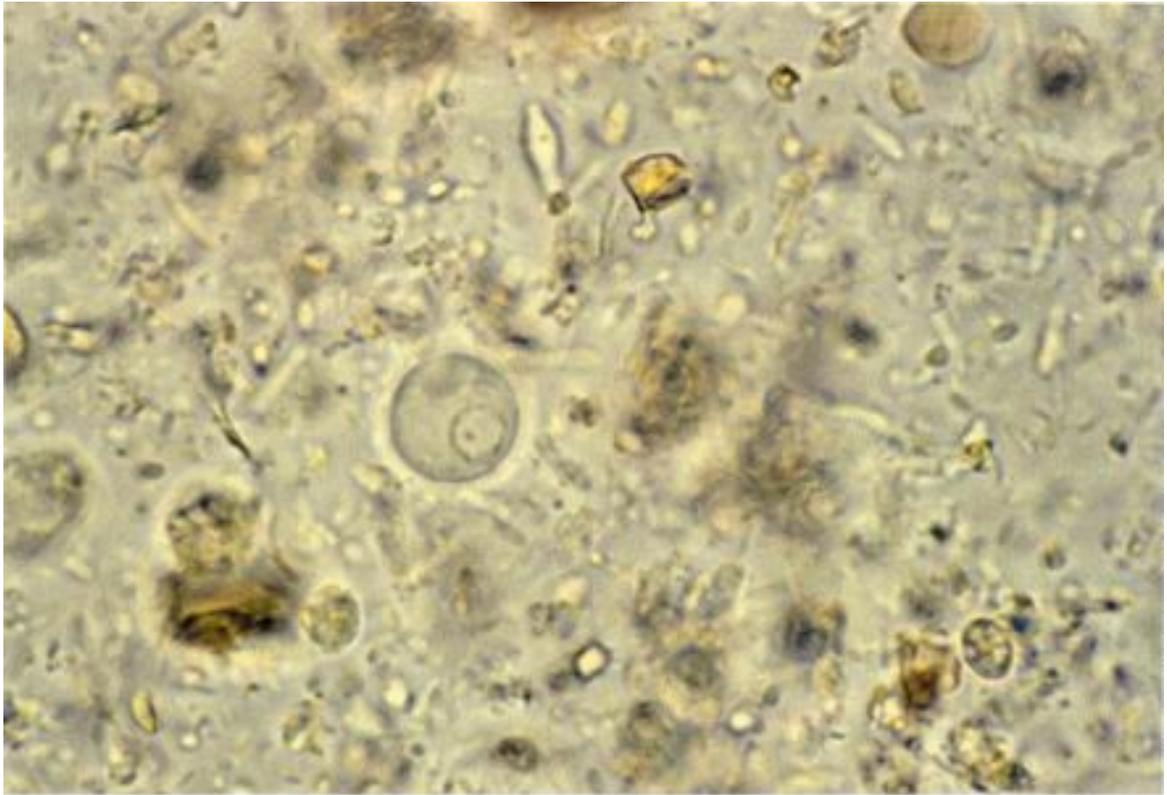


Photo n° 116

E. histolytica/*E. dispar*. Kyste à un noyau. Sans coloration. Obj. X 100.



Photo n° 117

E. histolytica / *E. dispar*. Kyste à un noyau (même selle que la photo précédente). Coloration Lugol. Obj. X 100.



Photo n° 118

E. histolytica / *E. dispar*. Deux noyaux et un corps sidérophile visible. Coloration Lugol. Obj. X 100.

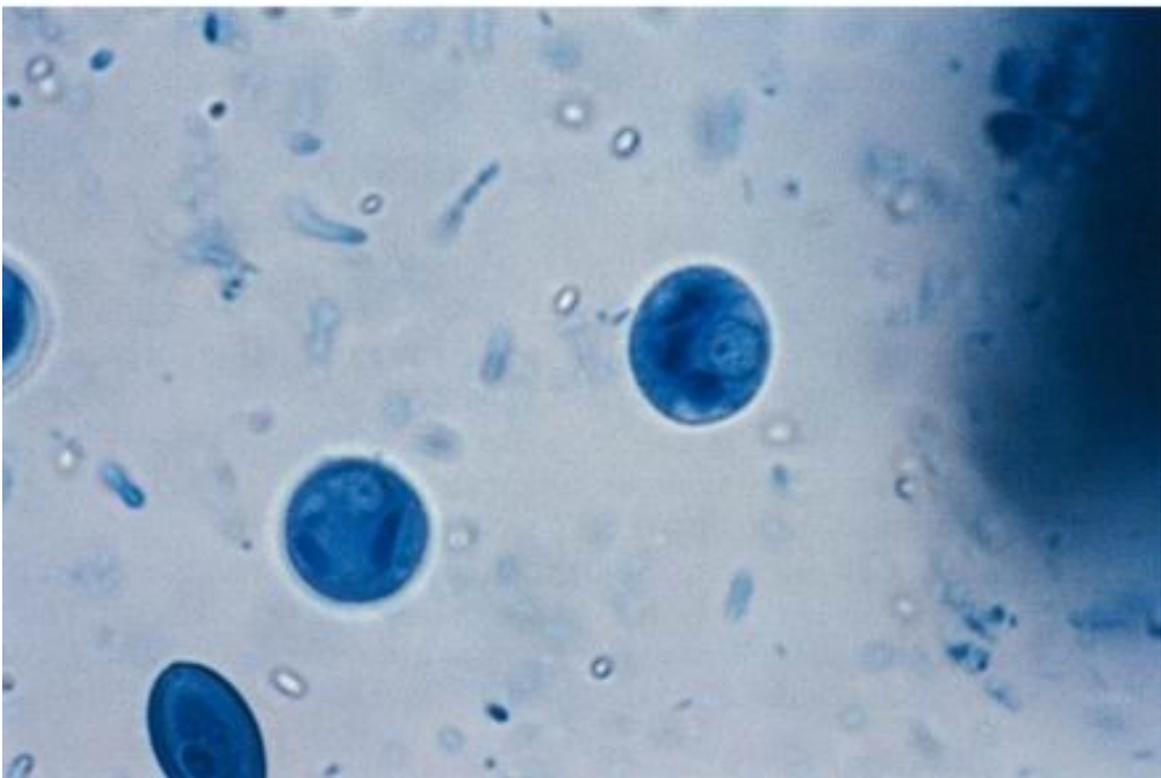


Photo n° 119

E. histolytica / *E. dispar*. Deux kystes avec un noyau visible. Plusieurs corps sidérophiles dans chaque kyste. Coloration Sargeaunt. Obj. X 100.

KYSTE À 4 NOYAUX :

Dans les kystes bien mûrs, la vacuole ainsi que les cristalloïdes ont disparu. Le cytoplasme est brillant, apparemment vide. Il est bien rare qu'on arrive à voir les quatre petits noyaux, à frais.

S'il existe encore des cristalloïdes ou la vacuole, ces noyaux sont souvent groupés 2 par 2. Autrement ils sont tous ensemble comme dans un kyste d'*Entamoeba coli*.

KYSTE À PLUS DE 4 NOYAUX : ils sont rarement observés, dans seulement 4 % des selles contenant des kystes d'*E. histolytica* / *E. dispar*.

ÉTUDE DU KYSTE D'*ENTAMOEBEA HISTOLYTICA* / *E. DISPAR* APRÈS COLORATIONS

Coloration au Lugol :

On distingue mal les petits noyaux si le cytoplasme du kyste prend trop fortement: le colorant. Les cristalloïdes se détachent en clair, les vacuoles en brun acajou, et les noyaux en brun noir. Mais la coloration n'est pas toujours très satisfaisante.

Coloration au M.I.F. :

C'est la meilleure coloration. Sur un fond rouge, les kystes se détachent en clair, incolore, et sur le fond incolore du cytoplasme les noyaux apparaissent nettement comme dessinés à l'encre. Les cristalloïdes restent incolores. Les vacuoles sont acajou en début de coloration mais se décolorent progressivement en quelques heures.

Coloration à l'hématoxyline ferrique :

Sans intérêt pratique. Les cristalloïdes sont noirs et, lorsqu'ils sont nombreux, cachent tous les noyaux. Le caryosome des noyaux est souvent excentré.

Coloration de Sargeant : elle assure la meilleure visibilité des cristalloïdes.

ÉTUDE DES KYSTES D'*E. HISTOLYTICA* / *E. DISPAR* APRÈS CONCENTRATIONS

Télémann-Rivas :

Sous l'influence de cette concentration la coque du kyste d'*E. histolytica* / *E. dispar* se dédouble nettement en deux contours concentriques séparés par un espace plus ou moins grand, le contour externe étant très fin et le contour interne plus épais, plus net.

Ce phénomène peut s'observer avec tous les autres kystes d'amibes, à l'exception de celui d'*Ent. coli*, ce qui permet en pratique, un diagnostic différentiel entre les kystes des deux espèces. Mais avant d'appliquer cette méthode il faut savoir :

- que les kystes d'*Ent. coli* peuvent présenter un faux dédoublement : ce n'est pas la coque qui se dédouble mais le cytoplasme qui s'est rétracté et qui laisse ainsi un vide entre la coque et son contenu. Dans ce cas : le contour externe reste épais, tandis que la limite interne correspondant à la membrane cytoplasmique est mince et déformée.

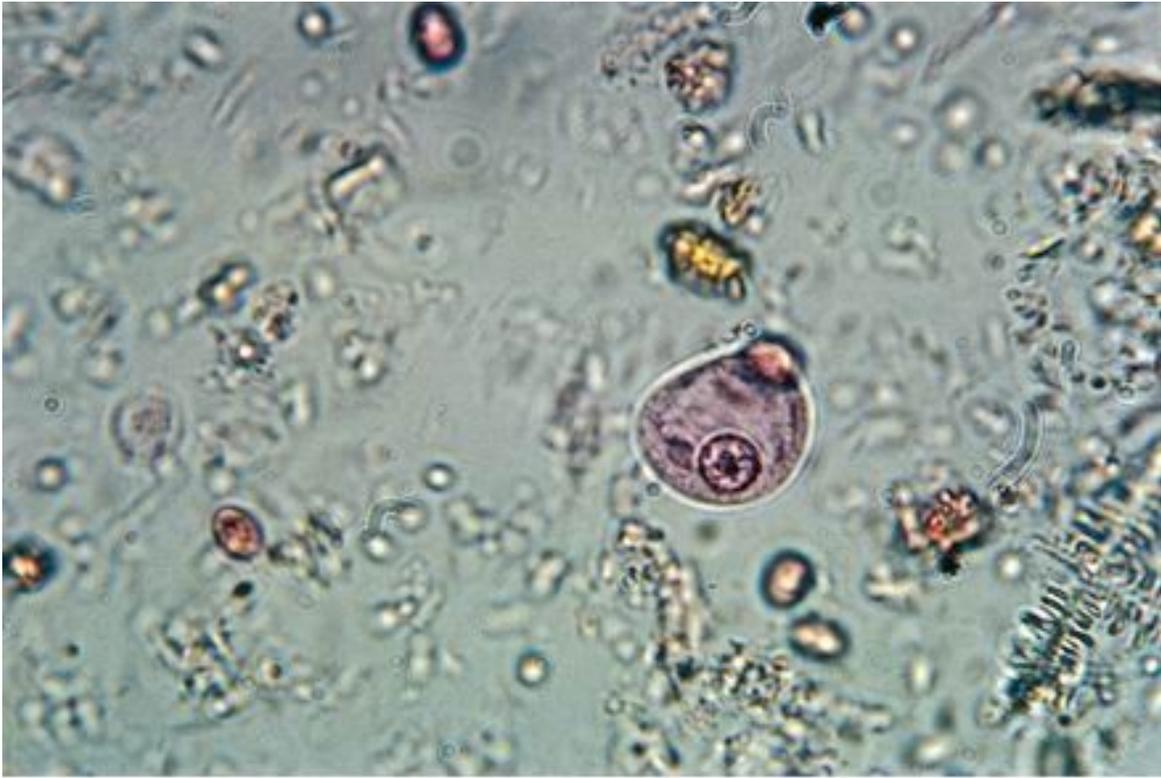


Photo n° 120
E. histolytica / *E. dispar*. Kyste à un grand noyau et une grande vacuole. Coloration M.I.F.
Obj. X 100.



Photo n° 121
E. histolytica / *E. dispar*. Kyste avec 2 noyaux voisins et une petite vacuole. Coloration M.I.F.
Obj. X 100.

- que ce phénomène peut dépendre de la vitesse comme de la durée de la centrifugation. Il faut donc faire des essais avec des kystes dûment identifiés.
- que les kystes d'*Ent. coli* conservés longtemps au réfrigérateur peuvent être abîmés et présenter un dédoublement.
- que le Télémann-Rivas n'est pas une technique élective pour concentrer les kystes d'*E. histolytica*/*E. dispar*, et qu'il vaut mieux, si l'on utilise cette méthode en routine, s'adresser à des moyens plus efficaces en vue de la recherche de kystes d'amibe dysentérique.

Thébaut simplifié :

Cette méthode concentre très bien les kystes d'*E. histolytica* / *E. dispar* mais elle n'est pas assez efficace pour de nombreux autres parasites. Aussi lorsque nous voyons des kystes d'Entamibes présentant un dédoublement de la coque, que nous désirons obtenir beaucoup de ces derniers intacts qui faciliteront l'identification, ou lorsque nous avons une recherche précise de kystes d'amibes, c'est à elle que nous recourrons.

Ces kystes seront au besoin colorés avec du M.I.F. dilué. Mais en général tous les noyaux deviennent visibles au bout d'une dizaine de minutes à une demi-heure.

KYSTE D'*E. DISPAR* (voir p. 132)

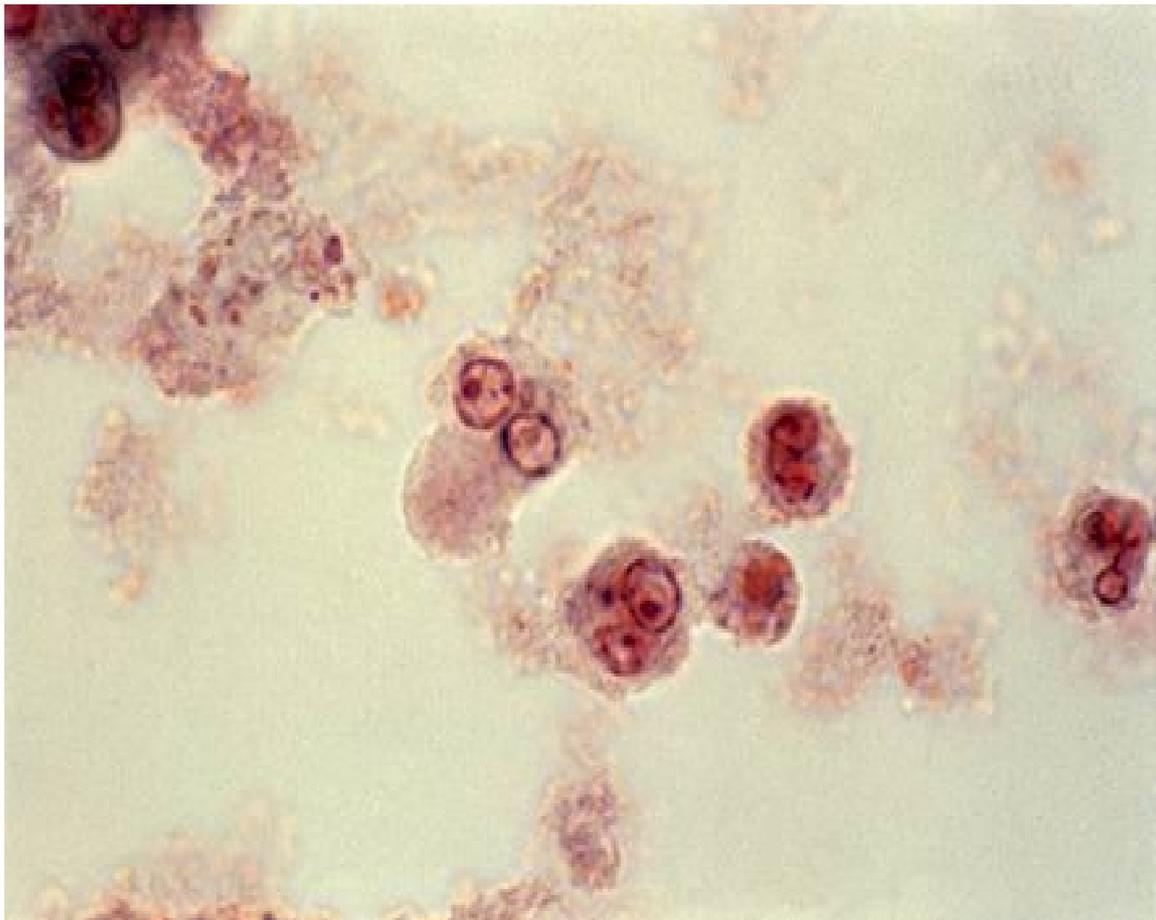


Photo n° 122

Polynucléaires neutrophiles plus ou moins altérés dans une glaire. L'aspect du noyau évoque celui d'une entamibe en particulier *E. histolytica* / *E. dispar*. Coloration trichrome. Obj. X 100.

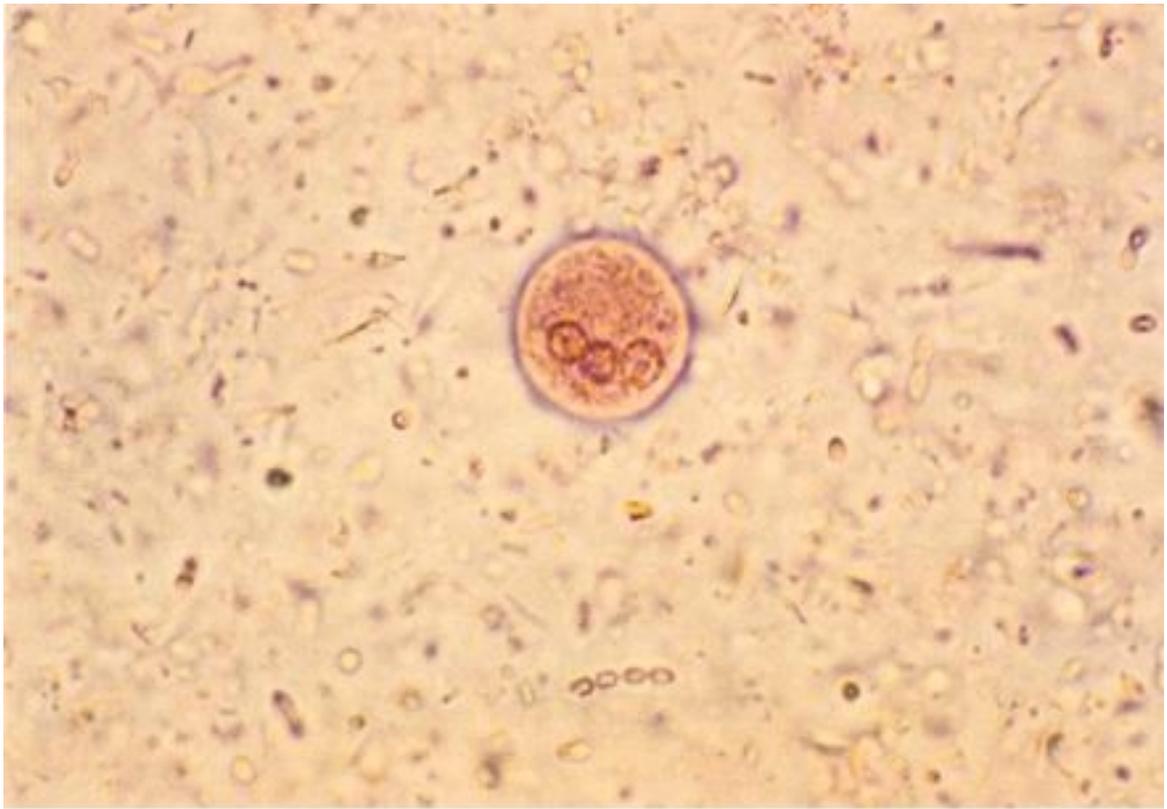


Photo n° 123

E. histolytica / *E. dispar*. Kyste avec trois noyaux visibles. Coloration M.I.F. Obj. X 100.

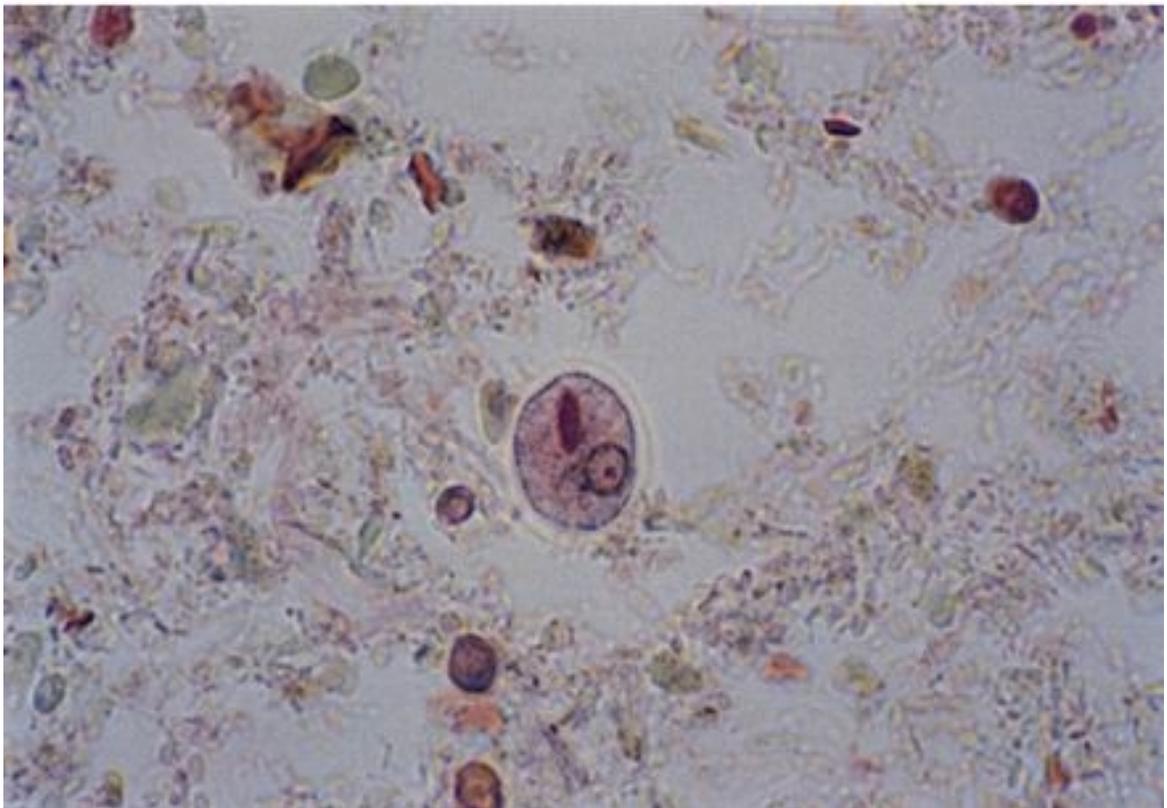


Photo n° 124

E. histolytica / *E. dispar*. Kyste avec un noyau visible et un corps sidérophile. Coloration trichrome. Obj. X 100.

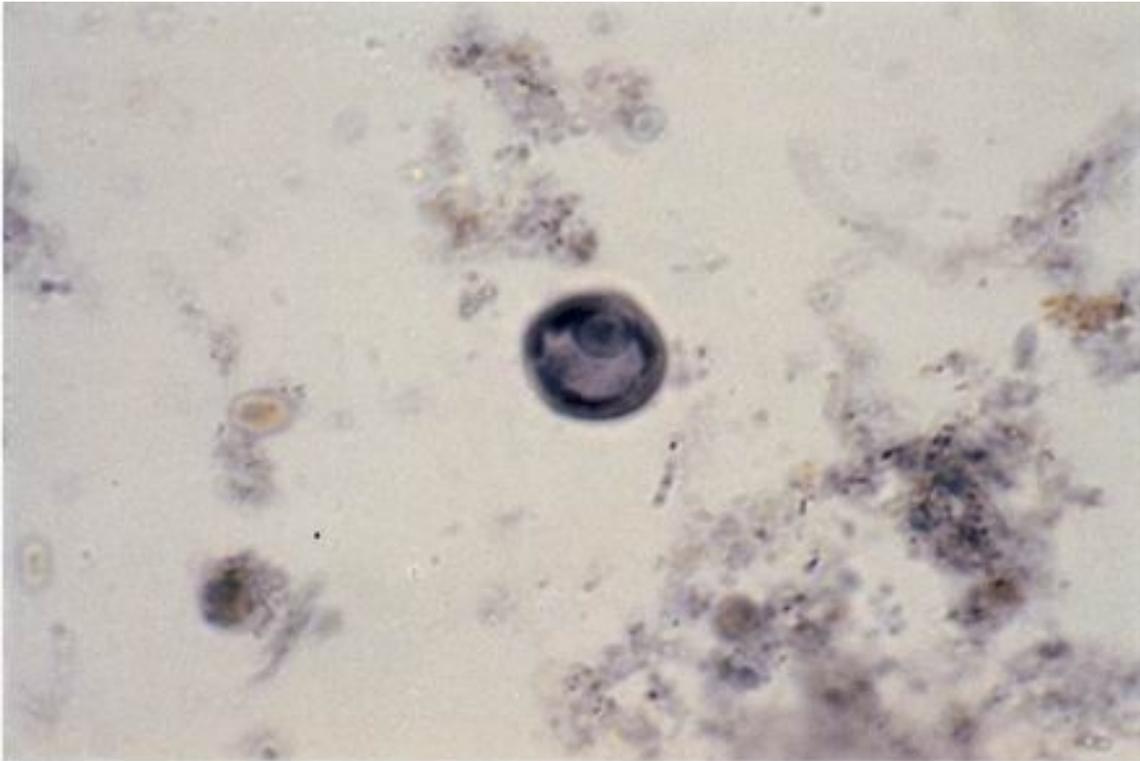


Photo n° 125

E. histolytica / *E. dispar*. Kyste à un grand noyau et une grande vacuole. Coloration hématoxyline ferrique. Obj. X 100.



Photon n° 126

E. histolytica / *E. dispar*. Kyste à un noyau visible et deux corps sidérophiles. Coloration hématoxyline ferrique. Obj. X 100.

ENTAMOEBIA HARTMANNI **KYSTE**

Forme végétative : p. 96

L'élément le plus caractéristique est sa petite taille. Il est à étudier après coloration par le Lugol, le M.I.F., la coloration de Bailenger ou celle de Sargeant pour mettre en évidence les corps sidérophiles (= cristalloïdes), s'ils sont présents.

Taille : 4-8 μm (121)

plus petit que celui d'*E. histolytica*

Forme : Arrondie, parfois ovalaire

Contour : Net et réfringent

Très différent du kyste d'*E. nanus*

Vacuoles : Petites vacuoles se colorant mal au Lugol, présentes dans de nombreux kystes (121)

Kyste à un noyau : Noyau occupant 25 à 40 % du diamètre du kyste, soit inférieur à la moitié du diamètre du kyste.

Cristalloïdes : Fréquents, forme et abondance comme pour *E. histolytica* bien visibles après coloration de Sargeant (44)

Kyste à 4 noyaux : Noyaux fins, de 1 à 2 μm (121)

En résumé, le kyste d'*E. hartmanni* se différencie du kyste d'*E. histolytica* / *E. dispar* par sa plus petite taille et par le nombre de vacuoles. En pratique, on considère qu'un kyste à quatre noyaux ayant une taille supérieure à 10 μm est celui d'*E. histolytica* / *E. dispar* et qu'un kyste ayant une taille inférieure à 8 μm est celui d'*E. hartmanni*.

La coloration au M.I.F. permet de voir nettement les noyaux de ces petits kystes et la concentration de Thébaud est très efficace.

KYSTE D'*E. MOSHKOVSKII*

voir p. 94



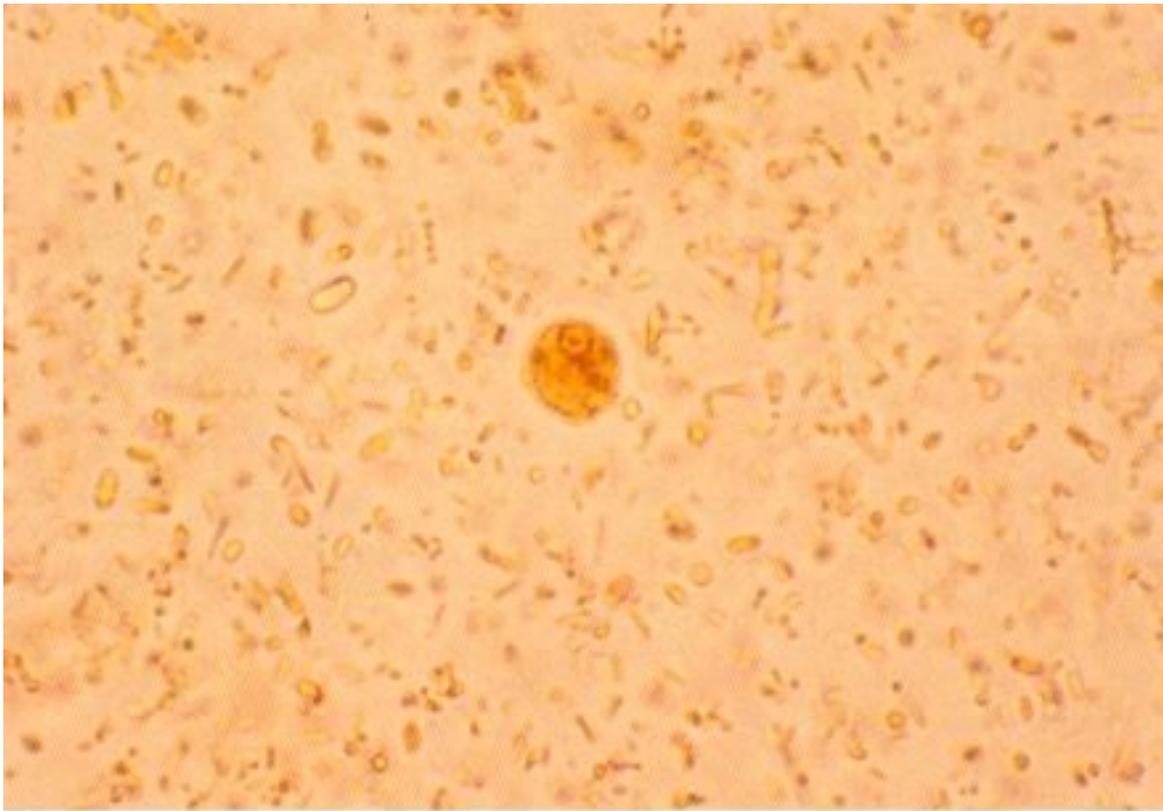


Photo n° 127
E. hartmanni. Kyste à un noyau. Cristalloïdes à peine visibles. Coloration Lugol. Obj. X 100.

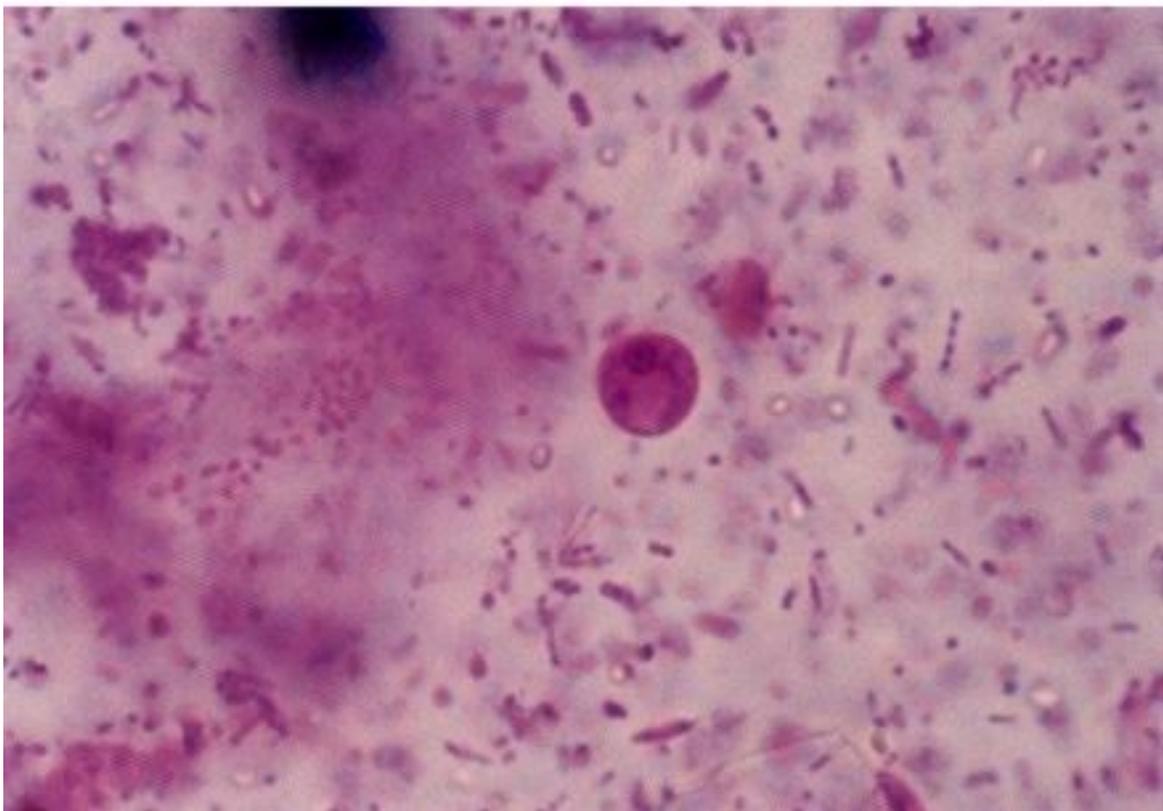


Photo n° 128
E. hartmanni. Kyste à un noyau avec une grande vacuole. Coloration Bailenger. Obj. X 100.

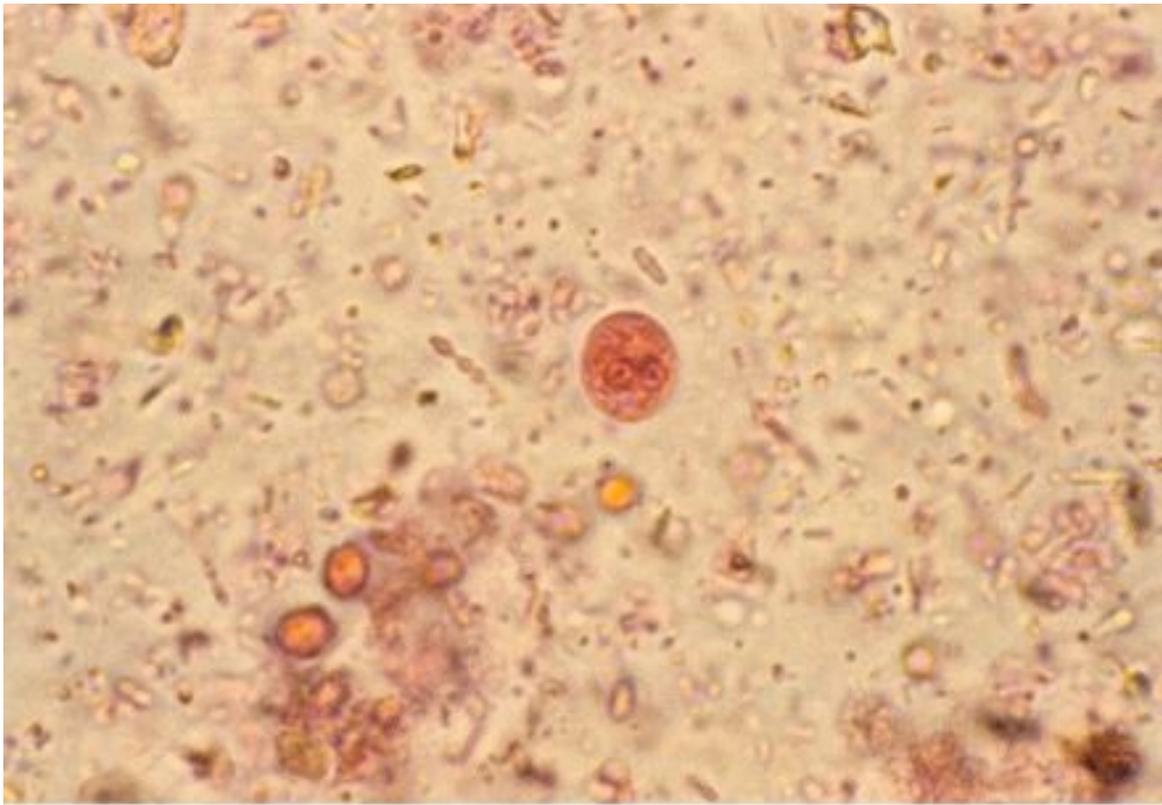


Photo n° 129
E. hartmanni. Kyste à deux noyaux. Coloration M.I.F. Obj. X 100.

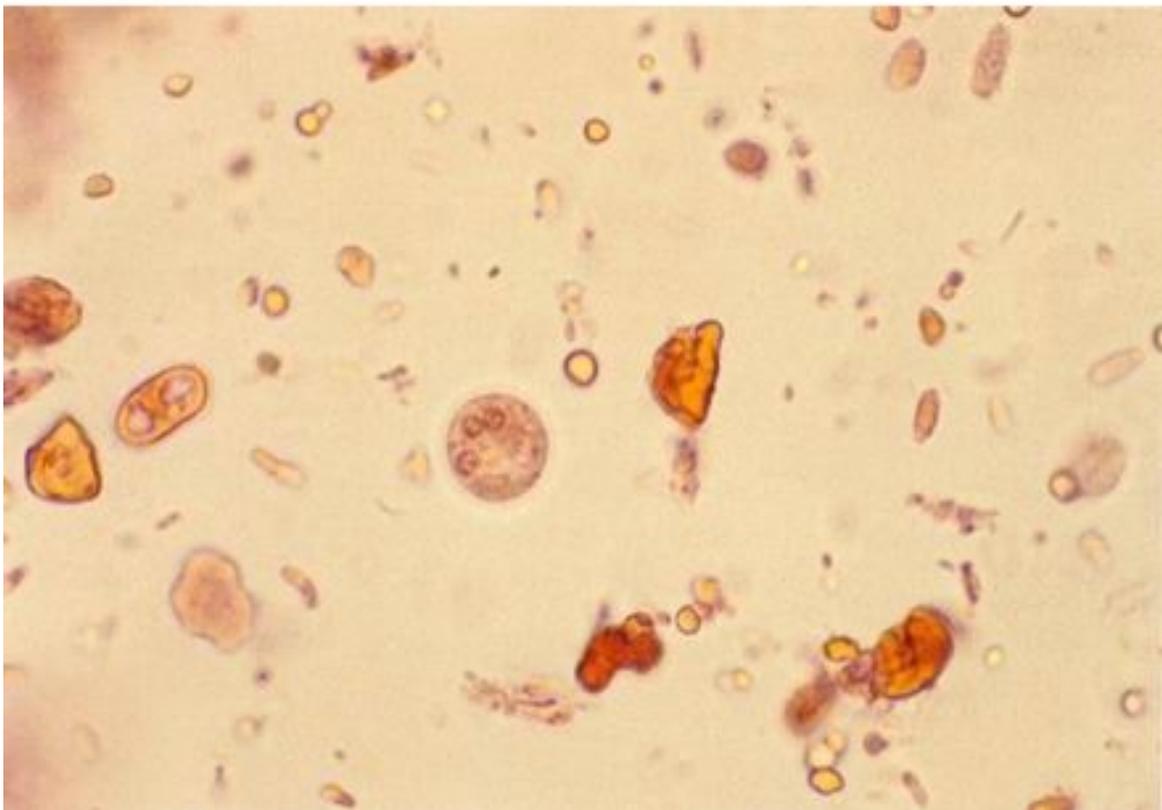


Photo n° 130
E. hartmanni. Kyste à quatre noyaux dont trois visibles. Remarquer la diminution de taille des noyaux quand leur nombre augmente par division. Coloration MAT. Obj. X 100.

ENTAMOEBA COLI KYTE

Forme végétative : p. 101

Tableau VII : Kystes d'*Entamoeba coli*
Résultats des tests du Contrôle National de Qualité en Parasitologie de France

Date d'envoi	Nombre de réponses	Richesse*	Résultats conformes	Deuxième réponse en %**	Troisième réponse en %**
11/1979	1 603	2,5	90,2 %	<i>Ascaris lumbricoides</i> 5	<i>Endolimax nanus</i> 4,3
11/1980	1 383	10 (+F.V.)	88,9 %	<i>Entamoeba histolytica</i> 12,8	Amibes diverses 3,7
11/1981	1 441	5 (+F.V.)	87 %	<i>Entamoeba histolytica</i> 24,6	<i>Endolimax nanus</i> 3,6
06/1984	950	8	95 %	<i>Entamoeba histolytica</i> 5,7	<i>Endolimax nanus</i> 1,4
01/1985	1 085	2,5	91,3 %	<i>Trichuris trichiura</i> 61,7	<i>Entamoeba histolytica</i> 5,9
11/1988	1 120	2,5	94,5 %	Abs de parasites 3,4	<i>Entamoeba divers</i> 1,8
01/1990	1 110	20 à 40 par lamelle	86,3 % (1)	Abs de parasites 3,9	<i>Giarda intestinalis</i> 3,2
03/1991	2 323	6	92,9 % (2)	<i>Entamoeba hartmanni</i> 4,6	<i>Endolimax nanus</i> 2,7
03/1993	1 236	20 à 50 par lamelle	92,6 %	<i>Trichuris trichiura</i> 2,2	<i>Entamoeba histolytica</i> 1,5
06/1995	1 182	15 (+ F.V.)	92,8 %	<i>Entamoeba histolytica</i> 2,5	<i>Entamoeba dispar</i> 1,3
03/1996	1 217	2	93,8 %	<i>Entamoeba histolytica</i> 3	<i>Endolimax nanus</i> 1,2

* La richesse moyenne = nombre de champs Obj. X 40 nécessaires pour trouver un parasite.

** Parasites absents de la selle.

(1) Associé avec des kystes d'*Endolimax nanus*.

(2) Associé avec des kystes d'*Entamoeba histolytica*.

C'est le kyste d'amibe le plus fréquemment rencontré, le plus grand et le plus facile à reconnaître : les résultats du Contrôle National de Qualité (tableau VII) le montre. Il existe des kystes normaux et des kystes nains qu'il ne faut pas confondre avec des kystes d'*E. histolytica*.

Avant d'arriver au stade de kyste mûr, tout kyste passe par les stades à 1,2,3,4 noyaux et ainsi de suite ; il ne faut donc pas croire que tous les kystes d'*Ent. coli* doivent avoir obligatoirement 8 noyaux. Certains kystes au contraire peuvent contenir 16 ou 32 noyaux : des kystes ayant plus de 8 noyaux sont observés dans 21 % des selles de porteurs d'*Ent. coli*. En principe, plus le kyste est jeune, plus grande est sa taille, ceci n'étant vrai que pour la même souche d'amibe.

Inversement des kystes mûrs peuvent contenir de 4 à 7 noyaux au lieu des huit de la forme « typique ». (11).

ÉTUDE DU KYSTE À FRAIS

Taille et forme :

En moyenne 15-20 µm, mais peut atteindre 30 µm.

Les kystes d'*Ent. coli* sont arrondis, souvent ovalaires, quelquefois même elliptiques et plus ou moins irréguliers et déformés.

Contour et aspect :

Les kystes sont sertis par une double coque assez difficile à distinguer. Cette coque se présente comme une limite nette, très réfringente et régulièrement épaisse. L'ensemble du kyste est un globule rond réfringent, se détachant très nettement sur le reste de la préparation, ce qui permet de repérer facilement ces kystes au petit grossissement lorsque l'éclairage est convenable.

Contenu du kyste : noyaux et vacuoles.

Le contenu du kyste varie selon le degré de maturation.

KYSTE À 1 NOYAU

Sur le fond brillant du kyste se détache un gros noyau, souvent ovalaire presque toujours en période active.

Il existe, dans la majorité des kystes (mais pas dans tous) une grande vacuole iodophile qui repousse le noyau vers la périphérie.

Dans les kystes, la vacuole de réserve, contenant du glycogène, se colore en brun acajou par l'iode, d'où le nom de vacuole iodophile. Cette vacuole de réserve se voit chez les kystes jeunes. Au fur et à mesure de la maturation, la vacuole diminue de taille et disparaît chez le kyste mûr. Il en est de même des cristalloïdes.

KYSTE À 2 NOYAUX

Les deux noyaux se voient bien à frais. Ils sont souvent de forme ovale situés à deux points diamétralement opposés de la grande vacuole centrale, différence importante d'avec les kystes d'*E. histolytica* / *E. dispar*.

KYSTE À 4 NOYAUX

A ce stade, il n'existe en général plus de vacuole, et les 4 noyaux sont groupés ensemble au milieu du kyste. Ils sont visibles à frais avec un bon éclairage. Ils sont de grande taille, de forme irrégulière, et en voie de division, avec une chromatine périphérique grossière et plusieurs granulations au niveau du caryosome. Il ne faut pas confondre, ce kyste avec celui d'*E. histolytica* : la taille plus grande et la forme variable du kyste d'*Ent. coli* sont les principaux éléments différentiels.

KYSTE À 8 NOYAUX

C'est le kyste mûr d'*Ent. coli*. Le pourtour du kyste est cerné d'une ligne épaisse, régulière, brillante. L'intérieur du kyste est hyalin, clair, brillant, réfringent apparemment vide. Avec un éclairage convenable et un fort grossissement, on peut facilement distinguer, à frais, dans la majorité de ces kystes, les 8 noyaux typiques de l'espèce : noyaux petits, à chromatine périphérique fine, à peine discernable, et caryosome excentré.

Cristalloïdes

Les cristalloïdes (= chromidies ou corps sidérophiles) sont difficiles à voir à frais, mais deviendront bien visibles après certaines coloration : Sargeaunt, lugol, M.I.F.

Ce sont des éléments d'aspect cristallin, incolores et réfringents, qu'on arrive à distinguer dans les kystes à frais, s'ils ont une certaine épaisseur. On ne les trouve pas dans tous les kystes : seuls les kystes immatures en possèdent, en quantité plus ou moins grande, selon les souches. Mais leur présence n'est pas constante, même chez les kystes jeunes: on les observe moins fréquemment dans les kystes d'*Ent. coli* que dans ceux d'*E. histolytica* / *E. dispar*.

Le kyste mûr, infectieux, contient rarement des cristalloïdes, et pas de vacuole de réserve iodophile.

Chez *Ent. coli*, les cristalloïdes sont en forme d'aiguilles plus ou moins longues et fines, à extrémités pointues. Ils sont parfois de formes variables et peuvent, quand ils sont nombreux, prendre un aspect en gerbe, voir en réseau.

ÉTUDE DU KYSTE APRÈS COLORATION

Coloration au Lugol

L'iode colore la vacuole en brun acajou et le cytoplasme du kyste en brun plus ou moins clair selon le degré de maturation du kyste. Sur ce fond sombre se détachent les noyaux, qui paraissent plus clairs, ainsi que les cristoïdes.

Chez les kystes mûrs, le cytoplasme clair laisse apparaître les noyaux dont la membrane et la chromatine périphérique sont plus colorées.

Il faut apprendre à bien compter les noyaux des kystes et pour cela, se rappeler tout d'abord que les kystes sont des sphères dans lesquelles les noyaux sont d'autres petites sphères disposées dans tous les plans de l'espace. Il ne s'agit donc pas d'un cercle sur lequel sont posés de petits cerceaux, tous dans le même plan, comme sur un dessin.

Il faut mettre au point sur le plan supérieur du kyste pour commencer. Puis, tout en suivant attentivement au microscope, faire descendre l'objectif grâce à la vis micrométrique, jusqu'à ce que le kyste disparaisse, en comptant au passage tous les noyaux successifs qu'on rencontre.

Les cristoïdes sont inconstamment colorés en raison de leur faible épaisseur.



Photo n° 131

Ent. coli. Kyste à cinq noyaux plus ou moins visibles dans le plan de la photo. Cristoïdes en aiguille. Coloration Lugol. Obj. X 100.

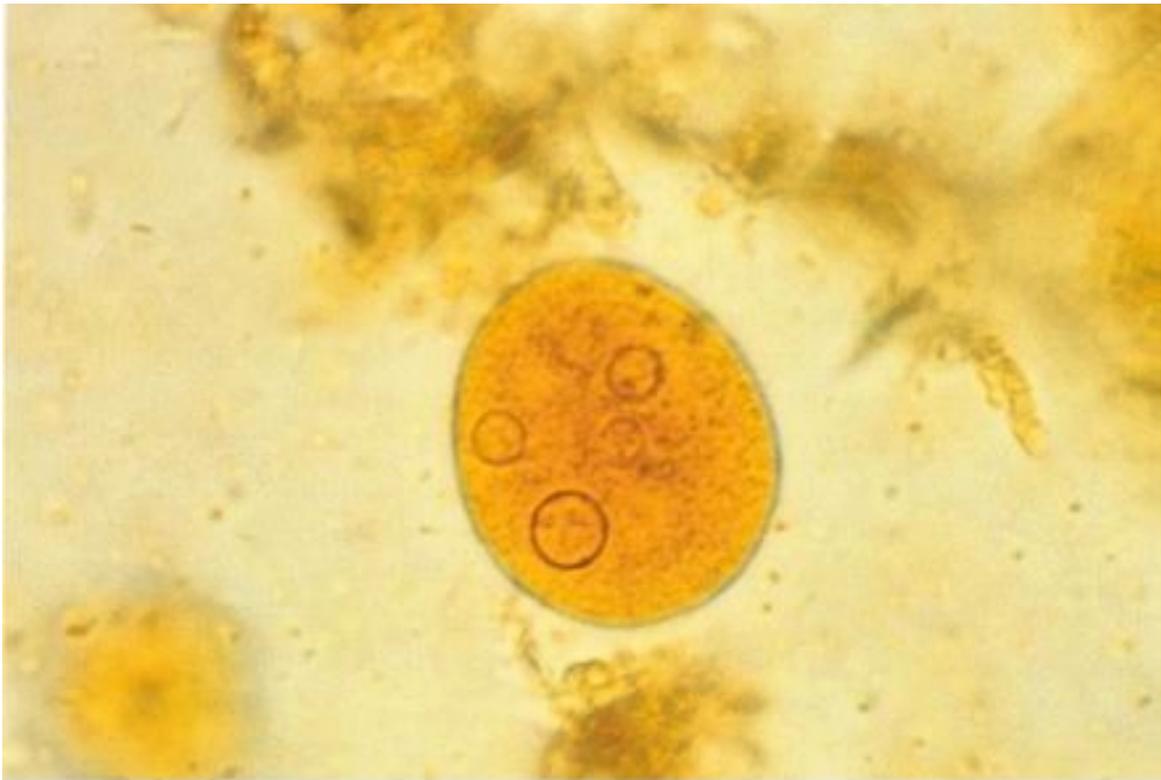


Photo n° 132

Ent. coli. Trois noyaux visibles dans ce plan : un grand et deux petits provenant d'une division. Coloration Lugol. Obj. X 100.



Photo n° 133

Ent. coli. Kyste à quatre noyaux. Coque externe épaisse. Coloration Lugol. Obj. X 100.

