

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité: Parasitologie
Département : Biologie

**Thème : Les Techniques De Diagnostic Utilisées en Parasitologie-
Mycologie Dans la Région GUELMA**

Présenté par :

Charef Fawzia
Debbabi Souad

Devant la commission composée de :

Bouchlaghem E.H
Zerguine K
Djebir S
Benrbiha R
Ksouri S
Hamdikane M
Fetni A

Président
Encadreur
Examinateur
Membre
Membre
Membre
Co-encadreur

Université de Guelma
Hôpital D'Ibn Zohr, Guelma

Juin 2017

REMERCIEMENT

Au terme de ce travail de mémoire de master, les mots justes sont difficiles à trouver pour exprimer nos remerciements.

*À « Allah », le tout puissant, qui nous a accordés le courage et la patience
Pour élaborer ce modeste travail.*

*Nous rendons un vibrant hommage aux membres du jury de ce mémoire qui
ont accepté de juger ce travail :*

*Un merci particulier à notre présidente de jury, **Bouchlaghem E.H**
de nous avoir faites l'honneur d'accepter la présidence du
jury de mémoire.*

*Un Merci Particulier à l'examinatrice de ce mémoire, **Djebir S**
pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.*

*Nous remercions également : Mme **Benrbiha R**, Mme **Hamdikane M**, Mr **Ksouri S**
D'avoir accepté d'assister à notre soutenance*

*Un très grand merci à notre encadreur madame **Zerguine Karima** pour sa
gentillesse, ses précieux conseils, sa bienveillance et son soutien tout au long de
la réalisation de notre mémoire.*

*Nous tenons à remercier le Dr **Fetni A**, Assistante en parasitologie et
mycologie
médicale qui nous a accueillis dans le laboratoire de microbiologie du hôpital
de Ibn Zohr à Guelma, pour ses
précieux conseils et son soutien tout au long de la réalisation pratique de notre
travail.*

*Nous remercions tout personnel médical du laboratoire de microbiologie pour
leur précieuse collaboration, recevez nos chaleureux remerciements*

Je dédie cette mémoire à

A mes très chers parents

A ma mère khadidja et mon père Abdelaziz

Aucun mot, aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur, l'ampleur de l'affection et de l'admiration que j'éprouve pour vous. Mon diplôme vous appartient. Que Dieu vous garde et vous accorde longue vie afin que je puisse à mon tour vous combler. Je vous aime.

À mes très chers frères Rabeh et Chiheb Eddine et mes chère sœurs Sihem et Zineb.

Tes encouragements et conseils m'ont été d'un grand secours Ces quelques lignes ne sauront exprimer toute l'amour que je te porte. Puisse dieu vous procurer santé, bonheur, réussite et prospérité que vous méritez.

A mon grand père Mohamed et mon grandes mères Djamaa.

Aucune dédicace ne saurait exprimer ma reconnaissance, mon grand attachement. Que dieu vous accorde longue vie et bonne santé.

A mon grand père CHaaban et mon grandes mères Aldjia

Que ton âme repose en paix.

Mon grande mère Charmoukha

A mes chers oncles et tantes

A mon oncle abd el wahab

Aucun mot ne pourra exprimer ma grande tristesse en ton absence, Que ton âme repose en paix

A mes chers cousins et cousines

À toute ma famille

Charef ET Souahlia

À mes chères amies et mes collègues

Souad ,Lwiza , Basma, Ranya, Ahlem, Fatima, Rawya. Et tout le groupe de parasitologie

À toute personne qui a participé à la réalisation de ce mémoire

FAWZIA

Je dédie cette mémoire à

*A mes Parents, pour tout l'embarras que je leur ai causé
au long de ce chemin tortueux mais finalement achevé,
qu'ils voient dans ce travail l'amour et la fierté.*

*A mes sœurs Hakima, Karima et son fils Malek, Abla,
Fatima que je n'ai pu ou su leur exprimer m'a toujours
épaulé et aimé dans les moments difficiles.*

*A mes frères Ahmed et kheireddine, ton conseils ont été
pour moi une source de courage et de confiance.*

A mon fiancé Yazid. Très affectueux remerciements.