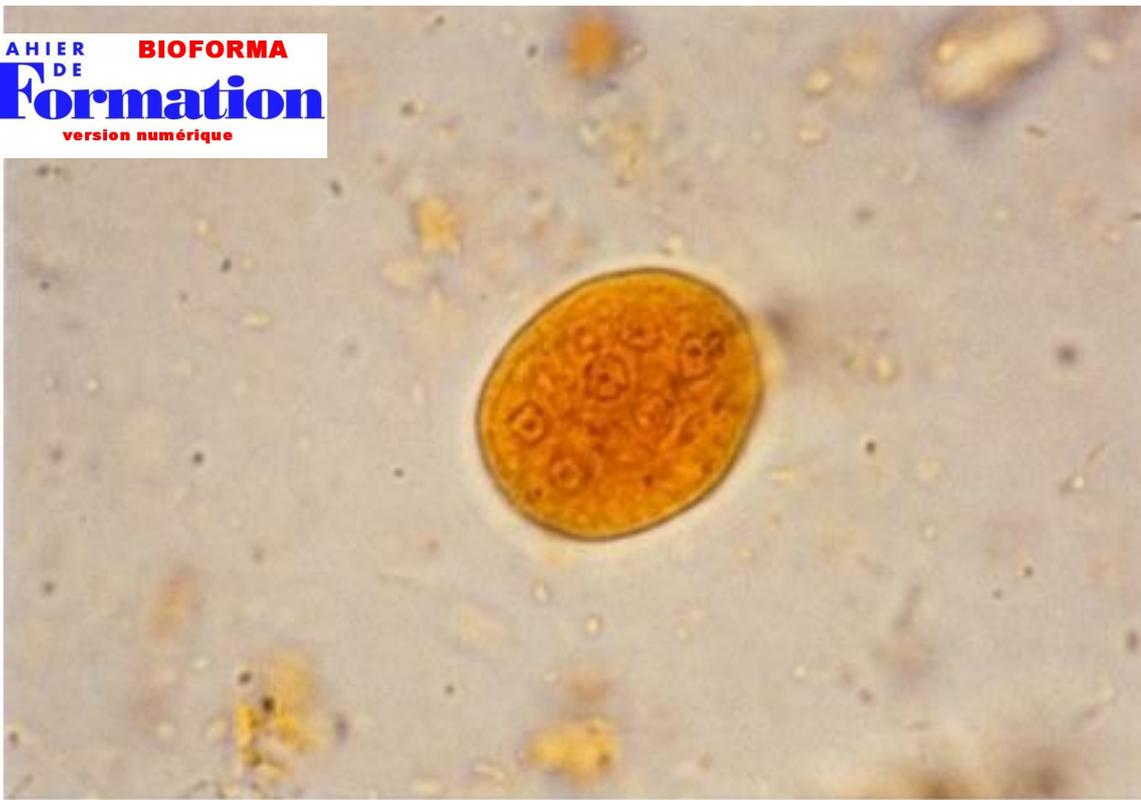


Photo n° 134

Ent. coli. Kyste à six noyaux visibles, forme légèrement ovulaire. Coloration Lugol. Obj. X 100.



Photo n° 135

Ent. coli. Kyste à huit noyaux. Coque externe épaisse. Coloration Lugol. Obj. X 100.

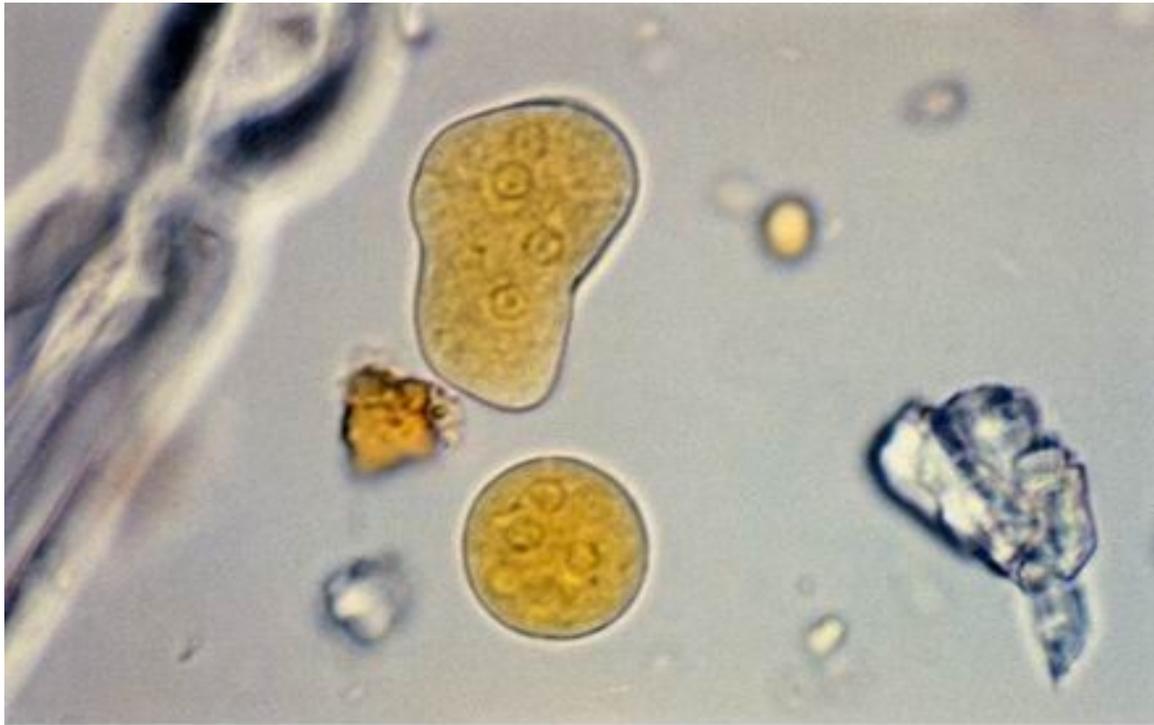


Photo n° 136

Ent. coli. Deux kystes. L'un de grande taille, de forme allongée et irrégulière, avec quatre noyaux bien visibles et un cinquième moins visible. L'autre de petite taille, de forme arrondie, avec quatre noyaux bien visibles et un cinquième moins visible dans le plan de la photo. Coloration Lugol. Obj. X 100.



Photo n° 137

Ent. coli. Deux kystes de forme arrondie avec quatre noyaux visibles dans le plan de la photo. L'un a un cristoïde de grande taille aux extrémités pointues. Coloration Lugol. Obj. X 100.

Coloration au M.I.F.

Les kystes jeunes ou peu résistants se laissent pénétrer par le colorant immédiatement et se colorent soit en brun acajou soit en rouge. Les kystes dont la coque est résistante restent incolores pendant un certain temps (quelques jours en général), ce qui en facilite la recherche. Mais leurs noyaux se dessinent nettement en brun noir.

Coloration à l'hématoxyline ferrique et au trichrome : ces colorations ont peu d'intérêt pratique pour l'identification des kystes. Si on souhaite cependant les réaliser

- faire une fixation au Bouin ou au Schaudinn, directement sur frottis, car la fixation des selles à l'A.P.V. déforme les kystes au point de les rendre difficiles à étudier ;
- faire une décoloration, pour l'hématoxyline ferrique, beaucoup plus poussée que pour les formes végétatives.

Coloration de Sargeant (44) : elle permet de bien voir les cristoïdes. Ces corps sidérophiles ne sont pas toujours présents dans les kystes d'*Ent. coli*. Ils sont surtout présents dans les kystes à 1 ou 2 noyaux et en règle générale absents dans les kystes mûrs à 8 noyaux. Dans l'ensemble, ils seraient présents dans 5,5 % des kystes au moins.

Ils sont de forme bien différente de ceux des kystes d'*E. histolytica* / *E. dispar*. Typiquement ils sont en aiguille, disposés en gerbe, ils peuvent aussi être comparés à des fragments de verre brisé. Ils peuvent être aussi d'aspect filamenteux : les filaments sont longs et minces (11).

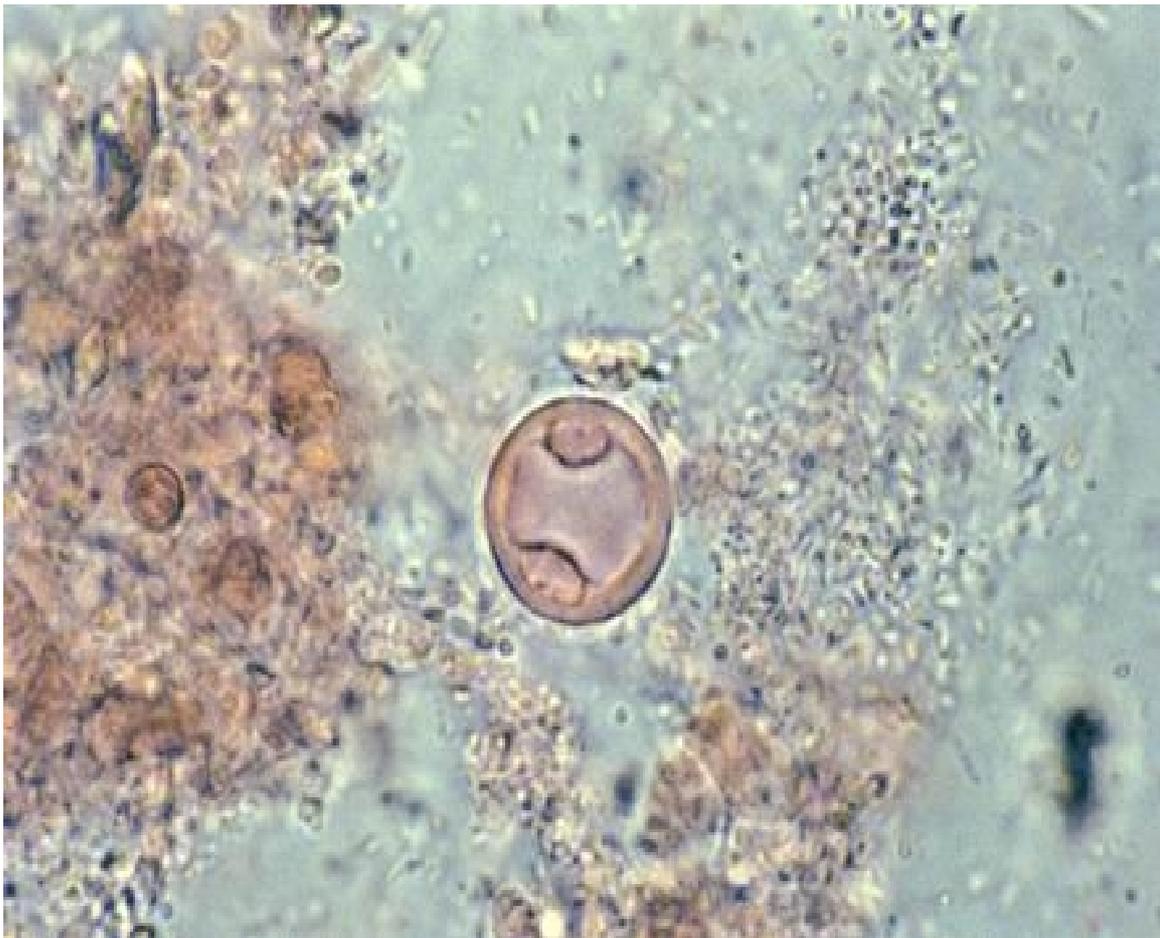


Photo n° 138

Ent. coli. Kyste à deux noyaux ovaires séparés par une grande vacuole, aspect différent des kystes à deux noyaux d'*E. histolytica* / *E. dispar*. Coloration M.I.F. Obj. X 100.



Photo n° 139
Ent. coli. Kyste à cinq noyaux plus ou moins visibles dans le plan de la photo. Coque épaisse.
Coloration M.I.F. Obj. X 100.



Photo n° 140
Ent. coli. Kyste à cinq noyaux visibles dans le plan de la photo. Coloration M.I.F. Obj. X 100.



Photo n° 141

Ent. coli. Kyste de forme ovale avec plusieurs noyaux visibles et de nombreux cristalloïdes en aiguilles. Coloration Sargeaunt. Obj. X 100.

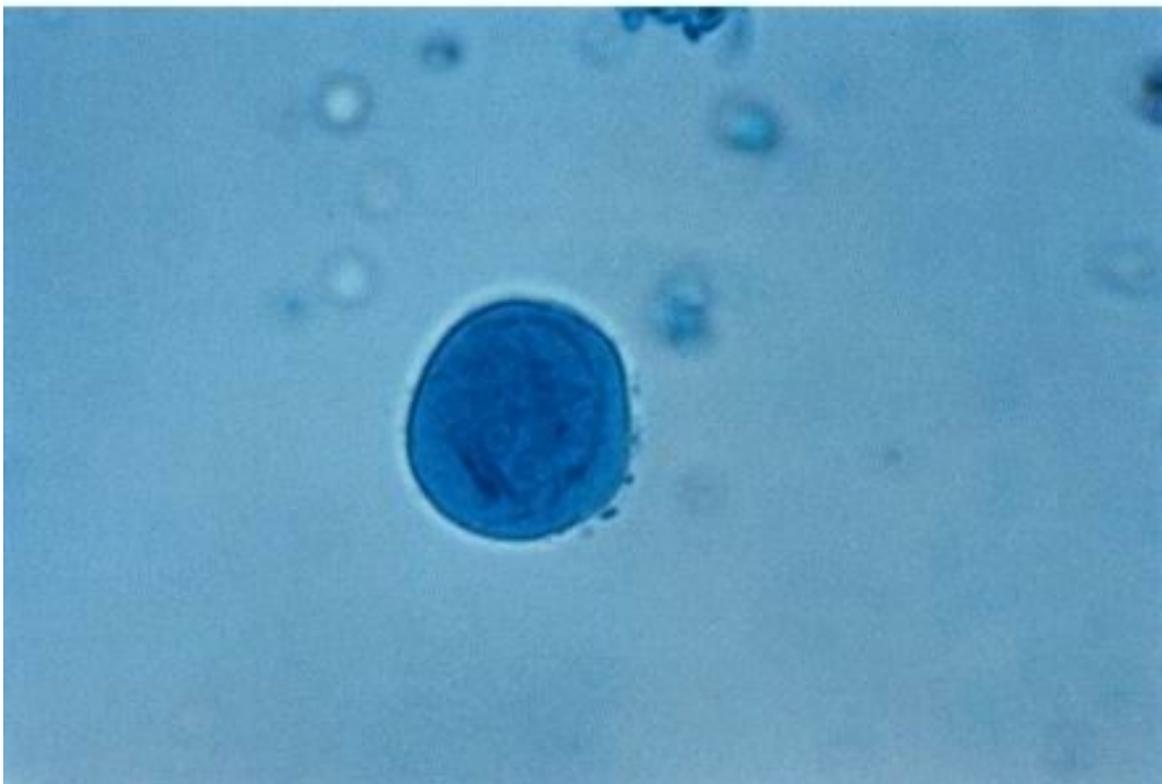


Photo n° 142

Ent. coli. Kyste avec plusieurs noyaux visibles et de nombreux cristalloïdes en aiguilles. Coloration Sargeaunt. Obj. X 100.

ÉTUDE DU KYSTE D'*ENTAMOEBIA COLI* APRÈS CONCENTRATION

Télémann-Rivas

Le Télémann-Rivas utilise un liquide non formolé. De plus son pH assez bas (aux environs de 3,5) n'est pas favorable pour conserver aux kystes un aspect normal ou presque normal.

Après concentration par cette méthode les kystes sont en effet assez abîmés. Le contenu a perdu son brillant et devient grossièrement granuleux, il est même parfois rétracté ou replié dans sa coque : c'est le faux dédoublement.

Le contour du kyste reste net, un peu moins réfringent, mais sans qu'on puisse distinguer une membrane double (à différencier des kystes d'*E. histolytica*).

Dans cette masse granuleuse on distingue très mal les noyaux. On peut s'aider d'une coloration au Lugol. En cas de doute, faire une concentration utilisant une solution formolée afin d'obtenir des kystes identifiables.

Thébaud simplifié

Le formol à 10 % contenu dans la solution utilisée conserve aux kystes un aspect presque normal : le cytoplasme a perdu un peu de sa réfringence et les noyaux sont très facilement visibles. Ces kystes se prêtent aux colorations par le Lugol ou par le M.I.F. dilué.

La méthode de Carles et Barthélémy, utilisant aussi une solution formolée est aussi très favorable, bien qu'elle concentre un peu moins bien les kystes d'*Ent. coli* que le Thébaud.

LES KYSTES NAINS D'*ENTAMOEBIA COLI*

Les kystes nains d'*Ent. coli* sont fréquents, d'où l'intérêt de connaître leur existence afin de ne pas les confondre avec des kystes d'*E. histolytica*. Ils ont en effet la taille de ces derniers, soit 12 à 15 µm.

Ce sont des kystes d'*Ent. coli* pour les raisons suivantes

- contour épais, bien net, bien réfringent ;
- ce contour ne se dédouble pas après concentration au Télémann-Rivas ;
- on voit les 8 noyaux chez les kystes mûrs.

Il ne s'agit pas d'une forme anormale de kystes d'*E. histolytica*.

ENTAMOEBEA POLECKI

KYSTE

Forme végétative: p. 113

Il est assez facile de faire le diagnostic d'*Entamoeba polecki* si l'on peut examiner au moins une centaine de kystes. En effet, les kystes de cette espèce, rappellent ceux d'*E. histolytica* par leur taille, leur forme et leur aspect. Ils en sont très différents par leur contenu : le caractère le plus facile à constater est l'existence chez tous les kystes d'un noyau unique.

ÉTUDE DU KYSTE D'*E. POLECKI* À FRAIS

Taille et forme

9 à 17 µm, moyenne 12-14 µm. Kystes donc, de toutes tailles avec une moyenne correspondant à celle d'*E. histolytica*. Les gros kystes rejoignent la dimension de ceux d'*Ent. coli*. Les kystes sont arrondis ou ovalaires.

Contour et aspect

Contour net assez épais, aspect réfringent comme tous les kystes d'amibes de cette taille.

Contenu : vacuoles, noyau, cristalloïdes

Il est rare de voir chez les kystes d'*E. polecki* une vacuole unique comme chez *Ent. coli* ou *E. histolytica* / *E. dispar*. On observe plutôt de nombreuses petites vacuoles se colorant mal au Lugol, au lieu d'être brun acajou elles sont jaunes ou brun clair.

Le noyau unique est assez visible. À peine 1 % des kystes ont 2 noyaux, ce qui constitue une exception au même titre que les kystes à 8 noyaux d'*E. histolytica* / *E. dispar*, ou ceux à 16 noyaux d'*Ent. coli*.

Les cristalloïdes sont très variables en nombre, en taille et en forme. On arrive à voir à frais des cristalloïdes épais et de grande taille. Mais il y a une grande quantité de petits cristalloïdes chez de nombreux kystes que l'on ne voit bien qu'après coloration.

ÉTUDE DU KYSTE D'*E. POLECKI* APRÈS COLORATION À L'HÉMATOXYLINE FERRIQUE

Cette coloration permet d'identifier à coup sûr les kystes d'*E. polecki* en montrant un élément caractéristique de ces kystes : la masse d'inclusion. Ni le Lugol, ni le M.I.F. ne colorent nettement cette masse ; ni ne font apparaître l'abondance exceptionnelle des petits cristalloïdes.

Masse d'inclusion

C'est une masse située dans le cytoplasme de nombreux kystes. Elle est sphérique ou irrégulière, peut être plus grande ou moins grande que le noyau, pouvant parfois cacher complètement celui-ci, elle est colorée en gris foncé.

Cristalloïdes

Ils sont présents dans un très grand pourcentage de kystes et sont extrêmement abondants : de 6 à 30 ou plus. Ils ont toutes les formes et sont de toutes les tailles. Ces corps sidérophiles se disposent dans le cytoplasme, autour de la masse d'inclusion. L'hématoxyline les colore en noir. Ils sont très bien mis en évidence par la coloration de Sargeant.

Noyau

Ce noyau unique occupe 25 à 30 % du diamètre du kyste alors que chez les kystes d'*E. histolytica* à un noyau, il occupe les 40 ou même 50 % du diamètre. En effet, chez *E. histolytica* le noyau unique du kyste est beaucoup plus gros que celui de la forme végétative qui lui a donné naissance, alors que chez *E. polecki*, ce noyau est plus petit.

Ce noyau est ovale, irrégulier ou arrondi. Il peut être déformé par la pression des multiples petites vacuoles.

La structure de ce noyau diffère légèrement de celle de la forme végétative

- membrane nucléaire mince comme la forme végétative ;
- chromatine périphérique uniformément répartie aussi ;
- caryosome variable, en général plus gros que chez la forme végétative, grand et granuleux, compact ou diffus, central ou excentré. Chez certains kystes, le nucléoplasme se colore en plus foncé que le cytoplasme, comme chez la forme végétative.

En résumé : ce sont des kystes de tailles diverses allant de celle d'un kyste d'*E. histolytica* à celle d'un kyste d'*Ent. coli*.

Un seul noyau de petite taille chez tous les kystes, noyau rappelant plutôt celui d'*E. histolytica*.

Très nombreuses petites vacuoles peu colorées par l'iode, dans un grand nombre de kystes.

Très grande quantité de petits cristalloïdes dans un grand nombre de kystes.

À l'hématoxyline ferrique, présence d'une masse d'inclusion caractéristique de l'espèce.

ETUDE DES KYSTES D'*E. POLECKI* APRES CONCENTRATION

Au Télémann-Rivas, la coque de ces kystes se dédouble comme celle des kystes d'*E. histolytica*.

La méthode de Thébaut concentre très bien ces kystes et permet d'obtenir une quantité d'exemplaires nécessaires à l'identification.

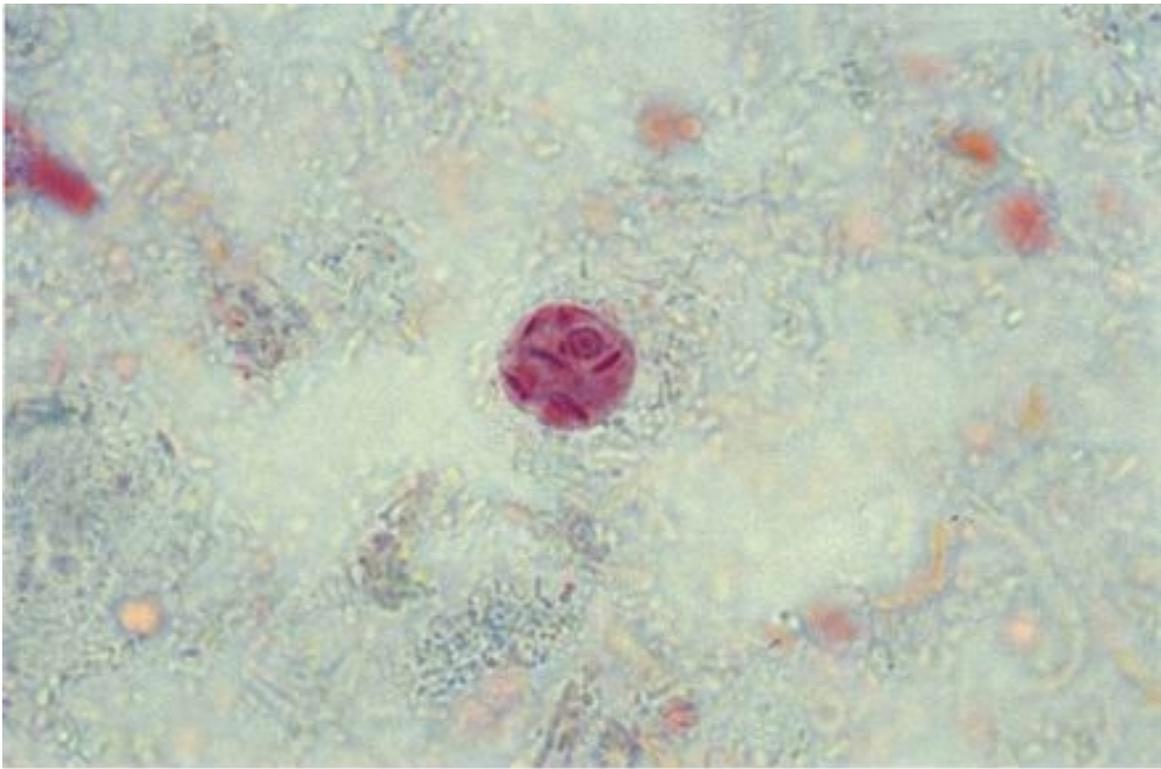


Photo n° 143
E. polecki. Kyste à un noyau. Nombreux corps sidérophiles. Coloration trichrome. Obj. X 100.

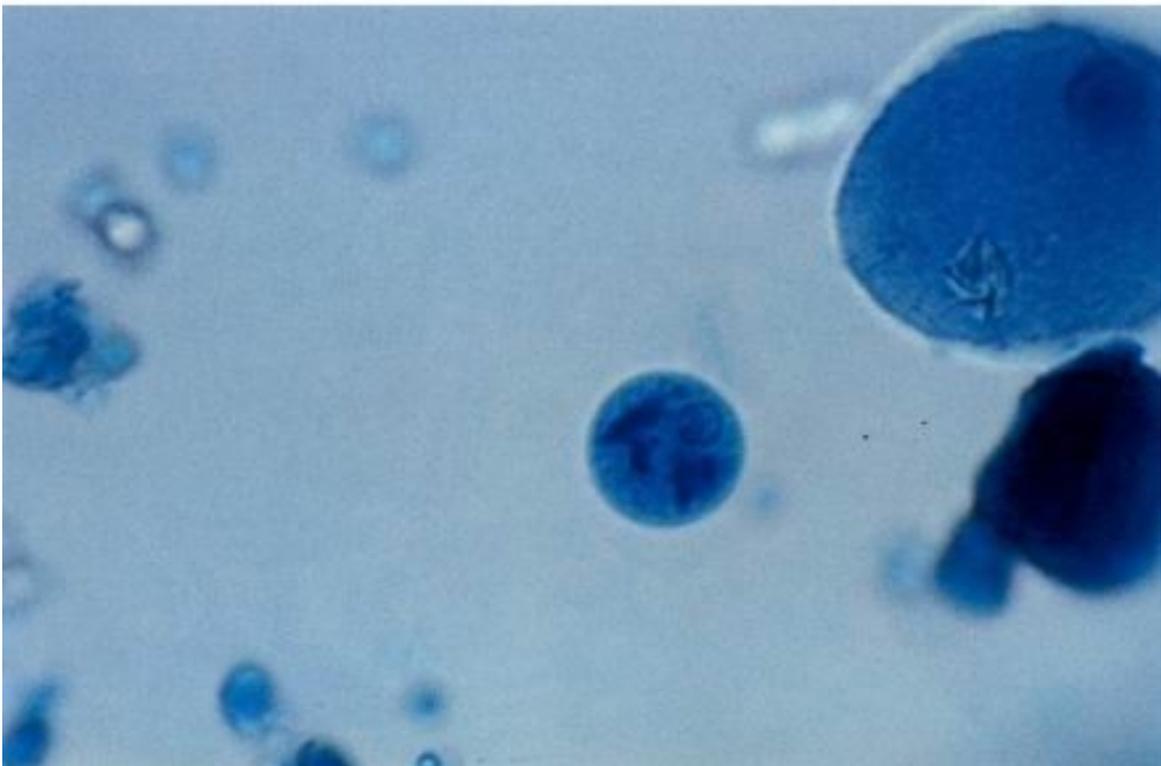


Photo n° 144
E. polecki. Kyste à un noyau. Nombreux corps sidérophiles. Coloration Sargeaunt. Obj. X 100.

ENDOLIMAX NANUS

KYTE

Forme végétative : p.. 117

Tableau VIII : Kystes d'*Endolimax nanus*
Résultats des tests du Contrôle National de Qualité en Parasitologie de France

Date d'envoi	Nombre de réponses	Richesse*	Résultats conformes	Deuxième réponse en %**	Troisième réponse en %**
11/1983	1 016	1	27,1 %	Abs de parasites 33,3	<i>Dientamoeba fragilis</i> 4,4
02/1984	1 024	1	46 %	Abs de parasites 15,2	<i>Entamoeba hartmanni</i> 11,5
06/1985	1 029	2	49,2 %	<i>Entamoeba hartmanni</i> 14,7	Abs de parasites 11,9
03/1987	1 123	< 1	61,5 %	<i>Entamoeba coli</i> 8,7	Abs de parasites 6,1
03/1989	1 139	3	38,8 %	Abs de parasites 18,9	<i>Entamoeba coli</i> 11,6
05/1992	2 406	1	52 %	Abs de parasites 19,7	<i>Entamoeba coli</i> 6,5
06/1995	1 224	1	50 %	Abs de parasites 31,4	Œufs helminthes 3,2
03/1996	1 218	1	18,4 % (1)	Protozoaires divers 3	<i>Entamoeba hartmanni</i> 2,1

* La richesse moyenne = nombre de champs Obj. X 40 nécessaires pour trouver un parasite.

** Parasites absents de la selle.

(1) Associé avec des œufs de *Paragonimus westermani*.

Les tests du Contrôle National de Qualité en Parasitologie (tableau VIII) montrent que les kystes d'*E. nanus* (anciennement *E. nana*) ne sont souvent pas diagnostiqués.

Ils sont pourtant assez souvent présents dans les selles moulées.

ÉTUDE DU KYSTE D'*ENDOLIMAX NANUS* À FRAIS

Forme et taille

Ce sont des kystes de forme ellipsoïdale ou ovale, présentant souvent deux bords opposés presque parallèles. Vu selon le grand axe, ils sont apparemment ronds.

Leur taille varie de 7 à 12 µm de long sur 3 à 7 µm de large. Ils sont souvent confondus avec les kystes d'*E. hartmanni* en raison de leur petite taille.

Contour et aspect

Le contour est différent de celui des autres kystes d'amibe, il est mince, formé d'une ligne très fine et, peu réfringent.

Le kyste paraît optiquement vide avec un cytoplasme hyalin et des noyaux invisibles.

Contenu

C'est un kyste qui n'a ni vacuole, ni cristalloïde.

Chez les kystes de grande taille et conservés dans l'eau formolée, on peut distinguer les noyaux sous la forme de petits grains réfringents (les caryosomes) dans un petit halo clair. Le cytoplasme, dans les préparations conservées reste longtemps hyalin.

Les kystes à 2 noyaux ont leurs noyaux groupés à l'une des deux extrémités.

Les kystes à 4 noyaux sont souvent allongés, avec les noyaux groupés le plus souvent par deux à chacune des deux extrémités.

ÉTUDE DU KYSTE D'*ENDOLIMAX NANUS* APRÈS COLORATION

Coloration au Lugol

Le Lugol colore le cytoplasme du kyste de façon plus ou moins uniforme, et les noyaux se détachent mal. Il permet cependant le diagnostic différentiel d'avec le kyste de *Giardia intestinalis*.

Coloration au M.I.F

Elle est excellente et très pratique pour

- retrouver ces petits kystes s'ils ne sont pas assez nombreux : ils restent incolores sur fond rouge, comme les autres kystes ;
- les différencier de ceux d'*E. hartmanni* de même taille souvent et de même forme parfois. Au besoin, il faut étudier les noyaux à l'immersion.

ÉTUDE DU KYSTE D'*ENDOLIMAX NANUS* APRÈS CONCENTRATION

Télémann-Rivas : l'intérieur du kyste se rétracte et laisse un vide.

Thébaut : technique de choix pour concentrer les kystes d'*Endolimax nanus* qui sont reconnaissables ainsi, même sans aucune coloration.

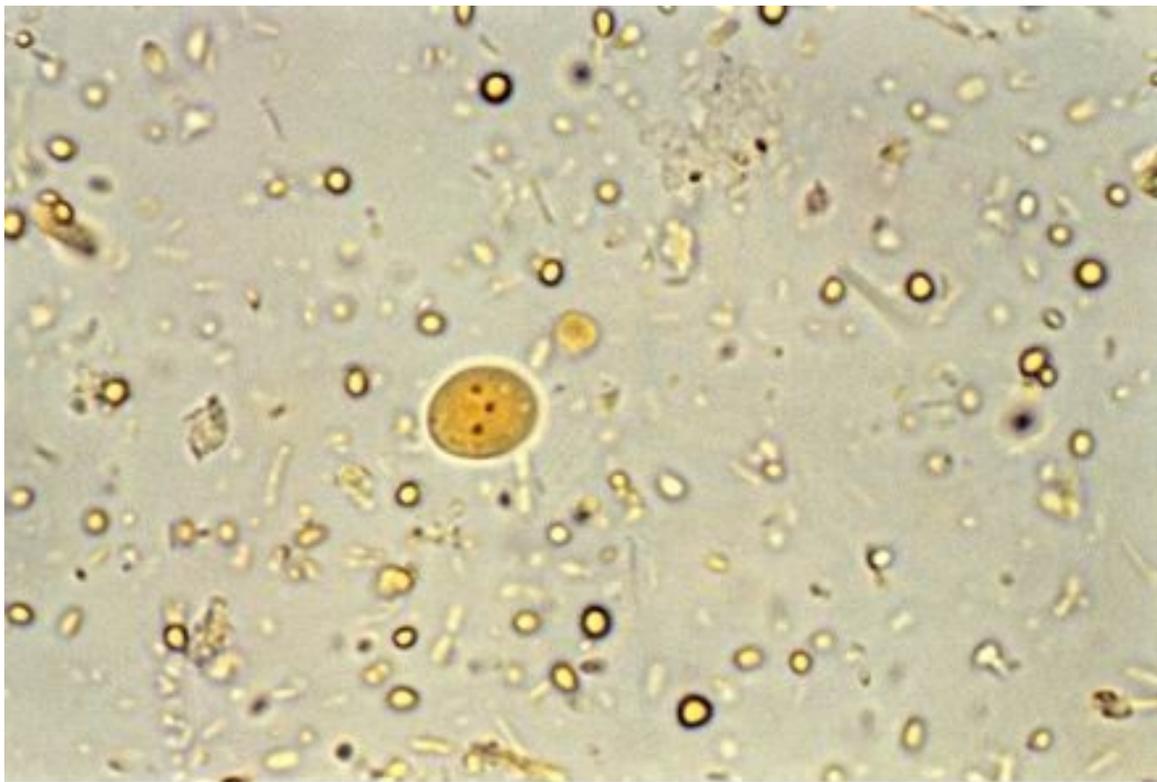


Photo n° 145

E. nanus. Kyste de forme ellipsoïdale avec trois noyaux visibles. Coloration Lugol. Obj. X 100.

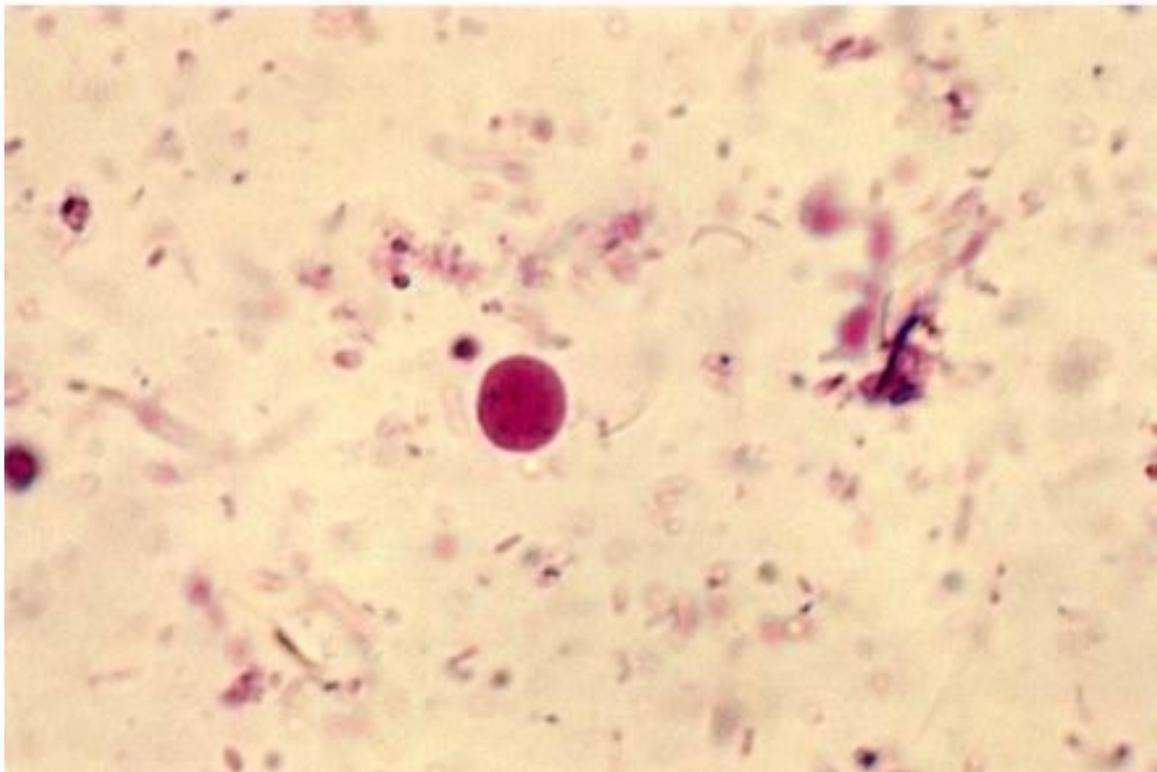


Photo n° 146

E. nanus. Kyste de forme ronde, vu selon le grand axe. Coloration Bailenger. Obj. X 100.

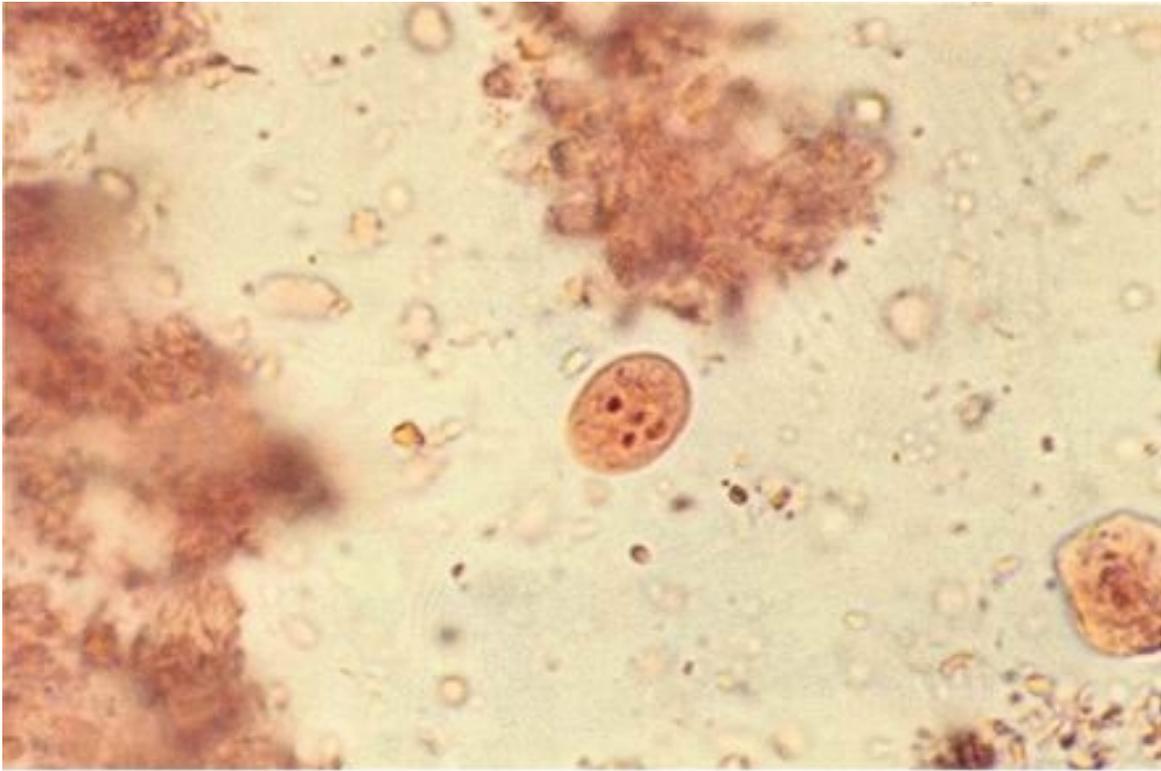


Photo n° 147
E. nanus. Kyste de forme ellipsoïdale, avec quatre noyaux de type « limax ». Coloration M.I.F.
Obj. x 100.

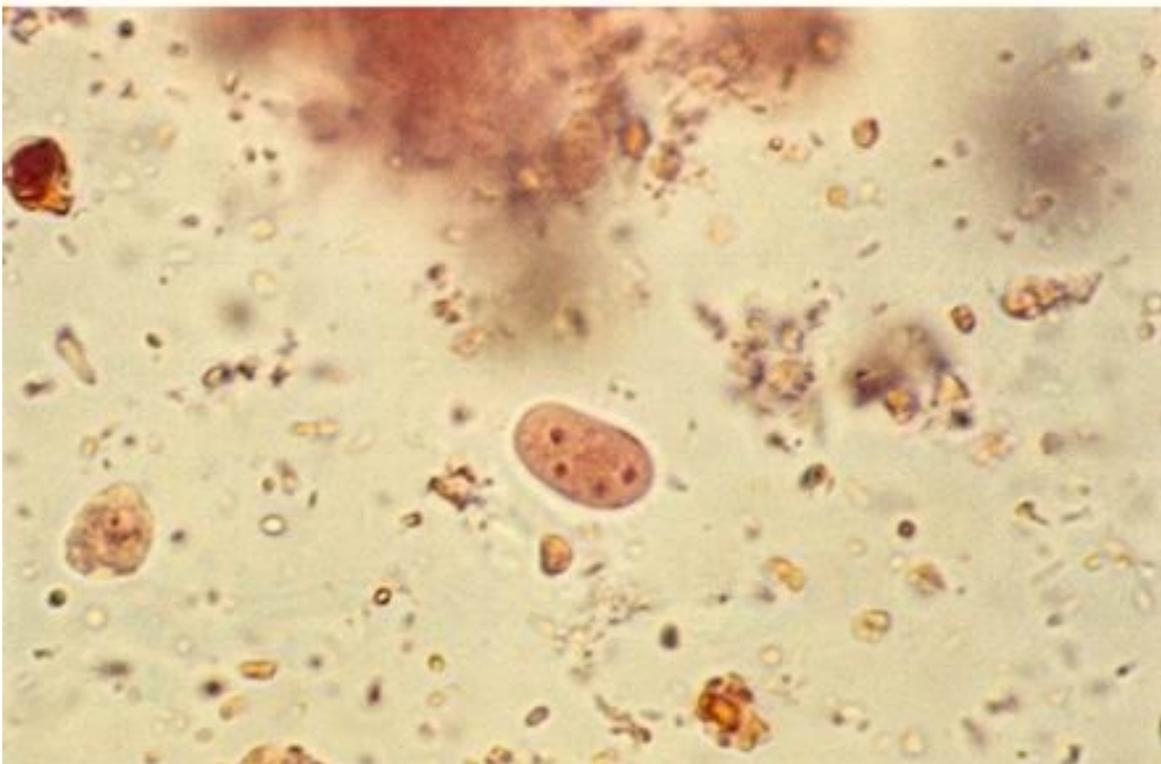


Photo n° 148
E. nanus. Kyste de forme allongée, avec quatre noyaux de type « limax ». Coloration M.I.F.
Obj. X 100.

IODAMOEBEA BUTSCHLII (= *PSEUDOLIMAX BUTSCHLII*) **KYSTE**

Forme végétative : p. 121

Tableau IX : Kystes de *Iodamoeba butschlii*
Résultats des tests du Contrôle National de Qualité en Parasitologie de France

Date d'envoi	Nombre de réponses	Richesse*	Résultats conformes	Deuxième réponse en %**	Troisième réponse en %**
11/1983	1 050	2,5	73,6 %	<i>Entamoeba histolytica</i> 11,3	<i>Entamoeba coli</i> 8,3
10/1993	1 217	< 1	76,3 %	<i>Entamoeba histolytica</i> 3,9	<i>Entamoeba coli</i> 3,4
11/1995	1 276	7	76,6 %	<i>Entamoeba coli</i> 1,6	<i>Entamoeba histolytica</i> 1,2

* La richesse moyenne = nombre de champs Obj. X 40 nécessaires pour trouver un parasite.

** Parasites absents de la selle.

Il ne faut pas confondre un kyste d'*I. butschlii* avec un kyste d'*E. histolytica* et encore moins avec un kyste d'*Ent. coli*. De nombreux détails permettent de les différencier, et une technique est absolument indispensable : la coloration au Lugol.

CAHIER DE BIOFORMA
Formation
version numérique

ÉTUDE DU KYSTE D'*I. BUTSCHLII* À FRAIS

Taille et forme

Dans une même préparation, ces kystes ont toutes les tailles, mesurent en moyenne de 8 à 15 µm (c'est-à-dire la taille d'un kyste d'amibe dysentérique), mais peuvent varier entre 5 et 20 µm.

Dans une même préparation aussi, ces kystes ont toutes les formes, et cela est absolument caractéristique. Ils peuvent en effet être arrondis ou ovalaires comme les autres kystes, mais ils peuvent être aussi rectangulaires, triangulaires, en bouteille, tellement irréguliers parfois qu'il est difficile de les décrire.

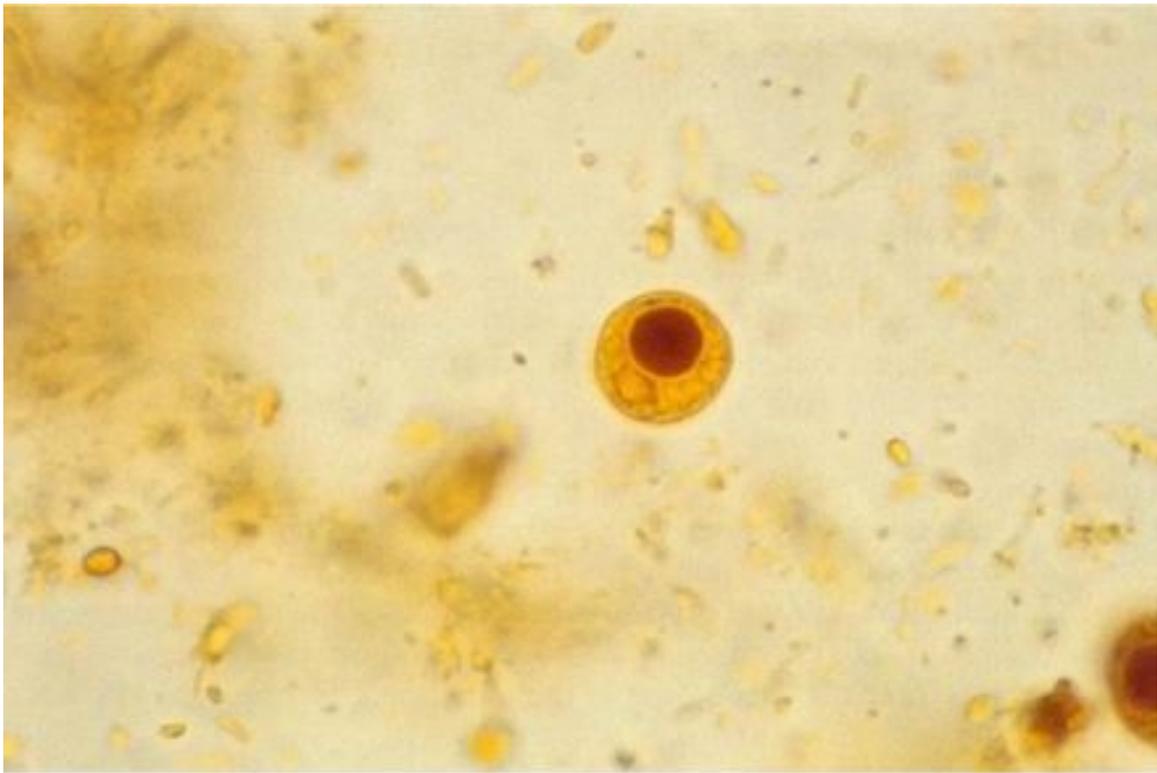


Photo n° 149

I. bustchlii. Kyste arrondi à un noyau peu visible, avec une grande vacuole iodophile. Coloration Lugol. Obj. X 100.

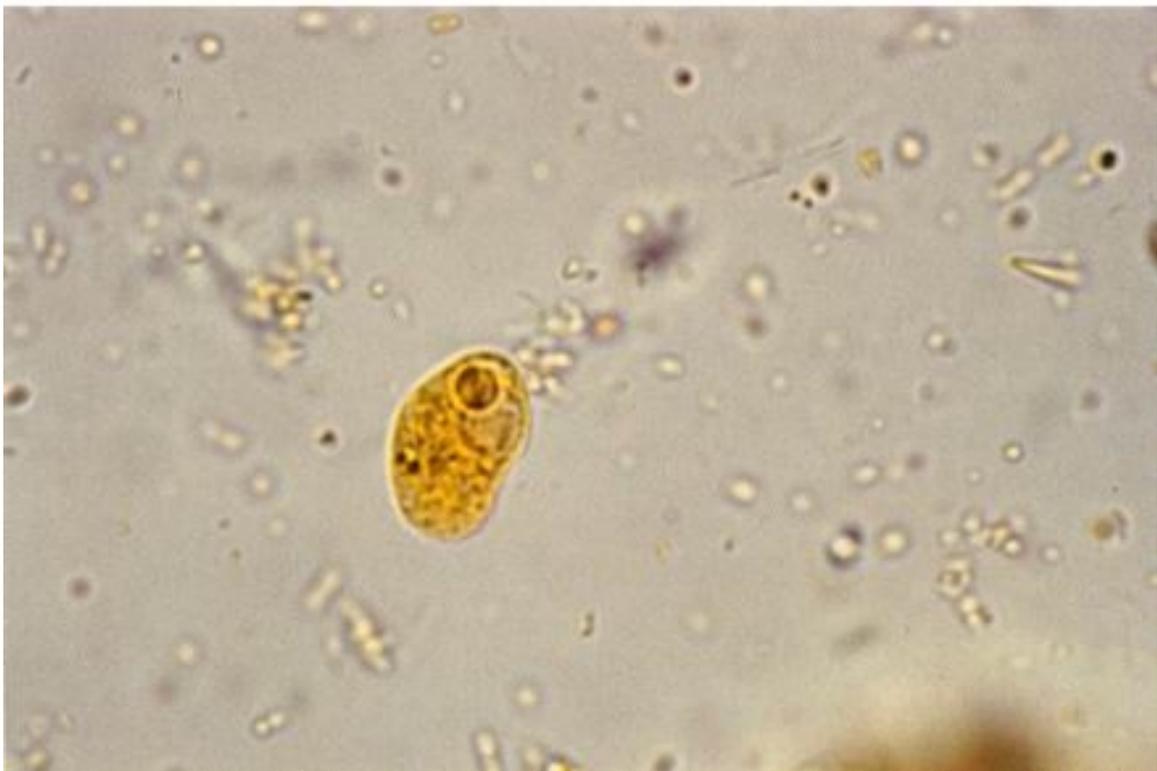


Photo n° 150

I. butschlii. Kyste allongé à un noyau de type « limax », halo clair autour du gros caryosome, avec une petite vacuole. Coloration Lugol. Obj. X 100.

Contour et aspect

Comme pour tous les kystes de taille comparable, le contour est assez épais, net. L'ensemble du kyste est brillant et réfringent.

Contenu : vacuole, noyau

Ce kyste n'a pas de cristoïde.

Le contenu du kyste est absolument caractéristique : en effet tous les kystes d'*I. butschlii* possèdent une vacuole de glycogène (ce qui n'est pas le cas des kystes des autres espèces). Cette vacuole est de taille variable et peut être parfois assez petite. Mais elle se colore toujours en brun acajou foncé avec le Lugol bien frais, ce qui justifie son nom: *Iodamoeba*.

Il n'y a dans chaque kyste qu'un seul noyau de type « *limax* », légèrement différent: de celui de la forme végétative correspondante. Ce noyau se voit très bien à frais si le kyste se présente de telle façon que la vacuole se trouve d'un côté du kyste et le noyau de l'autre. On distingue alors, un gros caryosome allongé, ovalaire ou arrondi, très réfringent, entouré d'un halo clair et en général en position excentrique par rapport à ce halo qui représente l'ensemble du noyau dont la membrane périphérique n'est pas visible comme celle du noyau d'*E. histolytica* / *E. dispar*.

ÉTUDE DU KYSTE D'*I. BUTSCHLII* APRÈS COLORATION

Coloration au Lugol

Le lugol est indispensable pour mettre en évidence la présence de la vacuole chez tous les kystes, vacuole qui, nous l'avons déjà dit, peut être minuscule, mais qui se colore toujours très bien. Il faut utiliser un Lugol double, frais, et examiner sans tarder.

Coloration au M.I.F.

Cette coloration donne un peu plus de netteté au noyau. Il faut ici aussi examiner rapidement une préparation après coloration en tube, car les vacuoles se décolorent au bout de quelques heures seulement.

Coloration à l'hématoxyline ferrique, ou au trichrome

Le caryosome est presque toujours en position excentrique. Dans la majorité des kystes on voit une série de granulations chromatiques entre le caryosome et la fine membrane nucléaire correspondant aux chromosomes.

ÉTUDE DU KYSTE D'*I. BUTSCHLII* APRÈS CONCENTRATION

Au **Télemann-Rivas**, le dédoublement de la coque est net et souvent plus important que celui observé chez les kystes d'*E. histolytica* après concentration.

Le **Thébaut** concentre très bien ces kystes et les conserve en bon état.

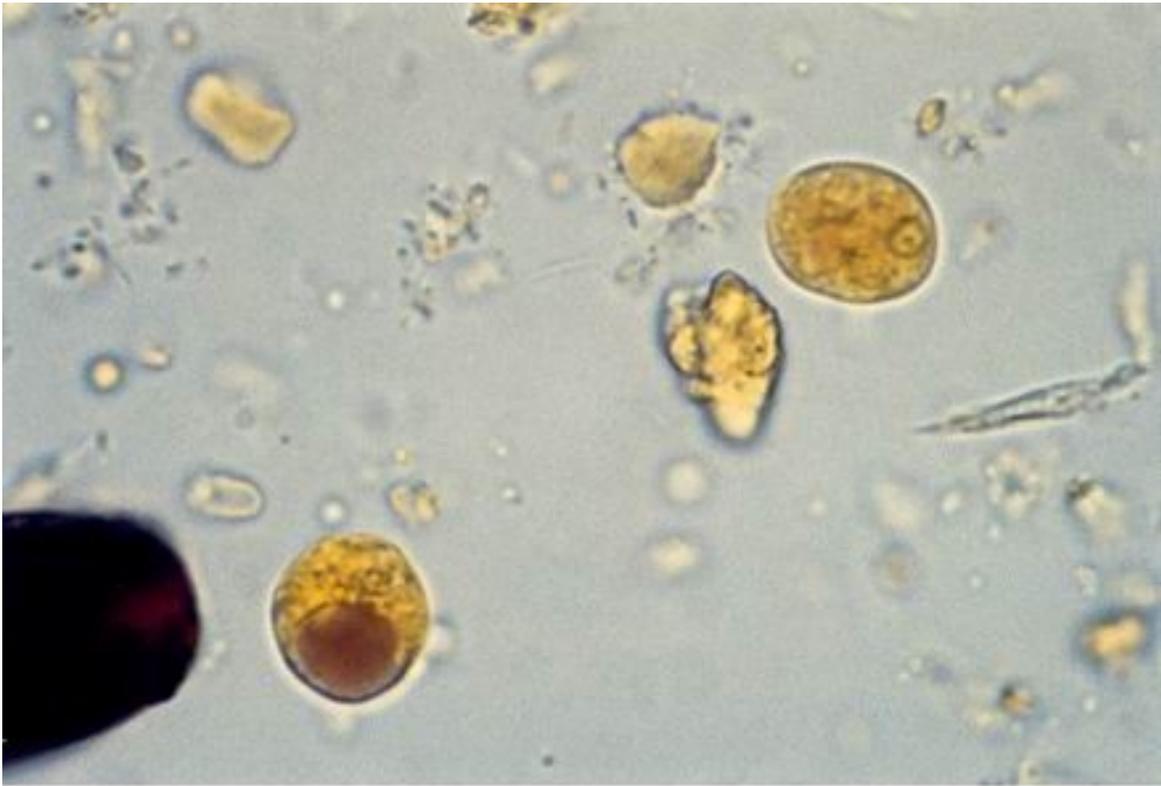


Photo n° 151- *I. butschlii*. Kyste arrondi avec une grande vacuole iodophile et un grand kyste d'*E. hartmanni* avec un noyau de type « entamibe » bien visible. Coloration Lugol. Obj. X 100.

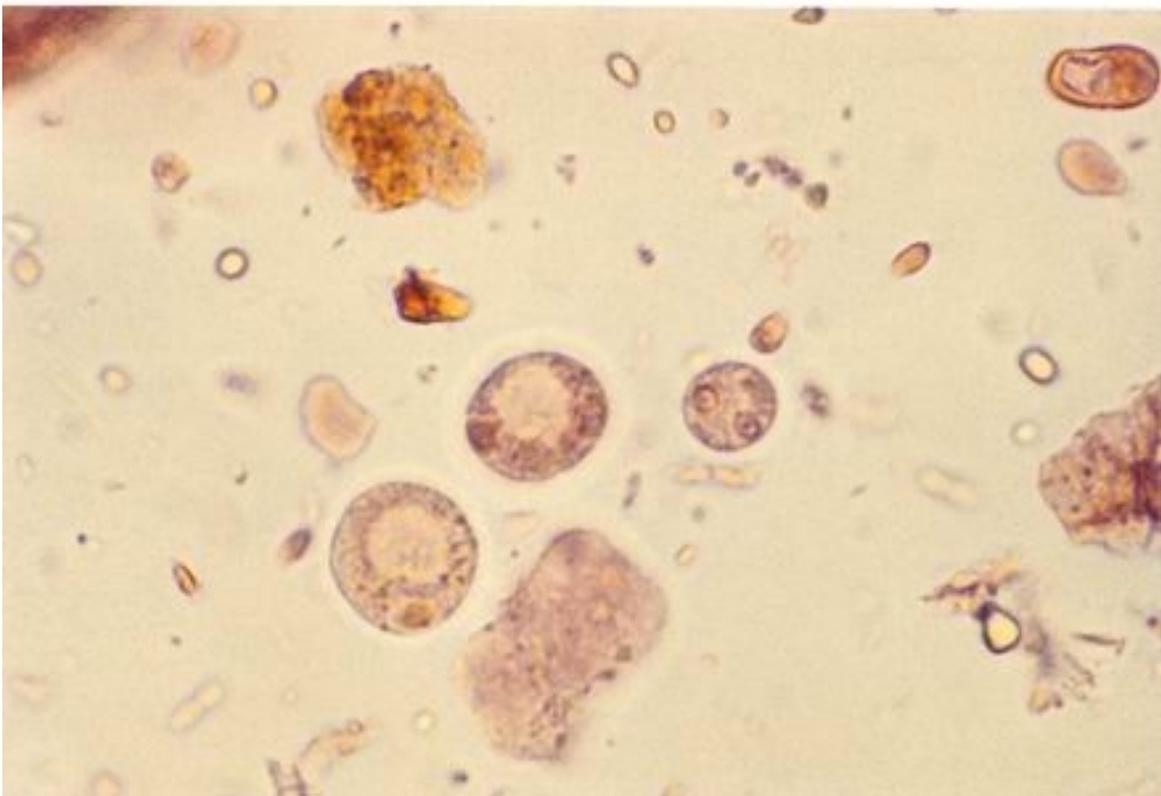


Photo n° 152 - *I. butschlii* (même selle que la photo précédente). Deux kystes arrondis avec une grande vacuole incolore et un noyau de type « limax ». Présence d'un plus petit kyste d'*E. hartmanni* avec deux noyaux visibles de type « entamibe ». Coloration M.I.F. Obj. X 100.

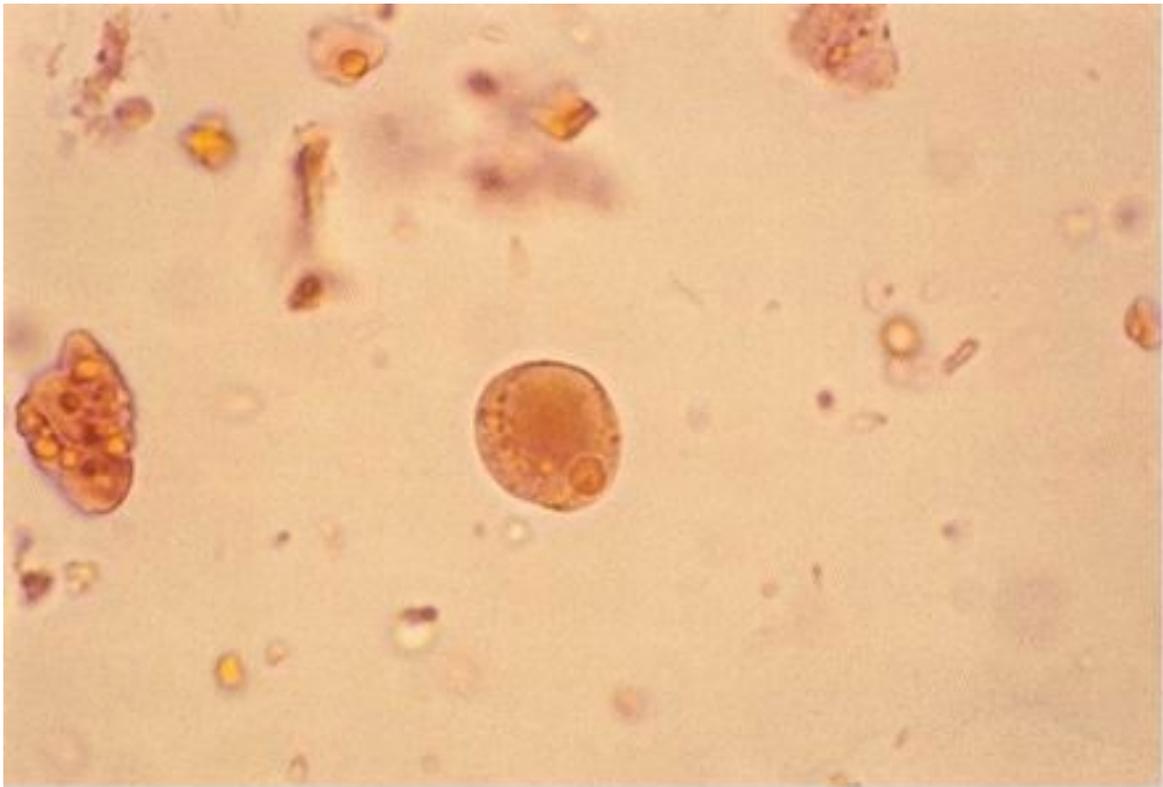


Photo n° 153

I. butschlii. Kyste avec une grande vacuole et un noyau. Coloration M.I.F. Obj. X 100.

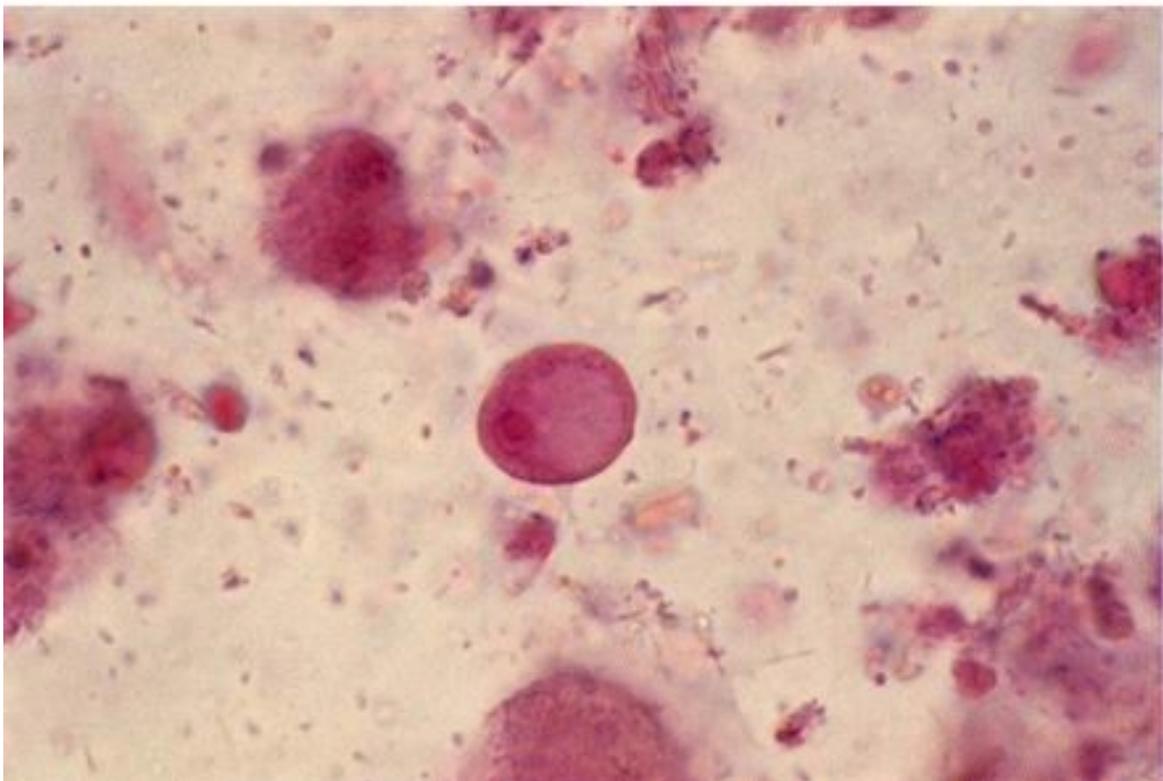


Photo n° 154

I. butschlii. Kyste avec une grande vacuole et un noyau de type « limax ». Coloration Bailenger. Obj. X 100.

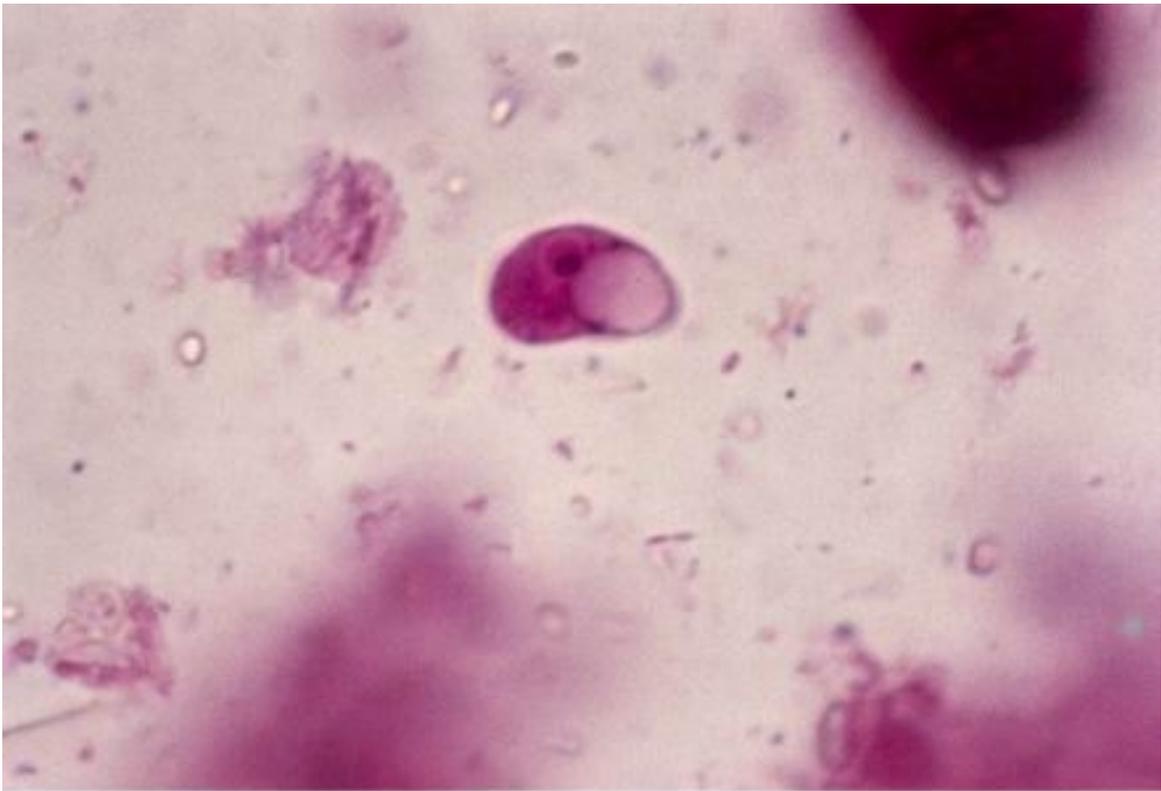


Photo n° 155
I. butschlii. Kyste de forme arquée, avec une grande vacuole et un noyau de type « limax ».
Coloration Bailenger. Obj. X 100.

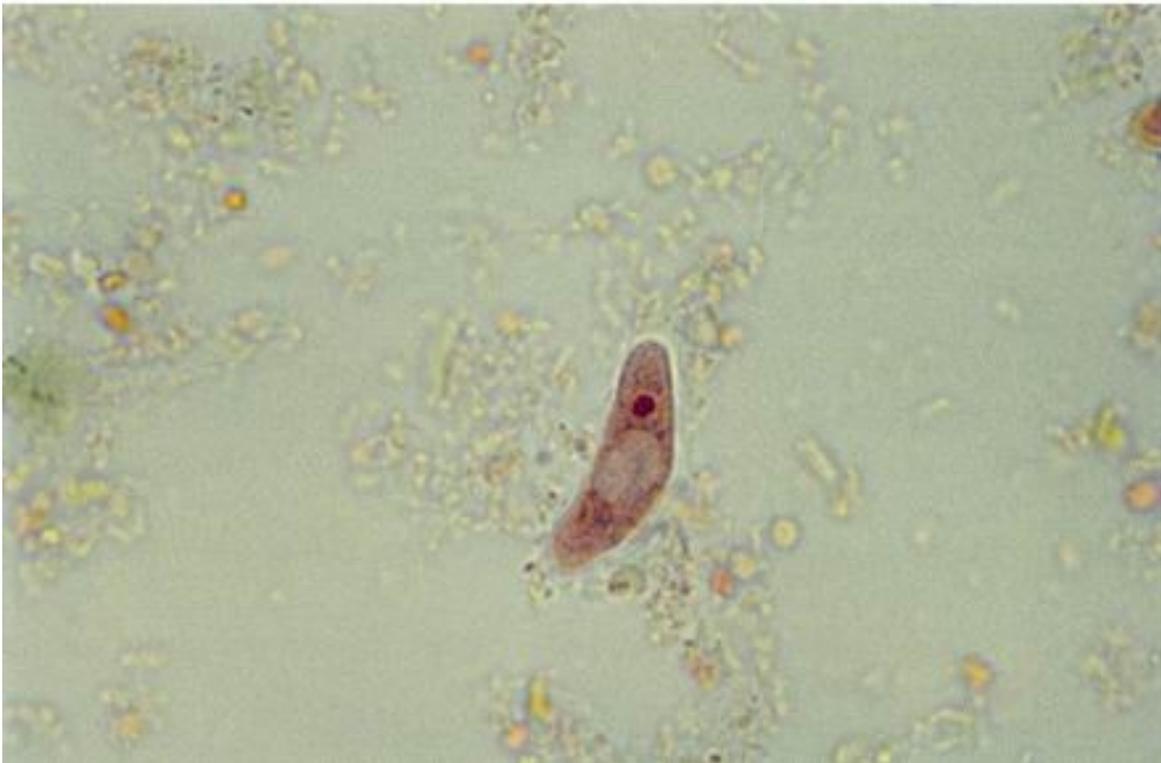


Photo n° 156
I. butschlii. Kyste de forme arquée, avec une grande vacuole incolore et un noyau de type « limax ».
Coloration trichrome. Obj. X 100.

FLAGELLÉS FORMES VÉGÉTATIVES ET KYSTES



Pages

- FLAGELLÉS FORMES VÉGÉTATIVES ET KYSTES

• Comment étudier un flagellé.....	169
• Forme végétative et kyste de <i>Giardia intestinalis</i>	171
• Forme végétative et kyste de <i>Chilomastix mesnili</i>	183
• Forme végétative et kyste de <i>Retortamonas intestinalis</i>	190
• Forme végétative et kyste d' <i>Enteromonas hominis</i>	193
• Forme végétative de <i>Pentatrichomonas intestinalis</i>	195
• Forme végétative de <i>Dientamoeba fragilis</i>	196

Les flagellés parasites de l'intestin de l'Homme sont au nombre de six qu'on trouve dans les selles sous la forme végétative, ou kystique pour certains d'entre eux.

1. **GIARDIA** (= *Lambli*a) **INTESTINALIS** : forme végétative et kyste ovalaire.
2. **CHILOMASTIX MESNILI** : forme végétative et kyste piriforme.
3. **RETORTAMONAS INTESTINALIS** (= *Embadomonas*) : forme végétative et kyste piriforme.
4. **ENTEROMONAS** (= *Tricercomonas*) **HOMINIS** : forme végétative et kyste ovalaire.
5. **PENTATRICHOMONAS INTESTINALIS** (= *Trichomonas*) : forme végétative seulement. PAS DE KYSTE.
6. **DIENTAMOEBA FRAGILIS** : forme végétative seulement. PAS DE KYSTE.

COMMENT ÉTUDIER UN FLAGELLÉ

Les flagellés doivent être examinés immédiatement après l'émission des selles, car à la température du laboratoire, ils s'immobilisent très vite et prennent alors tous une forme arrondie à l'exception de *Giardia intestinalis* et surtout *Pentatrichomonas intestinalis* qui est plus résistant. Comme ils sont de petite taille, on peut passer facilement à côté lorsqu'ils ne sont pas assez nombreux, ou au contraire les prendre pour des amibes s'ils sont suffisamment abondants pour attirer l'attention.

Comme pour les amibes, on rencontre les formes végétatives dans les selles pâteuses ou fluides et les kystes dans les selles plus moulées. Mais à part le kyste de *Giardia*, les kystes des autres espèces sont beaucoup plus rares en général que les formes végétatives, et l'on gagnerait à rechercher plutôt ces dernières.

Il n'y a aucune difficulté à identifier les flagellés intestinaux. Leur morphologie à frais est suffisamment caractéristique pour permettre une détermination d'espèce, et dans la pratique courante, il est inutile de faire une coloration à l'hématoxyline ferrique ou au trichrome. Une coloration au M.I.F. sur selles fraîchement émises aide à préciser certains détails de morphologie.

Si l'on a beaucoup de travail, on peut par exemple mettre les selles en culture, et les regarder en fin de journée. Cette culture sera faite non pas tout à fait dans le but de multiplier le nombre de flagellés, mais de les conserver vivants, de régénérer les éléments immobilisés afin de pouvoir les étudier dans des conditions favorables, au moment où l'on dispose du temps nécessaire. Ces cultures se font sur le milieu de Dobell-Laidlaw de Diagnostics Pasteur®.

DÉMARCHE À SUIVRE POUR ÉTUDIER UN FLAGELLÉ VIVANT

Taille : le plus long : *Chilomastix mesnili*
le plus large : *Giardia intestinalis*
le plus petit : *Enteromonas hominis*

Forme : elle suffit le plus souvent pour avoir un diagnostic de présomption.

Giardia intestinalis :

de face, symétrie bilatérale, en toupie, en cerf-volant.

de profil, caractéristique, en cuillère, en croissant.

Chilomastix mesnili :

allongé avec une extrémité arrondie, et une effilée, un sillon de torsion caractéristique.

Retortamonas intestinalis :

de face, comme un chilomastix, mais sans le sillon de torsion.

de profil : en sabot, en oiseau.

Pentatrichomonas intestinalis :

forme en amande, pointue des deux bouts,

membrane ondulante sur un seul côté du parasite.

Autres éléments à étudier

Nombre, place et direction des flagelles. C'est une donnée très importante.

Présence ou non de kystes, forme et taille de ces derniers.

GIARDIA INTESTINALIS

FORME VÉGÉTATIVE

Parasite cosmopolite, ayant une symétrie bilatérale

Tableau X : Formes végétatives de GIARDIA INTESTINALIS
Résultats d'un test du Contrôle National de Qualité en Parasitologie en France

Date d'envoi	Nombre de réponses	Richesse*	Résultats conformes	Deuxième réponse en %**	Troisième réponse en %**
11/1992	1 183	1 (+ kystes) Coloration : trichrome	66,1 % (1)	Entamoeba coli 26,1	Endolimax nanus 9,2

* La richesse moyenne = nombre de champs Obj. X 40 nécessaires pour trouver un parasite.

** Parasites absents de la selle.

(1) Associé avec des formes végétatives d'*Iodamoeba butschlii*, d'*Entamoeba hartmanni* et des kystes et formes végétatives d'*Entamoeba histolytica*.

C'est un flagellé intestinal très fréquemment rencontré. Chez les consultants en coprologie à Paris sa fréquence était d'environ de 4 % chez les adultes en 1994 et un peu plus chez les enfants. C'est un parasite cosmopolite dont la prévalence dans les examens parasitologiques de selles paraît être aux environs de 5 % dans tous les pays, mais en régression dans les pays occidentaux.

Giardia intestinalis peut provoquer des troubles digestifs principalement de la diarrhée, surtout chez les enfants. La guérison après traitement est assez rapide mais la réinfestation est facile.

Le diagnostic parasitologique se fait par la recherche dans les selles soit des formes végétatives, soit des kystes.

FORME VÉGÉTATIVE (= trophozoïte)

Habitat : La forme végétative vit au niveau du duodénum, à la surface de la muqueuse, où elle se multiplie par division binaire. On en trouve donc à l'état pur dans le liquide de tubage duodéнал, ce qui peut servir pour faire son diagnostic. C'est le seul flagellé qui habite dans le duodénum: *Trichomonas hominis* et *Chilomastix mesnili* n'y sont pas retrouvés (146). Dans les infections intenses *Giardia intestinalis* peut envahir une partie de l'intestin grêle.

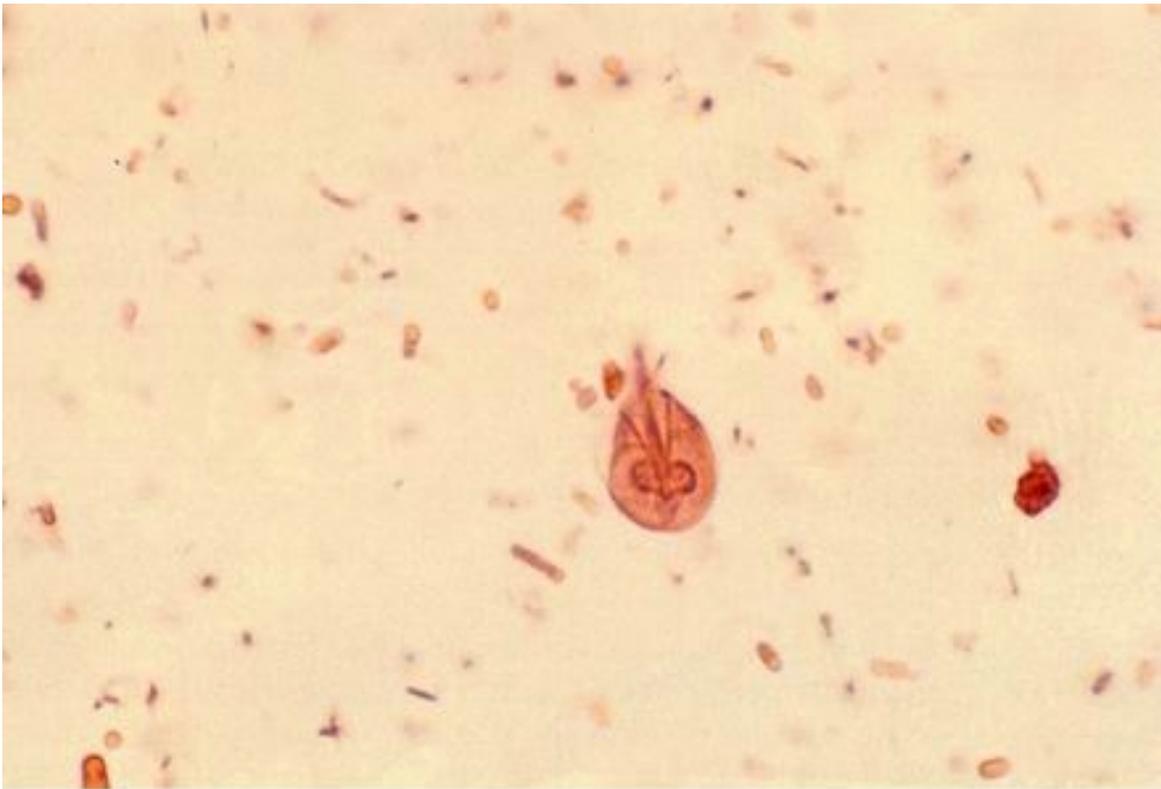


Photo n° 157
Giardia intestinalis. Forme végétative. Coloration M.I.F. Obj. X 100.



Photo n° 158
Giardia intestinalis. Forme végétative. Coloration Bailenger. Obj. X 100.

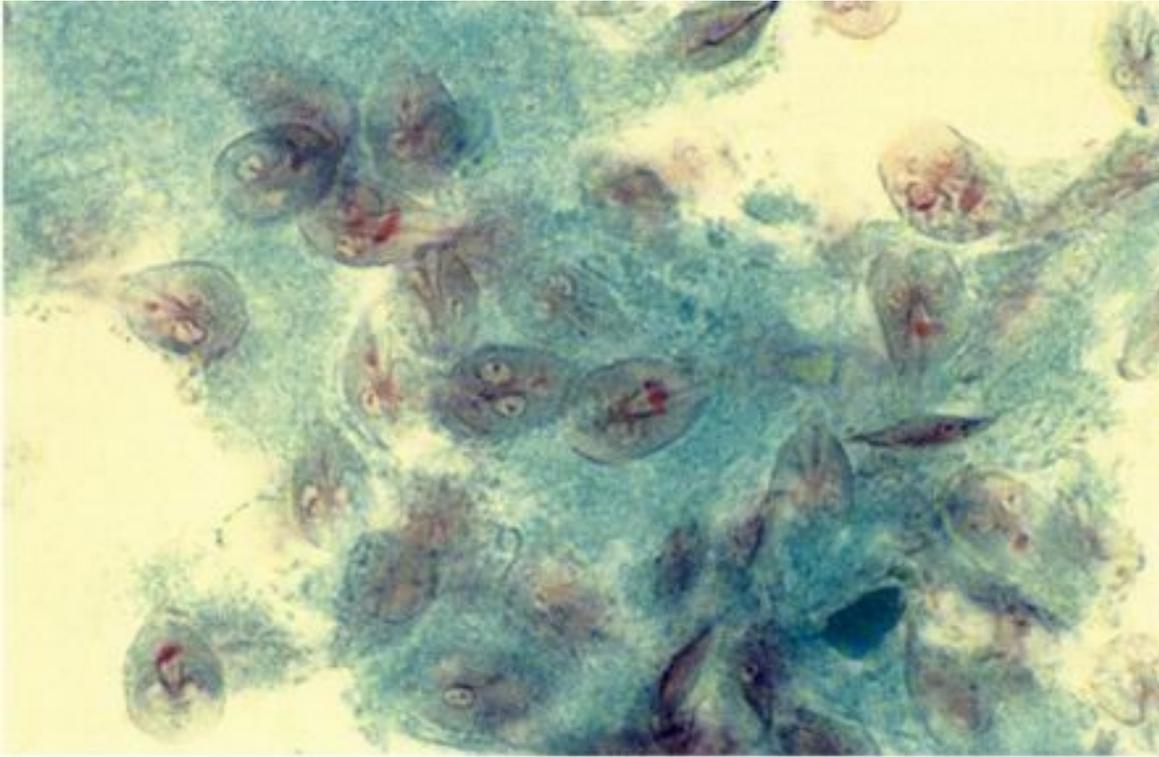


Photo n° 159

Giardia intestinalis. Nombreuses formes végétatives en amas, serrées dans le mucus. Coloration trichrome. Obj. X 100.

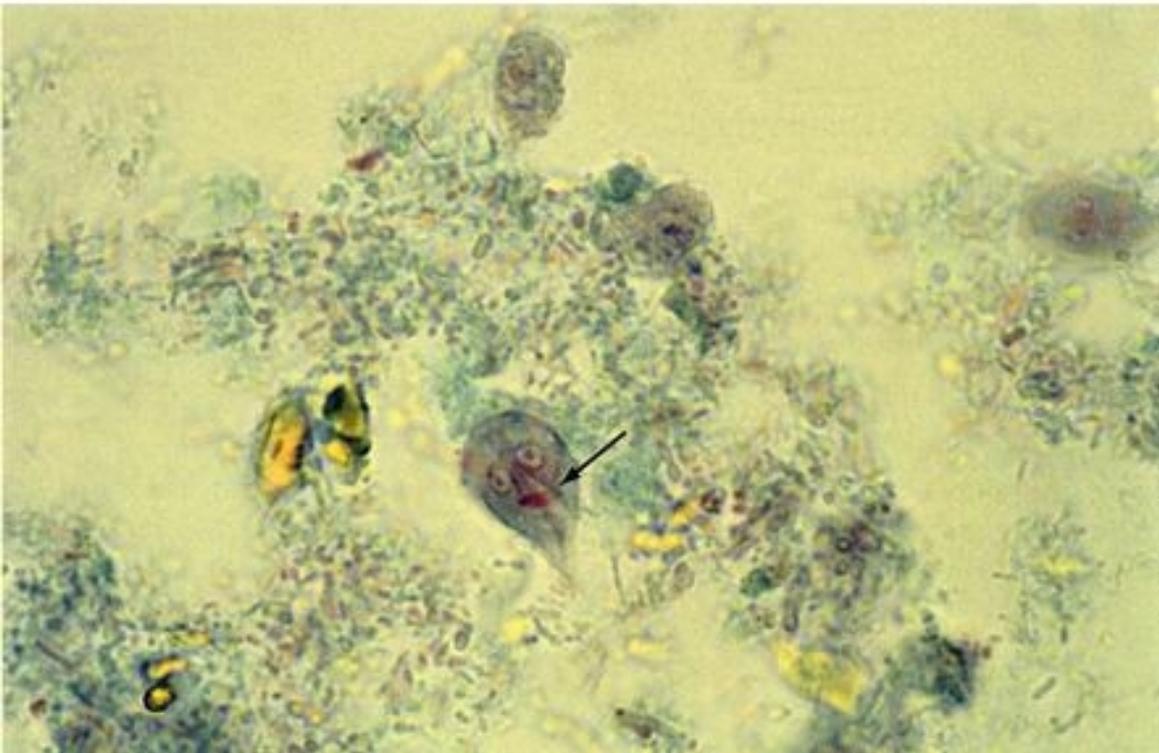


Photo n° 160

Giardia intestinalis. Forme végétative. Noter le corps parabasal en « virgule » de couleur brique. Coloration trichrome. Obj. X 100.

On trouve ainsi les formes végétatives de *Giardia intestinalis* dans les selles diarrhéiques, avec accélération du transit au niveau du grêle. Les kystes et les formes végétatives sont souvent associés dans une même selle. Des essais pour accroître l'excrétion des parasites avec des purgatifs se sont montrés inefficaces (65). Quelquefois, dans les selles d'entérite aiguë, on peut voir des amas serrés de formes végétatives de *G. intestinalis* dans les traînées de mucus.

Résistance

Les formes végétatives de *G. intestinalis* dans les selles sont très fragiles. Elles s'immobilisent très vite. Seule la paire de flagelles postérieurs reste assez longtemps mobile. Mais même immobile, *G. intestinalis* se reconnaît très facilement: il est néanmoins alors un peu plus difficile à voir, car très peu réfringent.

Morphologie

TAILLE: longueur 10-20 µm/largeur 5-12 µm épaisseur 2 µm.

FORME : de face aplatie, en toupie, en cerf-volant.

Seul flagellé à posséder une symétrie bilatérale.

A la partie antérieure, qui est la plus large, se trouve une grande dépression réniforme, occupant toute la largeur du protozoaire et paraissant plus claire que le reste du corps. Dans cette dépression on voit facilement à frais deux noyaux volumineux.

de profil : à cause de cette dépression antérieure, le profil de *Giardia intestinalis* est en cuillère ou en croissant, très caractéristique.

Nombre, place et direction des flagelles

4 paires de flagelles très longs et dirigés tous vers la partie postérieure, bien visibles sur les côtés du protozoaire.

Autres détails morphologiques

- Les prolongements intracytoplasmiques des flagelles postérieurs constituent un faux axostyle, sorte de filament de soutien situé dans l'axe longitudinal.
- Les corps parabasaux, en forme de virgule, courts, épais et réfringents, qui se rencontrent surtout chez les formes prékystiques, c'est-à-dire chez *Giardia intestinalis* sur le point de s'enkyster.

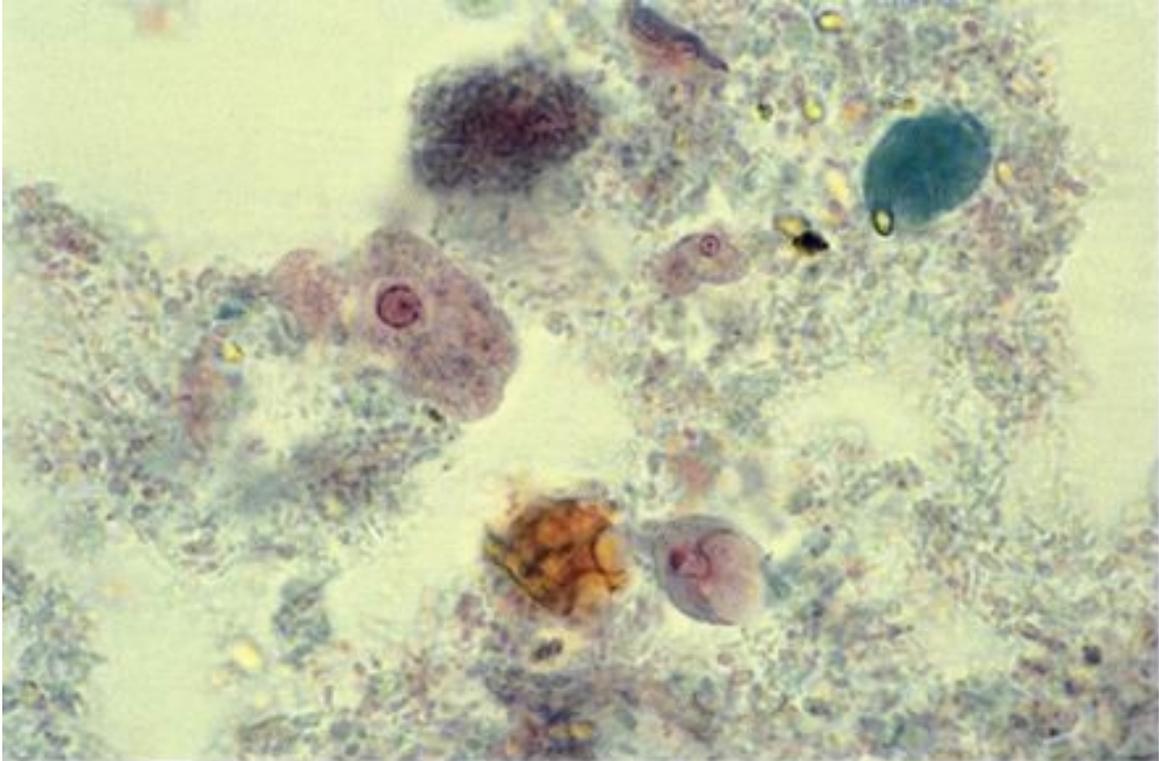


Photo n° 161

Giardia intestinalis. Forme végétative. Associé à *E. histolytica* / *E. dispar* forme végétative et à une très petite *E. hartmanni* forme végétative. Coloration trichrome. Obj. X 100.

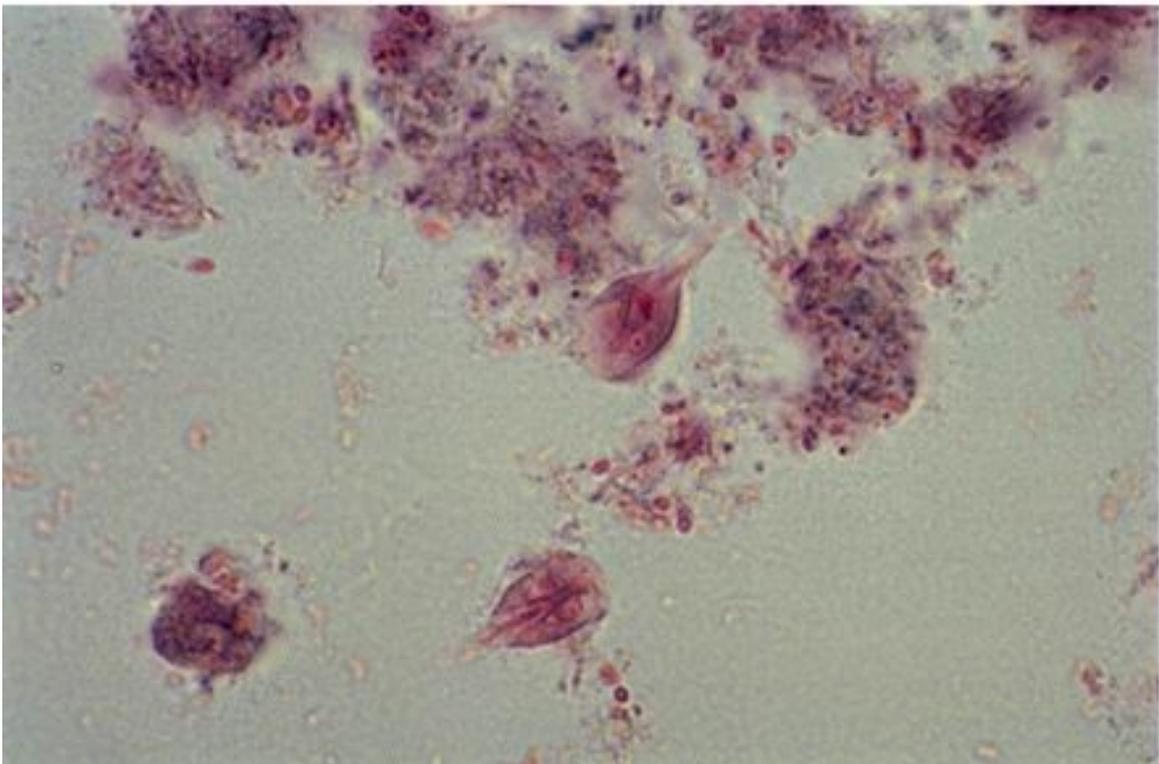


Photo n° 162

Giardia intestinalis. Deux formes végétatives, dont une avec le corps parabasal de couleur brique bien visible. Coloration trichrome. Obj. X 100

GIARDIA INTESTINALIS

KYTE

Tableau XI : Kystes de Giardia Intestinalis
Résultats des tests du Contrôle National de qualité en Parasitologie en France

Date d'envoi	Nombre de réponses	Richesse*	Résultats conformes	Deuxième réponse en %**	Troisième réponse en %**
11/1979	1 594	< 1	92,9 %	<i>Ascaris lumbricoides</i> 5,6	<i>Entamoeba coli</i> 1,9
06/1981	1 274	2	94,3 %	<i>Endolimax nanus</i> 3,7	<i>Entamoeba histolytica</i> 2,7
11/1982	1 050	1 (+F.V.)	88,9 %	<i>Strongyloides stercoralis</i> 6,3	Nématodes divers 2,1
02/1984	1 077	5	82,8 % (1)	<i>Entamoeba coli</i> 35	<i>Pseudomimas butschlii</i> 3,1
01/1985	1 080	1	96,9 %	Helminthes 3,5	Ankylostomidé 1
02/1986	645	1	99,3 %	Amibes diverses 3,1	Helminthes divers 2,3
11/1987	1 163	5	59,5 % (2)	<i>Entamoeba coli</i> 15,4	Parasites divers 12,9
07/1988	995	1	95,7 %	<i>Ascaris lumbricoides</i> 3,5	<i>Endolimax nanus</i> 2,4
11/1992	1 183	1 (+F.V.)	71,9 % (3)	<i>Entamoeba coli</i> 8,6	<i>Endolimax nanus</i> 2,8
11/1992	1 233	1	94,8 %	Protozoaires divers 2	Helminthes divers 1,4
11/1995	1268	1	97 %	Parasites divers 1,7	<i>Endolimax nanus</i> 0,9

* La richesse moyenne = nombre de champs Obj. X 40 nécessaires pour trouver un parasite.

** Parasites absents de la selle.

(1) Associé avec des kystes et des formes végétatives d'*Entamoeba histolytica*.

(2) Associé avec des larves rhabditoïdes de *Strongyloides stercoralis*.

(3) Associé avec des formes végétatives de *Pseudolimax butschlii*, d'*Entamoeba hartmanni* et des kystes et formes végétatives d'*Entamoeba histolytica*



Photo n° 163
Giardia intestinalis. Kyste. Coloration Lugol. Obj. X 100.

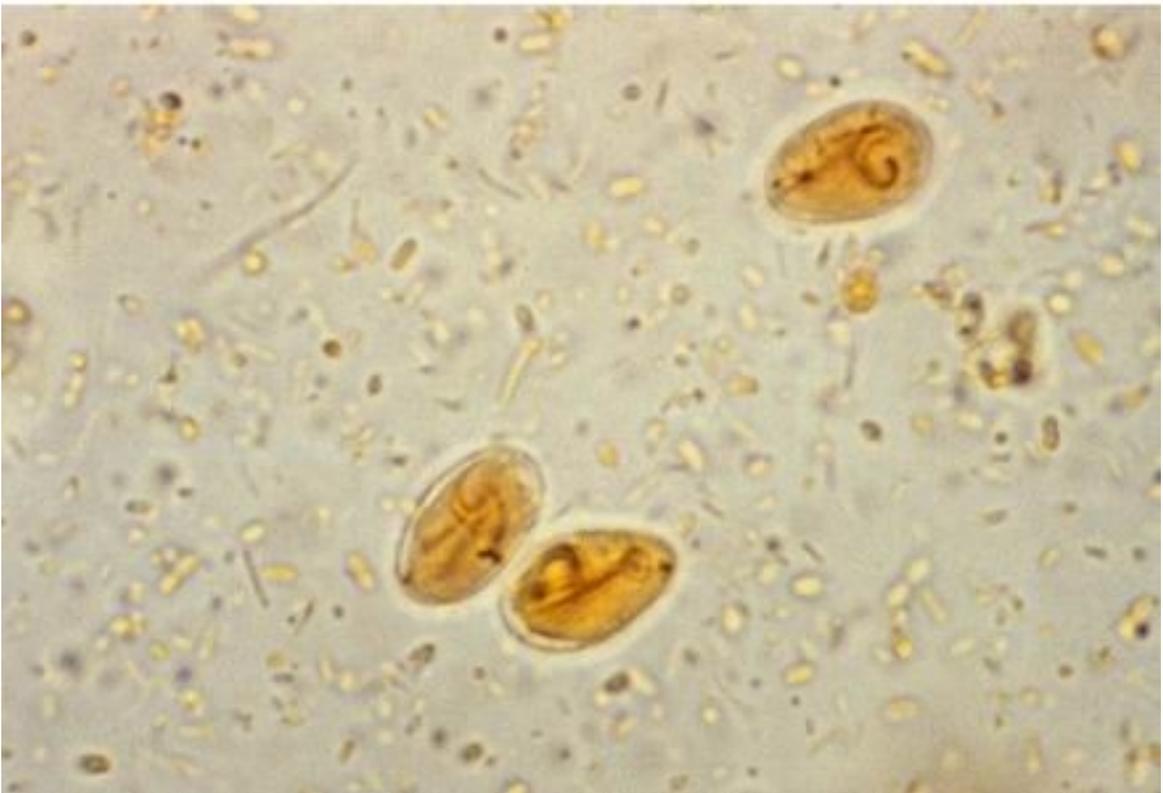


Photo n° 164
Giardia intestinalis. Trois kystes. Coloration Lugol. Obj. X 100.

Formation des kystes

A un certain moment, *Giardia intestinalis* ne se multiplie plus par division binaire. Il s'immobilise ; les corps parabasaux augmentent de volume, le protozoaire devient plus petit, moins large et s'entoure d'une membrane qui devient de plus en plus épaisse et plus résistante. Les noyaux se divisent une fois : le kyste mûr a ainsi 4 noyaux, et contient deux unités.

Rythme d'élimination des kystes

Les kystes de *Giardia intestinalis* sont en général très abondants dans les selles. Mais comme pour les amibes, la formation des kystes varie dans le temps, les kystes peuvent donc à un moment donné se raréfier progressivement et disparaître totalement pendant 7 à 10 jours : c'est la période négative. Quand le nombre de kystes croît, leur volume, largeur et longueur décroît et vice-versa (75).

Résistance des kystes

Les kystes peuvent vivre 66 jours dans le milieu extérieur. Ils sont détruits à la température de 64°C. Ils constituent la forme de résistance et de dissémination du parasite. La contamination se fait en effet par ingestion de kystes mûrs.

Morphologie

Les kystes de *Giardia intestinalis* sont dans leur forme typique habituelle très faciles à reconnaître.

TAILLE : 8-13 µm/8-9 µm.

FORME : les kystes nouvellement formés gardent encore la forme de la forme végétative : ils sont ovoïdes avec une extrémité plus large que l'autre. Les kystes mûrs sont d'un ovale très pur, régulier.

Il faut savoir distinguer les kystes de *Giardia intestinalis* :

- des spores de morilles,
- des spores d'*Isospora hominis*.

CONTOUR : il est lisse et assez mince, assez réfringent. Cette coque est nettement moins épaisse et moins réfringente que celle du kyste d'*Entamoeba coli* par exemple. Cette coque externe peu épaisse explique qu'il est assez difficile de conserver en bon état les kystes de giardia. Les kystes sont incolores.

CONTENU : le cytoplasme du kyste est plus petit que son enveloppe, si bien qu'il existe un vide donnant l'impression d'une double coque.