*A mes amie surtout Fawzia, Belkiss, Somia, Yasmin,
Rawia, samiha.....*

souad

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
PARTIE THEORIQUE	
Chapitre I : Différentes techniques en parasitologie.....	2
I-Examen parasitologique des selles	2
I.1- Conditions de prélèvement et de conservation des selles	2
I.1.1- préparation du malade	2
I.1.2- le prélèvement des selles	3
I.2- Délai entre la défécation et l'examen parasitologique.....	3
I.3- Conservation des selles	3
I.3.1-Conservation par le froid	3
I.3.2-Eau formolée	3
I.3.3-Merthiolate Iode Formol (MIF)	3
I.4- Examen des selles	4
I.4.1-Examen macroscopique	4
I.4.2-Examen microscopique	4
I.4.3- Examen après concentration.....	7
I.4.4-Techniques spéciales	10
II - Examen parasitologique du sang.....	12
II.1- Définition	12
II.2-Localisation des parasites dans le sang	12
II.3-Prélèvement	13
II.4. Techniques de recherche des parasites sanguicoles	13
II.4.1- Méthode directe	13
II.4.2-Méthode indirecte	16
III-Examen parasitologique d'une biopsie de la muqueuse rectale (BMR)	16
III.1-Méthode	16
III.2-Résultat	16
IV-Examens parasitologiques d'une ponction de moelle osseuse	16

V-Examens parasitologiques d'un tissu mou (foie, rate)	17
VI-scotch test de Graham	17
VI.1-Conditions du prélèvement	17
VI.2-Technique	17
VII-Examen parasitologique des urines	17
VIII-Examen parasitologique du suc ganglionnaire	18
IX-Examen parasitologique de l'expectoration (crachats)	18
IX.1-Coloration au RAL-555	18
IX.2-Coloration au Bleu de toluidine O	18
X. Examen parasitologie des liquides céphalorachidiens (LCR)	18
X.1-Examen direct	18
X.2-Examen après centrifugation :.....	18
X.3-Examen après double centrifugation	19
Chapitre II : Diagnostic mycologique.....	20
1-Objectifs de l'examen mycologique.....	20
2-Avant le prélèvement	20
3-Prélèvement.....	21
3.1 Prélèvements des mycoses superficielles	21
3.1.1 Prélèvement des ongles	21
3.1.2 Prélèvement du cuir chevelu	21
3.1.3 Prélèvement de la peau	22
3.1.4 Muqueuses	22
3.1.5 Biopsies.....	22
3.2 Prélèvement des mycoses profondes	22
4-Examen Direct	23
4.1 Examen direct après éclaircissement	23
4.2 Examen direct après Coloration	25
5- La culture	25
6-Identification	26
6.1 Examen macroscopique et microscopique	26
6.2 Identification d'un dermatophyte et de levure.....	26

Partie II : partie pratique

Chapitre III: Matériel et méthodes.....	29
1-Objectif	29
2. Matériel et méthodes	29
2.1 Lieu et période d'étude	29
2.2 Patients	29
2.3 Diagnostic parasitologique	29
2.4 Diagnostic mycologique	35
2.5 Diagnostic de la leishmaniose cutanée	40
Chapitre IV: Résultat.....	42
1- Examen parasitologique des selles.....	42
2- Technique du scotch test	45
3-Examen parasitologique des urines	46
4- La recherche de leishmaniose cutanée	48
5- Analyses mycologiques	49
Chapitr V :Discussion	51
Conclusion.....	55
Références bibliographique.....	56
Annexe	
Résumé	