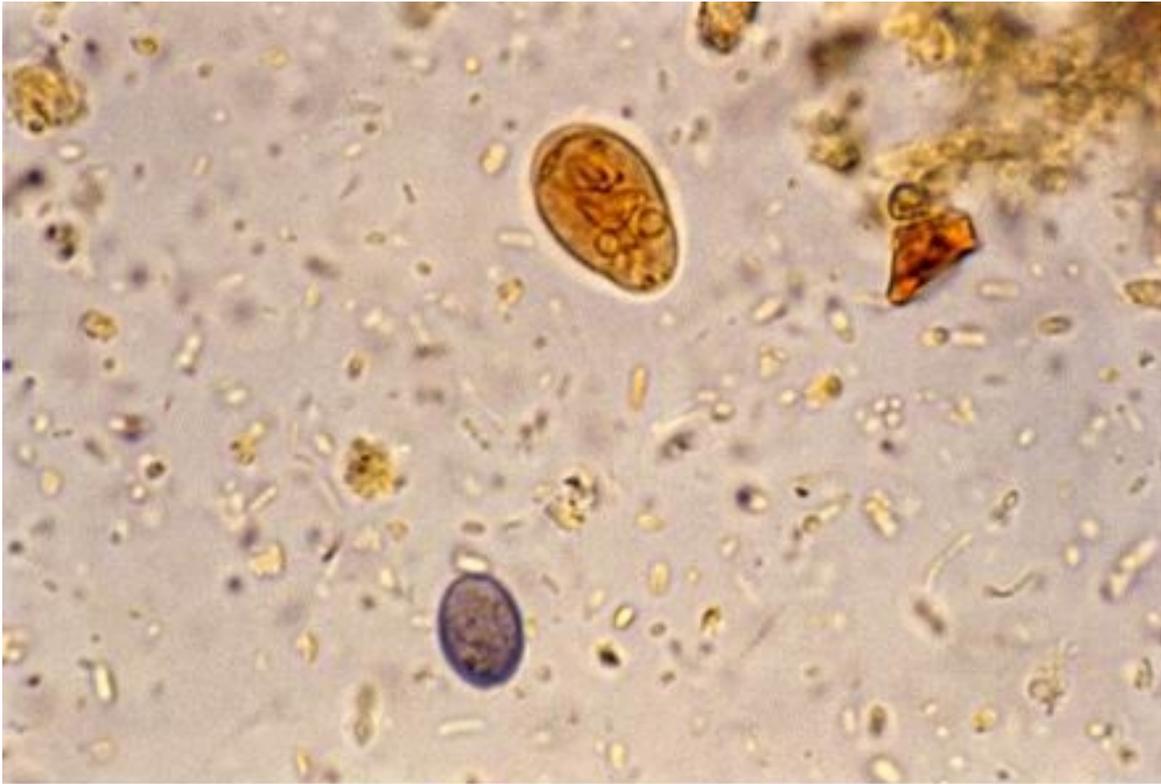


Photo n° 165

Giardia intestinalis. Deux kystes. Un de grande taille, jaune-brun et l'autre de petite taille, dégénéré, bleu-gris. Coloration Lugol. Obj. X 100.

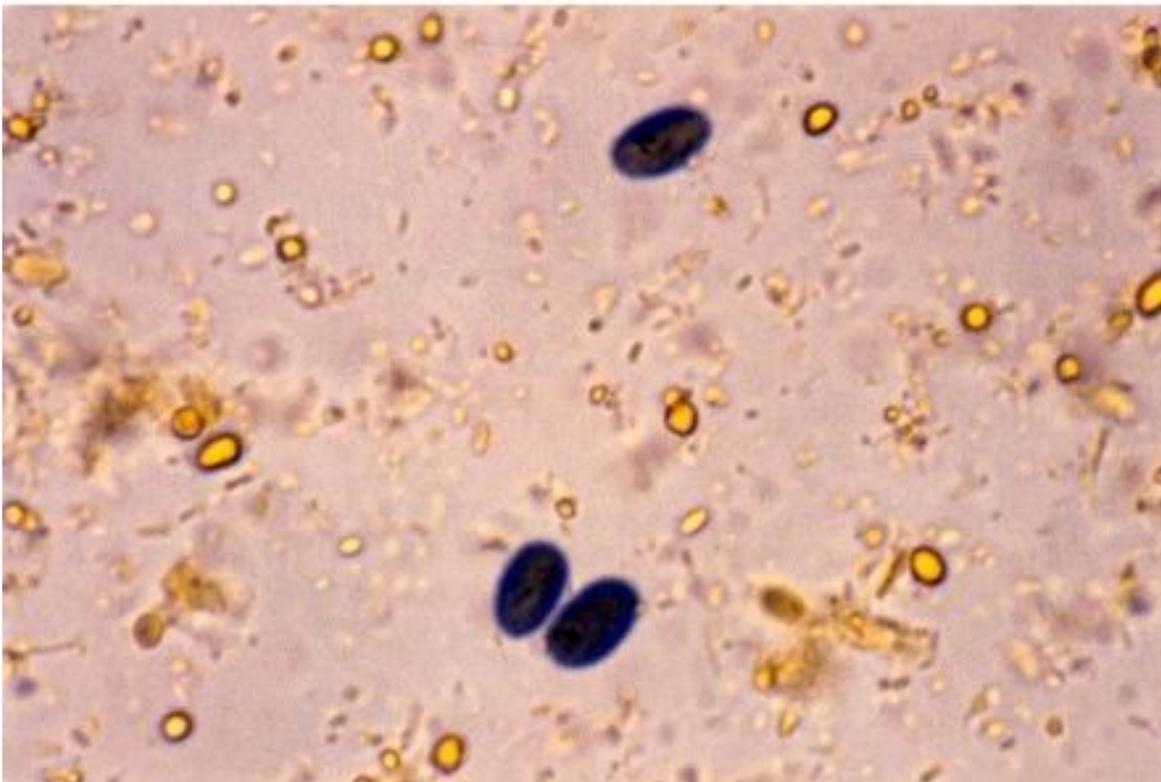


Photo n° 166

Giardia intestinalis. Trois kystes de petite taille, dégénérés, bleus. Coloration Lugol. Obj. X 100.

Le kyste est rarement optiquement vide : on voit en effet, même sans coloration, les détails du kyste

- les flagelles sous la forme d'une cloison longitudinale en S.
- 2 ou parfois 4 noyaux selon le degré de maturation du kyste,
- les corps parabasaux en forme de grosses virgules réfringentes.

Kystes vides

Avant ou au cours des périodes négatives, ou sous l'influence d'un traitement actif, on peut trouver dans les selles de rares éléments ovalaires, de la taille d'un kyste de *Giardia*, avec une coque externe peu réfringente contenant une petite masse cytoplasmique arrondie, sans structure organisée, granuleuse, occupant à peine le 1/4 ou le 1/5 du kyste. Ce sont des kystes dégénérés, vides ou presque, non viables.

Si l'on refait un examen quelques jours plus tard, on voit apparaître les formes typiques permettant de rattacher à *Giardia intestinalis* les éléments précédents.

COLORATION

Après coloration au Lugol on observe trois types de kystes de *G. intestinalis* de coloration différentes (148).

- **Les kystes jaunes clairs**, de beaucoup les plus fréquents, dans lesquels l'organisation interne du parasite est parfaitement visible.

- **Les kystes bruns, plus** ou moins foncés, chez lesquels l'organisation interne du parasite existe comme dans les kystes jaunes, mais moins facile à distinguer à cause de la teinte sombre de l'ensemble.

- **Les kystes bleus**

Ce sont des formes probablement dégénérées (148), appelées kystes bleus parce qu'ils prennent une couleur bleu-gris au Lugol, tout comme le fait l'amidon. Certains kystes sont colorés en partie en bleu, en partie en brun. À l'état naturel, ces kystes sont incolores comme les autres kystes.

TAILLE et FORME : ovale comme un kyste normal, mais beaucoup plus petit, de la taille d'un kyste ayant perdu sa coque externe.

ASPECT et CONTENU : pas d'enveloppe nette. Contenu hyalin ou granuleux. Le flagelle longitudinal persiste parfois.

Noyau souvent absent.

Le parasite est peu reconnaissable ou difficilement reconnaissable.

À l'état normal, on trouve toujours quelques kystes bleus parmi la multitude des kystes typiques. Dans certains cas, on en trouve une très grande quantité, et si l'on ne fait pas un Lugol systématique, on risque de prendre ces éléments pour des kystes d'*Endolimax nanus*.

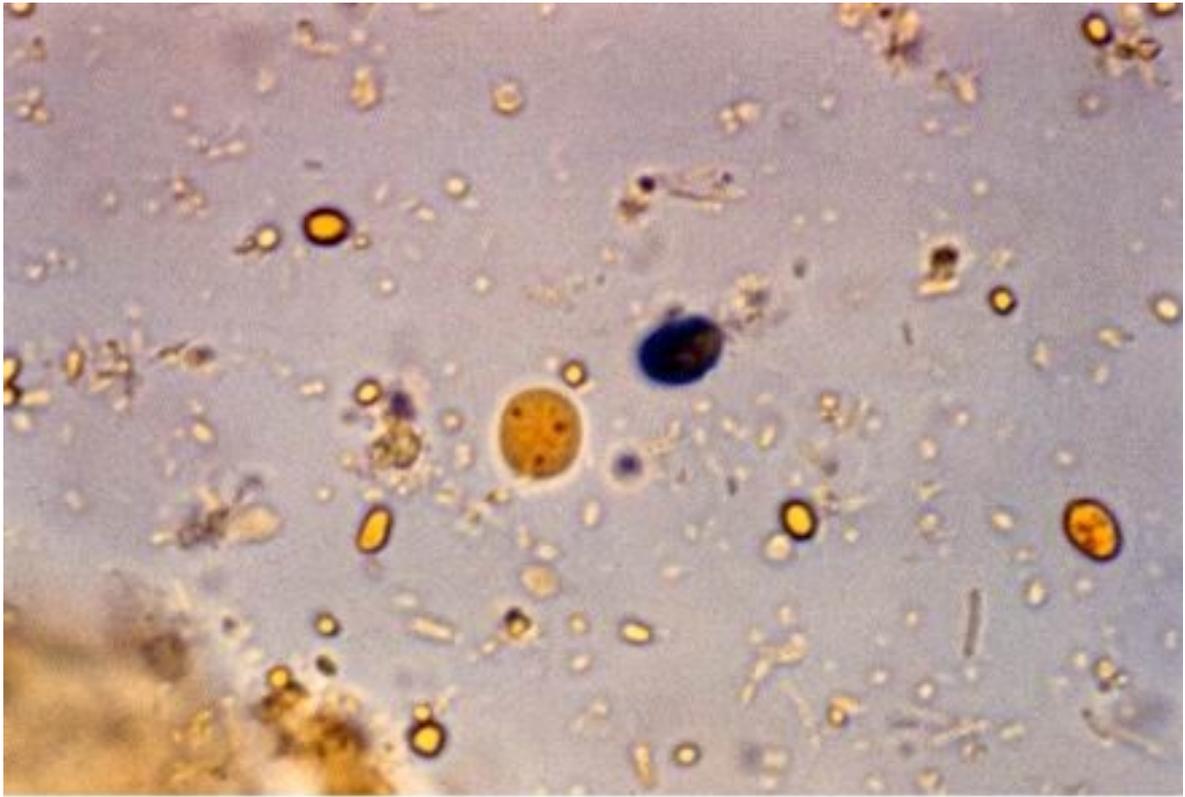


Photo n° 167

Giardia intestinalis. Kyste bleu et *E. nanus* kyste, avec trois noyaux bien visibles. Coloration Lugol. Obj. X 100.

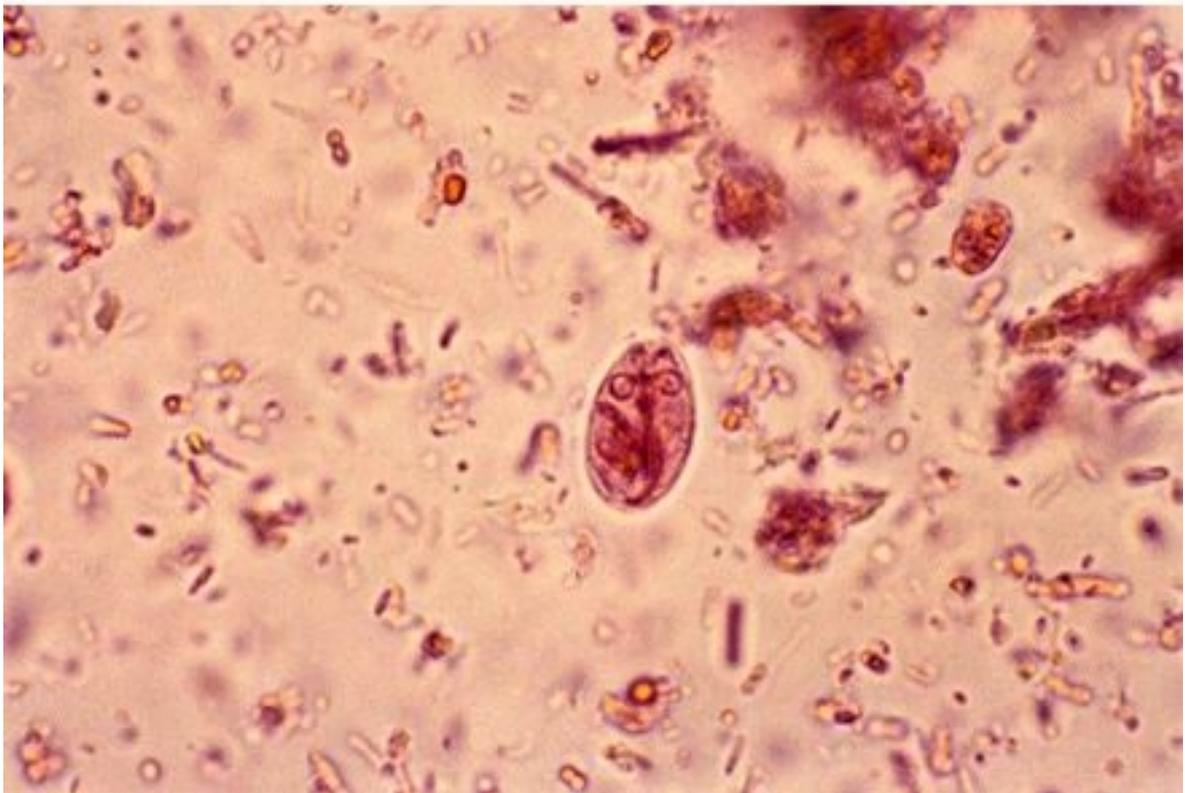


Photo n° 168

Giardia intestinalis. Kyste. Coloration M.I.F. Obj. X 100.

Coques bleues

À côté des kystes bleus dont la coloration correspond vraisemblablement au contenu, du kyste, il existe des coques bleues, souvent largement ouvertes en tulipes, et dont l'épaisseur irrégulière, est fréquemment renforcée à la base ou sur les côtés.

Le M.I.F. permet aussi de distinguer les détails dans un kyste qui reste incolore au début de la coloration et qui ne s'imprègne que peu à peu d'éosine. Il permet aussi de mettre en évidence les « kystes bleus ». La conservation des kystes en solution formolée n'est pas très bonne, le contenu se rétracte souvent et l'étude morphologique devient, au bout de quelques mois, difficile.

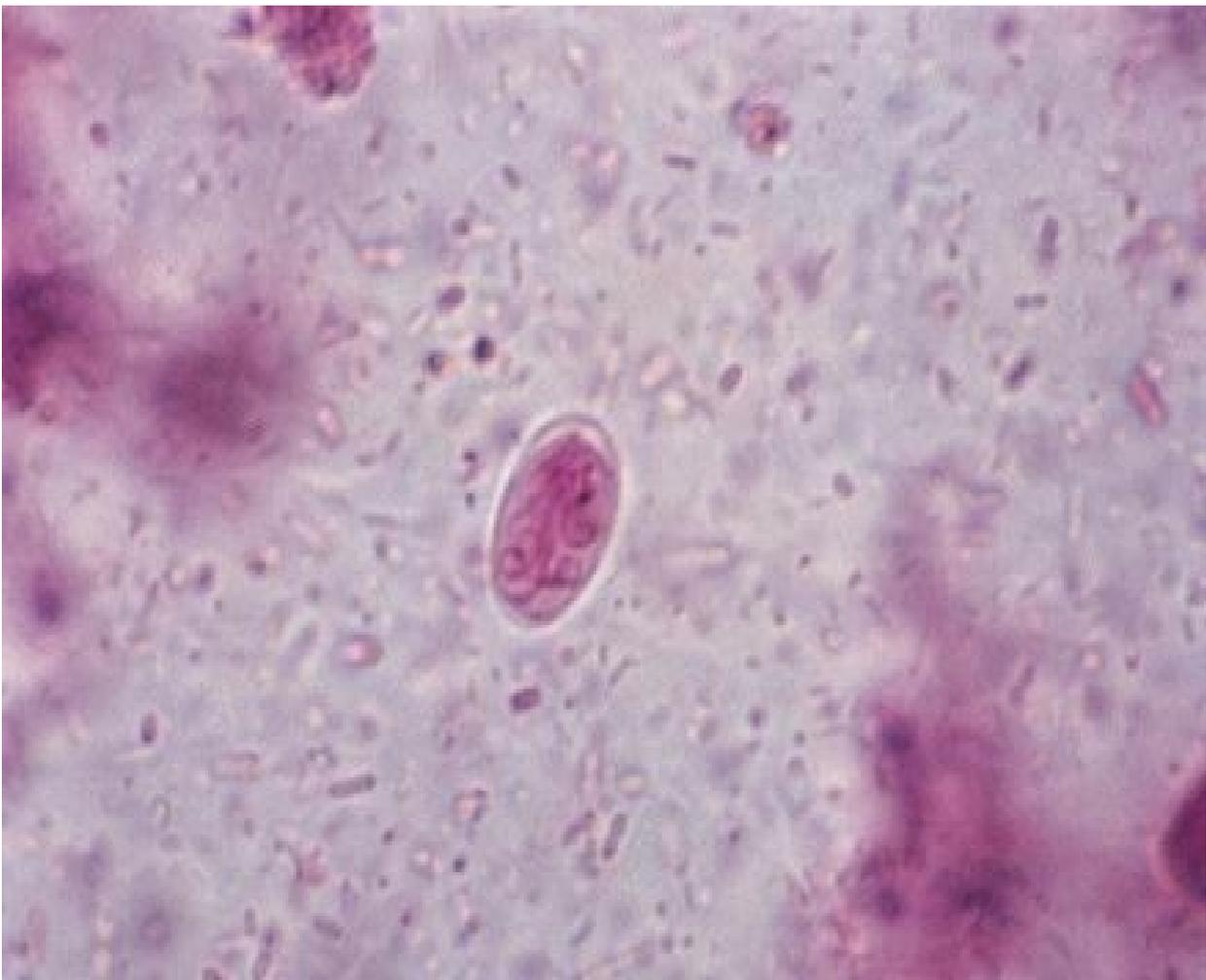


Photo n° 169

Giardia intestinalis. Kyste. Coloration Bailenger. Obj. X 100.

CHILOMASTIX MESNILI

Parasite cosmopolite.

Les diverses statistiques donnent des fréquences très variables, soit parce que certains les confondent avec *Pentatrichomonas intestinalis*, soit à cause de la rareté habituelle des kystes dans les selles moulées alors que les formes végétatives sont plus nombreuses dans les selles pâteuses.

C'est un flagellé considéré comme non pathogène, mais dont la présence peut coïncider avec des diarrhées.

Le diagnostic parasitologique se fait par la recherche :

- dans les selles moulées : de kystes qui sont petits, rares, donc difficiles à mettre en évidence,
- dans les selles pâteuses : de formes végétatives, de plus grande taille, mobiles, faciles à voir.

La culture sur le milieu de Diagnostics Pasteur® permet, sinon une multiplication, du moins une survie et parfois un début d'enkystement.



Photo n° 170

Chilomastix mesnili. Forme végétative. Coloration Bailenger. Obj. X 100.

FORME VÉGÉTATIVE (141 ; 144)

Habitat

Chilomastix mesnili vit dans le gros intestin en particulier dans le caecum, peut-être aussi dans le grêle. Il s'y multiplie par division binaire longitudinale.

Résistance

Chilomastix mesnili est assez fragile et s'immobilise vite à la température extérieure, sauf lorsqu'il se trouve dans les selles liquides où il survit plus longtemps. Comme tous les flagellés, *Chilomastix mesnili* immobilisé est arrondi.

Morphologie

TAILLE : longueur 12-20 µm, largeur 5-6 µm. Taille en fait assez variable. La forme végétative bien mobile est au moins trois fois plus longue que large.

FORME : relativement rigide, allongée avec une extrémité antérieure arrondie et une extrémité postérieure longuement effilée. Lorsque le flagellé ralentit un peu ses mouvements, on voit, vers la partie moyenne du corps, un sillon de torsion occupant toute la largeur du parasite.

Ce sillon de torsion est caractéristique et sa présence permet d'éliminer *Retortamonas intestinalis*.

CYTOSTOME ET FLAGELLE DU CYTOSTOME :

Dans certaines positions, on distingue nettement, à la partie antérieure, une profonde dépression c'est la bouche ou cytostome dans laquelle bat un flagelle court mais épais, facile à voir (d'où le nom du parasite qui veut dire : flagelle dans la lèvre). Si l'on ne voit pas bien le cytostome on peut toujours remarquer que ce flagelle bat à l'intérieur du protozoaire.

Nombre, place et direction des autres flagelles

Trois autres flagelles, partent d'un groupe de blépharoplastes, situés en avant du noyau et se dirigent tous en avant. *Retortamonas intestinalis* n'a que deux flagelles.

Autres détails

Le cytoplasme est rempli de vacuoles alimentaires et de quelques petites inclusions. L'hématoxyline ferrique montre, en avant, un gros noyau avec une membrane nucléaire fine, tapissée de peu de chromatine périphérique.

Le M.I.F. montre un noyau uniformément plus coloré que le cytoplasme.

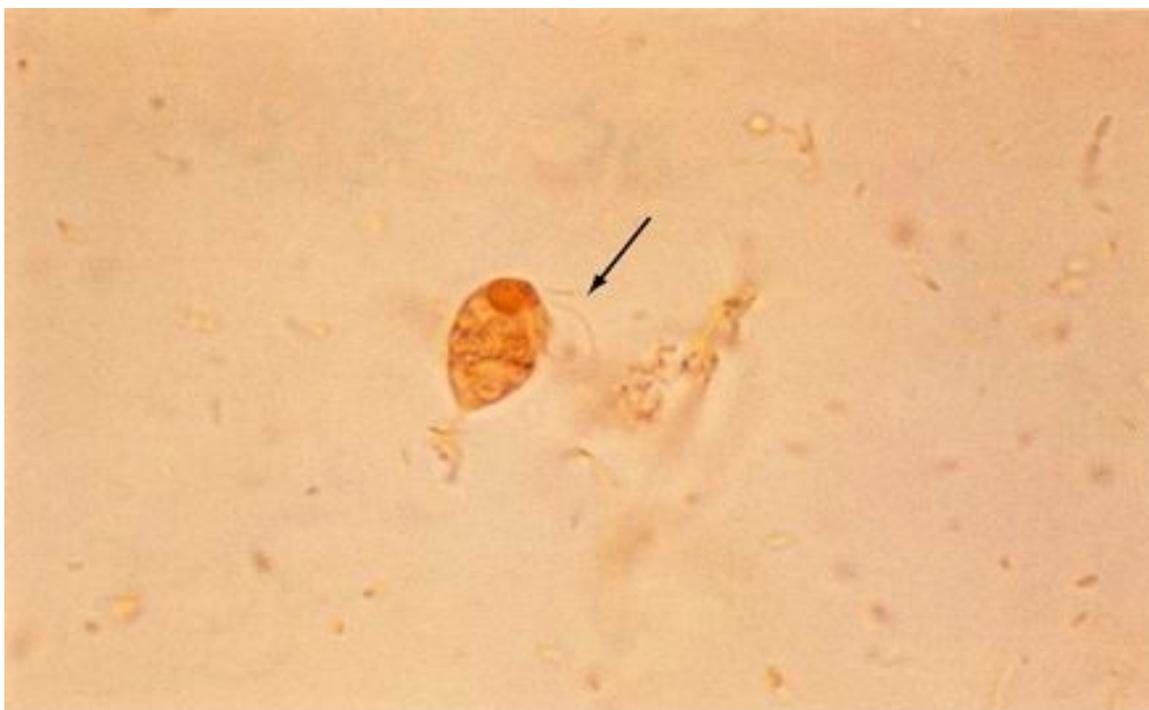


Photo n° 171
Chilomastix mesnili. Forme végétative. Trois flagelles visibles. Coloration M.I.F. Obj. X

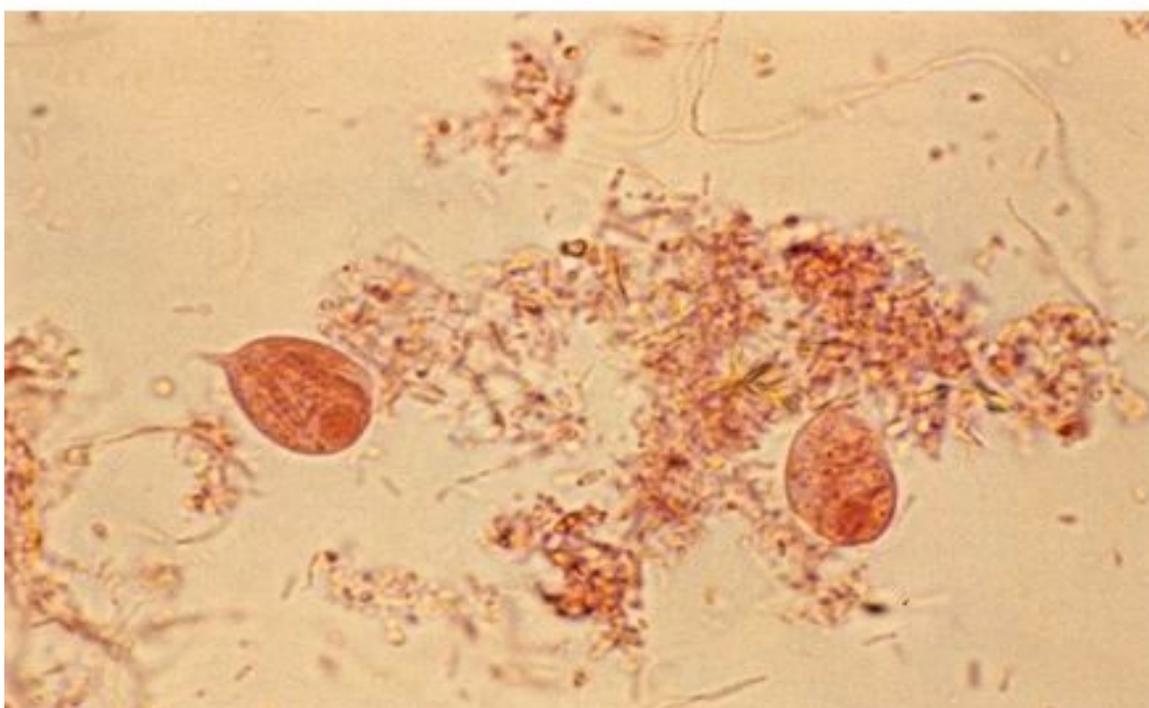


Photo n° 172
Chilomastix mesnili. Deux formes végétatives. Coloration M.I.F. Obj. X 100.

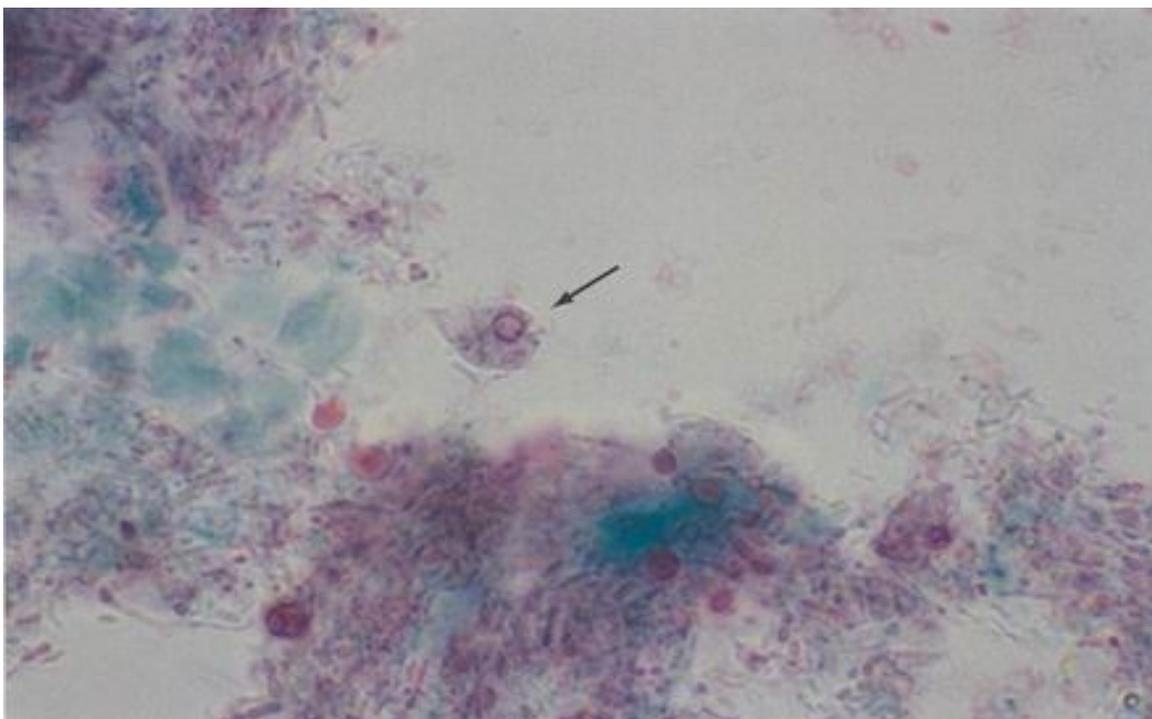


Photo n° 173
Chilomastix mesnili. Forme végétative. Coloration trichrome. Obj. X 100.

Tableau XII : Kystes de *CHILOMASTIX MESNILI*
Résultats des test du Contrôle National de Qualité en Parasitologie en France

Date d'envoi	Nombre de réponses	Richesse*	Résultats conformes	Deuxième réponse en %**	Troisième réponse en %**
04/1982	1 014	3	16,9 %	Abs de parasites 49,7 %	<i>Ascaris lumbricoides</i> 10,3 %
05/1992	1039	1	55,5	<i>Endolimax nanus</i> 8,6 %	<i>Giardia intestinalis</i> 6,7 %

* La richesse moyenne = nombre de champs Obj. X 40 nécessaires pour trouver un parasite.

** Parasites absents de la selle.



Photo n° 174
Chilomastix mesnili. Kyste. Sans coloration. Obj. X 100.

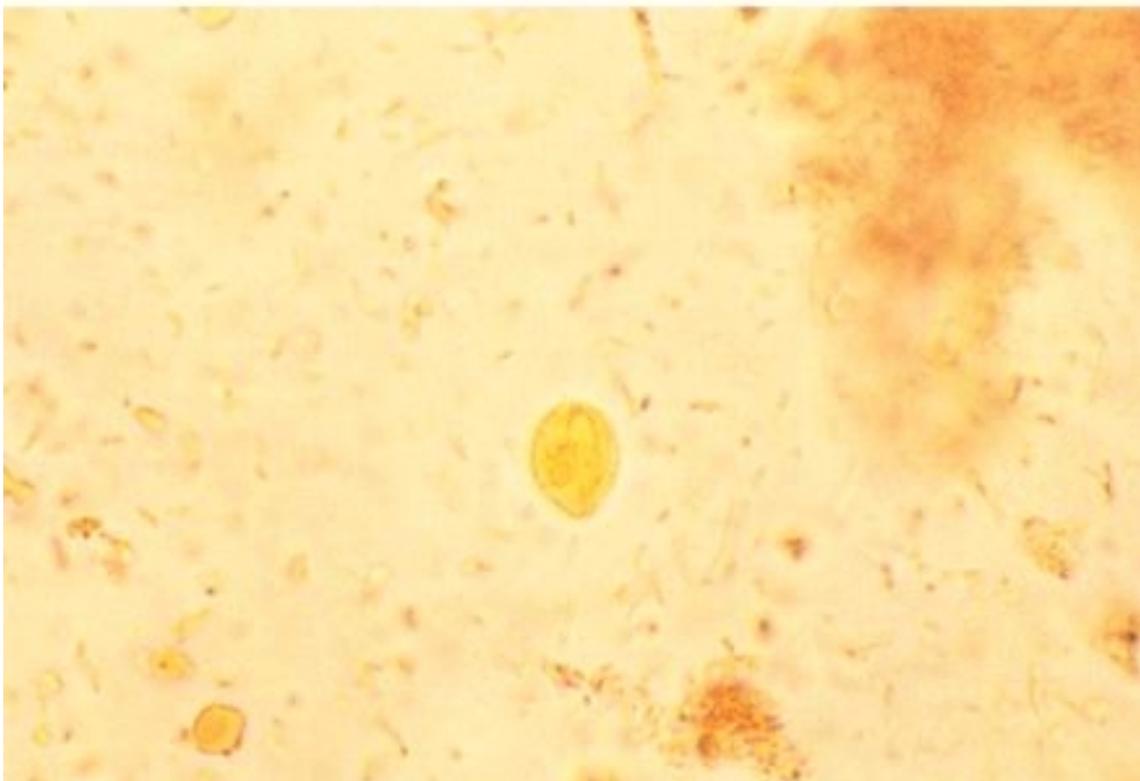


Photo n° 175
Chilomastix mesnili. Kyste. Flagelle recourbé et visible à l'intérieur du kyste. Coloration M.I.F., prédominance de la coloration par l'iode. Obj. X 100.

KYSTES

Formation des kystes

Le flagellé s'immobilise, devient de plus en plus arrondi et petit et s'enferme dans une toute petite enveloppe kystique piriforme. Il n'y a pas de division à l'intérieur du kyste un kyste donne une seule forme végétative.

Les kystes sont toujours très rares à côté de l'abondance des formes végétatives obtenues après réactivation.

Résistance des kystes

Les kystes de *Chilomastix mesnili* sont beaucoup plus résistants que ceux de *Giardia intestinalis* : la membrane kystique est très épaisse. Ces kystes résistent pendant 232 jours dans le milieu extérieur et meurent seulement à une température de 72 °C. Ils constituent ainsi la forme de résistance et de dissémination, la contamination se fait par voie digestive comme pour les autres flagellés et amibes.

Morphologie

Ce sont des kystes piriformes de petite taille, mais faciles à reconnaître.

TAILLE : assez variable. Le kyste s'inscrit facilement dans la largeur d'un kyste de *Giardia intestinalis*.

6-10 µm/4-6 µm.

FORME : caractéristique : légèrement piriforme, presque arrondi.

COULEUR ET CONTOUR : incolore comme tous les kystes de flagellés ou d'amibes. Coque externe lisse, épaisse, très nette et très réfringente. Au niveau du pôle rétréci on remarque un aplatissement et un épaissement de la coque.

CONTENU : le kyste est réfringent et optiquement vide à frais. On peut dans certains kystes distinguer un gros noyau dont le diamètre est à peine inférieur à la moitié du diamètre du kyste.

COLORATION : la coloration au Lugol montre un kyste brun acajou dans lequel se détachent en plus clair

le gros noyau les flagelles

le cytostome et son flagelle.

DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL

Ne pas confondre le kyste de *Chilomastix mesnili* vu de profil, donc arrondi, avec celui d'*Entamoeba hartmanni* : appuyer légèrement sur la lamelle pour retourner le kyste et faire apparaître sa forme en poire.



Photo n° 176
Chilomastix mesnili. Kyste. Coloration Lugol. Obj X 100.

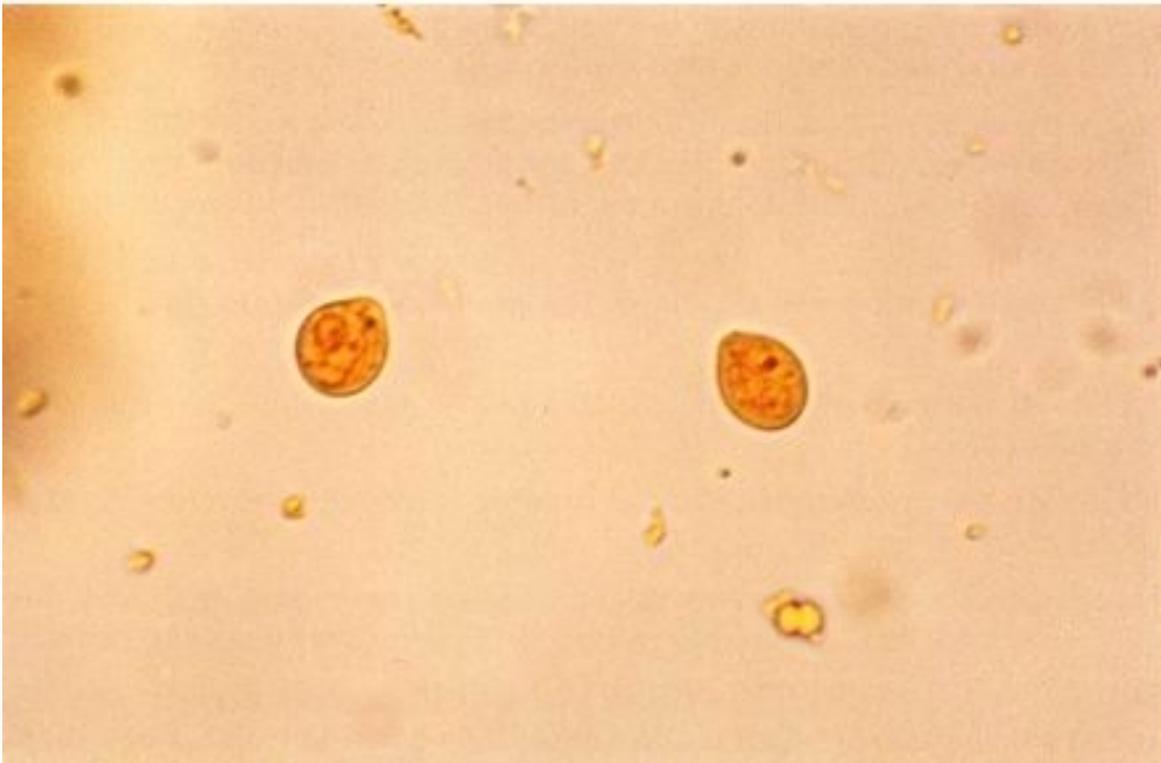


Photo n° 177
Chilomastix mesnili. Deux kystes. Coloration Lugol. Obj. X 100.

RETORTAMONAS INTESTINALIS (= *Embadomonas intestinalis*)

C'est un parasite cosmopolite. Son rôle pathogène n'est pas clairement défini.

Une autre espèce, *Retortamonas sinensis* découverte en Chine, diffère de la précédente par le fait que les deux flagelles sont égaux, et par sa grande longueur. Le diagnostic parasitologique se fait par la recherche

- dans les selles pâteuses ou fluides : de formes végétatives accompagnées le plus souvent de kystes,
- dans les selles moulées : de kystes qui ne seront mis en évidence qu'après coloration au M.I.F. suivi d'un examen pas trop retardé pour que les kystes qui sont très petits apparaissent encore en clair sur un fond rouge.

La culture sur le milieu de Diagnostic Pasteur® permet sinon une multiplication, du moins une survie et quelquefois la formation de kystes caractéristiques.

FORME VÉGÉTATIVE

Habitat : *R. intestinalis* vit probablement au niveau du colon, ou peut-être dans la fin du grêle. Il se divise dans l'intestin, comme en culture, par scissiparité longitudinale.

Résistance : Comparable à celle de *Chilomastix mesnili*. S'arrondit avant de s'immobiliser. Survie plus prolongée dans les selles liquides, et en milieu de culture à 37°C.

Morphologie

TAILLE : longueur 5-12 µm/largeur 3-5 µm, en moyenne 7,5 µm/4 µm. Donc taille variable, en général plus petite que pour *Chilomastix mesnili*.

FORME : le parasite, bien mobile, piriforme ressemble à *Chilomastix mesnili*, avec une forme allongée (au moins trois fois plus long que large), une extrémité antérieure arrondie et l'extrémité postérieure longuement effilée. Mais il n'existe pas de sillon de torsion.

Ce flagellé possède un profil en oiseau ou en sabot caractéristique à cause du cytostome.

MOBILITÉ : en tournant sur lui-même, tantôt à gauche, tantôt à droite ce qui donne une allure saccadée (143).

CYTOPLASME : le cytostome se trouve à la partie antérieure et ventrale, il est petit et peu profond.

NOYAU : possède normalement un noyau avec un caryosome, mais pas toujours visible, il peut être vu dans des formes en voie de division avec deux caryosomes.

NOMBRE, PLACE ET DIRECTION DES FLAGELLES : deux flagelles antérieurs se dirigeant en avant (Rappel : *Chilomastix mesnili* en possède trois). Deux blépharoplastes donnent naissance à deux flagelles.

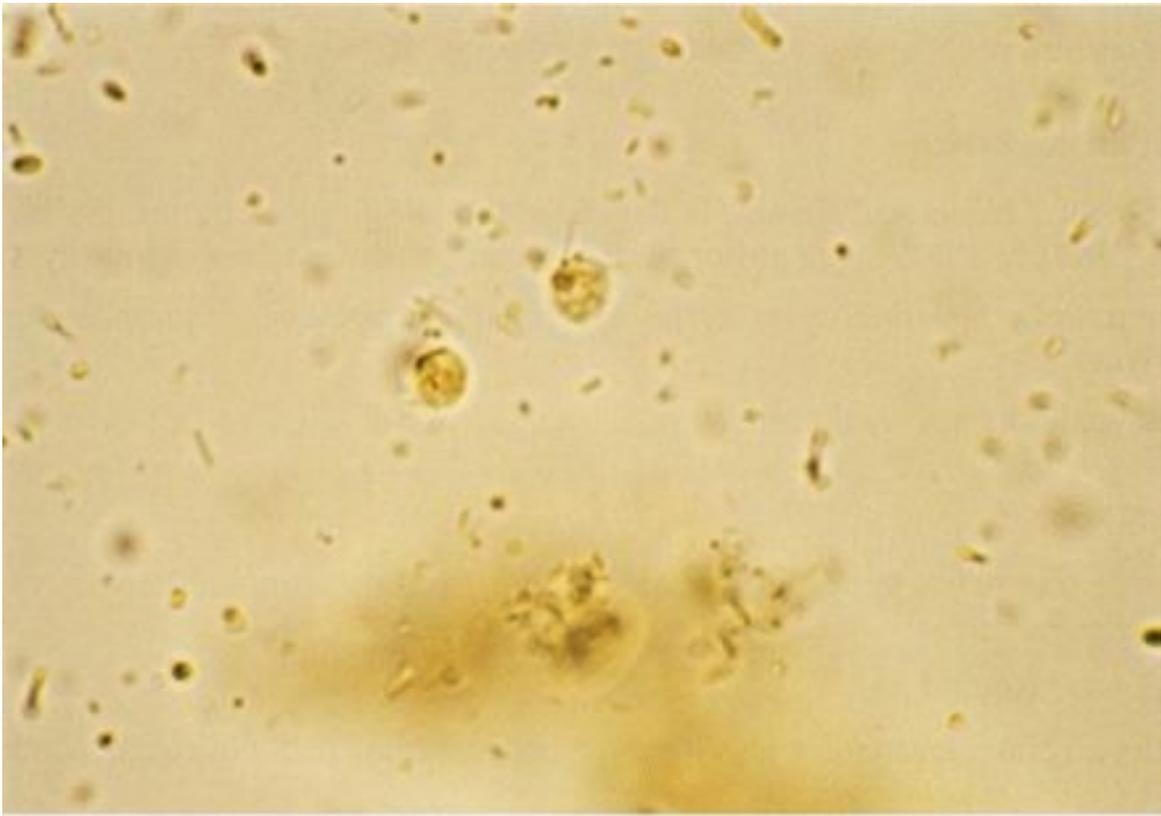


Photo n° 178

Retortamonas intestinalis. Deux formes végétatives. Coloration Lugol. Obj. X 100

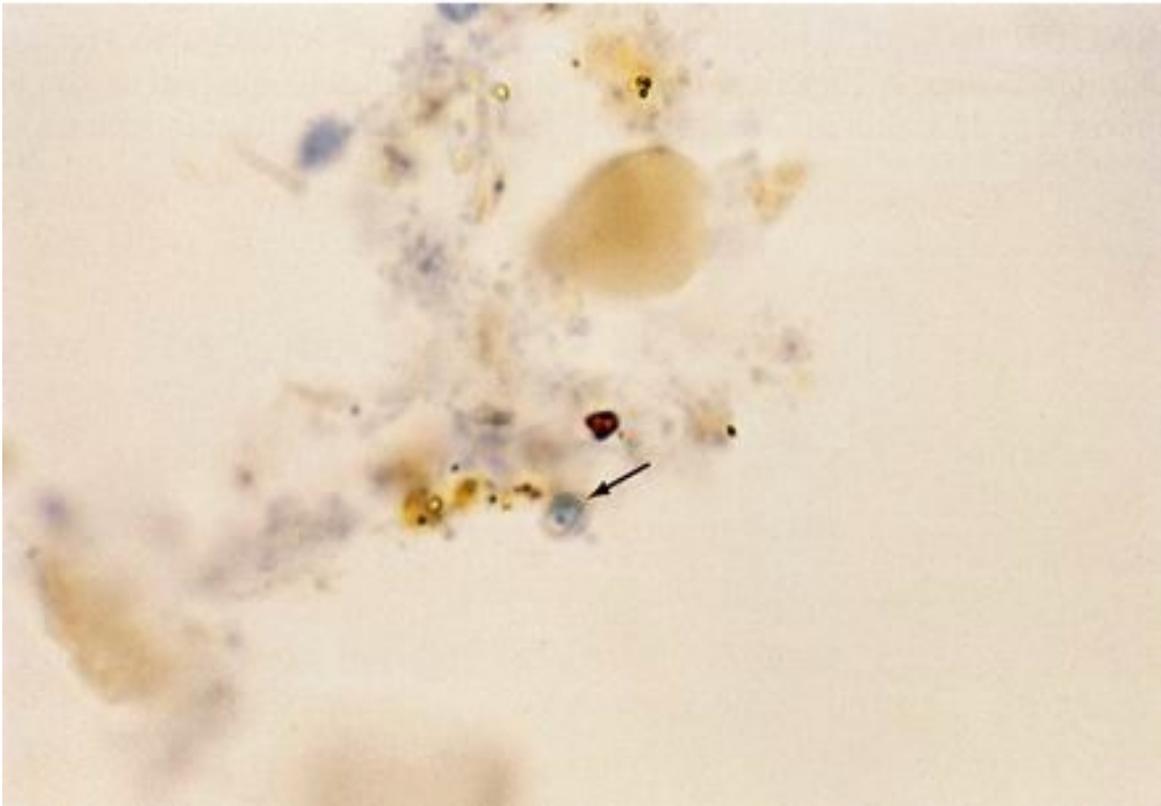


Photo n° 179

Retortamonas intestinalis. Kyste. Noter le flagelle qui se dédouble en U renversé et dont les deux branches entourent le noyau. Coloration hématoxyline. Obj. X 100.

KYSTES

Ce sont les plus petits kystes de protozoaires humains, de forme ovoïde.

Formation des kystes

Comme pour *Chilomastix mesnili*, le flagellé s'arrondit de plus en plus, diminue de taille et s'entoure d'une coque piriforme. Il n'y a qu'un parasite dans chaque kyste.

Comme pour *G. intestinalis*, les kystes accompagnent presque toujours les formes végétatives.

Résistance des kystes : mal connue

Morphologie

Ce sont de tout petits kystes piriformes, qu'on ne doit pas confondre avec ceux de *Chilomastix mesnili*.

TAILLE : 4-7 μm /3-4 μm .

FORME : en poire, légèrement plus long que large, avec un petit pôle aplati comme le kyste de *Chilomastix mesnili*.

CONTOUR : kyste incolore, coque relativement épaisse, réfringent. Conservation relativement facile, comme pour le kyste de *Chilomastix mesnili*.

CONTENU : optiquement vide à frais.

COLORATION : au lugol ou mieux au M.I.F., ce qui permet de repérer plus facilement ces kystes minuscules. A l'intérieur du kyste on voit un flagelle qui part de son extrémité rétrécie et se dédouble en U renversé, les deux branches de l'U entourant un noyau allongé.

***ENTEROMONAS HOMINIS* (= *Tricercomonas hominis*)**

C'est un protozoaire cosmopolite et on ne lui reconnaît aucun rôle pathogène.

Le diagnostic parasitologique se fait par la recherche

- dans les selles pâteuses ou mieux fluides, de formes végétatives qui sont minuscules et qui sur les selles fraîchement émises peuvent être repérées grâce à leur mobilité, elles ne sont presque jamais accompagnées de kystes,

- dans les selles plus fermes, de kystes qui sont toujours très rares et très difficiles à voir.

La culture sur le milieu de Diagnostic Pasteur® permet sinon la multiplication, du moins la survie des formes végétatives qui sont les plus faciles à identifier.

La coloration au M.I.F. avec examen rapide permet le repérage facile des kystes. La coloration au Giemsa après fixation à l'alcool méthylique ou la coloration au May-Grünwald-Giemsa donne de bons résultats (145).

FORME VEGETATIVE

Habitat et résistance

Il existe peu d'informations concernant l'habitat de ce parasite. Du point de vue de la résistance, ce flagellé très petit est aussi très fragile d'autant plus qu'il se trouve dans des selles moins fluides. Il peut s'immobiliser complètement au bout d'un quart d'heure à la température du laboratoire.

Morphologie

TAILLE : 3 à 6 µm. Le plus petit des flagellés intestinaux.

FORME : triangulaire ou ovalaire lorsqu'il est mobile, arrondi dans le cas contraire.

CYTOSTOME : pas de cystostome visible.

NOMBRE, PLACE ET DIRECTION DES FLAGELLES : trois flagelles naissent à la partie antérieure : un libre et simple ; un libre et dédoublé à partir des 2/3 de sa longueur ; un passant à la partie postérieure en suivant le bord, sans former une membrane ondulante.

NOYAU : antérieur, petit, de 1 µm de diamètre.

FORMES DE DIVISION : *Enteromonas hominis* se divise activement par scissiparité longitudinale et il est fréquent de voir des formes de division dans les selles.

KYSTES

Les kystes d'*E. hominis* sont peu nombreux et pas faciles à voir bien que leur taille ne soit pas des plus minuscules. Mais ils sont très peu réfringents.

Taille : 6-8 µm/3-4 µm, au moins deux fois plus long que large.

Forme : ovalaire ou ellipsoïdale. Forme régulière.

Contour et aspect : contour très mince, peu net et à peine réfringent, ce qui rend leur mise en évidence fort malaisée

Contenu : après coloration au lugol ou au M.I.F., on peut distinguer les noyaux qui sont au nombre de 1 à 4 disposés deux par deux aux extrémités du kyste. Les flagelles sont parfois visibles. Chaque kyste donne au maximum 4 formes végétatives.