Figure 01 : Le matériel du laboratoire utilisé.....	30
Figure 02 : Les réactifs utilisés.....	30
Figure 03 : Prélèvement des selles.....	31
Figure 04 : Les étapes de l'examen parasitologique des selles à l'état frais	32
Figure 05 : Les quatre couches obtenues après centrifugation par la technique de ...	34
figure 06 : prélèvement du cuir chevelu en vue de de l'examen mycologique.....	36
Figure 07 : Les étapes de l'examen direct (cuir chevelu, ongle)	37
Figure 08 : Les étapes de la preparation de la culture en mycologie	38
Figure 09: l'aspect macroscopique au recto versodes culturdes champignons sur sabauraud en tub.....	38
Figure 10 : Les étapes du test de drapeau.....	39
Figure 11 : Les étapes du repiquage sur le milieu PDA.....	40
Figure 12 : Les étapes du prélèvement de la leishmaniose cutanée.	41
Figure 13 : Répartition des patients étudiés selon le type de consultation.....	42
Figure 14: Fréquence des cas positifs concernant l'examen parasitologique des selles.	43
Figure 15: fréquence des cas positifs découverts selon l'examen direct.....	44
Figure 16: fréquence des cas positifs selon la technique de Ritchie.....	44
Figure 17 : fréquence des cas positifs selon la coloration de lugol.....	45
Figure 18 : fréquence des cas positifs selon la technique de scotch test.	45
Figure 19: fréquence des cas positifs découverts selon l'examen direct.....	47
Figure 20: fréquence des cas positifs découverts selon technique de centrifugation .	47
Figure 21: fréquence des cas positifs découverts selon la technique de coloration MGG48	

Tableau 01: Différents Types des prélèvements profonds selon la localisation des mycoses.	23
Tableau 02: La fréquence des cas positifs selon l'examen parasitologique des urines.....	46
Tableau 03: Fréquence des cas positifs dans la recherche de leishmanies.....	48
Tableau 04 : Répartition des mycoses selon leur localisation.....	49
Tableau 05: Fréquence de la positivité pour l'examen mycologique selon l'examen direct...	49
Tableau 06: Fréquence de la positivité de l'examen mycologique selon la technique de la culture.....	50
Tableau 07: Fréquence de la positivité des ongles et du cuir chevelu selon l'association de l'examen direct et la culture.....	50

Un parasite est un organisme qui se nourrit et se développe aux dépens d'autres organismes appelés hôtes, à la surface ou à l'intérieur duquel il vit. Le degré du parasitisme reflète le degré de préjudice commis à l'hôte allant de la symbiose à la mort de l'hôte. Le parasite dérive d'une forme vivant librement et qui a évolué vers un mode de vie caractérisé par l'exploitation d'un autre organisme vivant (Benouis, 2012).

Les maladies parasitaires ou parasitiques sont provoquées par le développement du ou des parasites dans l'organisme hôte. Également appelées parasitoses [1], ces dernières occupent une place très importante parmi les problèmes de santé publique, surtout dans les pays du tiers monde (Bennis, 2001).

La plupart des maladies parasitaires ne peuvent être diagnostiquées à l'aide d'un seul examen clinique et, de ce fait, des examens de laboratoire sont nécessaires pour savoir si un malade est infesté ou non par un parasite, si tel est le cas, par quelle espèce. Le laboratoire joue donc un rôle important dans l'établissement du diagnostic des maladies parasitaires. En effet, les examens de laboratoire doivent être exacts et fiables si l'on veut aider le médecin et par la même le malade (OMS, 1993).

L'objectif de notre travail est de savoir les diverses techniques de diagnostic utilisées en parasitologie et mycologie au niveau du laboratoire de microbiologie à l'hôpital d'Ibn Zohr au sein de la wilaya de Guelma.

Ce travail est exposé en deux parties :

-la première partie est consacrée à une étude bibliographique comprenant deux chapitres, un sur les diverses techniques utilisées en parasitologie : des selles, des urines, du sang, la peau, les crachats, le liquide céphalorachidien...ect. Le deuxième chapitre concerne le diagnostic mycologique : de la peau, les ongles et le cuir chevelu.

-la deuxième partie de ce mémoire se rapporte à la partie pratique qui décrit le matériel et les méthodes employés au laboratoire d'Ibn Zohr, les résultats et leur discussion.



PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I
Différentes Techniques
En Parasitologie

I-Examen parasitologique des selles

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

Un examen parasitologique des selles est un examen de routine qui comporte un examen direct à l'état frais, après coloration et après concentration par deux méthodes de routine (physique et physico-chimique). Le choix des techniques est orienté par les renseignements obtenus lors de l'interrogatoire du patient, l'examen clinique et les examens biologiques (EL-Hassani, 2014).

I.1- Conditions de prélèvement et de conservation des selles

Le clinicien doit fournir au biologiste les informations concernant l'origine géographique et la symptomatologie du malade pour orienter ses recherches. En effet chaque parasite n'est bien mis en évidence que par une technique qui lui est spécifiquement adaptée. L'examen parasitologique des selles nécessite 3 examens coprologiques à quelques jours d'intervalle après une préparation correcte du malade [2].