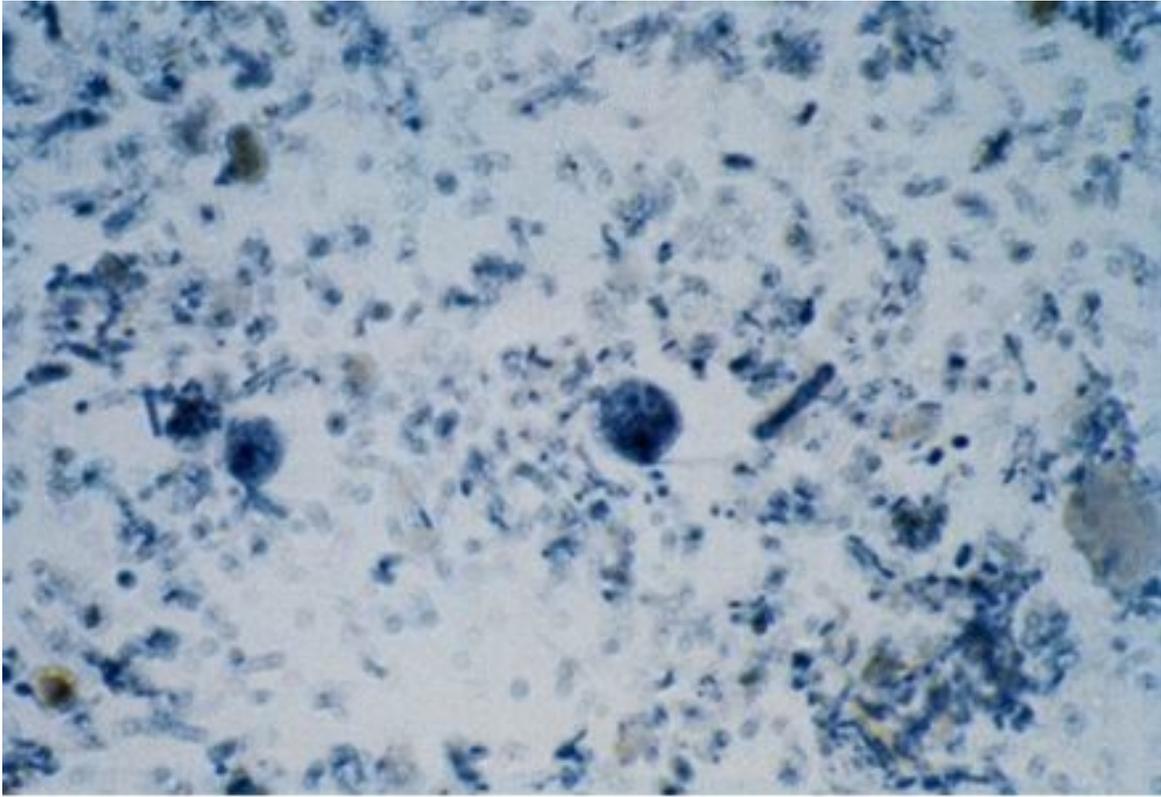
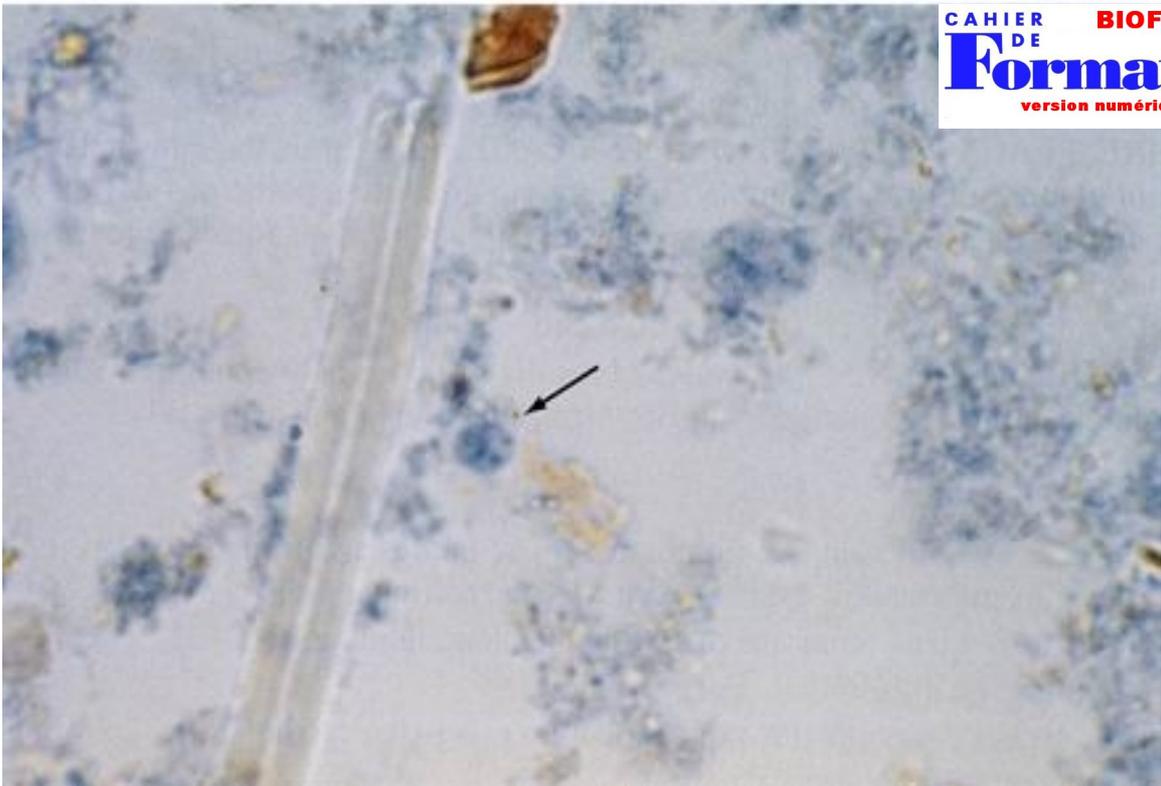


Photo n° 180
Enteromonas hominis. Forme végétative. Flagelle visible. Coloration hématoxyline. Obj. X 100.



CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Photo n° 181
Enteromonas hominis. Kyste à noyaux visibles. Coloration hématoxyline. Obj. X 100.

PENTATRICHOMONAS HOMINIS **(= *Trichomonas intestinales* = *Cercomonas hominis*)**

C'est un flagellé cosmopolite, plus fréquemment rencontré dans les pays tropicaux et que l'on trouve souvent chez les personnes présentant une diarrhée bien que son rôle pathogène soit nié par la plupart des auteurs.

Ce parasite vit habituellement dans le gros intestin mais différentes localisations erratiques ont été décrites : voie biliaire, poumons, plèvre, sang...

Pentatrichomonas intestinalis n'a pas de kystes mais les formes végétatives survivent longtemps dans le milieu extérieur, au moins 24h, ce qui permet leur transmission. Le diagnostic parasitologique ne peut donc se faire que par la mise en évidence de formes végétatives dans des selles pâteuses ou fluides. En revanche, on ne rencontre jamais ce flagellé si l'on n'examine que les selles moulées ou conservées en réfrigérateur.

Plus encore que pour les autres flagellés qui ont des kystes, la mise en culture des selles permet de ranimer *P. hominis* ayant perdu de sa mobilité en vue d'une étude différée. La reproduction se fait par division longitudinale.

FORME VÉGÉTATIVE

Habitat

Ce parasite se rencontre dans le gros intestin où il se divise par division longitudinale, comme les autres flagellés.

Résistance

C'est le plus résistant des flagellés intestinaux au stade forme végétative. Certains auteurs ont signalé qu'ils peuvent vivre et rester mobiles pendant un mois dans le milieu extérieur.

La contamination se fait par voie digestive.

Morphologie

TAILLE : longueur 10-15 µm largeur 7-10 µm.

FORME : lorsque le trichomonas est très mobile, il a une forme en amande, pointue aux deux extrémités. Au ralenti, l'animal est immobile mais l'un des bords latéraux est constamment et largement déformé par les mouvements continuels de la membrane ondulante, caractéristique du genre *Trichomonas*.

Il s'arrondit avant de s'immobiliser comme tous les autres flagellés.

CYTOSTOME : pas de cytostome net, une simple petite fente peu visible.

NOMBRE, PLACE ET DIRECTION DES FLAGELLES :

Une touffe de 3 à 5 longs flagelles antérieurs se dirigeant vers l'avant, un autre flagelle antérieur se dirigeant vers l'arrière formant avec le corps de l'animal une membrane ondulante, longue, plissée, qui dépasse beaucoup l'extrémité postérieure.

AUTRES DÉTAILS :

Un axostyle part de l'extrémité antérieure et dépasse l'extrémité postérieure en formant une pointe visible même chez *Pentatrichomonas intestinalis* : c'est une sorte de filament de soutien.

COLORATIONS :

L'hématoxyline ferrique permet de distinguer nettement les détails morphologiques mais n'est pas indispensable pour le diagnostic courant.

La coloration au May-Grünwald-Giemsa sur frottis de selles séchées permet de voir, parfois, les flagelles et la membrane ondulante. Le corps du flagellé possède de nombreuses vacuoles alimentaires contenant des bactéries, des levures, et parfois des hématies.

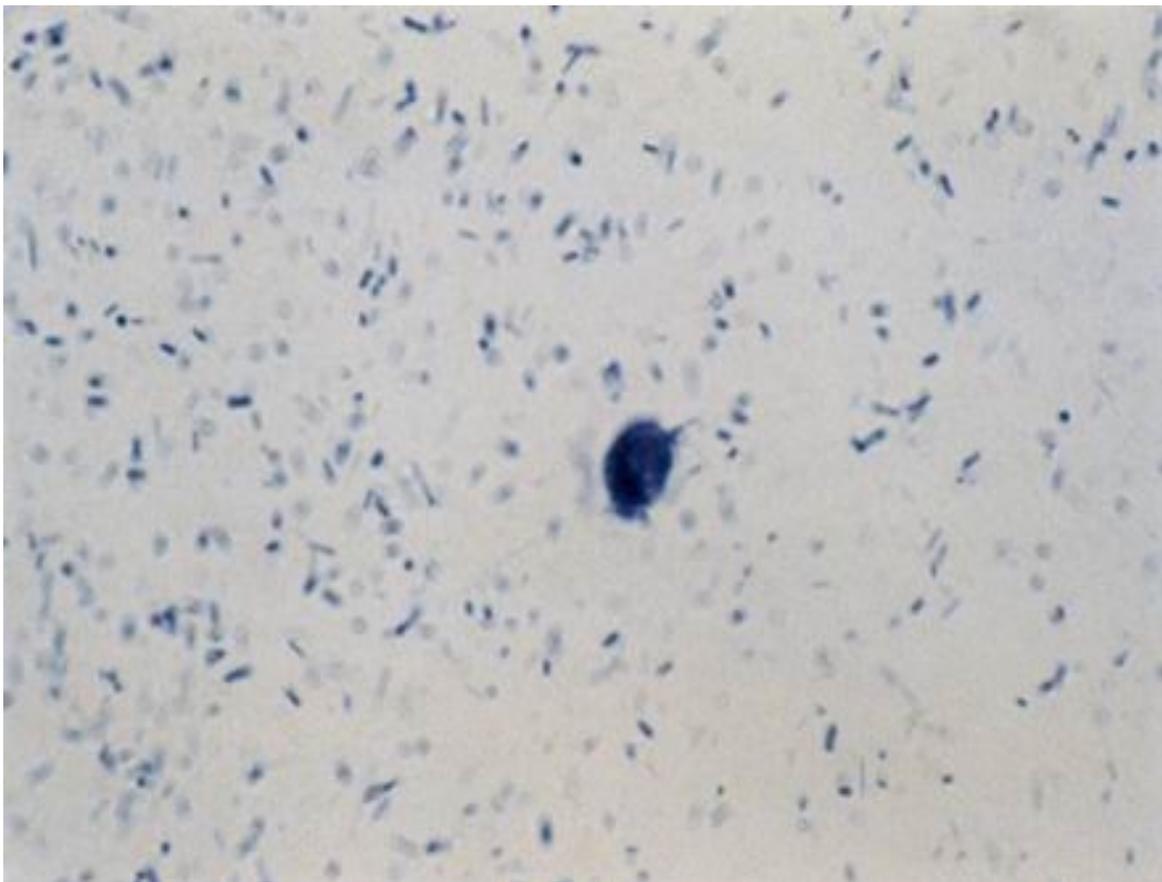


Photo n° 182

Pentatrichomonas hominis. Forme végétative. Coloration hématoxyline. Obj. X 100.

DIENTAMOEBA FRAGILIS

FORME VÉGÉTATIVE

Dientamoeba fragilis a été décrit par Jepps et Dobell en 1918 (155) à partir de 7 cas humains, considérant « qu'il n'y avait pas de raison pour penser qu'il s'agissait d'un organisme pathogène ». Ils l'ont rattaché aux amibes. Camp et al. en 1974 (151) étudiant cet organisme en microscopie électronique ont montré l'existence de composants d'un appareil parabasal connu chez les trichomonadidés et les hypermastigotes : ils ont modifié sa classification en le plaçant parmi les trichomonadidés, dans la famille des Dientamoebidae.

CE FLAGELLÉ NE POSSÈDE PAS DE KYSTE

Tableau XIII : Formes végétatives de *DIENTAMOERA FRAGILIS*
Résultats des tests du Contrôle National de Qualité en Parasitologie en France

On constate l'importance de la confusion avec *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba Coli*, mais aussi des progrès dans les résultats conformes.

Date d'envoi	Nombre de réponses	Richesse*	Résultats conformes	Deuxième réponse en %**	Troisième réponse en %**
11/1982	947	3 Coloration : M.I.F.	18,4 %	<i>Entamoeba histolytica</i> 51.5%	<i>Entamoeba coli</i> 26.6%
02/1984	1 045	3 Coloration : M.I.F.	28,8 %	<i>Entamoeba histolytica</i> 30.4%	<i>Entamoeba coli</i> 20.8%
11/1995 Test Bioforma	3 597	Coloration : M.I.F. et trichrome	32,1 %	<i>Endolimax histolytica</i> 25.1%	<i>Entamoeba coli</i> 12.2 %

* La richesse moyenne = nombre de champs Obj. X 40 nécessaires pour trouver un parasite.

** Parasites absents de la selle.

FRÉQUENCE

On le croit rare parce que les examens de selles moulées ne peuvent pas contenir de kystes et sont en général négatifs pour ce protozoaire. En outre, la richesse des selles en formes végétatives varie d'un jour à l'autre (160).

Il est pour cette même raison difficile de connaître exactement la distribution géographique de *Dientamoeba fragilis*. Sa prévalence a été trouvée de 4,2 % au Canada, mais elle est retrouvée dans toutes les parties du monde (160). Elle est plus souvent observée chez la femme et chez l'enfant (153 ; 160). Elle est plus rarement diagnostiquée au printemps et en été (153 ; 160)

RICHESSSE

Il est vrai qu'on peut, dans certaines selles, ne voir que de rares exemplaires de *Dientamoeba fragilis*. Mais le plus souvent, on en voit une quantité très importante, pouvant aller jusqu'à 15 ou 30 parasites par champ microscopique au fort grossissement. Il est difficile dans ces cas de passer à côté ; malheureusement, l'identification n'est pas toujours faite.

Dientamoeba fragilis peut également être trouvée dans la bile (157)

RÉSISTANCE

Le parasite en voie de lyse ressemble à *Blastocystis*. On en rencontre sous cette forme dans les selles de consistance normale ou molle, ou lorsqu'on ne fait pas les examens suffisamment rapidement. Ce fait a probablement justifié le qualificatif de « fragilis ». Mais, précisons-le, cette fragilité est toute relative. En effet, dans des préparations lutées à la vaseline où *Dientamoeba fragilis* se trouve dans du CINa à 9 p. mille, Hakansson les retrouve encore vivantes, émettant des pseudopodes au bout de 77 et 97 heures. De plus, dans des selles très riches et fluides (ou diluées dans du CINa à 9 p. mille), laissées à la température du laboratoire, on en retrouve encore en assez grande quantité le lendemain, bien mobiles.

TAILLE

Un caractère très important est la diversité des tailles de ce flagellé dans une même préparation. Cette taille va de 3 à 15 μm , mais peut aller jusqu'à 20 μm (159), avec une moyenne de 10-12 μm (155), soit la taille des kystes ou des formes minuta d'amibe avec lesquels elle peut être facilement confondue, comme ce fut le cas dans les tests, du Contrôle de Qualité en Parasitologie (tableau XIII).

FORME ET MOBILITÉ

A la température du laboratoire et dans une selle molle, *Dientamoeba fragilis* est immobile et arrondie.

Si le parasite provient d'une selle fluide ou d'une culture, ou s'il est réchauffé, il est très actif : il émet des pseudopodes clairs, larges, occupant au moins le 1/4 ou le 1/3 de sa circonférence, courts et à extrémité libre souvent frangée.

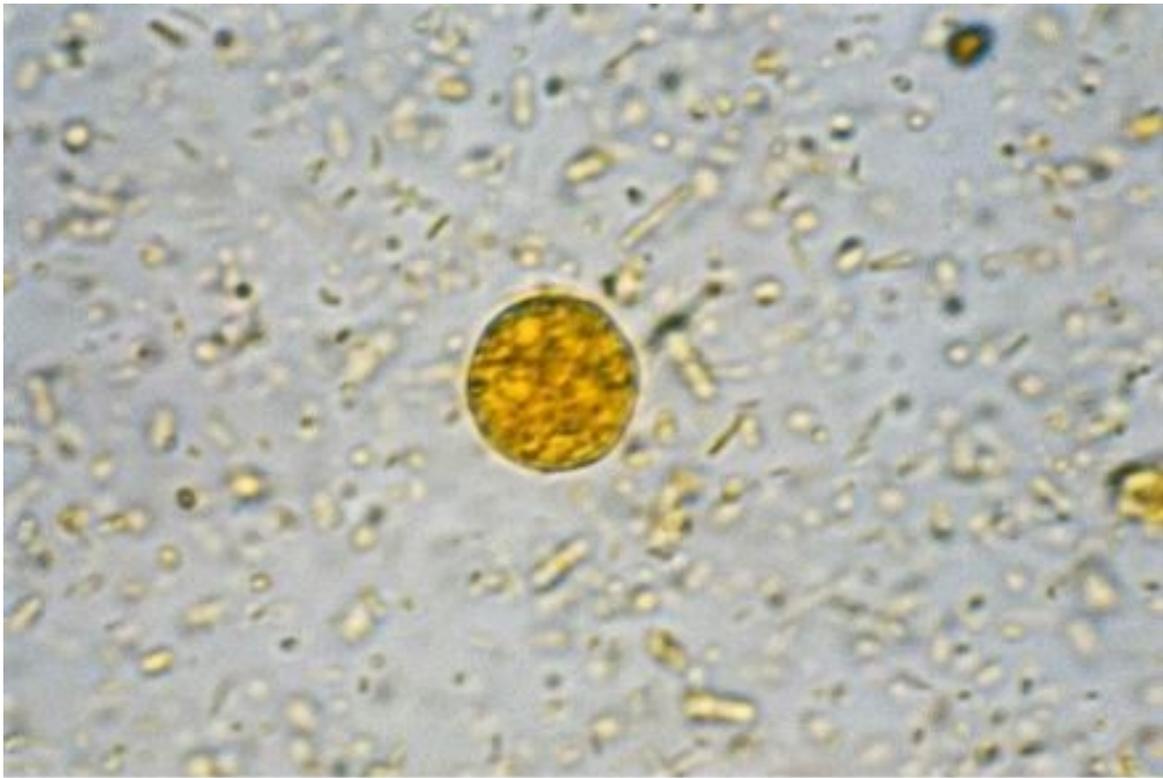


Photo n° 183 - *Dientamoeba fragilis*. Forme végétative. Les deux noyaux apparaissent en négatif. Coloration Lugol. Obj. X 100.

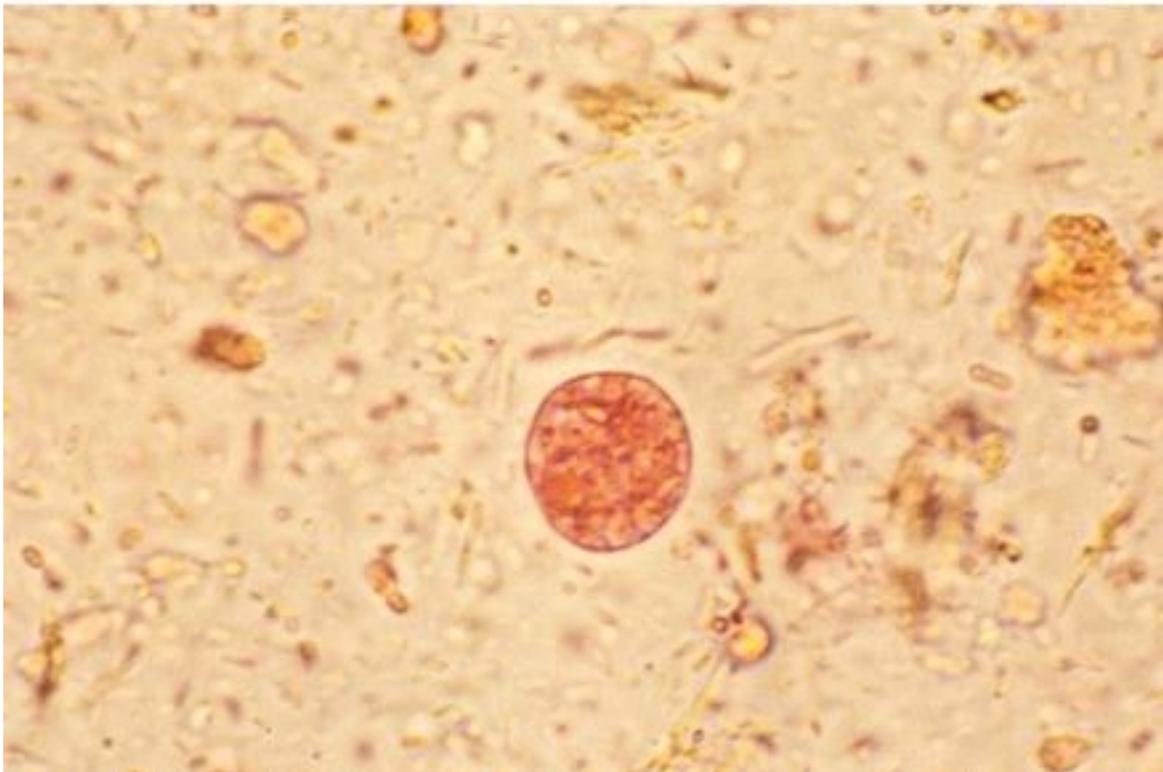


Photo n° 184 - *Dientamoeba fragilis*. Forme végétative. Noyaux difficilement visibles. Coloration M.I.F. Obj. X 100.

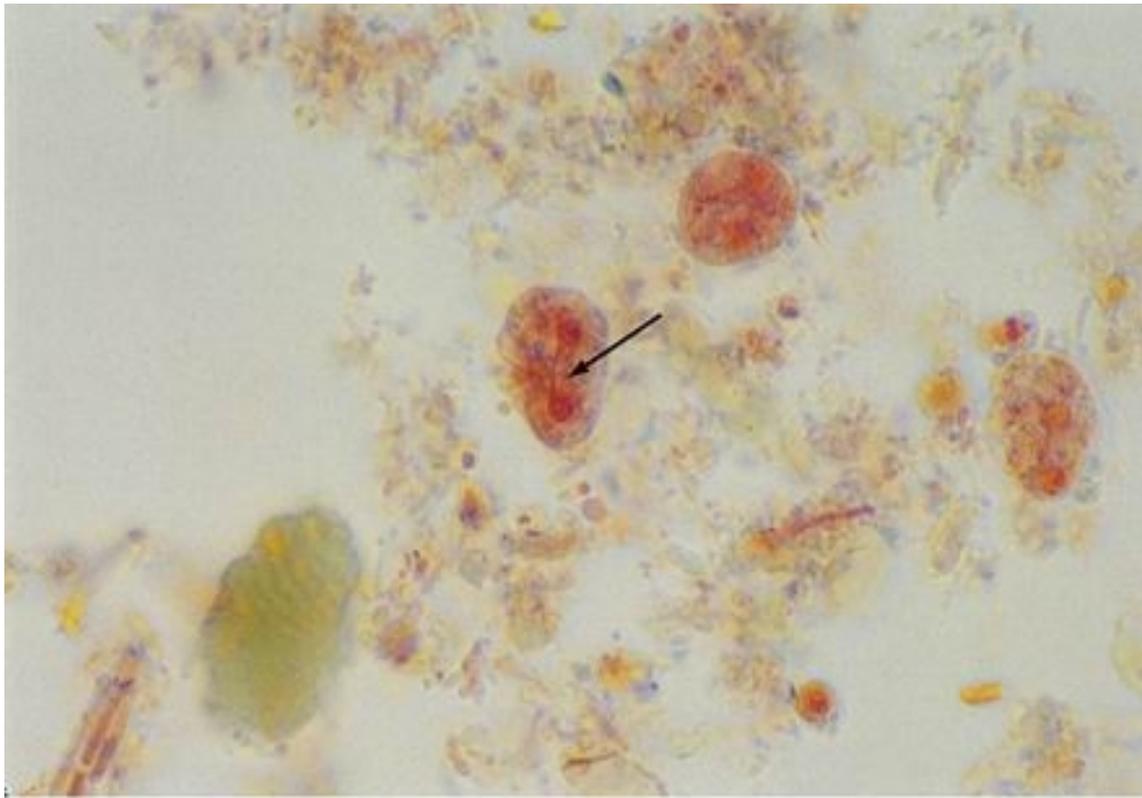


Photo n° 185 - *Dientamoeba fragilis*. Deux formes végétatives. Dans celle centrale, on voit un filament (paradesmose) reliant les deux noyaux. Coloration trichrome. Obj. X 100.

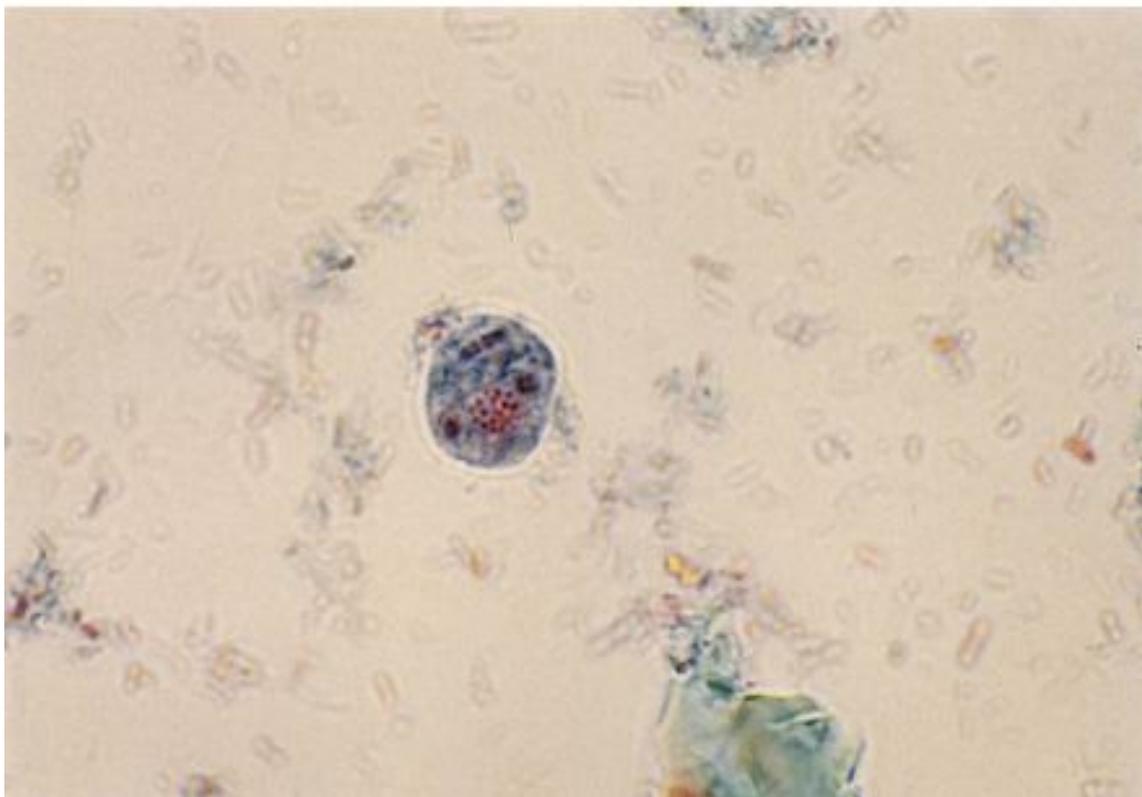


Photo n° 186 - *Dientamoeba fragilis*. Forme végétative. Deux noyaux bien colorés et amas de Sphaeritae. Coloration trichrome. Obj. X 100.

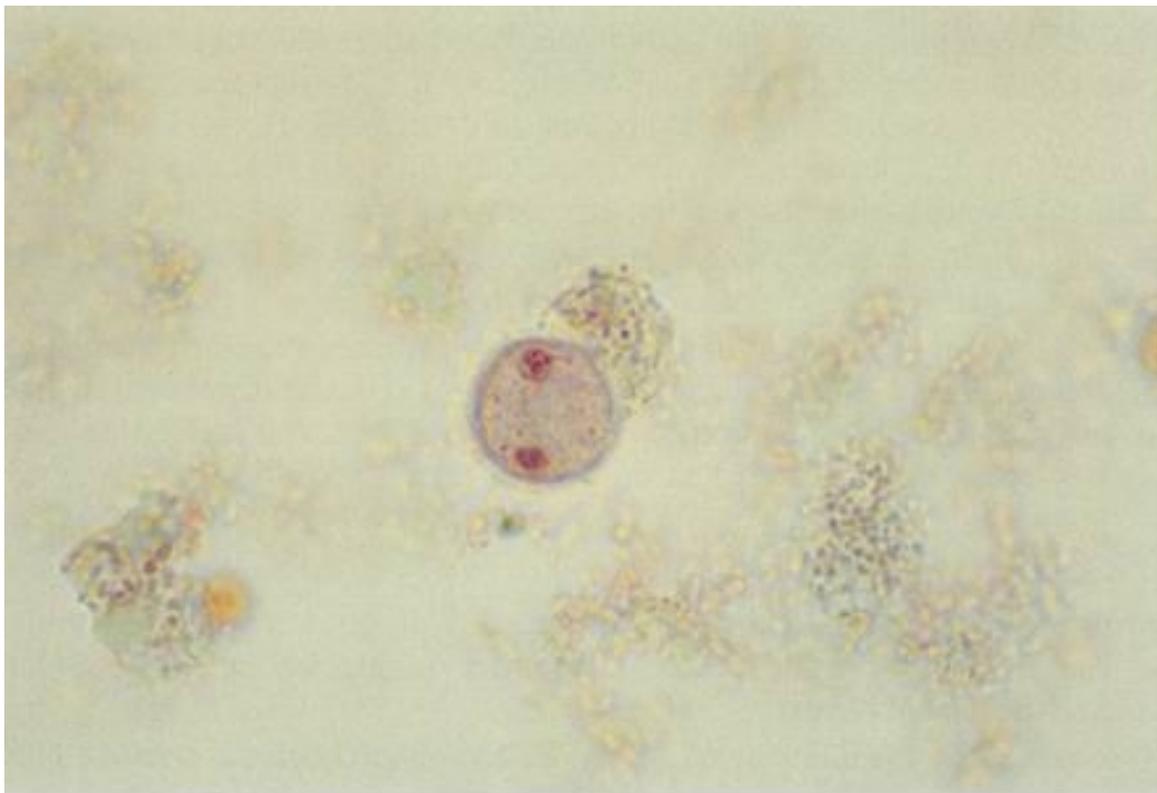


Photo n° 187 - *Dientamoeba fragilis*. Forme végétative à deux noyaux avec granules apparents. Coloration trichrome. Obj. X 100.

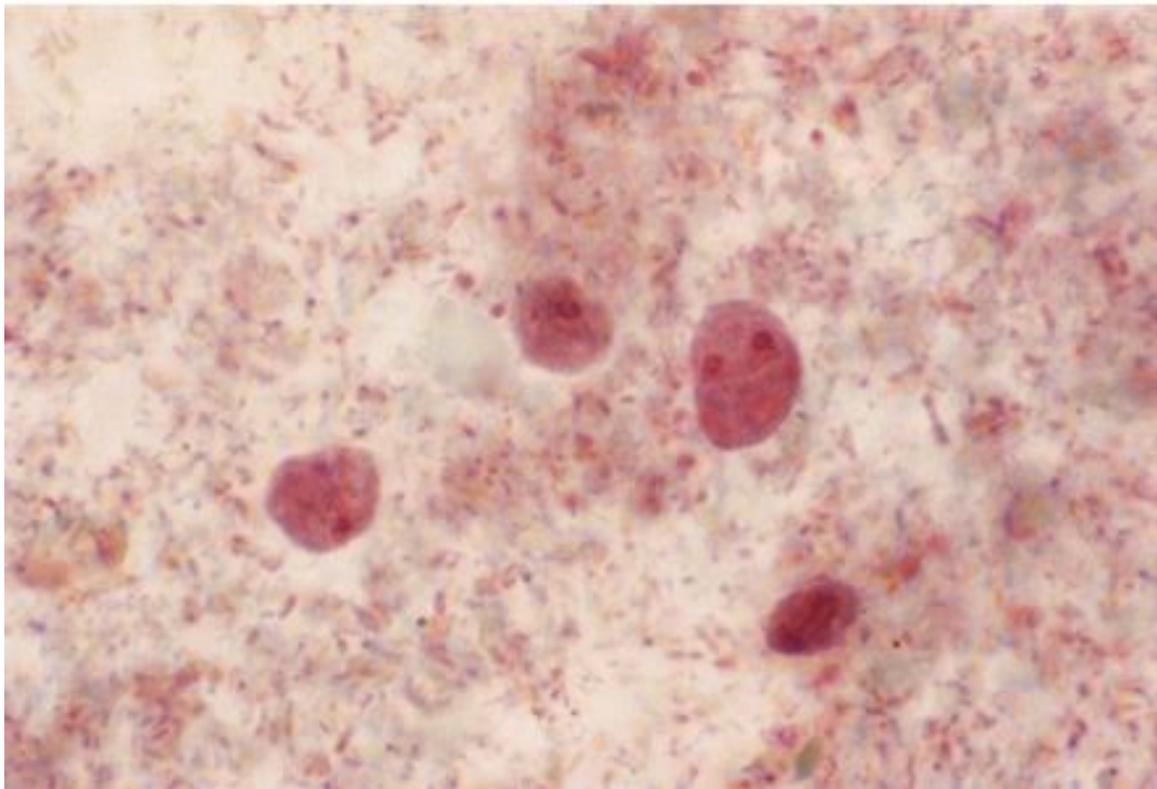


Photo n° 188 - *Dientamoeba fragilis*. Trois formes végétatives de taille variable, une avec un noyau et deux autres avec deux noyaux. Coloration trichrome. Obj. X 100.

En général, il n'y a qu'un seul pseudopode émis à la fois : le parasite le retire au bout d'un instant, en émet un autre à une autre place, le retire de nouveau et ainsi de suite ce sont des pseudopodes en ailes de ventilateurs dont il ne résulte aucun déplacement effectif. Ces pseudopodes sont parfois si courts, au ras du parasite, qu'il faut les observer à l'immersion pour les mettre en évidence. On peut aussi observer *Dientamoeba fragilis* émettant deux pseudopodes diamétralement opposés.

Dientamoeba fragilis phagocyte souvent de grandes bactéries dont la longueur dépasse largement son diamètre : elle se déforme alors en fuseau.

Un caractère important est la grande sensibilité des formes végétatives fraîches de *Dientamoeba fragilis* à l'eau ordinaire (eau du robinet) : elles se distendent très vite; et se lysent en 2 à 8 minutes. Les formes végétatives d'*Entamoeba histolytica* résistent 30 minutes et les kystes des différentes amibes ne sont pas détruits (154).

CYTOPLASME

Le cytoplasme de *Dientamoeba fragilis* renferme de petites vacuoles, mais ces vacuoles sont peu visibles en général. On distingue par contre, très bien les granulations fines caractéristiques dont le cytoplasme est rempli.

De plus, le parasite est presque aussi vorace qu'*Entamoeba coli* : il contient presque toujours de nombreuses bactéries, des levures, des grains d'amidon. Le parasitisme par Sphaerita est commun (159). (photo n° 186)

NOYAU

Le ou les noyaux ne sont pas visibles à frais ni après coloration par le Lugol fort (156). Lorsque le flagellé est lysé, on le ou les distingue bien mais leur identification est pour ainsi dire impossible sans une coloration élective.

STRUCTURE DU NOYAU DE *DIENTAMOEBEA FRAGILIS* APRÈS COLORATION AU TRICHOME OU À L'HÉMATOXYLINE

Nombre : *Dientamoeba fragilis*, comme son nom l'indique, peut contenir deux noyaux. Mais ceci n'est pas la règle. Dans chaque selle, il y a un certain nombre de parasites à 1 noyau et le reste à 2 noyaux. Le pourcentage de flagellés à un seul noyau peut atteindre 80 %, mais peut être de 10 % seulement (158). Il peut être observé des formes avec 3 ou 4 noyaux (158).

Taille : Petit noyau de 2 à 3 µm (ordre de grandeur de celui d'*Entamoeba hartmanni*). Aspect vésiculeux (158).

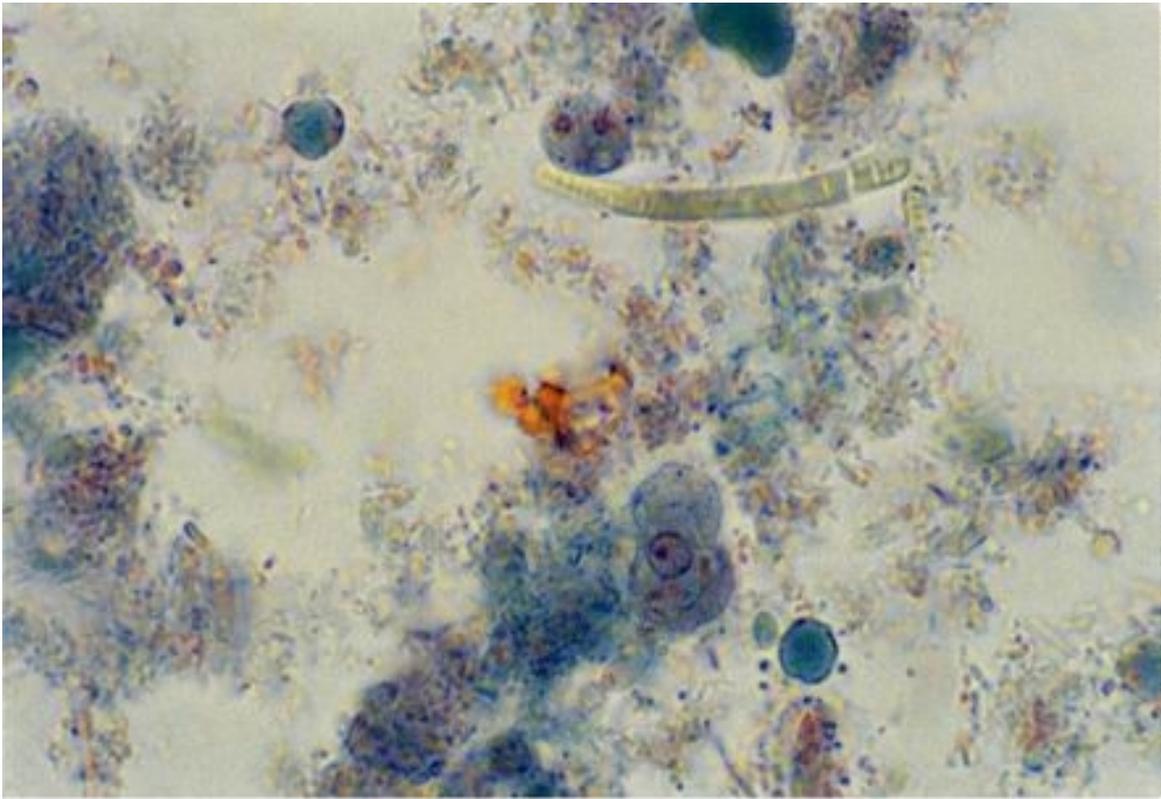


Photo n° 189

Dientamoeba fragilis. Forme végétative à deux noyaux. Également présents *E. histolytica* / *E. dispar* forme végétative et deux *Blastocystis hominis* de petite taille. Coloration trichrome. Obj. X 100.

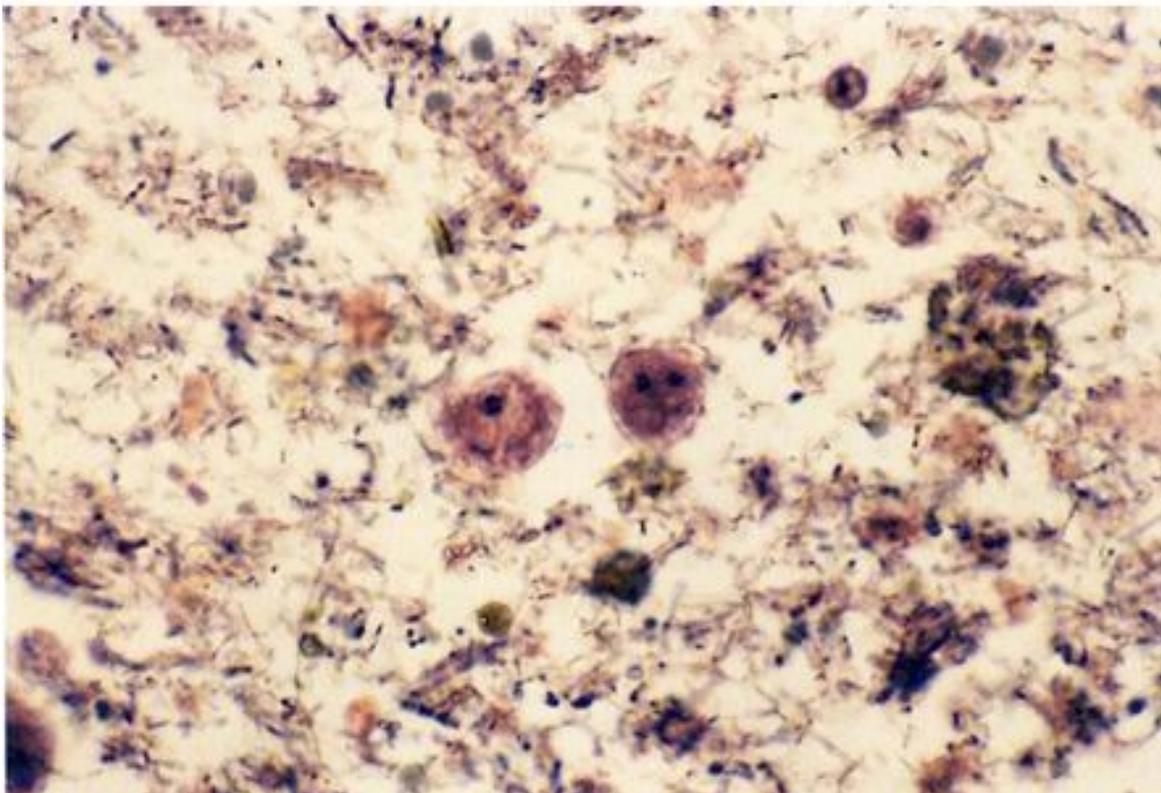


Photo n° 190 - *Dientamoeba fragilis*. Deux formes végétatives, l'une à un noyau, l'autre à deux noyaux, bien colorés. Coloration hématoxyline ferrique. Obj. X 100.

Structure :

- membrane nucléaire très mince, peu colorable, le noyau apparaissant en clair sur un cytoplasme coloré (comme dans *I. butschlii*).
- amas central formé par 4 ou 8 granules (158) chromatiques groupées en un amas irrégulier (6 d'après Dobell)
- lorsque le flagellé possède 2 noyaux, ceux-ci sont souvent reliés entre eux par un filament = paradesmose.

La division permanente du noyau explique les variations de structure.

ASPECT DE *DIENTAMOEBIA FRAGILIS* COLORÉE AU M.I.F.

Le parasite conserve son aspect général avec sa forme arrondie ou ses pseudopodes caractéristiques, son cytoplasme finement vacuolisé et rempli de granulations. Sur ce cytoplasme apparaît le ou les noyaux dont la membrane nucléaire mince n'est pas visible. Les granulations chromatiniennes du caryosome sont si petites qu'elles sont peu réfringentes et se distinguent ainsi difficilement.

On se trouve donc en présence d'un flagellé granuleux chez lequel on ne voit pas nettement les noyaux, à la différence des autres espèces. Ces noyaux apparaissent lorsque la coloration à été faite avec un peu de Lugol : le fond moins rouge du cytoplasme permet aux noyaux de se détacher sous la forme d'une ou de deux masses claires centrées par de petits grains à peine réfringents.

ASPECT DE *DIENTAMOEBIA FRAGILIS* COLORÉE AU MAY-GRÜN WALD-GIEMSA

On utilise la technique habituelle de coloration de May-Grünwald-Giemsa mais en prolongeant la coloration du frottis de selles par le Giemsa pendant 30'.

Cette coloration simple permet de :

- bien identifier *D. fragilis*
- voir que les inclusions (bactéries en particulier) sont très nombreuses
- voir les noyaux.

CULTURE facile sur milieu avec sérum coagulé, Ringer sérum, amidon de riz. La multiplication est très abondante 24 heures après l'ensemencement.

TRANSMISSION : des essais de transmission inter-humaine ont échoué (152 ; 160).

Burrows (150) a incriminé sa transmission par l'intermédiaire des œufs d'*Enterobius vermicularis*, ayant trouvé chez ceux-ci des éléments semblables à *D. fragilis*, mais sans pouvoir les cultiver.

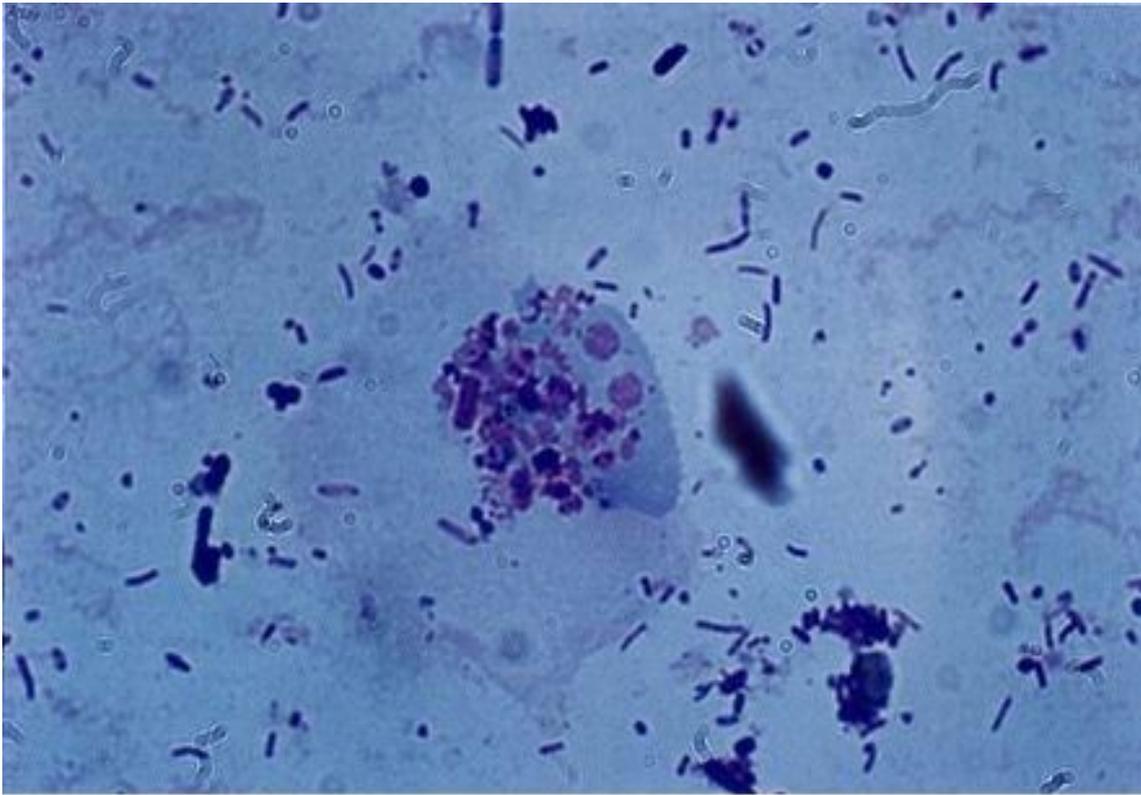


Photo n° 191- *Dientamoeba fragilis*. Forme végétative. Deux noyaux bien colorés et nombreux éléments phagocytés. Coloration May-Grünwald-Giemsa. Obj. X 100.

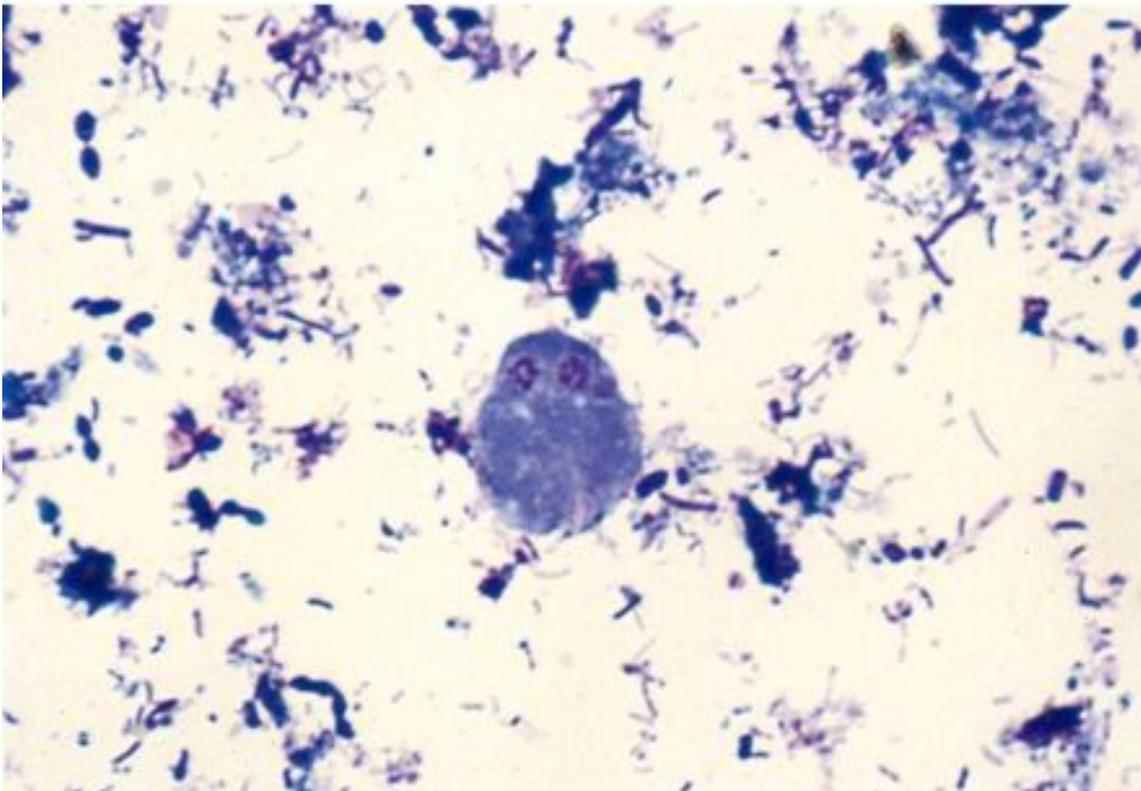


Photo n° 192 - *Dientamoeba fragilis*. Forme végétative à deux noyaux bien colorés. Coloration May-Grünwald-Giemsa. Obj. X 100.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES KÉRATITES ET ULCÈRES DE CORNÉE À AMIBES LIBRES



	Pages
• Introduction.....	207
• Classification parasitologique	208
• Epidémiologie	214
• Signes cliniques.....	217
• Physiopathologie	218
• Immunologie	220
• Diagnostic biologique.....	221
• Mise en évidence des amibes par culture avec examen à l'état frais.....	226
• Anatomopathologie	231
• Traitement et surveillance	233
• Prévention.....	234

INTRODUCTION

Les amibes du genre *Acanthamoeba* sont de petites amibes libres, c'est-à-dire pouvant accomplir la totalité de leur cycle dans la nature. Elles appartiennent à la famille des ACANTHAMOEBIDAE qui sont des amibes ayant des pseudopodes mais pas de flagelle. Les *Acanthamoeba*, comme les *Noegleria*, sont des protozoaires saprophytes présents de façon ubiquitaire dans la nature : elles vivent libres dans le sol, l'eau courante, les égouts, la vase, l'eau de mer et l'air (les *Acanthamoeba* ont été également retrouvées dans l'eau saumâtre) ; elles se nourrissent de bactéries (184). Elles ont une répartition géographique étendue : dans les pays chauds, les pays tempérés et même dans les zones froides comme l'Antarctique (165), mais elles sont plus nombreuses dans les eaux chaudes.

En France, l'eau potable du réseau peut contenir entre 1 000 et 10 000 amibes par litre malgré les traitements. Ces amibes résistent de plus en plus aux doses de chlore utilisées pour désinfecter l'eau courante et les piscines. Les eaux de piscine peuvent en être très riches, l'ozonisation n'empêche pas leur prolifération ; les eaux de table embouteillées peuvent également en contenir. Des kystes d'amibes sont présents dans l'air : en moyenne 1 kyste d'amibe/9,1 m³ dans l'air de Londres (169).

Des *Acanthamoeba* ont été isolées de la bouche et du pharynx chez des adultes et des enfants asymptomatiques (201). Des amibes des deux genres *Acanthamoeba* et *Noegleria* sont responsables d'infections gravissimes chez l'homme. *N. fowleri* a été mise en évidence dans des méningoencéphalites aiguës et fulminantes, mortelles la plupart du temps (184). Les *Acanthamoeba* sont relativement moins agressives que les *Noegleria*. Elles sont responsables de kératites qui peuvent être graves car particulièrement difficiles à traiter lorsque le diagnostic est tardif, une kératoplastie peut alors être nécessaire, elle est parfois suivie d'une récurrence de l'infection sur le greffon. Les *Acanthamoeba* et plus rarement, des *Hartmanella*, ont été mises en cause dans les kératites amibiennes (161). Les *Acanthamoeba* peuvent provoquer des infections oculaires autres que les kératites, Visvesvara et coll. en ont trouvé dans le corps ciliaire et le cerveau chez un patient ayant une uvéite et une méningite mortelle ce qui suggère une dispersion hématogène de l'infection (178). Elles peuvent être responsables d'encéphalites chroniques granulomateuses, d'infections auriculaires, pulmonaires.

Elles peuvent provoquer des infections disséminées chez des patients séropositifs pour le V.I.H. Chez ces patients, la symptomatologie peut être très diverse, il faut penser au risque d'infection généralisée (171 ; 178 ; 206). Le premier signe le plus fréquent est l'apparition de nodules cutanés de 1 à 3 cm qui peuvent se transformer en plaques érythémateuses et se nécroser. Ils sont souvent localisés au niveau des membres puis du tronc et de la face. La présence d'amibes au niveau des sinus ou de lésions du palais est également fréquente chez ces patients. Une uvéite peut apparaître secondairement. La dissémination par voie veineuse et/ou lymphatique est vraisemblable.

CLASSIFICATION PARASITOLOGIQUE

Différentes classifications ont été proposées, celle de Pussard et Pons (200) est basée essentiellement sur la morphologie des kystes. Ils séparent les Acanthamibes en trois groupes en fonction de l'aspect de l'endokyste. La classification de Page (198) est basée sur l'étude de la morphologie, du mouvement, de la structure nucléaire, de la mitose, de la nutrition et des caractères immunologiques des amibes libres (190). Les classifications, initialement basées sur l'aspect morphologique, le cycle biologique et parfois le pouvoir pathogène des amibes libres, seront modifiées en fonction des résultats de l'étude de leur A.D.N.



Photo n° 193

Amibes libres. Acanthamoebidae. Deux kystes. Examen à l'état frais au microscope inversé d'une culture en milieu liquide. Obj. X 40.

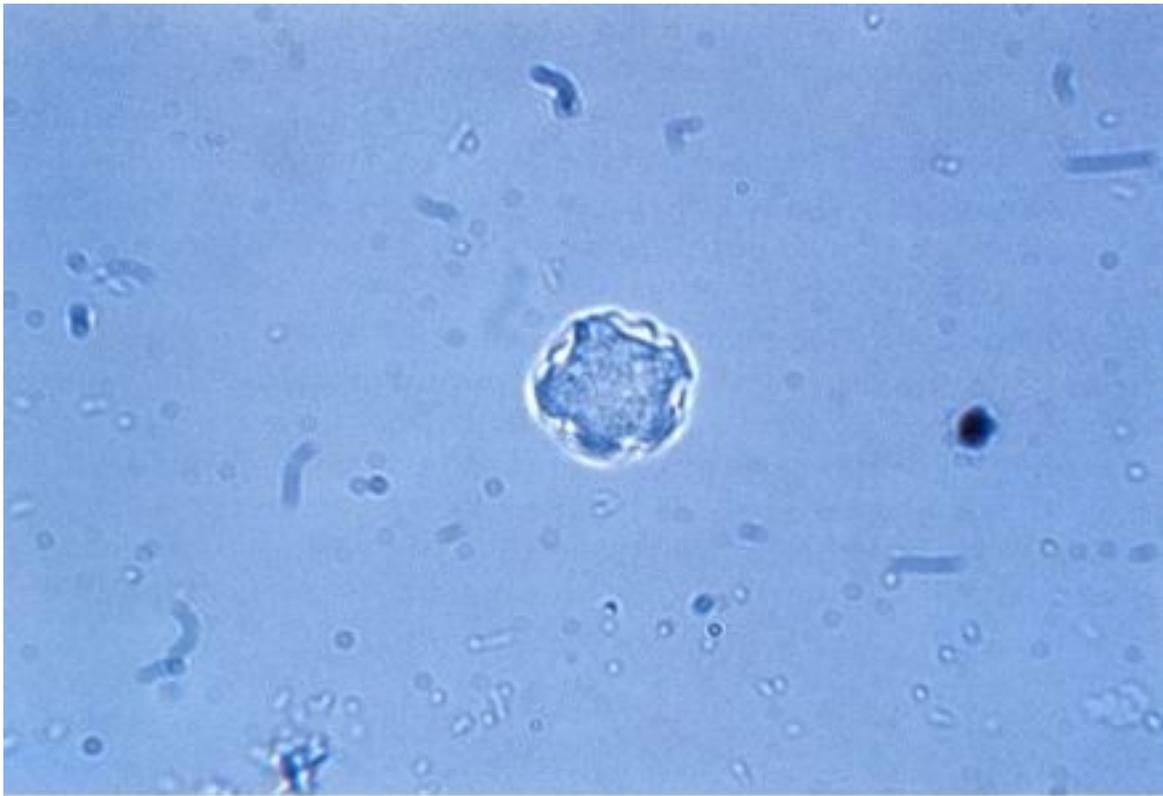


Photo n° 194

Acanthamoeba. Kyste. Examen à l'état frais d'une culture sur lame. Obj. X 100.

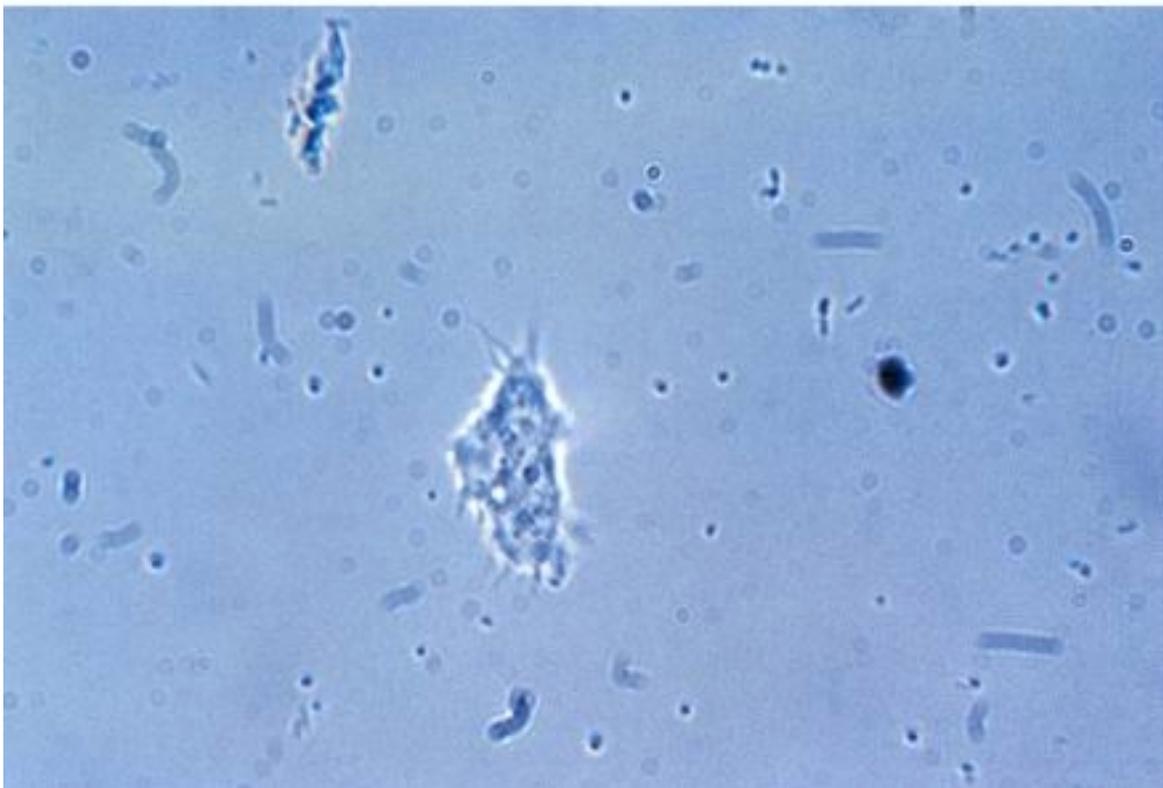


Photo n° 195

Acanthamoeba. Forme végétative. Examen à l'état frais d'une culture sur lame. Obj. X 100.

- **La famille des ACANTHAMOEBIDAE** de l'ordre des ACANTHOPODIDA comprend des amibes libres, de forme étalée, le plus souvent régulière, parfois allongée lorsqu'elles sont en mouvement. Elles ont un seul noyau, pas de stade flagellé ni de spore.

Elles existent sous deux formes. La forme végétative, stade réplicatif, mobile, produit de fines projections hyalines appelées acanthopodia quelquefois fourchues à la base (195). Elle mesure de 15 à 40 µm. Le kyste, forme de résistance, a une double paroi.. La taille du kyste varie de 11 à 20 µm, sa forme est polygonale étoilée ou plus ou moins ronde (photo n° 193).

- **Le genre Acanthamoeba** se caractérise par la présence d'une double paroi, les deux enveloppes superposées se raccordent en certains points formant des orifices ou ostioles obturés par un opercule. La paroi interne ou intine adhère au protoplasme amibien et forme avec celui-ci l'endokyste, la paroi externe ou exine forme autour de l'ensemble un voile plus ou moins ondulé (200). La forme des kystes varie suivant les espèces, elle est plus ou moins ronde ou étoilée (198) (photos n°s 194 ; 196). La coloration à l'alcool polyvinylique trichrome permet de mieux visualiser le noyau (photos n°s 197 ; 198 ; 199 ; 200).

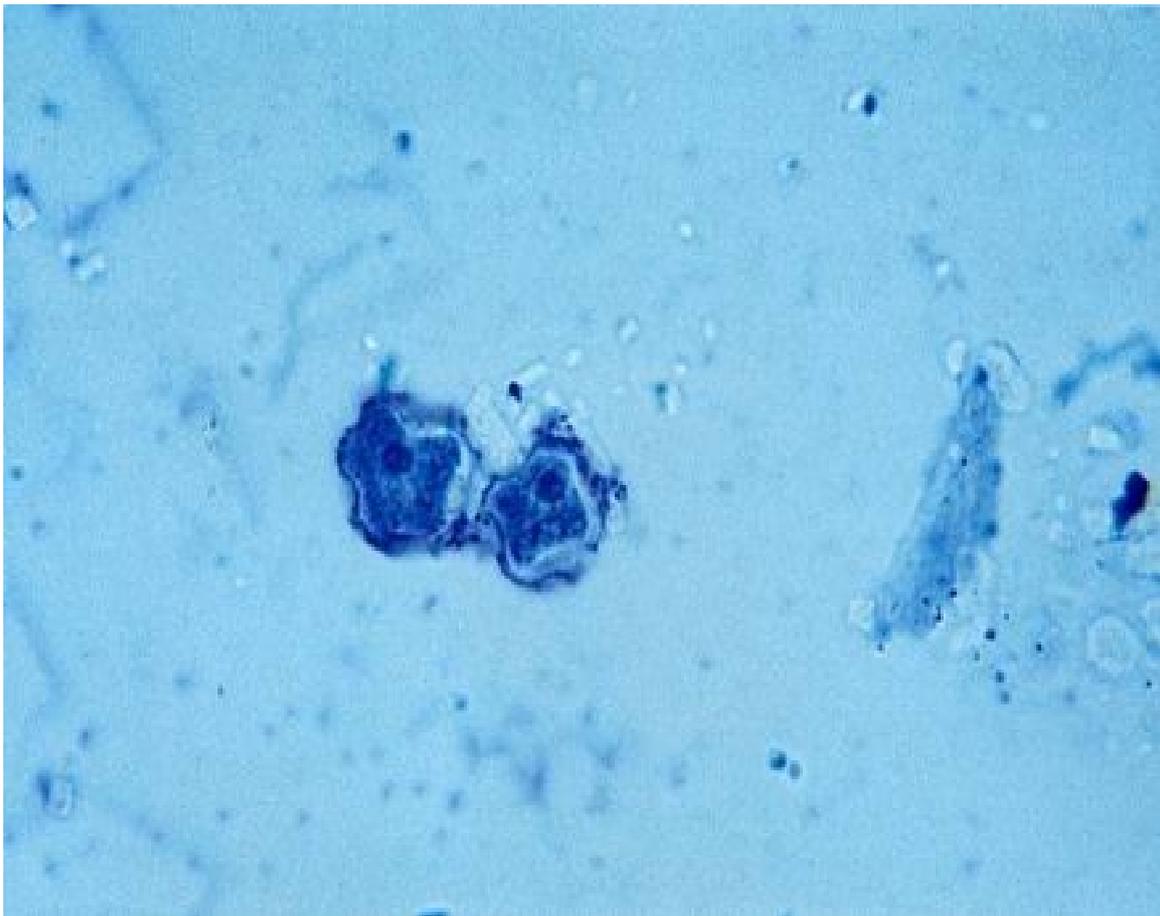


Photo n° 196

Acanthamoeba. Deux kystes avec leur noyau visible. Culture sur lame. Coloration de May-Grünwald-Giemsa. Obj. X 100.

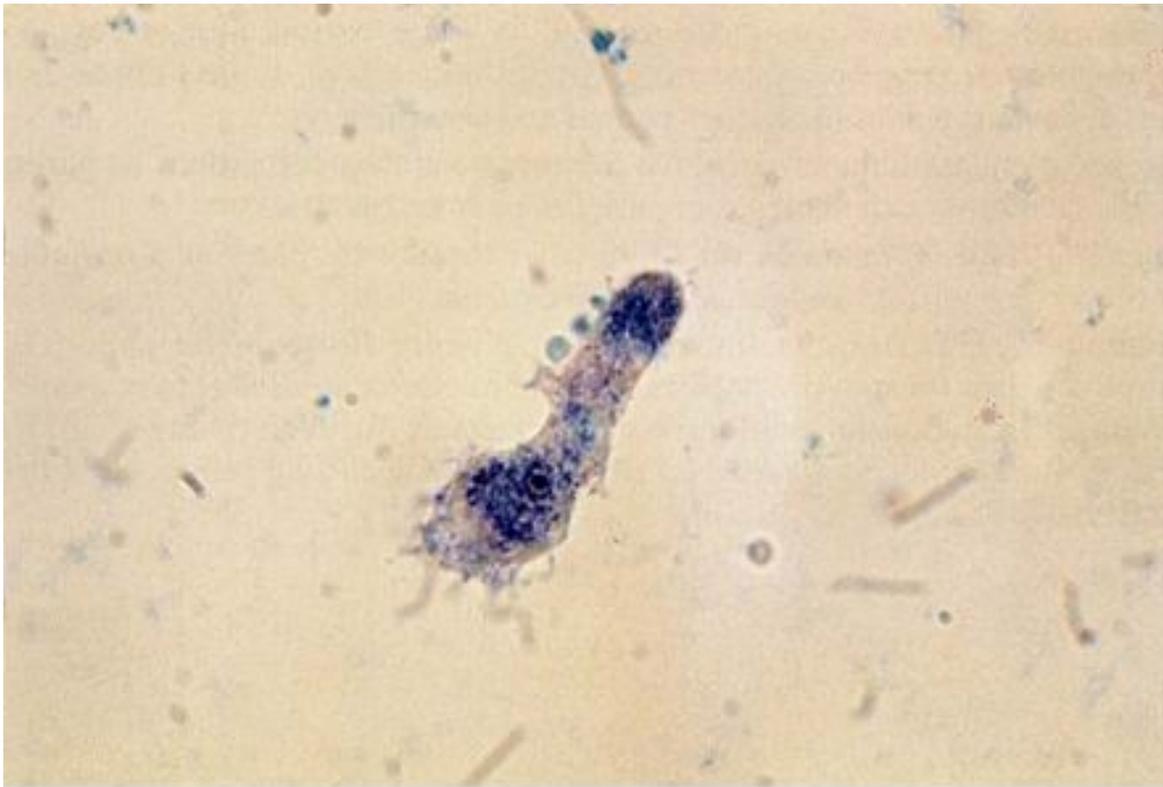


Photo n° 197

Acanthamoeba. Forme végétative. Culture sur lame. Coloration trichrome. Obj. X 100.

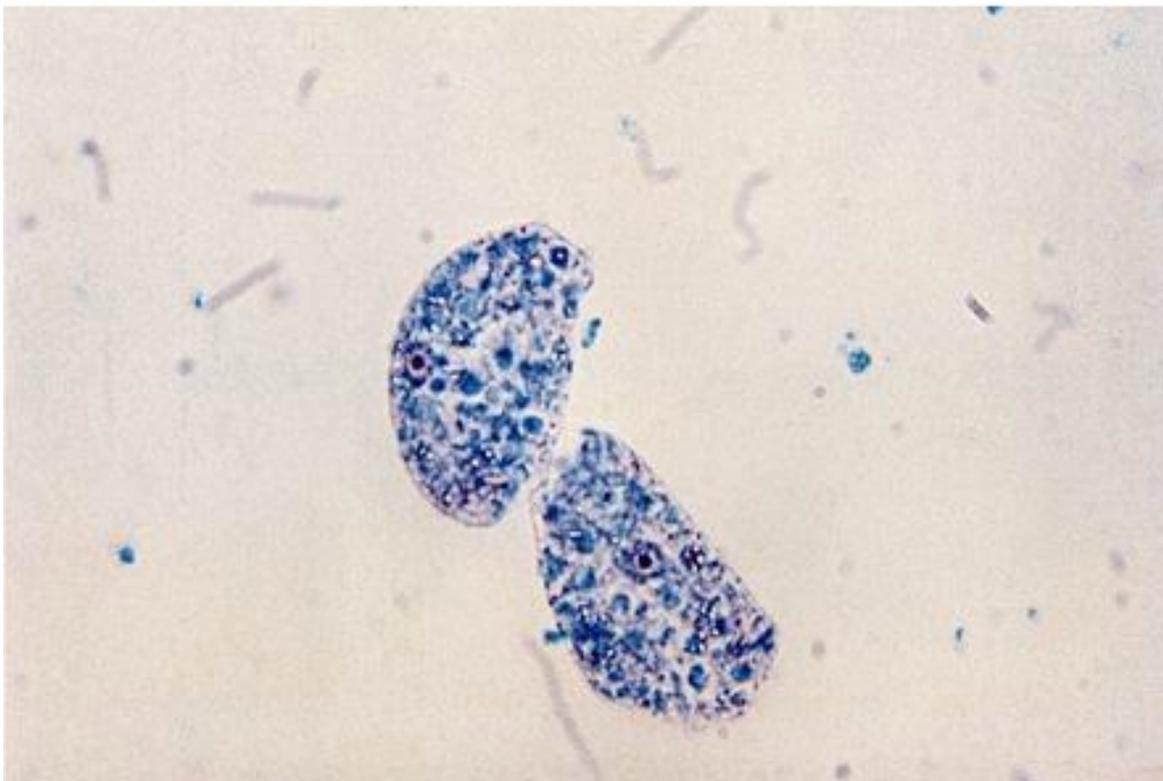


Photo n° 198

Acanthamoeba. Deux formes végétatives avec le noyau coloré. Culture sur lame. Coloration trichrome. Obj. X 100.

L'identification précise et la classification des souches isolées est difficile, voire impossible par les techniques courantes. *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes* ne peuvent être distinguées ni morphologiquement ni sérologiquement, seule l'étude de leurs enzymes et de leurs acides nucléiques permet une classification.

La présence d'endosymbionts s'observe fréquemment chez ces amibes en particulier lorsque les conditions extérieures sont difficiles pour les bactéries.

- **Le genre *Protacanthamoeba*** est défini par l'absence de pores et d'opercules au niveau des kystes qui ont une forme ronde ou ovalaire (198).

- La famille des HARTMANELLIDAE comprend le **genre *Hartmanella***, amibes libres, non éruptives. Les formes végétatives sont habituellement allongées et avancent à l'aide d'un seul pseudopode sauf lors du changement de direction (photo n° 201). Leur taille est habituellement inférieure à 75 µm et souvent beaucoup plus petite. Elles ont un seul noyau (198).

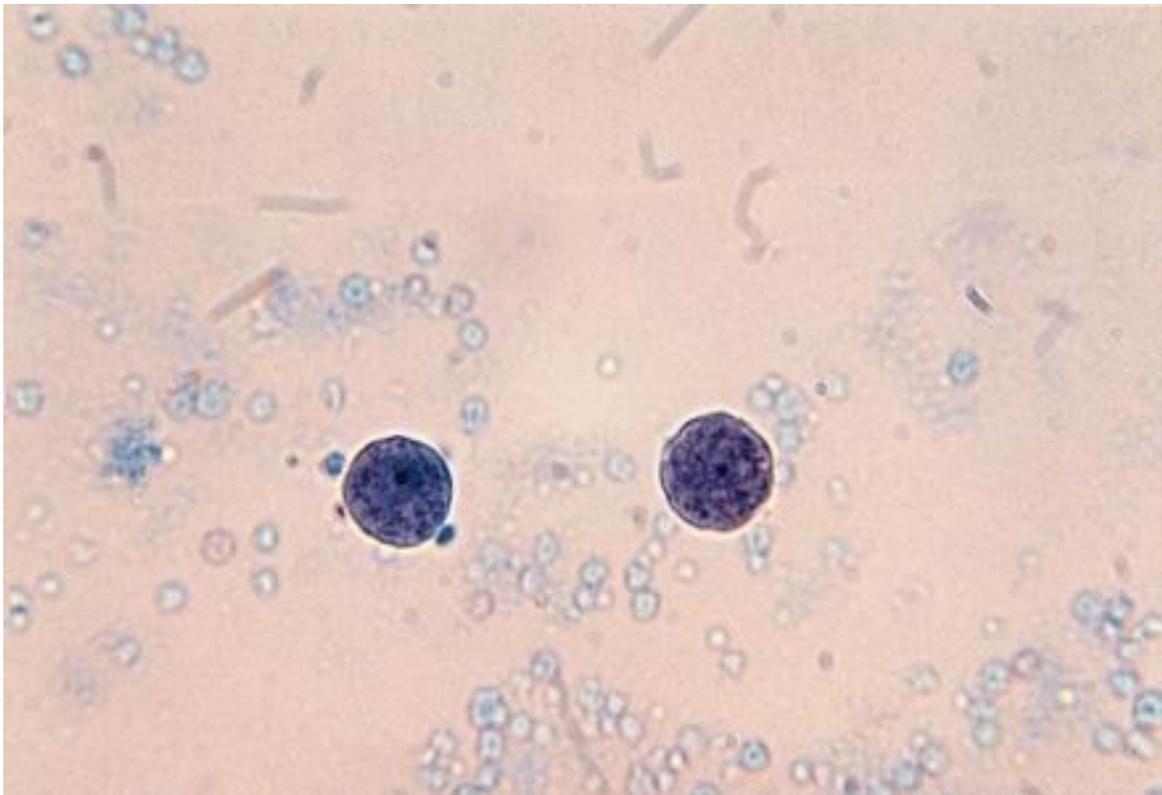


Photo n° 199

Acanthamoeba. Deux prékystes. Culture sur lame. Coloration trichome. Obj. X 100.

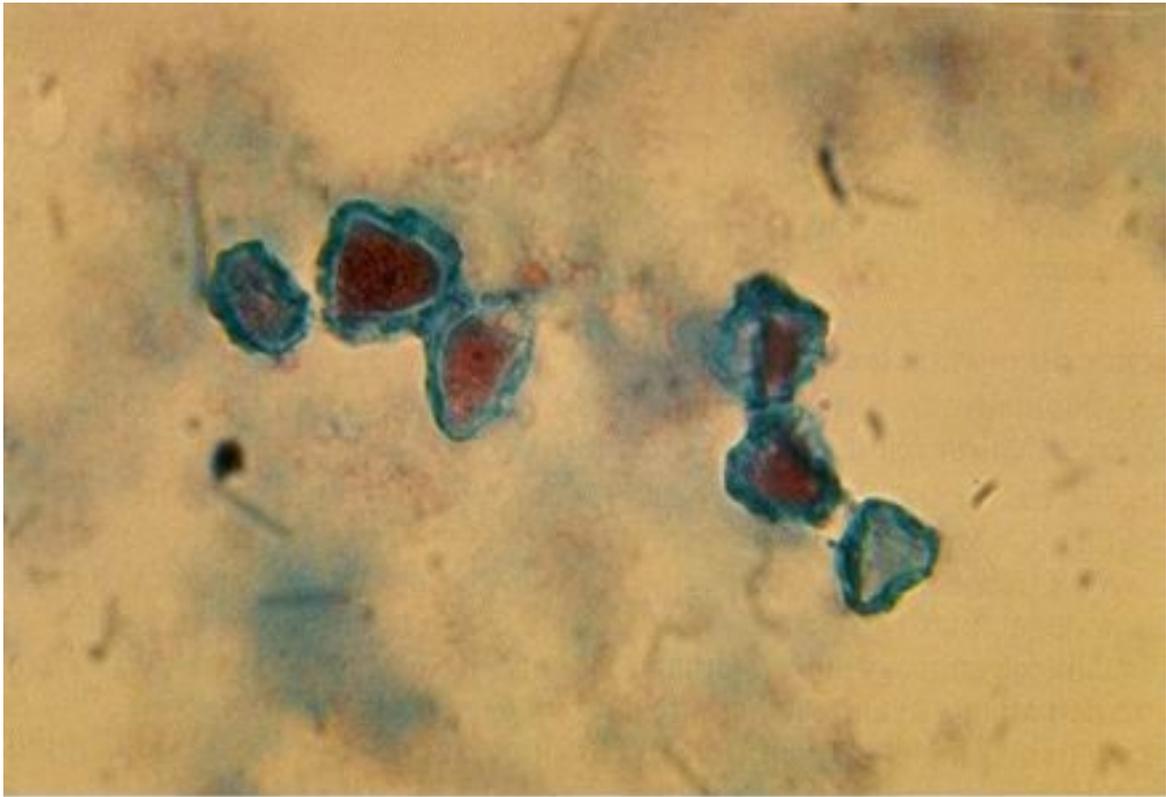


Photo n° 200
Acanthamoeba. Kystes. Culture sur lame. Coloration trichrome. Obj. X 100.

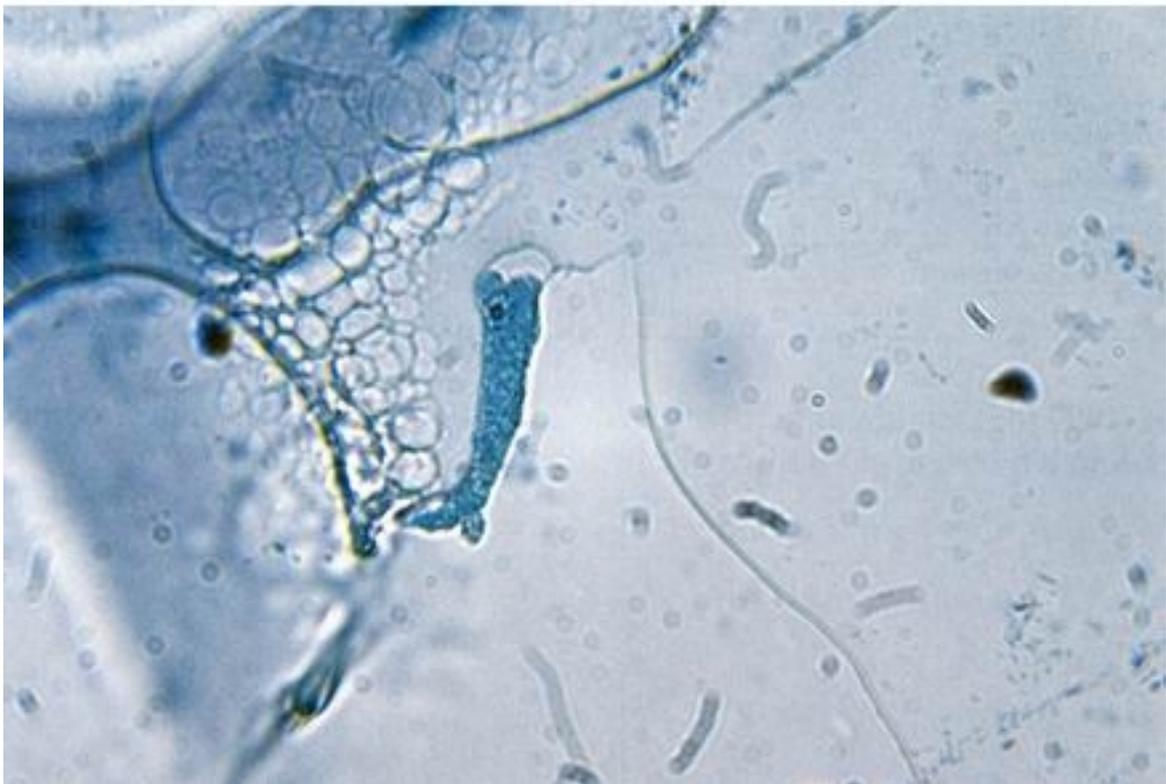


Photo n° 201
Hartmannella. Forme végétative. Culture sur lame. Coloration trichrome. Obj. X 100.

ÉPIDÉMIOLOGIE

Le premier cas de kératite amibienne a été diagnostiqué en 1973 au Sud Texas, après un traumatisme (181).

La kératite à *Acanthamoeba* serait due au contact direct de la cornée avec du matériel ou de l'eau contaminés, une lésion de l'épithélium par un corps étranger, par des lentilles de contact ou même une kératite virale permettraient l'installation et la multiplication des amibes.

- Influence du port de lentilles de contact

Les micro-traumatismes cornéens, fréquents lors du port de lentilles de contact, constituent la porte d'entrée habituelle de l'infection.

Parmi les 160 cas recensés aux USA de 1973 à fin 1988, 85 % portaient des lentilles de contact (208). L'augmentation du nombre des cas a été très importante depuis 1981 (179) ; ceci est probablement dû au diagnostic qui s'est amélioré et au nombre croissant de porteurs de lentilles de contact. La fréquence des kératites à *Acanthamoeba* a augmenté pendant les années 1990 en Grande-Bretagne (179) ; au Moorfield Eye Hospital, le nombre de patients ayant une kératite amibienne a augmenté de 1989 à 1994 puis a décru (45 patients en 1994, 15 en 1996), cette diminution serait due à l'influence d'une émission télévisée de la B.B.C. (196).

Au Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts (C.H.N.O.), le nombre de patients chez lesquels des amibes ont été isolées a augmenté depuis 1989. En 1995-1996 le nombre a diminué pour augmenter en 1997.

Tableau XIV : Acanthamoeba isolées à l'hôpital des Quinze-Vingts

Nombre de cultures d'Amibes positives	1993	1994	1995	1996	1997	Total
Cornée seule	2	3	0	4	2	11
Cornée et Boîtier	2	0	0	0	1	3
Boîtier et lentilles seuls	14	14	7	5	17	57
Nb total de patients	18	17	7	9	20	71

En **1996-1997**, des amibes ont été isolées de 23 boîtiers et lentilles et de 7 cornées de patients dont 2 n'étaient pas porteurs de lentilles.

Des kératites amibiennes surviennent chez des non porteurs de lentilles de contact, à la suite de lésions cornéennes d'origines diverses : blessure avec une algue, traumatisme par un insecte, poussière dans l'œil, projection d'eau de mer, d'eau sale, branche d'arbre, éclat de bois reçu dans l'œil ; mais quelquefois aucun incident n'est retrouvé à l'origine de l'infection.

- Influence du type de lentilles

La fréquence est plus grande chez les porteurs de lentilles souples hydrophiles, les lentilles rigides perméables au gaz sont plus rarement incriminées (208).

- Rôle du mode d'entretien des lentilles et des produits utilisés

Les sources les plus fréquentes de contamination sont le nettoyage, le rinçage ou la conservation des lentilles dans une solution contaminée

- rinçage des lentilles à l'eau du robinet ;
- humidification avec la salive ;
- préparation des solutions de rinçage à la maison (167 ; 182 ; 193 ; 194 ; 208).



La contamination des boîtiers de lentilles de contact par les amibes est beaucoup plus fréquente que ne le laisse supposer le nombre des kératites amibiennes. La recherche d'amibes dans les boîtiers de lentilles de contact de 63 patients asymptomatiques venus pour un contrôle systématique en contactologie, a montré (tableau XV) que 5 % des boîtiers de patients sans problème particulier sont contaminés. Si l'on considère uniquement les boîtiers sales, ce chiffre passe à 14 %.

Tableau XV : Contamination amibienne de 63 boîtiers de lentilles de contact de patients asymptomatiques (Centre Hospitalier Ophthalmologique des Quinze-Vingts, 1990) (187)

Aspect du boîtier	Nbre de boîtiers	Nbre de boîtier contenant des amibes
0	28	0
1	8	0
2	10	2
3	4	0
4	8	1
inconnu	5	0

Aspect du boîtier : - 0 = propre, liquide limpide. - 1 = sale, liquide limpide. - 2 = sale, liquide légèrement trouble. - 3 = sale, liquide très trouble. - 4 = sale, liquide très trouble, présence de dépôts. - inconnu.

L'étude de Gray et coll. (176) portant sur la contamination bactérienne, fongique et amibienne du boîtier de 101 porteurs de lentilles asymptomatiques ayant utilisé leurs lentilles (non thérapeutiques) pendant plus de 6 mois a montré la présence de bactéries dans 77 % des cas, de champignons dans 24 % des cas, de protozoaires dans 20 % des cas, les boîtiers étaient stériles dans 19 % des cas. Une kératite puis un ulcère ne surviennent que chez un petit nombre de patients, les facteurs de risques restent à déterminer.

Les produits d'entretien commercialisés ne contiennent pas d'amibes car ils subissent une filtration stérilisante, mais une contamination peut survenir après l'ouverture des flacons. Il faut donc que les produits d'entretien soient amoebicides. La contamination des lentilles peut se faire également pendant le port (baignade en eau contaminée, projection etc.).

Plusieurs auteurs ont étudié l'action des produits d'entretien sur les amibes, les résultats sont difficilement interprétables car ils sont souvent contradictoires et les études peu standardisées.

Seraient efficaces :

La désinfection par la chaleur: 10 minutes à 70-80°C (189 ; 195 ; 203 ; 204).

La chlorhexidine à 0,001 % pendant 4 heures ou à 0,004 % pendant 1 heure (205).

Le chlorure de benzalkonium à 0,005 % (195) et 0,1 % (197).

Le thimerosal à 0,001 % associé à la chlorhexidine à 0,005 % pendant 4 heures serait efficace sur certaines souches seulement (205).

Le peroxyde d'hydrogène à 3 % pendant 10 minutes au moins avant neutralisation.

Le Polyhexaméthylène biguanide ou P.H.M.B. à 0,0001 %.

Seraient inefficaces :

Le peroxyde d'hydrogène à 3 % quand le boîtier contient un catalyseur pour la neutralisation (205).

Le thimerosal à 0,001 % seul (195 ; 197).

Le polyquaternium-1 à 0,001 % (205).

Le biguanide de polyaminopropyl (205).

Le chlorure d'alkyl triéthanol ammonium (205).

Le Polyhexaméthylène biguanide ou P.H.M.B. à 0,00005 % (186).

SIGNES CLINIQUES

- **Au début**, les signes cliniques sont, le plus souvent, la rougeur, une irritation avec sensation de corps étranger et la photophobie. L'épithélium cornéen peut être intact ou montrer une image de kératite ponctuée ou un aspect de lésion pseudo-dendritique. Des infiltrats peuvent être présents au niveau du stroma, sous la forme de minuscules lésions blanches ou de lésions irrégulières plus ou moins grises.

La douleur intense et la présence d'un oedème cornéen avec infiltrat stromal péri-lésionnel sont très évocatrices d'une kératite amibienne, il peut y avoir une réaction discrète à modérée dans la chambre antérieure. La douleur très intense peut être liée à l'affinité des *Acanthamoeba* pour le tissu nerveux. Une kératonévrite radiale peut se développer, les ramifications nerveuses peuvent être atteintes lors de l'extension de l'infiltrat stromal en direction du limbe.

- **Au stade suivant, transitoire, l'infiltrat** stromal forme un anneau partiel ou complet. Chez un patient dont les prélèvements à la recherche d'autres micro-organismes sont restés négatifs, ce signe est pathognomonique de l'infection à *Acanthamoeba*. De minuscules lésions blanches peuvent être observées en dehors de l'anneau d'infiltrat stromal et la kératonévrite disparaît à ce stade (photo n° 202).

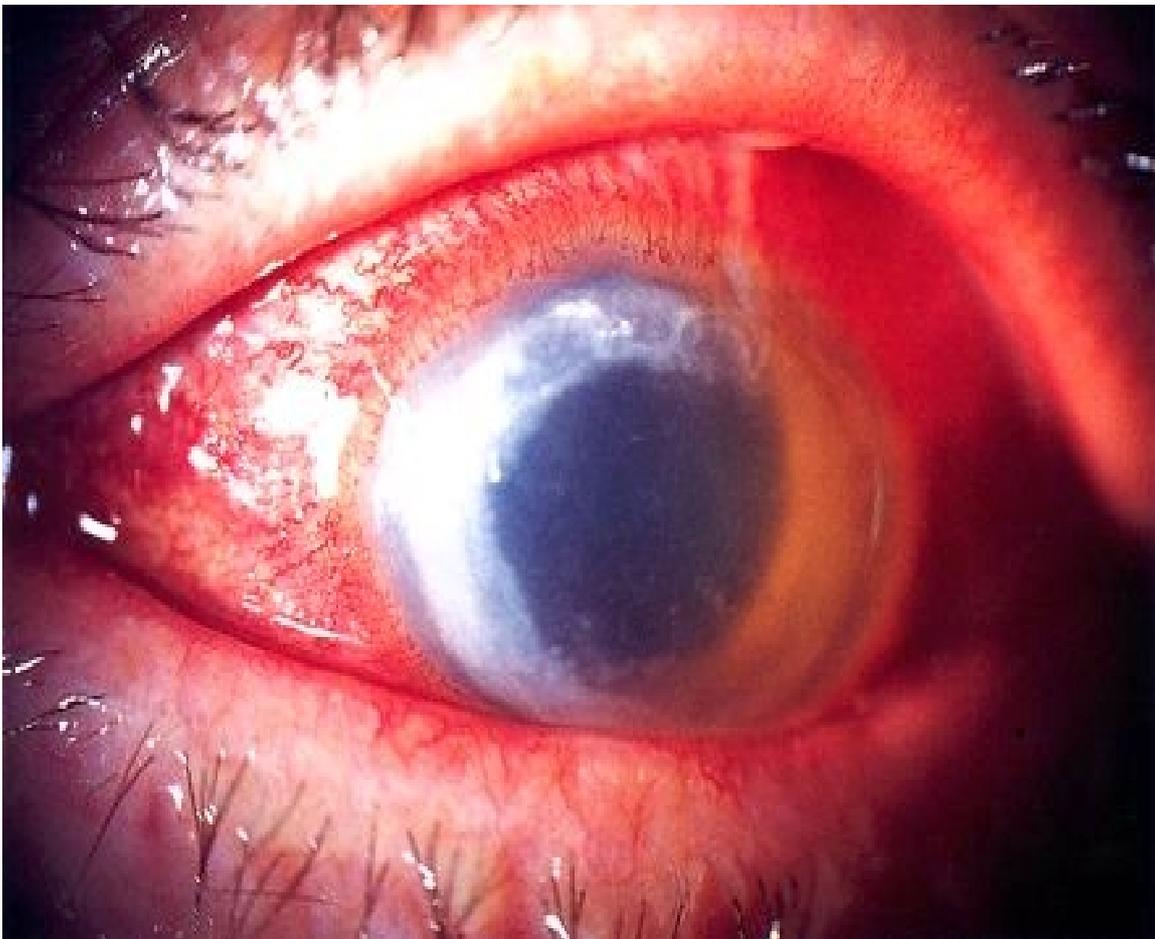


Photo n° 202

Œil atteint de kératite amibienne : infiltrat stromal formant un anneau avec présence de lésions blanches en dehors de l'anneau d'infiltrat.

- **Au dernier stade**, on observe des abcès cornéens qui peuvent s'étendre au centre de la cornée et un oedème central, un double anneau d'infiltrat a été observé dans certains

cas. Avec la progression de l'infection, il y a diminution progressive du stroma cornéen et formation d'un descemetocèle associé à un iritis et à un hypopion (180).

Dans de rares cas, l'infection peut être d'emblée profonde, par exemple lors d'une lésion post-traumatique (cas d'un patient bûcheron ayant reçu un éclat de bois dans l'œil) la présence d'amibes a pu être observée dans la chambre antérieure.

Le diagnostic évoqué en tout premier lieu est, la plupart du temps, celui de kératite herpétique. La présence d'une hyperhémie importante et de petites opacités sous-épithéliales peut également faire penser à une infection à Adenovirus (175) ; cependant, lors d'une infection à Adenovirus, la rougeur est souvent beaucoup plus importante et le deuxième œil rapidement atteint.

Les traitements en général instaurés, anti-herpétiques ou antibiotiques n'entraînent pas de guérison et il y a bien souvent une succession de périodes de rémissions et d'exacerbations au cours desquelles les lésions se développent. Les lésions sont souvent aggravées du fait du retard mis au diagnostic, celui-ci n'étant bien souvent envisagé qu'après les échecs thérapeutiques successifs. Lorsque le traitement est précoce, ces infections sont de bon pronostic, mais plus les lésions sont profondes, plus le traitement devient difficile et plus le risque d'échec grand ; il est donc très important d'établir le plus rapidement possible le diagnostic.

PHYSIOPATHOLOGIE

Les *Acanthamoeba* sont très répandues dans l'environnement, la question est de savoir si cela a une importance médicale ou non, si toutes les souches ou si seulement certaines d'entre elles peuvent être pathogènes. Malgré la large distribution de ces micro-organismes les infections léthales sont rares : 30 cas d'encéphalites granulomateuses amibiennes dans le monde ont été attribués à *de sAcanthamoeba*. En ce qui concerne les infections oculaires, elles sont rares également, même si l'augmentation du nombre des porteurs de lentilles de contact ainsi que la mise au point du diagnostic ont entraîné une augmentation du nombre de cas recensés. La contamination des boîtiers de lentilles de contact par les amibes est beaucoup plus fréquente que ne le laisse supposer le nombre des kératites amibiennes. Les facteurs de risques restent à déterminer. La virulence des souches augmente avec le nombre de passages chez l'animal et diminue par passage sur milieu axénique ; elle est restaurée par passage chez l'animal (191). La mesure comparative de l'activité des protéases et des peroxydases de souches virulentes (isolées du cerveau de souris), de souches devenues non virulentes par multiples passages sur milieu axénique et de souches non virulentes (peu invasives) a montré, chez les souches pathogènes devenues non virulentes une activité protéase < 5 u/mg de protéines et une activité comprise entre 8 et 14 u/mg de protéines pour les souches virulentes. L'activité peroxydasique des souches non virulentes est d'environ 0,06 u/mg de protéines et augmente jusqu'à 0,2 u/mg chez les souches virulentes (186).

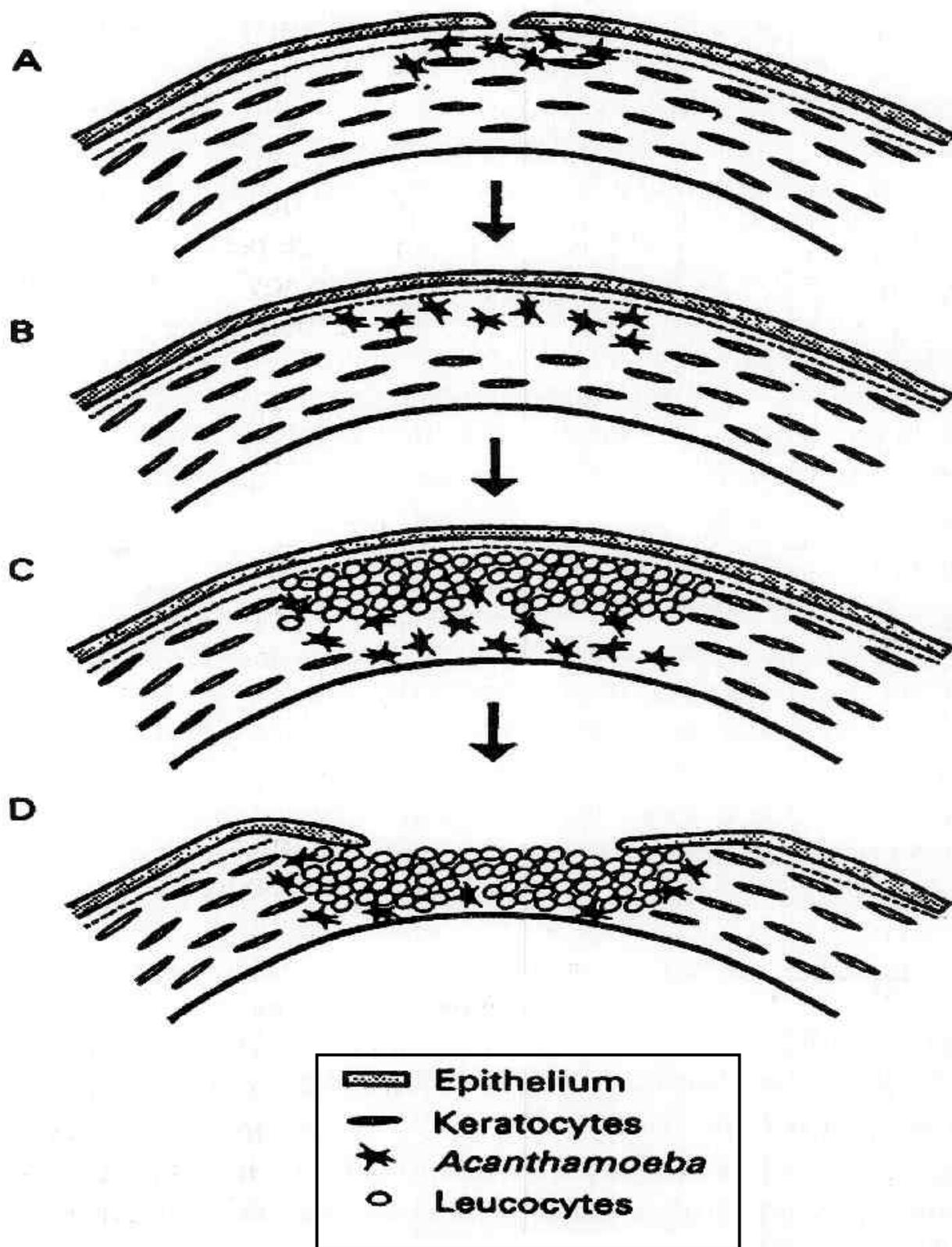


Figure 6 d'après A. GARNER : (173) Pathogénèse de la kératite amibienne, hypothèse basée sur l'étude de 30 cas, des séquences du développement d'une kératite amibienne. (A) Pénétration de l'épithélium cornéen. (B) Déplétion du stroma en kératocytes provoquée par les *Acanthamoeba*. (C) Infiltration secondaire du stroma en polynucléaires neutrophiles. (D) Nécrose stromale.

L'adhésion à la surface des cellules épithéliales jouerait un rôle important, ce qui expliquerait la spécificité d'espèce : les trophozoïtes adhèrent aux cellules épithéliales humaines et de porc mais pas à celles de rat chez lequel l'infection expérimentale est très difficile et nécessite des artifices (163 ; 185). La fixation des *Acanthamoeba* sur les cellules épithéliales se ferait sur des glycoprotéines de membrane contenant du mannose, l'addition de mannopyranoside à une suspension d'*A. castellani* empêche leur fixation ultérieure sur les cellules épithéliales (214).

La présence d'une lésion et de bactéries sur la cornée favorise le développement d'une infection amibienne. Le biofilm déposé à la surface des lentilles augmente probablement l'adhérence des amibes. Les lentilles n'agissent pas seulement en transportant les amibes au niveau de la cornée mais aussi en prolongeant leur contact avec celle-ci et en les protégeant du balayage des paupières et du flux lacrymal (195). La relative anaérobiose du stroma favoriserait l'enkystement des amibes qui seraient alors beaucoup moins sensibles au traitement (169).

Le développement de l'infection suivrait le schéma suivant

Une lésion traumatique de l'épithélium cornéen permet la pénétration des formes végétatives, il y a invasion du stroma antérieur au niveau de la brèche et sous l'épithélium adjacent, on observe une diminution du nombre des kératocytes ; à ce stade, la réaction inflammatoire est quasi inexistante. Ensuite, une réaction inflammatoire se développe, on observe la présence de nombreux polynucléaires neutrophiles et de quelques macrophages mais rarement une réaction lymphocytaire. Une nécrose se produit ensuite, le collagène stromal est lysé sous l'influence des enzymes libérées par les polynucléaires et/ou des enzymes lytiques produites par les amibes (173, voir Figure 6).

IMMUNOLOGIE

Des *Acanthamoeba* ont été isolées des fosses nasales et de la cavité pharyngée chez des sujets sains et atteints de rhinite (163), des anticorps anti *Acanthamoeba* ont été observés chez des sujets sains (166 ; 172).

L'immunité serait en partie à médiation cellulaire et l'exposition répétée de l'homme à des amibes non pathogènes ou à des fractions de ces amibes pourrait l'immuniser contre les amibes pathogènes. Parmi 20 sujets japonais sains n'ayant pas eu d'épisode connu d'infection à *Acanthamoeba* et deux nouveau-nés servant de témoins, 10 patients ont montré des tests de prolifération des lymphocytes T CD4+ positifs en présence d'extraits d'antigènes de deux souches d'*Acanthamoeba* (200). Une immunodéficiency pourrait favoriser les infections à *Acanthamoeba* (164), ce que confirment les infections invasives observées chez les patients atteints par le V.I.H. Culbertson a montré que les *Acanthamoeba* étaient pathogènes en instillation nasale chez le singe traité aux corticoïdes.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Recherche d'amibes associée à un examen bactériologique, mycologique et virologique

- PRÉLÈVEMENT :

La recherche d'amibes est pratiquée sur le grattage cornéen péri-lésionnel. Un examen direct est effectué ainsi qu'une mise en culture du prélèvement. Les amibes sont présentes au niveau des lésions mais elles sont souvent localisées en profondeur et sont parfois peu nombreuses. Le prélèvement doit donc être effectué sous lampe à fente par un ophtalmologiste, en grattant assez profondément en périphérie des lésions.

Les résultats obtenus peuvent être faussement négatifs si le grattage ne contenait pas d'amibes ; c'est pourquoi, chez les porteurs de lentilles de contact, la recherche d'amibes sera également pratiquée systématiquement sur les lentilles et le culot de centrifugation du liquide de conservation contenu dans le boîtier.

Si nécessaire (résultats négatifs, extension des lésions....), une biopsie cornéenne peut être effectuée. Une partie du fragment comprenant de l'épithélium et surtout du stroma est mise en culture, l'autre partie est incluse en paraffine, des coupes sont effectuées afin de rechercher la présence d'amibes sur lames après coloration.

- **Lorsque des examens bactériologique, mycologique ou virologique sont nécessaires**, ensemercer d'abord le Sabouraud chloramphénicol puis mettre un anesthésique local (Novésine® ou Oxybuprocaine®) et effectuer les prélèvements de virologie, bactériologie et en dernier le grattage pour la culture d'amibes.

- Prélever au niveau de la lésion (à l'aide d'une éponge montée stérile et d'écouvillons) et ensemercer les milieux suivants :

- Sabouraud Chloramphénicol sans Actidione
- Schaedler + extrait globulaire
- gélose chocolat polyvitex
- milieu de transport pour la culture virale

- RECHERCHE D'AMIBES :

Gratter assez profondément sous lampe à fente à l'aide d'un vaccinostyle stérile et mettre celui-ci dans un tube stérile fermé. Si l'ensemencement est différé au lendemain, mettre une goutte d'eau distillée stérile au fond du tube, passer celui-ci longuement au vortex et enlever le vaccinostyle ; mettre le tube bouché à 4 °C.

Gratter à nouveau et étaler le produit du grattage délicatement sur une ou plusieurs lames de microscope.

En cas de kératite, le protocole est le même mais au lieu d'un vaccinostyle on utilisera une éponge montée stérile afin de ne pas provoquer de lésion.

- Récupérer les lentilles et le boîtier utilisés par le patient.

- EXAMEN DIRECT DE FROTTIS COLORÉS :

Les colorations utilisées pour l'examen direct seront fonction du contexte et du nombre de lames réalisées.

Lorsque l'on a une seule lame : une coloration à l'acridine orange permet de visualiser les kystes et les trophozoïtes ainsi que les bactéries (photo n° 203) ; sur la même lame peut ensuite être effectuée une coloration de May-Grünwald-Giemsa qui permettra d'examiner la cytologie, de voir les bactéries et les kystes d'amibes (photos n°s 204 ; 205 ; 206).

Selon le résultat et la symptomatologie, la deuxième lame peut être utilisée pour faire un Gram, un P.A.S...(photos n°s 207 ; 208).

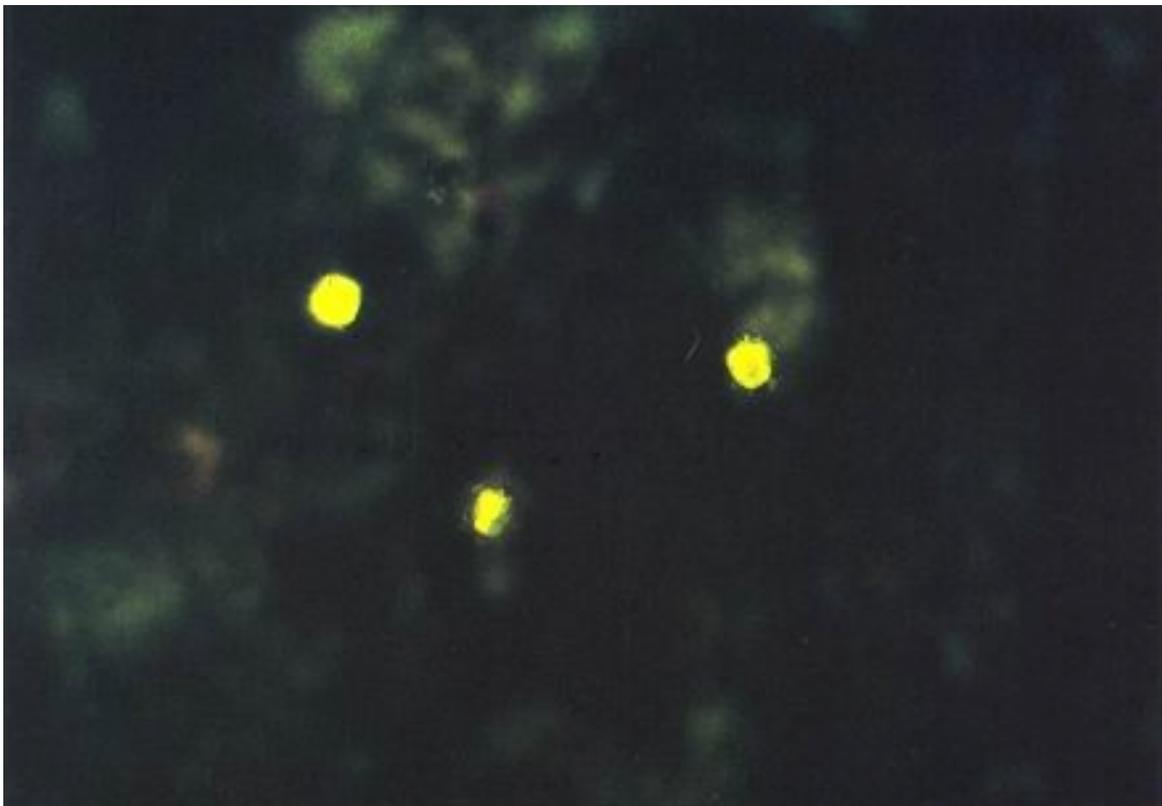


Photo n° 203

Acanthamoeba. Trois kystes. Examen direct d'un grattage d'ulcère de cornée. Coloration à l'acridine orange. Obj. X 40.

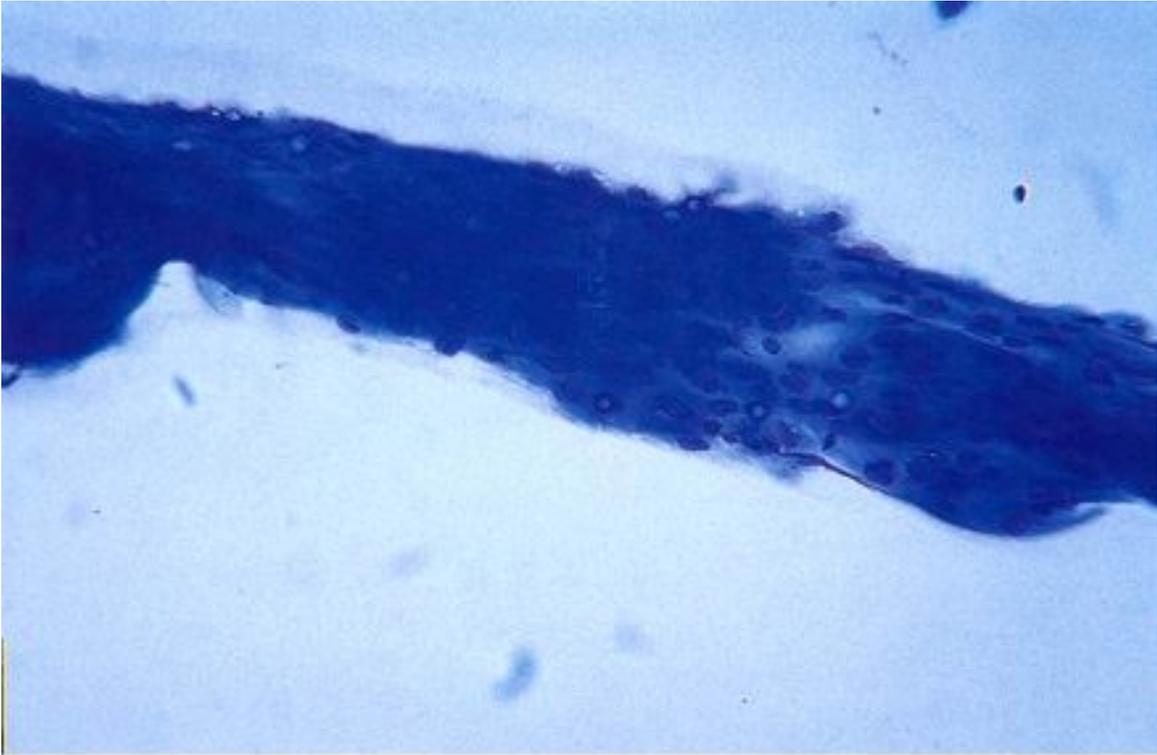


Photo n° 204

Acanthamoeba. Très nombreux kystes apparaissant, au faible grossissement, comme des petites bulles réfringentes avec une paroi épaisse. Examen direct d'un grattage d'ulcère de cornée. Coloration de May-Grünwald-Giemsa. Obj. X 25.

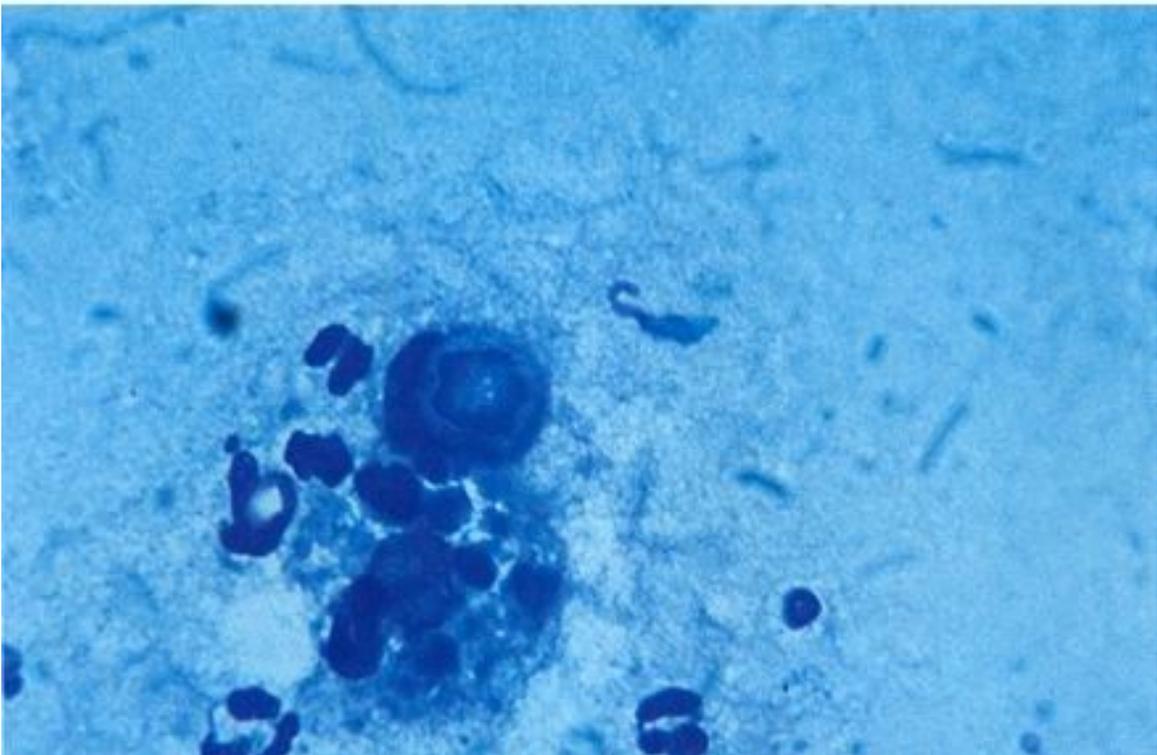


Photo n° 205

Acanthamoeba. Kystes et polynucléaires neutrophiles altérés. Examen direct d'un grattage d'ulcère de cornée. Coloration de May-Grünwald-Giemsa. Obj. X 100.

Coloration à l'Acridine orange

* REACTIFS :

- Fixateur : mélange éthanol absolu-éther vol. à vol.
- Acide acétique à 1 %.
- Solution aqueuse d'Acridine-orange à 0,1 % (conservée à + 4 °C et à l'obscurité).
- Tampon phosphate M/15, pH 6 : 6,7 g de phosphate monosodique + 3,58 g de phosphate disodique pour un litre de tampon.
- Solution M/10 de CaCl₂.

* COLORATION :

- Fixer le frottis pendant 30 minutes minimum dans l'alcool-éther.
- Plonger la lame 6 secondes dans l'acide acétique à 1 %.
- Laver très rapidement dans 2 bains d'eau distillée.
- Colorer dans l'acridine-orange pendant 3 minutes.
- Laver dans le tampon phosphate pendant 1 minute.
- Différencier dans le CaCl₂ pendant 30 secondes.
- Monter dans une goutte de tampon phosphate, recouvrir d'une lamelle et regarder au microscope à fluorescence.

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

RÉSULTAT :

L'ADN fluoresce en vert, l'ARN en rouge.

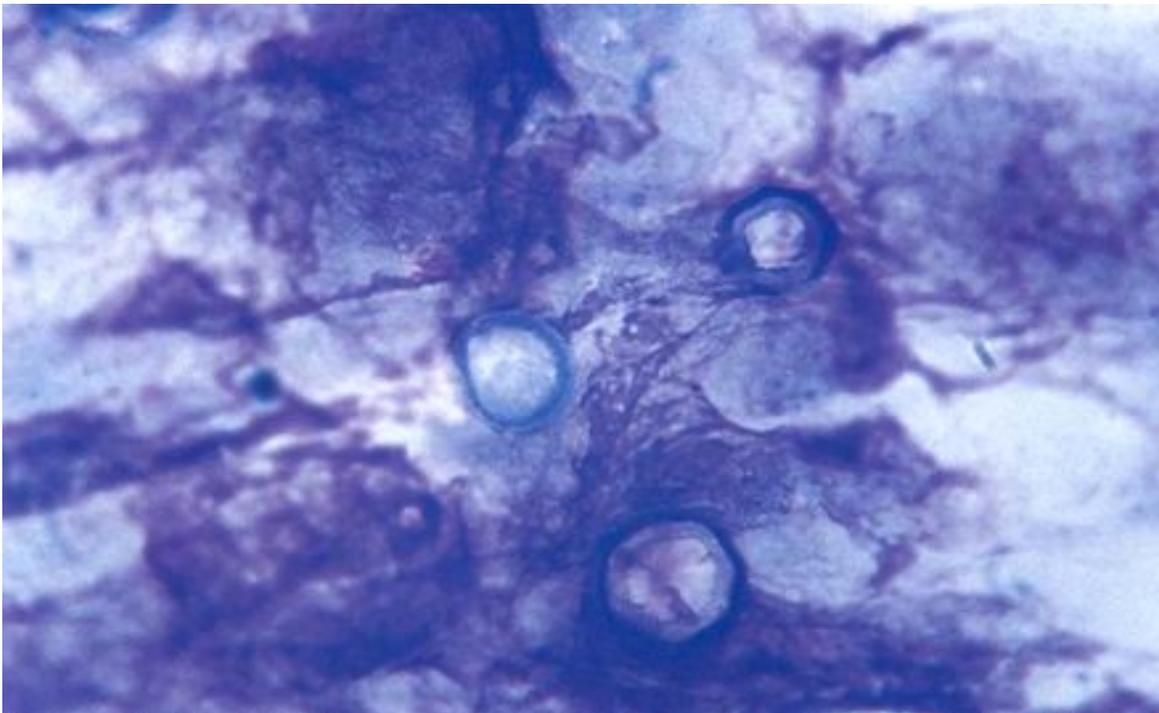


Photo n° 206

Acanthamoeba. Trois kystes. Examen direct de grattage d'ulcère de cornée. Coloration de May-Grünwald-Giemsa. Obj. X 100.

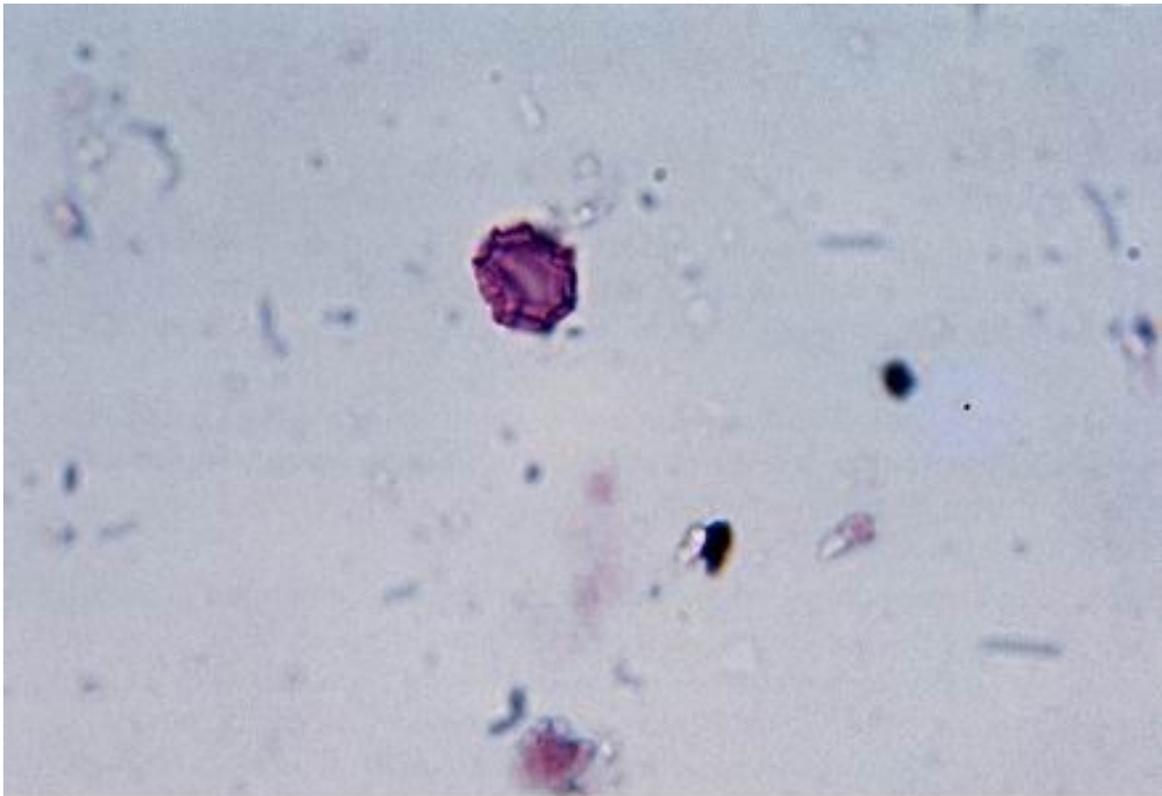


Photo n° 207
Acanthamoeba. Kyste. Culture sur lame. Coloration de Gram. Obj. X 100.

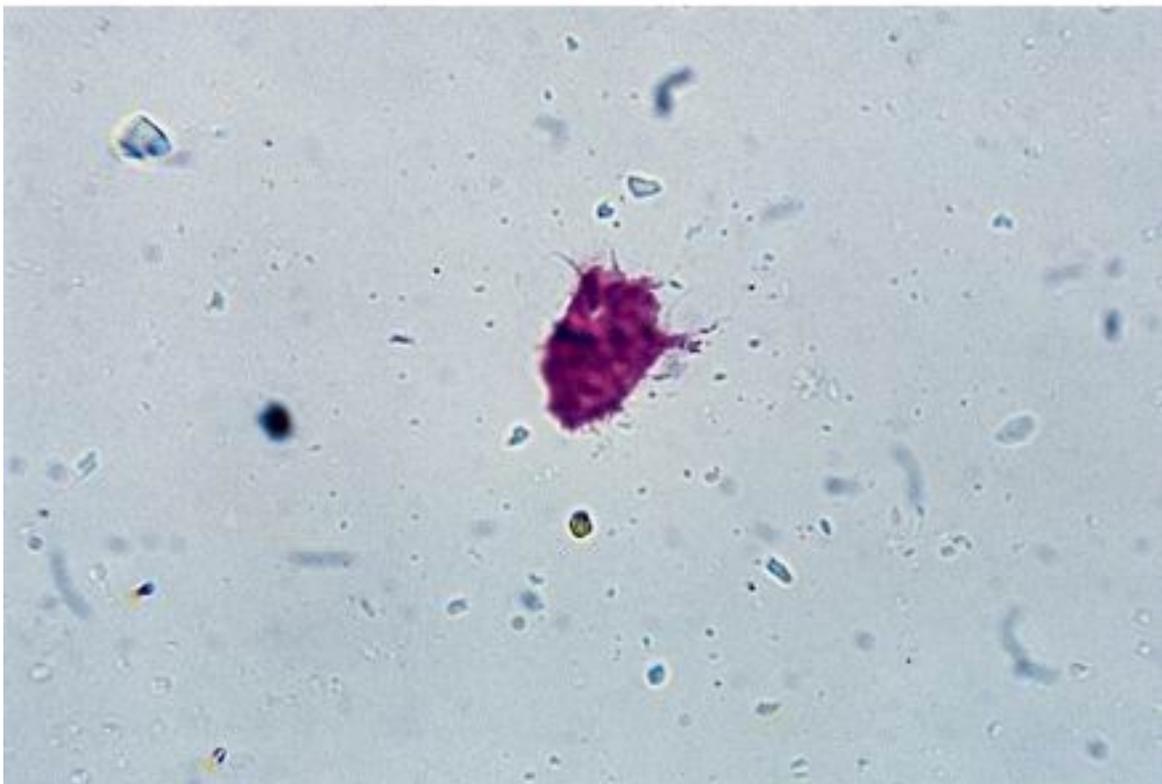


Photo n° 208
Acanthamoeba. Forme végétative. Culture sur lame. Coloration de Gram. Obj. X 100.

MISE EN ÉVIDENCE DES AMIBES PAR CULTURE ET EXAMEN À L'ÉTAT FRAIS

MISE EN CULTURE

- Grattage d'ulcère :

* Milieu de culture

Préparer de l'Agar (Agar bactériologique ex : type A Biokar diagnostic) à 2 % (p/vol.) dans de l'eau distillée stérile, le porter à ébullition au bain-marie pendant 3 à 4 heures. Couler la gélose en petites boîtes de pétri, l'épaisseur doit être de 2 mm. Les garder à 4 °C.

* Préparer une suspension d'*Escherichia coli* (bien dissocier les colonies), dans 10 ml de NaCl 9 ‰, la suspension doit être très légèrement opalescente. Agiter au vortex et porter à ébullition au bain-marie pendant 15 minutes, vortexer. Garder le tube à 4 °C, vortexer avant chaque utilisation.

- Sortir une gélose pour culture d'amibes du réfrigérateur ainsi que la suspension de colibacilles. Lorsqu'elles sont à température ambiante, vortexer la suspension de colibacilles, déposer au centre de la gélose une petite goutte de suspension de germes tués et frotter dedans le vaccinostyle ayant servi au grattage de l'ulcère, ne pas trop écorcher la gélose. Fermer la boîte avec un parafilm et la mettre à 30 °C, sans la retourner le premier jour (les jours suivants, elle sera placée dans l'étuve couvercle en bas pour que la condensation se fasse sur la gélose).

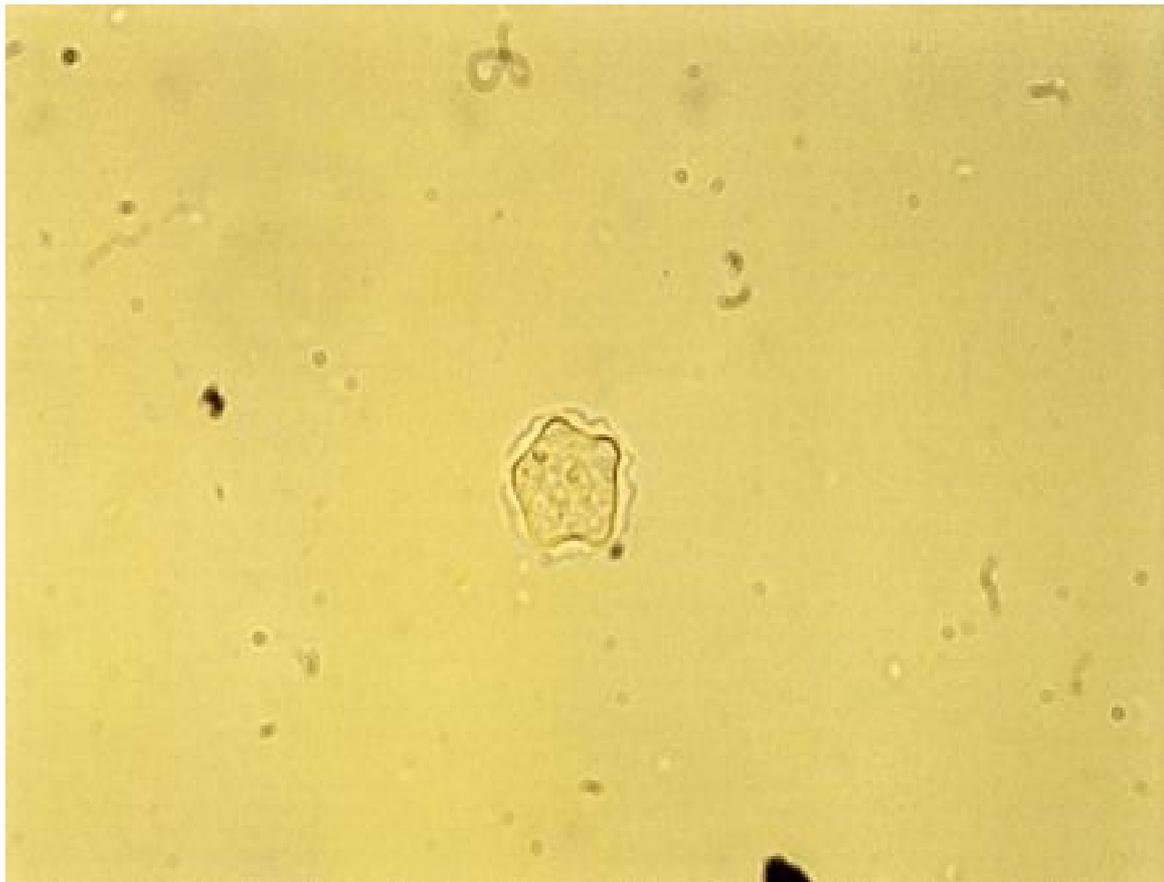


Photo n° 209

Acanthamoeba. Kyste. Examen d'une culture en milieu liquide (microscope inversé). Obj. X 40.

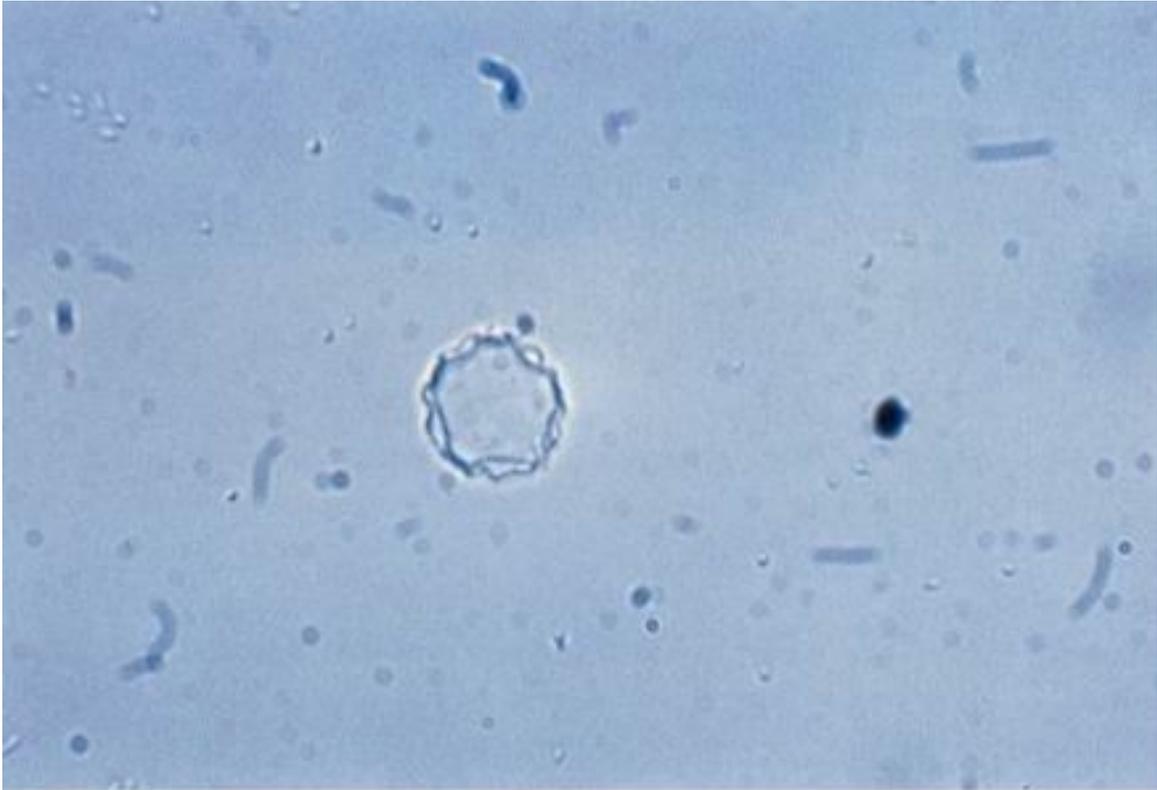


Photo n° 210
Acanthamoeba. Kyste vide. Examen à l'état frais d'une culture sur lame. Obj. X 100.



Photo n° 211
Amibe libre. Acanthamoebidae. Forme végétative. Examen à l'état frais d'une culture sur lame.
Obj. X 100.

- Boîtier de lentilles :

- Après les examens de bactériologie, mettre le liquide du boîtier dans un tube à centrifuger stérile, écouvillonner les parois et décharger l'écouvillon dans le tube, centrifuger à 1 500 trs/mn pendant 20 minutes.
- Mettre 5 ml de NaCl 9 ‰ stérile dans un petit flacon pour culture cellulaire et ajouter le culot de centrifugation du liquide de boîtier plus une goutte de suspension d'*Escherichia coli* tuées.
- Incuber à 30°C.

- Lentilles :

Mettre 5 ml de NaCl 9 ‰ dans un flacon (idem précédent) plus une goutte d'*E. coli* tuées, y ajouter les lentilles. Incuber à 30°C.

- Biopsie :

Un morceau de la biopsie comportant du stroma est mis en culture dans un petit flacon pour culture cellulaire avec 5ml de NaCl 9 ‰ stérile et une goutte de suspension d'*E. coli* tuées. Incuber à 30°C.

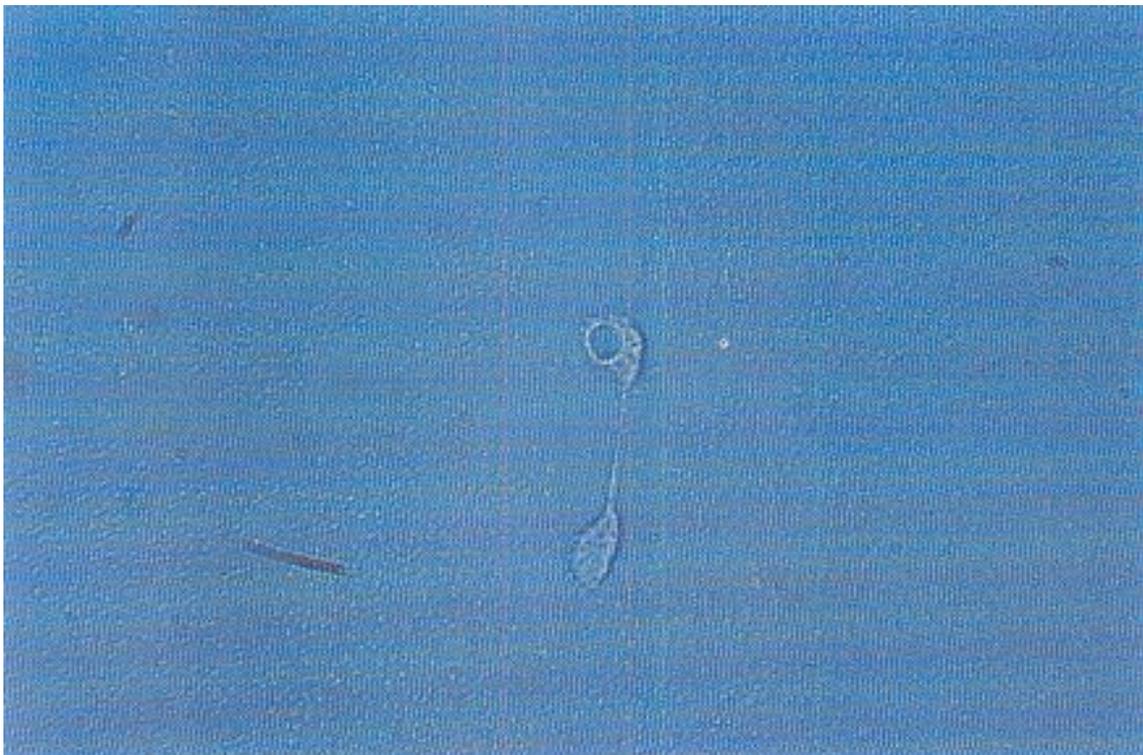


Photo n° 212

Amibes libres. *Acanthamoeba*. Deux formes végétatives. Examen à l'état frais d'une culture en milieu liquide. Obj. X 25.

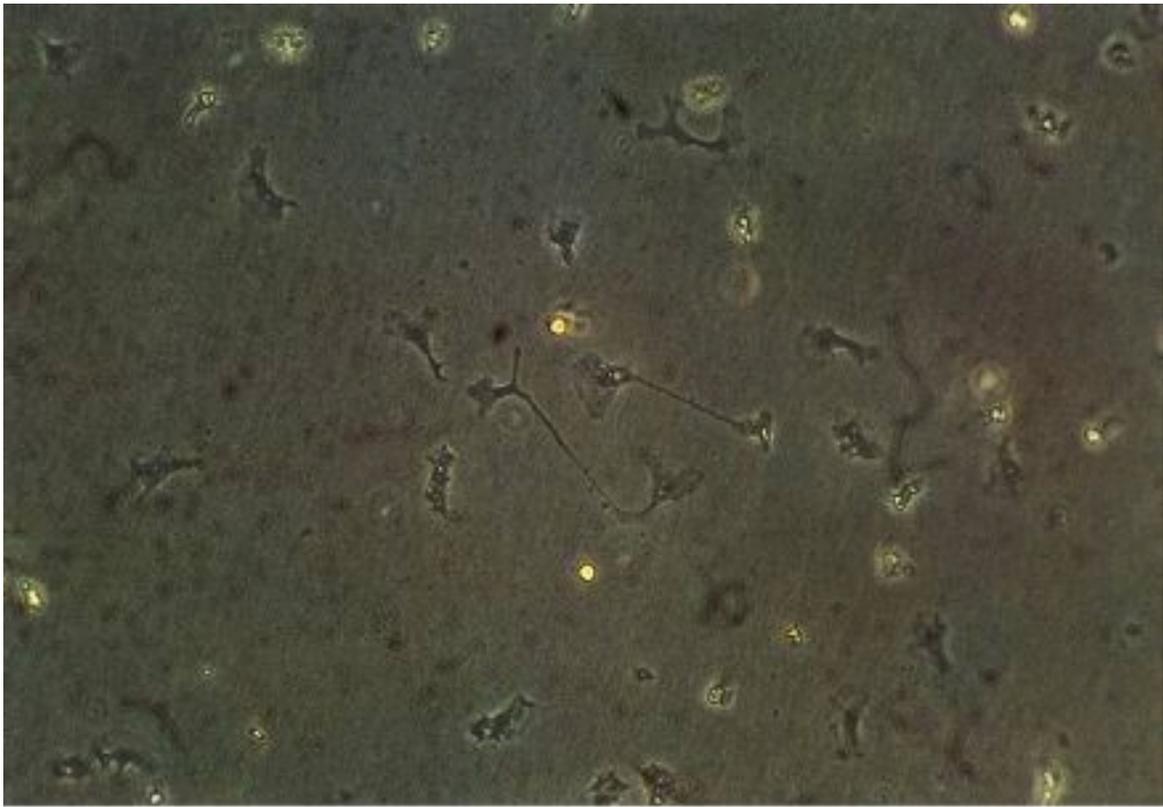


Photo n° 213 - *Hartmanella*. Présence de très nombreuses formes végétatives. Examen à l'état frais d'une culture en milieu liquide. Contraste de phase. Obj. X 25.

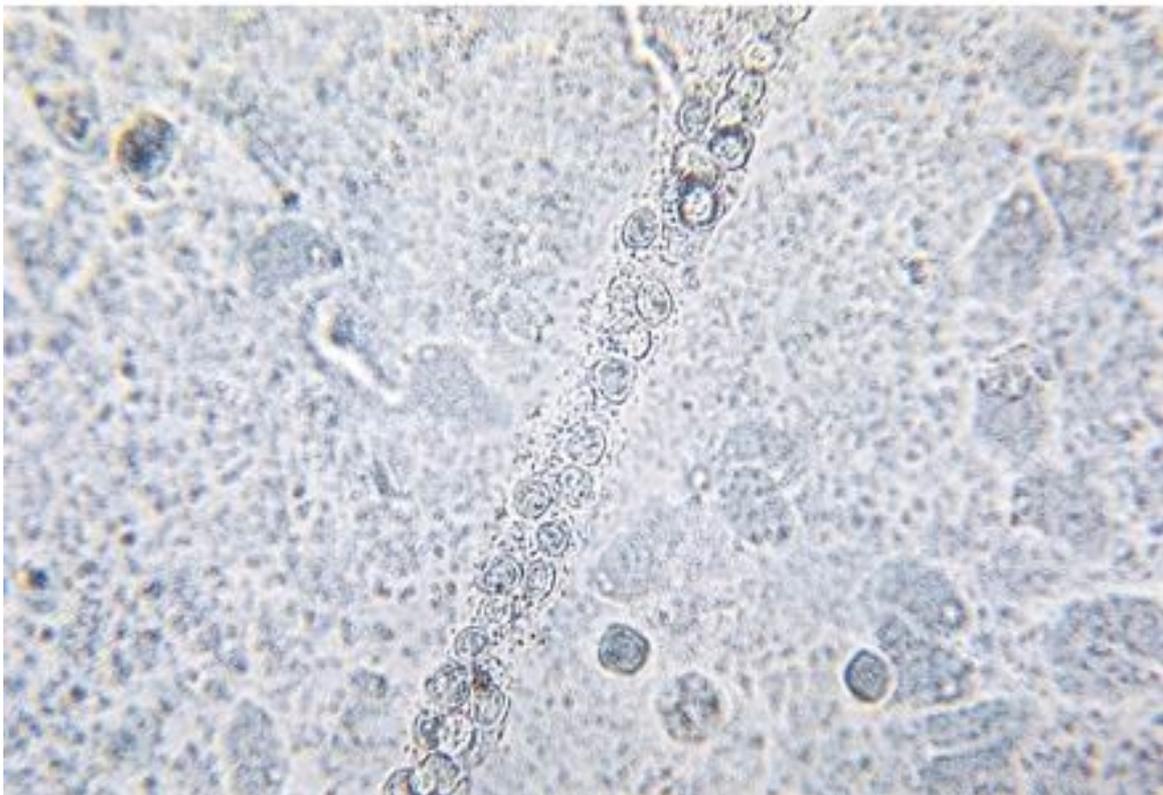


Photo n° 214 - *Acanthamoeba* - Tapis de très nombreuses formes végétatives et kystes. Culture sur Agar. Obj. X 40.

- Lecture

La lecture se fait à l'état frais, immédiatement après l'ensemencement. Les flacons sont regardés immédiatement au microscope inversé ; puis la lecture des cultures est ensuite faite tous les jours pendant 15 jours au microscope inversé avant de conclure à un résultat négatif (photos n^{os} 209 ; 210 ; 211 ; 212 ; 213 ; 214 ; 215).

Si l'on observe la présence de champignons ou de levures dans les petits flacons dès l'examen direct, ajouter au flacon 12 µl de solution à 1 mg/ml d'Amphotéricine B pour 5 ml de solution dans le petit flacon. (ne pas en ajouter davantage, l'Amphotéricine B risque d'empêcher le développement des amibes).

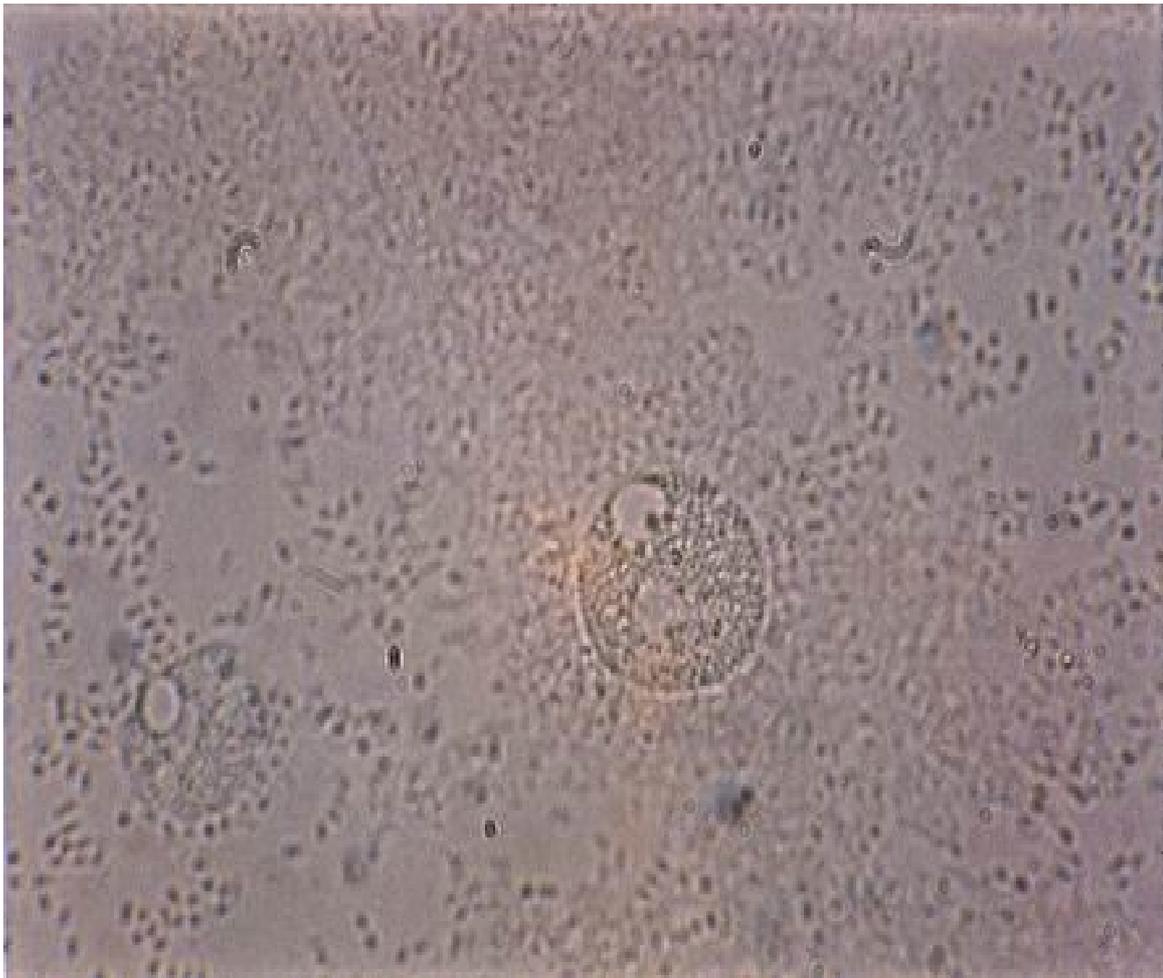


Photo n° 215

Acanthamoeba. Deux formes végétatives. Examen à l'état frais d'une culture sur Agar faite en présence d'*Escherichia coli*. Obj. X 100.

*** Biopsie**

Un morceau de la biopsie (comportant du stroma) est mis en culture dans un petit flacon pour culture cellulaire (cf. précéd.), l'examen direct est possible immédiatement (photo n° 218) ; l'autre partie de la biopsie est fixée et incluse en paraffine. Sur les coupes, des colorations à l'hématoxyline éosine, de Wright, de May-Grünwald-Giemsa modifié, au trichrome, au PAS, peuvent être effectuées (Gomori-Grocott pour les kystes).

L'examen des tissus montre un amincissement de la cornée avec une déplétion du stroma en kératocytes et très souvent une diminution du collagène. La présence d'un infiltrat leucocytaire est commune, plus souvent dans le stroma antérieur, il s'agit de polynucléaires neutrophiles et de macrophages. On observe la présence de kystes au niveau du stroma mais ils sont rares au niveau de l'épithélium (photos n°s 216 ; 217). L'étude histologique de 10 cornées de patients ayant subi une kératoplastie postinfection à *Acanthamoeba* par Kremer et coll. (183) a montré une inflammation discrète à modérée, localisée préférentiellement dans la partie antérieure du stroma et l'absence de néovascularisation. Mietz et coll (192) observent chez un patient après une infection de 6 mois, une réaction granulomateuse avec des cellules macrophagiques géantes, certaines ayant phagocyté des kystes, au niveau postérieur du stroma et le long de la membrane de Descemet. La réaction inflammatoire était aiguë et une nécrose stromale observée.

L'examen histologique d'une biopsie cornéenne effectuée à l'Hôpital des Quinze-Vingts chez un patient pépiniériste ayant reçu une branche d'arbre dans l'oeil a montré à l'état frais sous microscope inversé la présence de nombreux kystes d'*Acanthamoeba* au niveau du stroma (photo n° 218) alors que le grattage cornéen n'avait montré qu'une image douteuse de 1 ou 2 kystes très altérés. La coloration à l'hématoxyline éosine a confirmé la présence de nombreux kystes au niveau du stroma et l'absence de réaction inflammatoire notable et de néo-vaisseaux sur la biopsie (photo n° 216).

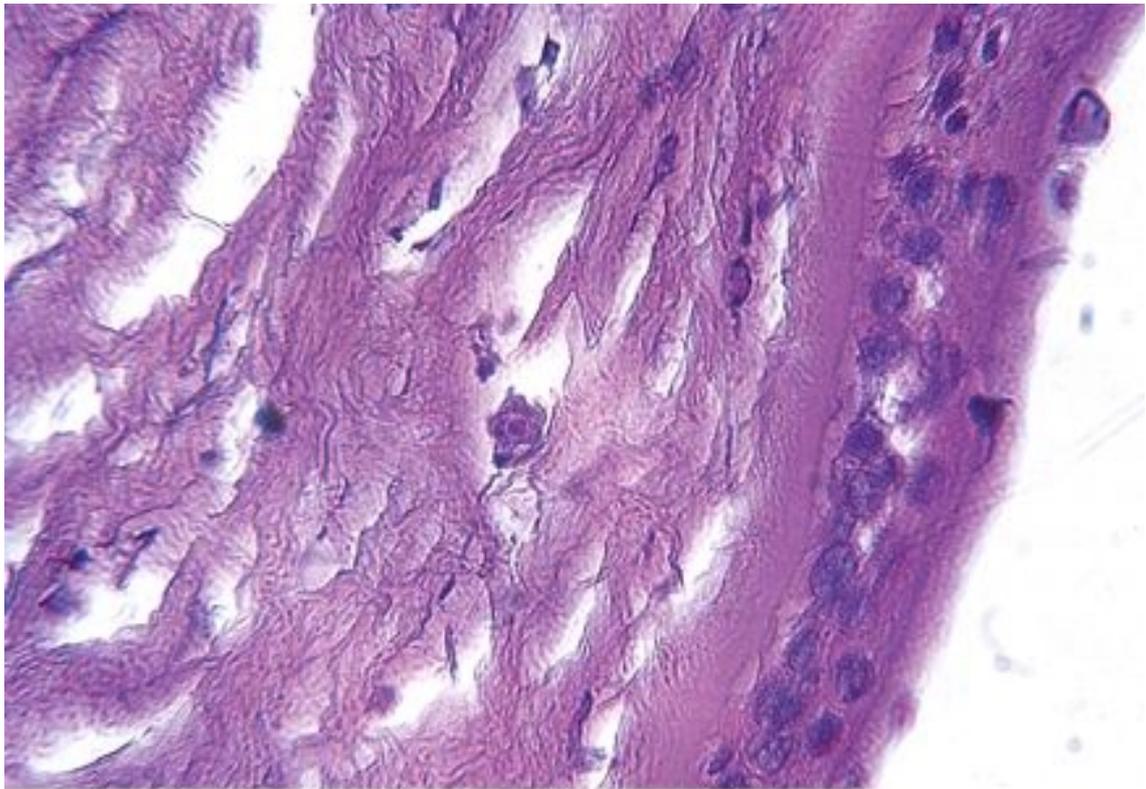


Photo n° 216

Acanthamoeba. Kyste. Biopsie de cornée. Coloration hématoxyline éosine. Obj. X 40.

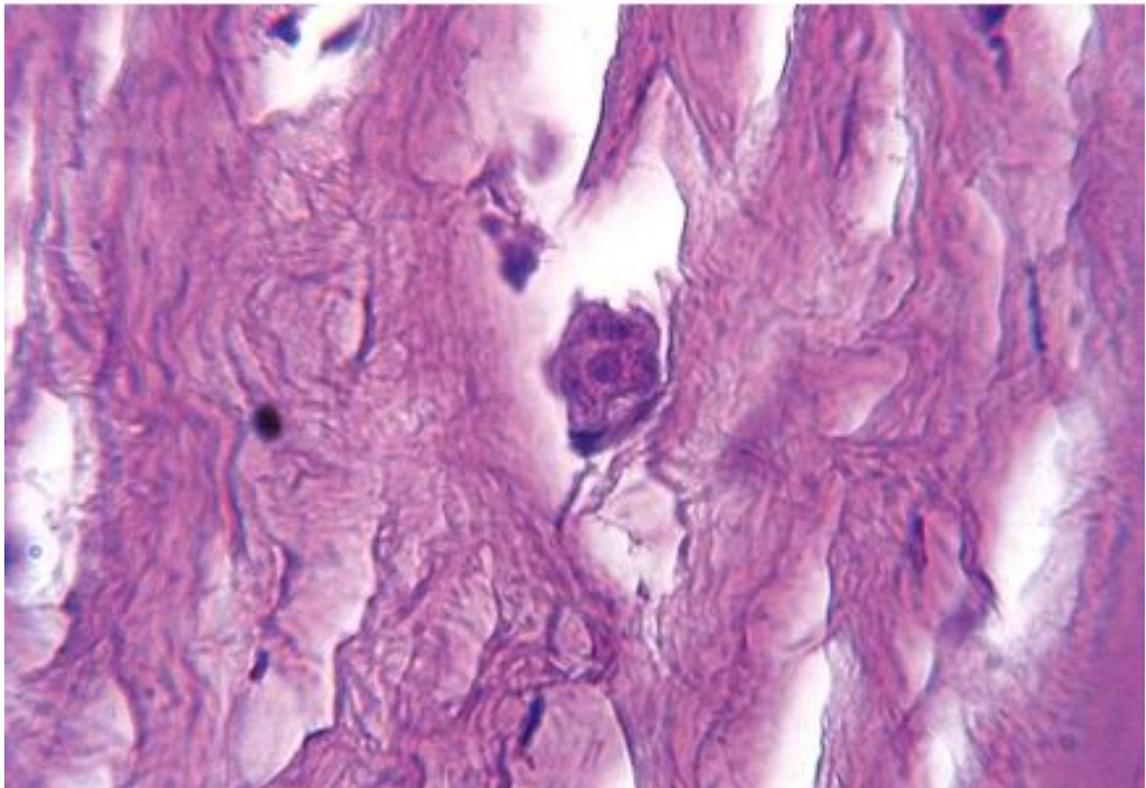


Photo n° 217

Même lésion que la photo précédente vue à un plus fort grossissement. *Acanthamoeba*. Kyste. Biopsie de cornée. Coloration hématoxyline éosine. Obi. X 100.

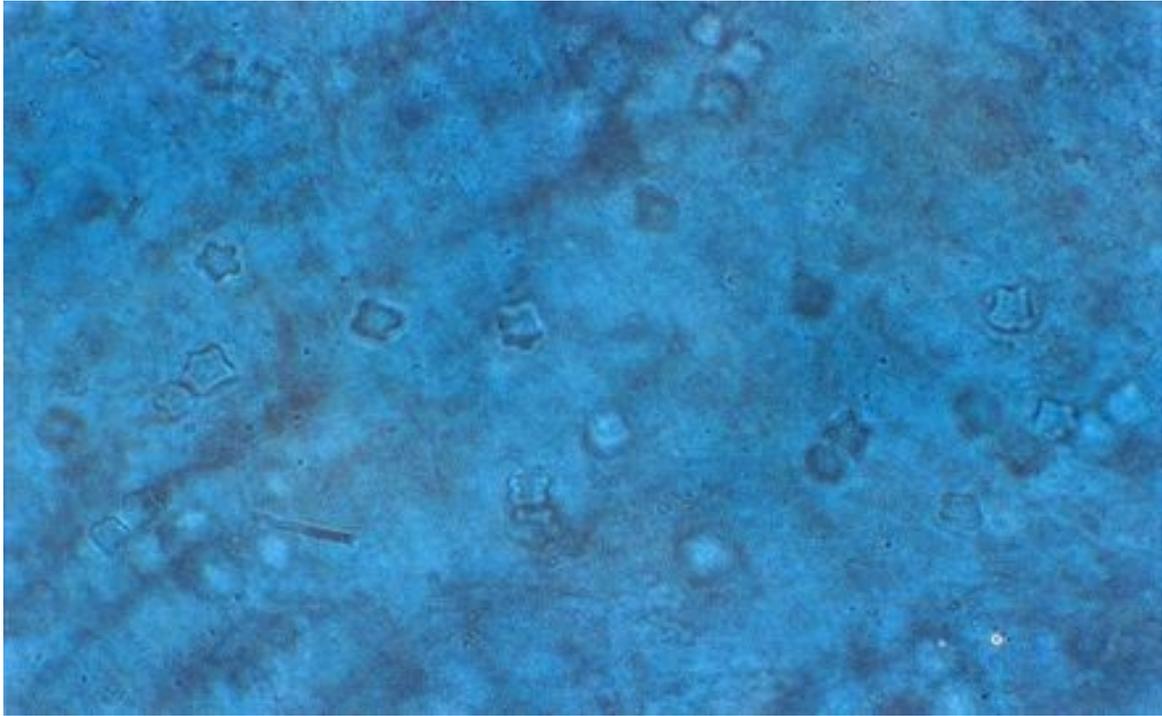


Photo n° 218

Acanthamoeba. Présence de très nombreux kystes. Examen à l'état frais d'une biopsie de cornée. Obj. X 25.

TRAITEMENT ET SURVEILLANCE

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Lorsque le traitement est précoce et les lésions peu profondes le pronostic est bon, mais lorsque les lésions sont profondes, il est long et difficile. Si les lésions sont invalidantes, une kératoplastie peut être nécessaire.

Les médicaments utilisés sont divers et les protocoles thérapeutiques en associent plusieurs.

Des antibiotiques ont une activité amoebicide : la Colimycine, la Norfloxacin, la Rifamycine se sont montrées actives à des degrés variables in vitro (170) ; le Miconazole, le Clotrimazole, le Kétoconazole, l'Itraconazole sont également actifs (162).

Des antiseptiques :

- de la famille des diamidines, agiraient en perturbant, par leur structure cationique bipolaire, la perméabilité de la membrane cellulaire (199) ; ils pourraient intervenir sur la synthèse du DNA (177). L'Hexamidine (Désoméline®), l'iséthionate de propamidine et la dibrorriopropamidine (Brolène(w)), sont actifs à des degrés variables.

Les diamidines sont constituées de deux noyaux benzéniques, portant des fonctions amides, reliés par une chaîne alkyl plus ou moins longue (- CH₂)_n : la pénétration dans l'amibe augmenterait avec la longueur de la chaîne et donc avec le caractère lipophile des molécules (199) ; l'Hexamidine (Desoméline®) (n = 6), pénétrerait donc mieux que la Propamidine (Brolène®) (n = 3).

- Parmi les antiseptiques de la famille des biguanides, le P.H.M.B. (Polyhexaméthylène biguanide) à 0,02 % actuellement à l'essai, donne de bons résultats (186 ; 211). La chlorhexidine à 0,02 %, autre biguanide est également active (177 ; 202 ; 210). Ils agiraient sur la structure membranaire (177).

Les souches peuvent avoir une sensibilité variable aux différentes molécules utilisées, notamment au Brolène® et des résistances peuvent se développer en cours de traitement ; il peut être nécessaire de tester la sensibilité de la souche isolée lors d'une infection profonde et/ou récidivante.

Le traitement est poursuivi pendant 4 à 6 semaines, quelquefois plus, jusqu'à disparition des symptômes. La persistance d'un infiltrat stromal granuleux sans symptôme ne justifie pas la poursuite du traitement. Des prélèvements effectués à ce stade ont montré que les kystes présents ne pouvaient pas cultiver (168).

Lorsque le diagnostic est tardif et les lésions importantes, la greffe est bien souvent nécessaire, le traitement médicamenteux permet d'éviter les rechutes.

En cas d'infection disséminée, l'association Pentamidine Itraconazole par voie générale a montré une efficacité en l'absence de localisation cérébrale (207).

PRÉVENTION

Il est très difficile d'éviter toute contamination des lentilles lors des manipulations ou du port, ou des produits d'entretien une fois que les flacons sont ouverts.

La prévention consiste à proscrire :

- la préparation à la maison des solutions de rinçage ;
- le rinçage des lentilles à l'eau du robinet ;
- l'humidification des lentilles avec la salive ;
- les baignades avec les lentilles.

La projection dans l'œil d'une eau pouvant être contaminée devra entraîner une désinfection des lentilles.

De plus :

- les produits d'entretien utilisés doivent être amoebicides ;
- les solutions salines de rinçage doivent être utilisées sous forme d'uni-doses ;
- la désinfection des boîtiers doit être fréquente et rigoureuse.

Ces précautions assez simples devraient permettre d'éviter ces infections. Il faut indiquer aux porteurs de lentilles les risques encourus et les précautions à prendre.

BIBLIOGRAPHIE

OUVRAGES DE BASE

1. ALBERT B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D., Biologie moléculaire de la cellule, Flammarion Médecine Sciences, 1986.
2. ASH L.R., ORIHEL T.C., Parasites: a guide to laboratory procedures, Am. Soc. Clin. Path. Press, Chicago, 1987.
3. ASH L.R., ORIHEL T.C., Atlas of human parasitology, Am. Soc. Clin. Path. Press, Chicago, 4e édition, 1997.
4. BAILENGER J., Coprologie parasitaire et fonctionnelle. Drouillard, Éditeurs, Bordeaux, 1973.
5. BRUMPT E., Précis de parasitologie, Masson et Cie, Éditeurs, 1949.
6. BURROWS R.B., Microscopic diagnosis of the parasites of man, Yale University Press, New Haven and London, 1965.
7. CLARK G., Staining procedures, Williams & Wilkins, Éditeurs, Baltimore - Londres, 1981.
8. CONN'S H.J., Biological stains, Williams & Wilkins, Éditeurs, Baltimore - Londres, 1977.
9. COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MÉDICAL SCIENCES AND WORLD HEALTH ORGANIZATION, International nomenclature of diseases. Volume II. Infectious diseases. Part 4 : Parasitic Diseases. Genève 1987.
10. DESCHIENS R., L'amibiase et l'amibe dysentérique, Masson et Cie, Éditeurs, Paris 1965.
11. DOBELL C., The amoebae living in man, Medical Research Committee by John Bale, Sons & Danielsson, London 1919.
12. GOIFFON R., Manuel de Coprologie clinique, Masson et Cie, Éditeurs, Paris, 1949.
13. GUIART J., Précis de parasitologie, Flammarion, Paris 1910.

14. GURR GEORGE T., Biological Staining Methods. Georges T. Gurr Ltd, London, 7th edition, 1963.
15. HO THI SANG, Cours de coprologie parasitaire microscopique, Faculté de Médecine, Paris, 1980.
16. LAMY L.H., Protozoaires et helminthes parasites. Recherche et identification au laboratoire, Maloine S.A. Éditeurs, Paris 1980.
17. LANGERON M., Précis de microscopie, Technique - Expérimentation - Diagnostic, Masson et Cie, Paris 1942.
18. LANGERON M., RONDEAU DU NOYER M., Coprologie microscopique, Masson et Cie, Paris 1926.
19. MELVIN D.M., BROOKE M.M., Laboratory procedures for the diagnosis of intestinal parasites, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, Reprinted 1980.
20. LOCQUIN M., LANGERON M., Manuel de microscopie, Masson et Cie, Éditeurs, Paris, 1978.
21. MALLORY F.B., Pathological technique, W.B. Saunders Philadelphia, Hafner New York 1938 Reprinted 1961.
22. PETITHORY J.C., ARDOIN-GUIDON F., Vrais et faux parasites en coprologie microscopique, Bioforma, Paris 1995.
23. ROSSEL J.M., CAMBIES J., Coprologie clinique. Exploration - Sémiologie et diagnostic coprologique, Vigot Frères, Paris 1927.
24. ROUSSET J.J., Copro-parasitologie pratique : intérêt et méthodologie : notion sur les parasites du tube digestif, Estem, Paris 1993.
25. SEPULVEDA B., DIAMOND L.S., Amibiasis, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexique 1976.
26. SPENCER F.M., MONROE L.S., The color atlas of intestinal parasites, Thomas C., Springfield U.S.A., 1966.

PUBLICATIONS PÉRIODIQUES

TECHNIQUES DE COLORATION

27. ANTONI J.S., Standardization of the iodine stain for wet preparations of intestinal protozoa, Am. J. Trop. Med., 1937, 17: 79-84

28. BROOKE M.M., GOLDMAN M., Polyvinyl alcohol-fixative as a preservative and adhesive for protozoa in dysenteric stools and other liquid materials, *J. Lab. Clin. Med.*, 1949, 34 : 1554-1560.
29. BURROWS R.B., A new fixative and technic for the diagnosis of intestinal parasites, *Am. J. Clin. Path.*, 1967, 48 : 342-346.
30. CAPET R.G., GOIGOU P., La coloration des amibes par l'hématoxyline rapide après fixation au dioxane, *Ann. Biol. Clin.*, 1969, 27: 247-251.
31. GARCIA L.S., SHIMIZU R.Y., BREWER T.C., BRUCKNER D.A., Evaluation of intestinal parasite morphology in polyvinyl alcohol preservative : comparison of copper sulfate and mercuric chloride bases for use in Schaudinn fixative, *J. Clin. Microbiol.*, 1983, 17: 1092-1095.
32. GARCIA L.S., SHIMIZU R.Y., SHUM A., BRUCKNER D.A., Evaluation of intestinal protozoan morphology in polyvinyl alcohol preservative : comparison of zinc sulfate- and mercuric chloride-based for use in Schaudinn's fixative, *J. Clin. Microbiol.*, 1993, 31 : 307-310.
33. GLEASON N. N., HEALY G.R., Modification and evaluation of Kohn's one-step staining technic for intestinal protozoa in feces or tissue, *Am. J. Clin. Pathol.*, 1965, 43 494-496.
34. GOLDMAN M., Use of polyvinyl alcohol to preserve fecal smears for subsequent staining, *Science*, 1947, 106 : 42.
35. GOLDMAN M., BROOKE M.M., Protozoans in stools unpreserved and preserved in PVA-fixative, *Publ. Hlth Rep.*, 1953, 68: 703-706.
36. GOMORI G., A rapid one-step trichrome stain, *Am. J. Clin. Path.*, 1950, 20: 661-664.
37. JUNOD Ch., Technique coprologique nouvelle essentiellement destinée à la concentration des trophozoïtes d'amibes, *Bull. Soc. Pathol. Exo.*, 1972, 65 : 390-398.
38. KOHN J., A one stage permanent staining method for faecal protozoa, *Med. Quart. Israel.*, 1960, 19 : 160-161.
39. LAMY L., LAMY H., CRIGNON I., THIEBAULT M., La technique de Kohn au chlorazol pour la coloration des protozoaires, *Bull. Soc. Pathol. Exo.*, 1966, 59 : 70-73.
40. NICOLLE M., Pratique des colorations microbiennes (Méthode de Gram modifiée et méthode directe), *Ann. Inst. Pasteur*, 1895, IX : 664-670.

41. PETITHORY J.C., ARDOIN F., JUNOD C., Fixation et coloration permanente des amibes par l'APV-trichrome, Rev. Fran. Lab., 1990, 206 : 63-71.
42. SAPERO J.J., LAWLESS D.K., STROME C.P.A., An improved iodine-staining technique for routine laboratory diagnosis of intestinal protozoa, Science, 1951, 114 550-551.
43. SAPERO J.J., LAWLESS D.K., The « MIF » stain-preservation technic for the identification of intestinal protozoa, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1953, 2 : 613-619.
44. SARGEAUNT P., ROBINSON G.L., Confirmation of amoebic cyst chromatoids by wet stain after Ridley's faecal concentration, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1962, 56 : 12 S.
45. YANG J. SCHOLTEN T., A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures, Am. J. Clin. Pathol., 1977, 67: 300-305.
46. WHEATLEY W.B., A rapid staining procedure for intestinal amoebae and flagellates, Am. J. Clin. Path., 1951, 21 : 990-991.
47. WHO MEETING, Amoebiasis and its control, Bull. World Health Organization, 1985, 63 : 417-426.

DIVISION DES FORMES VÉGÉTATIVES D'ENTAMIBES

48. ALBACH R.A., BOODEN T., BOONLAYANGOOR P., DOWNING S., Concepts of function of peripheral non-chromatin and endosome in *Entamoeba histolytica*, Arch. Invest. Méd., 1980, suppl. 1, 63 : 63-74.
49. ARGÜELLO C., VALENZUELA B., RANGEL E., Structural Organization of chromatin during the cell cycle of *Entamoeba histolytica* trophozoites, Arch. Med. Research., 1992, 23 : 77-80.
50. BRUG S.L., The nuclear division of *Dientamoeba fragilis*, Am. Trop. Med. Parasitol., 1936,30: 283-285.
51. CHIA-TUNG PAN, GEIMAN Q.M., Comparative studies of intestinal amebae, I. Distributions and cyclic changes of the nucleic acids in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*, Am. J. Hyg. 1955, 62: 66-79.
52. GICQUAUD C.R., Étude de l'ultrastructure du noyau et de la mitose d'*Entamoeba histolytica*, Biol. Cellulaire 1979, 35 : 305-312.

53. KOFOID C. A., SWEZY O., On the number of chromosomes and the type of mitosis in *Entamoeba dysenteriae*, Uni. Cal. Publ. Zoo., 1925, 26: 331-352.
54. LAMY L., Présentation de documents photographiques et films relatifs à des trophozoïtes multinucléées d'*Entamoeba histolytica* in vitro, interprétation et discussion, Bull. Soc. Pathol. Exo., 1969, 62: 108-112.
55. OROZCO E., SOLIS F.J., DOMINGUEZ J., CHAVEZ B., HERNANDEZ F., *Entamoeba histolytica* : Cell cycle and nuclear division, Experimental Parasitology, 1988, 67: 85-95.
56. SHAFFER J.G., A study of the occurrence of multi-nucleate trophozoites of three strains of *Entamoeba histolytica* in the Shaffer-Frye and CLG media, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1965, 14: 207-210.
57. URIBE C., Nuclear division in the trophozoites of *Entamoeba histolytica*, Zoology, 1926, 12: 305-311.

AMIBES

58. ANDREWS J., The Diagnosis of intestinal protozoa from purged and normally passed stools, J. Parasitol., 1934, XX : 1-2.
59. BELTRAN E., Supernucleate cysts of *Endamoeba coli* and *E. histolytica*, Trans. Am. Micros. Soc., 1945, 64: 283-285.
60. BOECK W.C., On the longevity of human intestinal protozoan cysts, Am. J. Hyg., 1921, 1 : 527-540.
61. BOECK W.C., The thermal-death point of the human intestinal protozoan cysts, Am. J. Hyg., 1921,1: 365-387.
62. BROWN P.W., Results and dangers in the treatment of amebiasis, Jour. A.M.A., 1935, 17: 1319-1325.
63. BRUMPT E., L'étuve a microscope de N. Foot, Ann. Parasitol. Hum. Comp., 1925, 3 : 252-254.
64. DALCHE P., Toxicité de l'émétine, Bull. Soc. Thérap., 1920: 542-545.
65. DANCIGER M., LOPEZ M., Number of *Giardia* in the feces of infected children, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1974, 24: 237-242.

66. DOBELL C., O'CONNOR F.W., The intestinal protozoa of Man, Med. Research Council, 1920: 1-39.
67. HEALY G.R., Laboratory diagnosis of amebiasis, Bull. N.Y. Acad. Med., 1971, 47: 478-493.
68. HEGNER R.W., Frog and toad tadpoles as sources of intestinal protozoa for teaching purposes, Science, 1922, 56 : 439-441.
69. HIATT R.A., MARKELL E.K., NG E., How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa ?
Am. J. Trop. MED. Hyg., 1995, 53: 36-39.
70. LABORATOIRE CLIN, Emétine. Ann. Lab. Clin, 1921, 3 : 99-109.
71. LAVIER G., Action, sur la biologie d'une Entamibe, du parasitisme intra-nucléaire par une Nucleophaga, C.R. Séances Soc. Biol., 1935, 118 : 457-458.
72. ROUSSET J.J., GAUDEBOUT C., ROUSSET-THEVENOUX A.M., BINELLI-VILAPLANA M., Interrelations épidémiologiques entre protozoaires intestinaux à contagement direct. Analyse statistique de 9 471 examens et comparaison avec la littérature, Bull. Soc. Path. Exot., 1994, 87: 112-116.
73. SAUTET J., Formation des kystes bleus de *Giardia intestinalis*, Annal. Para., 1929, VII: 193-195.
74. THOMSON R.B., HAAS R.A., THOMPSON J.H., Laboratory medicine. Intestinal Parasites : The necessity of examining multiple stool specimens, Mayo. Clin. Proc., 1984, 59 : 641-642.
75. TSUCHIYA H., A study on variabilities in dimensions and numbers of discharged cysts of *Giardia lamblia* (Stiles, 1915) from day to day under normal conditions, Am. J. Hyg., 1931, 13 : 544-567.
76. WALSH J.A., Problems in recognition and diagnosis of amebiasis : Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality, Rev. Infect. Diseases, 1986, 8 : 228-238.

ENTAMOEBIA HISTOLYTICA

77. BEAVER P.C., DESCHAMPS G., The viability of *E. histolytica* cysts in soil, Am. J. Trop. Med., 1949, 29: 189.

78. GLEASON N.N., GOLDMAN M., CARVER R., Size and nuclear morphology of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba hartmanni* trophozoites in culture and in man, Am. J. Hyg., 1963, 77: 1-14.
79. MORICHAU-BEAUCHANT J., Les causes d'insuccès et d'erreurs dans la recherche des amibes et kystes dysentériques, Presse Méd., 1953, 37 : 769-770.
80. SILARD R., PANAITESCU D., Etude in vitro des relations entre *Entamoeba histolytica* et *Candida albicans*, I. Aspects de la phagocytose de *C. albicans* par *E. histolytica*, Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 1973, 32: 211-218.
81. SIMITCH T., PETROVITCH Z., CHIBALITCH D., La vitalité des kystes d'*Entamoeba dysenteriae* en dehors de l'organisme de l'hôte, Arch. Inst. Pasteur d'Algérie, 1954, 32: 223-231.

ENTAMOEBA DISPAR

82. BRUMPT E., Étude sommaire de l'«*Entamoeba dispar*» n. sp. Amibe à kystes quadri-nucléés, parasite de l'homme, Bull. Acad. Méd., 1925, 94: 943-952.
83. BRUMPT E., Individualité de l'*Entamoeba dispar*, présentation de pièces, Bull. Soc. Pathol. Exo., 1926, 19 : 399-404.
84. BRUMPT L.C., HO THI SANG,, Données relatives à l'épidémiologie de l'amibiase, Bull. Soc. Pathol. Exo., 1961, 54: 466-481.
85. CHARMOT G., Traitement actuel de l'amibiase, Presse Med., 1970, 78: 2193.
86. CLARK C.G., DIAMOND L.S., Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* from other intestinal protozoa by riboprinting, Arch. Med. Res., 1992, 23: 15-16.
87. DIAMOND L.S., CLARK C.G., A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925, J. Eukaryot Microbiol, 1993, 40 : 340-344.
- 87 bis. GONZALEZ-RUIZ A., WRIGHT S. G., Disparate amoebae, Lancet, 1998, 351: 1672-1673.
88. HAOUE R., KRESS K.D., LYERLY D., WILKINS T., PETRI W.A., Monoclonal antibody-based ELISA to detect *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in stool, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1993, suppl. 49: 393-394.

89. JACKSON T.G., GATHIRAM V., SIMJEE A.E., Seroepidemiological study of antibody responses to the zymodemes of *Entamoeba histolytica*, Lancet, 1985, i : 716-718.
90. JACKSON T.F., GATHIRAM V., SUPARSAD S., ANDERSON C.A., Stability of the zymodemes of *Entamoeba histolytica* in culture, Arch. Med. Res., 1992, 23 : 71.
91. MARTINEZ-PALOMO A., ESPINOSA-CANTELLANO M., Amoebiasis : New understanding and new goals, Parasitology Today, 1998, 14 : 1-3.
92. NANDA R., BAVEJA U., ANAND B.S., *Entamoeba histolytica* cyst passers : clinical features and outcome in untreated subjects, Lancet, 1984, II: 301-303.
93. PAUGAM A., TOURTE-SCHAEFER C., DUPOUY-CAMET J., *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba dispar* : deux amibes microscopiquement identiques mais une seule espèce pathogène, Sem. Hôp. Paris, 1998, 5-6: 177-181.
94. PETITHORY J.C., BRUMPT L.C., POUJADE F., *Entamoeba histolytica* (Schaudinn 1903) et *Entamoeba dispar* E. Brumpt 1925 sont deux espèces différentes, Bull. Soc. Path. Exot., 1994, 87 : 231-237.
95. PETITHORY J.C., ARDOIN F.G., SARGEAUNT P.G., BRUMPT L.C., Experimental studies on the kitten showing the difference of pathogenicity between *Entamoeba dispar* and *Entamoeba histolytica* by E. Brumpt, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1995, 53 : 168-169.
96. PETRI W.A., CLARK C.G., BRAGA L.L., MANN B.J., International seminar on Amebiasis, Parasitology Today, 1993, 9 : 73-76.
97. PETRI W.A., JACKSON T.F., GATHIRAM V., KRESS K., SAFFER L.D., SNODGRASS T.L., CHAPMAN M.D., KEREN Z., MIRELMAN D., Pathogenic and non-pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin, Infect. Immun., 1990, 58 : 1802-1806.
98. ROBINSON G.L., The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1968, 62: 285-294.
99. SARGEAUNT P.G., WILLIAMS J.E., Electrophoretic isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1978, 72: 164-166.
100. SARGEAUNT P.G., Identification of stocks of non-pathogenic « *Entamoeba histolytica* », Bull. Soc. Path. Exo., 1983, 76 : 588-591.

101. SARGEAUNT P.G., The epidemiological aspects of *Entamoeba histolytica* zymodemes, Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol., 1990, 12: 1-4.
- 101 bis. SARGEAUNT P.G., A survey of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* (Brumpt) infections on Mahé, The Seychelles, Arch. Med. Res., 1992, 23 : 265-267.
102. SARGEAUNT P.G., JACKSON T.F., SIMJEE A., Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates, especially those from liver abscess, Lancet, 1982, I 1386-1388.
103. SARGEAUNT P.G., WILLIAMS J.E., The differentiation in invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1978, 72: 519-521.
104. SARGEAUNT P.G., WILLIAMS J.E., Electrophoretic isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1978, 72: 164-166.
105. SARGEAUNT P.G., WILLIAMS J.E., BHOJNANI R., CAMPOS J.E., GOMEZ A., The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in a rural and an urban area of Mexico. A pilot survey II, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1982, 76: 208-210.
106. STRACHAN W.D., CHIODINI P.L., SPICE W.M., MOODY A., ACKERS J.P., Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*, Lancet, 1988, I : 561-562.
107. TANNICH E., HORSTMANN R.D., KNOBLOCH J., HENNING A.H., Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 5118-5122.
108. VOHRA H., BHATTI H.S., GANGULY N.K., MAHAJAN R.C., Virulence of pathogenic and non-pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* (Indian strains) in guinea pigs, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1989, 83 : 648-650.
109. WALSH J.A., Problems in recognition and diagnosis of amebiasis : estimation of the global magnitude of morbidity and mortality, Rev. Infect. Dis., 1986, 8 : 228-238.
110. WEBER G., MOHR W., FLEISCHER K., SARGEAUNT P.G., *Entamoeba histolytica* infections in flight personnel of an international airline, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1990, 84: 803-805.

ENTAMOEBA MOSHKOVSKII

111. CLARK C.G., DIAMOND L.S., The Laredo strain and other « *Entamoeba histolytica-like* » amoeba are *Entamoeba moshkovskii*, Molec. Bioch. Parasitol., 1991, 46 11-18.
112. DE CARNERI I., *Entamoeba moshkovskii-like* Amoebae in Milan; some considerations of status, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1963, 57: 148.
113. DIAMOND L.S., BARTGIS L.I., *Entamoeba moshkovskii* : Axenic cultivation, Exper. Parasitol., 1970, 28 : 171-175.
114. GOLDMAN M., *Entamoeba histolytica-like* Amoebae occurring in man, Bull. Org. Mond. Santé, 1969, 40: 355-364.
115. MEEROVITCH E., Some biological studies on the Laredo strain of *Entamoeba histolytica*, Excerpta Medica. International Congress Series, 1965, 1 : 194.
116. NEAL R.A., A species of *Entamoeba* from sewage, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1950,44: 9.
117. RICHARDS C.S., GOLDMAN M., CANNON L.T., Cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba histolytica-like* strains at reduced temperature and behavior of the Amebae in diluted media, Am. J. Top. Med. Hyg., 1966, 15: 648-655.
118. SARGEAUNT P.G., WILLIAMS J.E., A comparative study of *Entamoeba histolytica* (NIH : 200, HK9, etc.), « *E. histolytica-like* » and other morphologically identical amoebae using isoenzyme electrophoresis, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1980, 74: 469-474.
119. SCAGLIA M., GATTI S., STROSSELLI M., GRAZIOLI V., VILLA M.R., *Entamoeba moshkovskii* (Tshalaia, 1941) : Morpho-biological characterization of new strains isolated from the environment, and a review of the literature, Ann. Parasitol. Hum. Comp., 1983,58: 413-422.
120. ZSHALAIA L.E., On a species *Entamoeba* detected in sewage effluents, Med. Parazit. Moscou, 1941, 10 : 244-252.

ENTAMOEBA HARTMANNI

121. BURROWS R.B., Morphological differentiation of *Entamoeba hartmanni* and *E. polecki* from *E. histolytica*, Am. J. Top. Med. Hyg., 1959, 8 : 583-589.

122. BURROWS R.B., Identification of *Entamoeba hartmanni* from nuclear structure, Am. J. Hyg., 1964, 79: 29-36.

123. SIMIC T., Infection expérimentale de l'homme et du chien par *l'Entamoeba hartmanni* Prowazek 1912, Ann. Parasitol., 1935, XIII : 234-237.

ENTAMOEBA COLI

124. BACIGALUPO J., *Entamoeba coli* parasitada con Sphaerita, Rev. Soc. Argentina Biol., 1927, 3 : 694-698.

125. DOBELL C., Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man, IX. The life-history of *Entamoeba coli*, with special reference to metacystic development, Parasitol, 1938, 30: 195-238.

126. TYZZER E.E., GEIMAN Q.M., The ingestion of red blood cells by *Entamoeba coli* and its significance in diagnosis, Am. J. Hyg., 1938, 28 : 271-287.

ENTAMOEBA POLECKI

127. ARMSTRONG D.E., Occurrence of *Entamoeba polecki* in school children in Taiwan, J. Parasitol., 1966, 52: 700.

128. BURROWS R.B., KLINK G.E., *Entamoeba polecki* infections in man, Am. J. Hyg., 1955, 62: 156-167.

129. CHACHIN-BONILLA L., *Entamoeba polecki* infection in Venezuela. Report of a new case, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 1983, 77: 137.

130. CHAKER E., KREMER M., KIEN T., Quatorze cas d'*Entamoeba polecki* chez des réfugiés du sud-est asiatique : remarques sur l'aspect morphologique du parasite, Bull. Soc. Path. Exot., 1982, 75 : 484-490.

131. DESOWITZ R.S., BARNISH G., *Entamoeba polecki* and other intestinal protozoa in Papua New Guinea highland children, Ann. Trop. Med. Parasitol., 1986, 80 399-402.

132. KESSEL J.F., JOHNSTONE H.G., The occurrence of *Entamoeba polecki*, Prowazek 1912, in *Macaca mulatta* and in man, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1949, 29: 311-317.

133. LAWLESS D.K., Report on a human case of *Entamoeba polecki* Prowazek, 1912, J. Parasitol., 1954, 40: 221-228.
134. LAWLESS D.K., KNIGHT V., Human infection with *Entamoeba polecki* : report of four cases, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1966, 15: 701-704.
135. LUBINSKY G., The occurrence in Pakistan of a human *Entamoeba* of the *polecki* type, Parasitology, 1950, 42 : 48-51.
136. MASURE O., BOLES J.M., BAYON A.M., LEUZINGER D., BERGERET G., Infestation à *Entamoeba polecki* chez l'homme, Revue de la littérature. À propos d'une observation brestoise, Bull. Soc. Patho. Exot., 1980, 73 : 451-457.

AMIBES DE TYPE LIMAX

137. BRUG S.L., Nucleophage intestinalis n. sp., parasite der Kern van *Endolimax williamsi* (Prow.) (= *Iodamoeba butschlii* (Prow.)), Overgedrukt uit de Mededeelingen Van Den Dienst der Volksgezondheid, Nederlandsch-Indië, 1926, 4 : 520-522.
138. BRUMPT E., LAVIER G., Sur une nucléophaga parasite *d'Endolimax nana*, Ann. Parasit. Hum. Comp., 1935, 13 : 439-444.
139. WENRICH D.H., Studies on *Iodamoeba butschlii* (protozoa) with special reference to nuclear structure, Proc. Am. Philo. Soc., 1937, 77 : 183-209.
140. YARINSKY A., BURROWS R.B., Atypical nuclei of *Endolimax nana* in purged stool specimens, Am. J. Clin. Pathol., 1966, 46: 490-495.

FLAGELLÉS

141. CAVIER R., Les flagellés intestinaux. Leur rôle pathogène diagnostic et traitement des parasitoses qu'ils déterminent, R.I.C.M., 1967, 3 : 23-34.
142. DOBELL C., O'CONNOR F.W., The intestinal protozoa of man, Med. Research Council, 1909: 57-88.
143. HOGUE M.J., A new variety of *Retortamonas (Embadomonas) intestinalis* from man, Am. J. Hyg., 1933, XVIII : 433-441.
144. KOFOID C.A., SWZEY O., On the morphology and mitosis of *Chilomastix mesnili* (Wenyon). A common flagellate of the human intestine,.

Univ. Calif. Publ. Zool., 1920, 20: 117-145.

145. LOPEZ-NEYRA C.R., SUÁREZ PEREGRIN, Estudios sobre et « *Enteromonas hominis* », parâsito intestinal humano, Publication Officiel de la C.P.I. S. (Madrid), 1934, 18: 1-30.

146. PAULSON M., ANDREWS J., The incidence of human intestinal protozoa in duodenal aspirates, J. Am. Med. Ass., 1930, 28 : 2063-2065.

147. ROMAN E., BRUN J., MASSON R., Sur quelques cas de parasitisme intestinal dus à un protozoaire peu fréquent « *Chilomastix mesnili* », Lyon Médical, 1940, 7 : 1-4.

148. SAUTET J., Formation des kystes bleus de *Giardia intestinalis*, Ann. Parasitol., 1929, 7 : 193-195.

DIENTAMOEBA FRAGILIS

149. BRUG S.L., The nuclear division of *Dientamoeba fragilis*, Ann. Trop. Med. Parasitol., 1936, 30 : 283-285.

150. BURROWS R.B., SWERDLOW M.A., *Enterobius vermicularis* as a probable vector of *Dientamoeba fragilis*, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1956, 5 : 258-265.

151. CAMP R.R., MATTERN C.F.T., HONIGBERG B.M., Study of *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell, J. Protozool, 1974, 21 (1) : 69-82.

152. DOBELL C., Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man, The life-story of *Dientamoeba fragilis* : observations, experiments and speculations, Parasitology, 1940, 32: 417-439.

153. GRENDON J.H., DI GIACOMO R.F., FROST F.J., Descriptive features of *Dientamoeba fragilis* infections, J. Trop. Med. Hyg., 1995, 98 : 309-315.

154. HAKANSSON E.G., The use of aqueous smears in the study and identification of the amoebae of man, Am. J. Trop. Med., 1935, 15 : 439-453.

155. JEPPE M.W., DOBELL C., *Dientamoeba fragilis* N.G., n. sp., a new intestinal amoeba from man, Parasitology, 1918, 10 : 352-368.

156. LAMY L., *Dientamoeba fragilis* : recherche, culture, fréquence, intérêt et caractères pathogènes, Bull. Soc. Path. Exo., 1960, 53 : 505-509.

157. TALIS B., STEIN B., LENGY J., *Dientamoeba fragilis* in human feces and bile, Israel J. Med. Sci., 1971, 9 :1063-1069.
158. WENRICH D.H., Nuclear structure and nuclear division in *Dientamoeba fragilis* (protozoa), J. Morphology, 1944, 74 : 467-491.
159. WENRICH D.H., Studies on *Dientamoeba fragilis* (protozoa). IV. Further observations, with an outline of present-day knowledge of these species, J. Parasitol., 1944, 30 :322-338.
160. YANG J., SCHOLTEN TH., *Dientamoeba fragilis* : a review with notes on its epidemiology, pathogenicity, mode of transmission and diagnosis, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1977, 26: 16-22.

AMIBES DE L'ŒIL

161. AITKEN D., HAY J., KINNEAR F.B., Mc KIRKNESS C, LEE W.R., SEAL D.V., Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmanella* infection, Ophthalmol., 1996, 3 : 485-494.
162. AURAN J.D., STARR M.B., JAKOBIEC F.A., *Acanthamoeba* keratitis, Cornea, 1987,6 (1) : 2-26.
163. BADENOCH P.R., JOHNSON A.M., CHRISTY P.E., COSTER D.J., Pathogenicity of *Acanthamoeba* and a *Corynebacterium* in the rat cornea, Arch. Ophthalmol. 1990,108: 107-112.
164. BHADURI C.R., JANITSCHKE K., MASIHI K.N., Immunity to *Acanthamoeba culbertsoni* : experimental studies with *Acanthamoeba* and control antigen preparations, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1987, 81 : 768-770.
165. BROWN T.J., CURSONS R.T., KEYS E.A., Amoeba from the Antarctic soil and water, Appl. Env. Microbiol., 1982, 44: 491-493.
166. CURSONS R.T.M., BROWN T.J., KEYS E.A., MORIARTY K.M., TILL D., Immunity to pathogenic free-living amoebae : role of humoral antibody, Infect. Immunol, 1980, 29 : 401-407.
167. C.D.C., Department of Health and Human Services, Public Health Service, *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lenses., Morbidity and Mortality Weekly Report, 1986, 35, 25, June 27.

168. DART J., Parasitic keratitis, Proceedings of the International Congress « The Cornea », 1996 : 52-56.
169. DAVEAU C., GRILLOT R., Kératites amibiennes et contactologie, Contactologia, 1988, 10 : 124-127.
170. DEBBASCH C., CHAUMEIL C., BATELLIER L., WARNET J.M., LIOTET S., Étude de l'activité d'agents anti-protozoaires, antibiotiques et antiseptiques sur une souche d'*Acanthamoeba* isolée d'un ulcère de cornée, Ophthalmol., 1996, 10: 114-117.
171. DELUOL A.M., TEILHAC M.F., POIROT J.L. et coll., Cutaneous lesions due to *Acanthamoeba sp.* in a patient with AIDS, J. Euk. Microbiol., 1996, 43 : 130 S-131 S.
172. FERRANTE A., Free living amoeba : pathogenicity and immunity, Parasite Immunol. 1991, 13: 31-47.
173. GARNER A., Pathogenesis of acanthamoebic keratitis : hypothesis based on a histological analysis of 30 cases, Brit. J. Ophthalmol. 1993, 77 : 366-370.
174. GAUTOM R.K., FRITSCH T.R., Transmissibility of bacterial endosymbionts between isolates of *Acanthamoeba sp.*, J. Euk. Microbiol., 1995, 42 (5) : 452-456.
175. GOODALL K., BRAHMA A., RIGWAY A., *Acanthamoeba* keratitis : masquerading as Adenoviral keratitis, Eye, 1996, 10 (5) : 643-644.
176. GRAY T.B., CURSONS R., SHERWAN J.F., ROSE P.R., *Acanthamoeba*, bacterial and fungal contamination of contact lens storage cases, Brit. J. Ophthalmol., 1995, 79 : 601-605.
177. HAY J., Mc KIRKNESS C., SEAL D., WRIGHT P., Drug resistance and *Acanthamoeba* keratitis : the quest for alternative antiprotozoal chemotherapy, Eye, 1994, 8 : 555-563.
178. HEFFLER K.F., ECKHARDT T.J., REBOLI A.C., STIERITZ D., *Acanthamoeba* endophthalmitis in Acquired Immunodeficiency Syndrome, Am. J. Ophthalmol., 1996, 122 (4) : 584-586.
179. ILLINGWORTH C.D., COOK S.D., KARABATSAS C.H., EASTY D.L., *Acanthamoeba* keratitis : risk factor and outcome, Brit. J. Ophthalmol., 1995, 79 : 1078-1082.
180. ISHIBASHI Y., *Acanthamoeba* keratitis, Ophthalmologica, 1997, 211(suppl. 1) 39-44.

181. JONES D.B., VISVESVARA G.S., ROBINSON N.M., *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis, Trans. Ophthalmol. Soc. UK, 1975, 95: 221-232.
182. KOENIG S.B., SOLOMON J.M., HUNDIUK R.A., SUCRER R.A. and al., *Acanthamoeba* keratitis associated gas-permeable contact lens wearer, Am. J. Ophthalmol., 1987, 103 (6) : 832.
183. KREMER I., COHEN E.J., EAGLE R.C., UDELL I., LAIBSON P.R., Histopathologic evaluation of stromal inflammation in *Acanthamoeba* keratitis, CLAO Journal, 1994,20 (1) : 45-48.
184. KROGSTAD D.J., VIVESVARA G.S., WALLS K.W., SMITH J.W., Free living pathogenic amoebae, Clin. Microbiol. LENNETTE E.H. AM. Soc. Microbiol., 1985 626-630.
185. LARKIN D.F.P., EASTY D.L., Experimental *Acanthamoeba* keratitis : I. Preliminary findings, Brit. J. Ophthalmol., 1990, 74: 551-555.
186. LARKIN D.F.P. et al., Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with Polyhexamethylene biguanide, Ophthalmol. 1992, 99 : 185-191.
187. LELUAN P., LIOTET S., BATELLIER L., CHAUMEIL C., Contamination amibienne et bactérienne des étuis de lentilles de contact en France (étude de 32 cas de kératites et de 63 porteurs sains), Contactologia, 1991, 13 : 137-141.
188. LIN J.C., WARD T.P., BELYEA D.A., Mc EVOY P., KRAMER K.K., Treatment of *Nocardia asteroides* keratitis with Polyhexaméthylène Biguanide. Ophthalmol., 1997, 104 (8) : 1306-1311.
189. LUDWIG I.H., MEISLER D.M., RUTHERFORD I., BICAN F.E., LANGSTON R. H., VISVESVARA G.S., Susceptibility of *Acanthamoeba* to soft contact lens disinfection system, Inv. Opht. Vis. Sci., 1986, 27: 626-628.
190. MARTINEZ A.J., DE JONCKHEERE J.F., Les infections par les amibes libres, Bull. de L'Institut Pasteur, 1981, 79: 171-205.
191. MAZUR T., RADAS E., The effect of the passages of *Acanthamoeba* strains through mice tissues on their virulence and its biochemical markers, Parasitol. Res., 1994, 80: 431-434.
192. MIETZ H., FONT R.L., *Acanthamoeba* keratitis with granulomatous reaction involving the stroma and anterior chamber, Arch. Ophthalmol., 1997, 115 : 259-263.

193. MOORE M.B., Mc CULLEY J.P., LUCKENBACH M. and al., *Acanthamoeba* keratitis associated with soft contact lenses, *Am. J. Ophthalmol.*, 1985, 100 : 396-403.
194. MOORE M.B., Mc CULLEY J.P., KAUFMAN M.E. and al., Radial keratoneuritis as presenting sign in *Acanthamoeba* keratitis, *Ophthalmol.*, 1986, 93 : 1310-1315.
195. MOORE M.B., *Acanthamoeba* keratitis and soft contact lens wear : the patient is at fault, *Cornea*, 1990, 9 (suppl.) : s33-s35.
196. MORLET N., DUGUID G., RADFORD C., MATHESON M., DART J., Incidence of *Acanthamoeba* keratitis associated with contact lens wear, *Lancet*, 1997, 350 414.
197. NAUHEIM R.C., BROCKMAN R.J., STOPAK S.S., TURGEON P.W., KELETIG., ROAT M.I., THOFT R.A., Survival of *acanthamoeba* in contact lens rinse solutions, *Cornea*, 1990, 9 (4) : 290-293.
198. PAGE F.C., In a new key to freshwater and soil Gymnamoebae with introduction for culture, *Freshwater Biological Association*, The Ferry House, Ambleside, Cumbria LA22 0LP, 1988, 91-92, 61-62.
199. PERRINE D., CHENU J.P., GEORGES P., LANCELOT J.C., SATURNINO C., ROBBA M., Amoebicidal efficiencies of various Diamidines against two strains of *Acanthamoeba polyphaga*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995 : 339-342.
200. PUSSARD M., PONS R., Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida), *Protistologica*, 1977, T. XIII, fasc. 4 : 557-598.
201. RIVERA F, MEDINA F, RAMIREZ P, ALCOCER J, VILAERALA G, ROBLES E., Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral region of a dental patient, *Environ. RES.*, 1984, 33 : 428-435.
202. SEAL D., HAY J., Mc KIRKNESS C., MORRELL A., BOOTH A., TULLO A., RIGDWAY A., ARMSTRONG M., Successful medical therapy of *Acanthamoeba* keratitis with topical chorhexidine and propamidine, *Eye*, 1996, 10 : 413-421.
203. SILVANY R.E., WOOD T.S., BOWMAN R.W., Mc CULLEY J.P., The effect of preservatives in contact lens solutions on two species of *Acanthamoeba*, *Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1987, 28 (suppl.) : 371.
204. SILVANY R.E., MOORE M.B., Mc CULLEY J.P., The effect of less than 4 hours exposure of thimerosal, benzalkonium chloride and chlorhexidine on *Acantha-*

moeba castellanii and *Acanthamoeba polyphaga*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1987, 30 (suppl.), 41.

205. SILVANY R.E., DOUGHERTY J.M., Mc CULLEY J.P., WOOD T.S., BOWMAN R.W., MOORE M.B., The effect of currently available contact lens disinfection systems on *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga*, Ophthalmol., 1990, 97 (3) : 286-290.

206. SISON J.P., KEMPER C.A., LOVELESS M., Mc SHANE D., VISVESVARA G.S., DERESINSKI S., *Disseminated Acanthamoeba* infection in patients with AIDS Case reports and review, C.I.D., 1995, 20: 1207-1216.

207. SLATER C.A., SICKEL J.Z., VISVESVARA G.S., PABICO R.C., GASPARI A.A, Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient, New Engl. J., 1994, 331 (2) : 85-87.

208. STEHR-GREEN J.K., BAILEY T.M., VISVESVARA G.S., The epidemiology of acanthamoeba keratitis in the United States, Am. J. Opht., 1989, 107 : 331-336.

209. TANAKA Y., SUGERI S., HARADA M., HAYABARA T., SUZUMORI K., *Acanthamoeba*-specific human T-cell clones isolated from healthy individuals. Parasitol. Res., 1994, 80: 549-553.

210. TIRANDO-ANGAL J., GABRIEL M., WILSON L., AHEARN D., Effects of Polyhexamethylene Biguanide and Chlorhexidine on four species of *Acanthamoeba* in vitro, Current Eye Research, 1995, 5 (2) : 225-228.

211. VARGA J.H., WOLF T.C., JENSEN H.G., PARMLEY V.C., ROWSEY J.J., Combined treatment of *Acanthamoeba keratitis* with Propamidine, Neomycin and Polyhexamethylene biguanide, Am. J. Ophthalmol., 1993, 115 : 466-470.

212. WARHUST D.C., Pathogenic free-living amoebae, Parasitol. Today, 1985, 1 24-28.

213. YASUHISA ISHIBASHI, *Acanthamoeba* keratitis, , Ophthmlol., 1997, 211 (suppl.1) : 39-44.

214. ZHANTO YANG, ZHIYI CAO, NOORJAHAN PANJWANI, Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis : carbohydrate-mediated host-parasite interactions, Infection and immunity, 1997, 65 (2) : 439-445.

INDEX DES PHOTOS PAR NUMERO

AMIBES

Entamoeba histolytica :

FORME VÉGÉTATIVE : 6, 9, 11, 17, 18, 22, 25, 26, 27, 41,44, 48, 49, 50, 51, 52, 53,54,55,56,57,58,59,60,61.

Entamoeba histolytica / *Entamoeba dispar* :

FORME VÉGÉTATIVE : 1, 2, 7, 8, 10, 16, 23, 24, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 45, 46, 47, 89, 114, 161, 189.

KYSTE : 3, 4, 14, 20, 21, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126.

Entamoeba dispar :

FORME VÉGÉTATIVE : 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80.

Entamoeba moshkovskii :

FORME VÉGÉTATIVE: 81.

Entamoeba hartmanii :

FORME VÉGÉTATIVE : 35, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 115, 162.

KYSTE : 127, 128, 129, 130, 151, 152.

Entamoeba coli :

FORME VÉGÉTATIVE : 15, 36, 43, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101.

KYSTE : 5, 13, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142.

Entamoeba polecki :

FORME VÉGÉTATIVE: 102, 103, 104. KYSTE: 143, 144.

Endolimax nanus :

FORME VÉGÉTATIVE : 37, 42, 105, 106, 107.

KYSTE : 145, 146, 147, 148, 167.

Iodamoeba butschlii :

FORME VÉGÉTATIVE : 38, 39, 40, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115.

KYSTE: 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156.

FLAGELLES

Giardia intestinalis :

FORME VÉGÉTATIVE: 12, 19, 157, 158, 159, 160, 162.

KYSTE: 113, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169.

Chilomastix mesnili :

FORME VÉGÉTATIVE: 170, 171, 172, 173.

KYSTE: 174, 175, 176, 177.

Retortamonas intestinalis :

FORME VÉGÉTATIVE: 178, 179.

Enteromonas hominis :

FORME VÉGÉTATIVE : 180.

KYSTE: 181.

Pentatrichomonas intestinalis :

FORME VÉGÉTATIVE: 182.

Dientamoeba fragilis :

FORME VÉGÉTATIVE: 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192.

AMIBES LIBRES DE L'OEIL

FORME VÉGÉTATIVE : 195, 197, 198, 201, 208, 211, 212, 213, 214, 215.

KYSTE: 193, 194, 196, 199, 200, 203, 204, 205, 206, 207, 209, 210, 216, 217, 218.

OEIL ATTEINT D'ULCÈRE AMIBIEN: 202.

INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

RÉSULTATS DU CONTRÔLE NATIONAL DE QUALITÉ EN PARASITOLOGIE

	Pages
Tableau III : Formes végétatives, <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	64
Tableau IV : Formes végétatives, <i>Ent. coli</i>	101
Tableau V : Formes végétatives, <i>I. butschlii</i>	121
Tableau VI : Kystes, <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	132
Tableau VII : Kystes, <i>Ent. coli</i>	144
Tableau VIII : Kystes, <i>E. nanus</i>	158
Tableau IX : Kystes, <i>I. butschlii</i>	162
Tableau X : Formes végétatives, <i>G. intestinalis</i>	171
Tableau XI : Kystes, <i>G. intestinalis</i>	176
Tableau XII : Kystes, <i>C. mesnili</i>	186
Tableau XIII : Formes végétatives, <i>D. fragilis</i>	197

TABLEAUX GÉNÉRAUX

Tableau I : Prévalence des protozoaires intestinaux	58
Tableau II : Survie des kystes d' <i>E. histolytica</i>	60
Tableau XIV : <i>Acanthamoeba</i> isolées à l'hôpital des Quinze-vingts	214
Tableau XV : Contamination amibienne de 63 boîtiers de lentilles de contact de patients asymptomatiques. Centre Hospitalier Ophtalmologique des Quinze-vingts	215

FIGURES

Figure 1 : Formes végétatives d'amibes	56
Figure 2 : Formes végétatives d' <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	67
Figure 3 : Diagramme de 21 zymodèmes d' <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	92
Figure 4 : Formes végétatives d' <i>Entamoeba coli</i>	102
Figure 5 : Kystes d'amibes	131
Figure 6 : Pathogénèse de la kératite amibienne	219

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--|--|
| N° 1 : <i>HÉMATOLOGIE</i> | N° 15 : <i>DÉPISTAGE</i> |
| N° 2 : <i>IMMUNOANALYSE</i> | <i>DE LA TRISOMIE 21</i> |
| N° 3 : <i>PARASITOLOGIE</i> | N° 16 : <i>IMMUNO-ALLERGIE (2)</i> |
| N° 4 : <i>BACTÉRIOLOGIE</i> | N° 17 : <i>VIRUS DES HÉPATITES</i> |
| N° 5 : <i>HORMONOLOGIE</i>
<i>GAZOMÉTRIE</i> | <i>A (VHA) et E (VHE)</i> |
| N° 6 : <i>G.B.E.A.</i> | N° 18 : <i>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</i> |
| N° 7 : <i>IMMUNO-ALLERGIE (1)</i> | <i>TOME II</i> |
| N° 8 : <i>HÉMOGLOBINES GLYQUÉES</i>
<i>LIPIDES</i> | N° 19 : <i>VAGINITES ET VAGINOSES</i> |
| N° 9 : <i>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</i>
<i>TOME I</i> | N° 20 : <i>HÉMOSTASE ET THROMBOSE</i> |
| N° 10 : <i>HÉMATOLOGIE</i>
<i>CAS ILLUSTRÉS</i> | N° 21 : <i>VIRUS DES HÉPATITES</i>
<i>B (VHB), DELTA (VDH),</i>
<i>C (VHC), AUTRES</i> |
| N° 11 : <i>AMIBES ET FLAGELLÉS</i>
<i>INTESTINAUX</i> | N° 22 : <i>SYNDROME</i>
<i>DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES</i> |
| N° 12 : <i>LES MALADIES A PRIONS</i> | N° 23 : <i>PARASITES SANGUINS</i> |
| N° 13 : <i>AUTOIMMUNITÉ</i>
<i>ET AUTOANTICORPS</i> | N° 24 : <i>BIOCHIMIE PEDIATRIQUE</i> |
| N° 14 : <i>L'EXPLORATION</i>
<i>DE LA THYROÏDE</i> | N° 25 : <i>LES MOISSISSURES</i>
<i>D'INTÉRÊT MÉDICAL</i> |

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m. privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A., et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes. (S.d.B., S.N.M.B., et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privés et hospitaliers, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros, ou épuisés en version papier, seront disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net à partir de 2002.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6 500 exemplaires.