I.1.1- préparation du malade

On conseille au malade pendant les 3 jours qui précèdent le prélèvement de supprimer :

- les compositions pharmaceutiques contenant du charbon végétal, du bismuth, des sels de magnésium, du kaolin et du benzonaphtol.
- les produits opaques utilisés en radiologie, en particulier les composés barytes.
- les suppositoires et les huiles laxatifs, en particulier l'huile de paraffine. La présence de ces éléments dans les selles rend l'examen microscopique difficile, car ils augmentent le volume des culots de centrifugation et peuvent être la cause d'erreurs d'identification avec

des parasites authentiques. Il est utile de prescrire au patient un régime alimentaire à faible résidu pendant les 3 jours qui précèdent le prélèvement [2].

I.1.2- le prélèvement des selles

Le malade déposera sa selle, le matin, au laboratoire dans un récipient propre, sec et sur lequel est collée une étiquette portant l'identité du malade. Il faut bien indiquer au patient qu'il doit déposer la totalité de la selle dans le récipient et qu'il ne doit pas y mélanger de l'urine, du papier hygiénique ou des fragments de coton. Si le malade ne peut pas se déplacer, la selle doit parvenir au laboratoire le plus rapidement possible pour éviter une baisse de la température du prélèvement qui risque de lyser les protozoaires sous forme végétative [2].

I.2- Délai entre la défécation et l'examen parasitologique.

L'échantillon de selles doit parvenir très rapidement au laboratoire c'est-à-dire dans la demi-heure qui suit son émission car les formes végétatives d'amibes vont se décomposer ou se modifier assez rapidement après l'émission de la selle et ne seront plus reconnaissables (Menan, 2016).

I.3- Conservation des selles

I.3.1-Conservation par le froid :

En mettant la selle dans une boîte hermétique à +4° C on pourra conserver d'une manière acceptable les kystes de protozoaires et les œufs d'helminthes pendant quelques jours (Achir et Hamrioui, 2001).

I.3.2-Eau formolée :

C'est une solution fixatrice et conservatrice. En fait, kystes de protozoaire et œufs d'helminthes seront conservés dans du formol à 10 % pour les selles pâteuses et à 5 % pour les selles fermes.

Les formes végétatives pourront être fixées et conservées quelques semaines dans du formol à 10 %. Quant aux œufs qui peuvent continuer leur segmentation après émission il faudra utiliser le formol à 20 % (Achir et Hamrioui, 2001).

I.3.3-Merthiolate Iode Formol (MIF) :

Les selles peuvent être également conservées dans une solution de MIF (Merthiolate Iode Formol). C'est la technique de MIF conservation ou de MIF stockage ou MIF coloration. Le protocole est le suivant :

- Verser 2,35 ml de la solution Merthiolate Formol dans 0,15 ml d'une solution iodo-iodurée

- Ajouter un petit pois de selles.
- Laisser sédimenter 20 à 30 min.
- Prélever 1 à 2 gouttes au dessus du sédiment à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Observer au microscope entre lame et lamelle.

Les flacons de selles colorées seront mis à l'abri de la lumière. La méthode de MIF conservation permet une bonne conservation des éléments coproparasitaires sur plusieurs mois ou années. Elle permet également l'identification des formes végétatives et kystiques de protozoaires par la mise en évidence de leur structure interne (Menan, 2016).

-Réactifs utilisé (Annexe).

I.4- Examen des selles

I.4.1-Examen macroscopique : Il précise

-L'aspect des selles (selle liquidiennes, semi liquide hétérogène, dure, spongieuse, grumeleuse, excès de féculents non digérés, aspect de pâte à modeler, abondance de lipide).

-La couleur de la selle (normal, noire, verte ocre, selle décolorée.)

-la présence d'éléments non parasitaires :(sang, glaires, mucus, résidus alimentaires).

-La présence d'éléments parasitaires :(anneaux de tænia, oxyures adultes, ascaris adulte, douves adultes, élément pseudo parasitaires) (Fall, 2006) [3].

I.4.2-Examen microscopique

L'examen microscopique est le temps essentiel de l'analyse. Il permet de dépister les œufs et les larves d'helminthes, les kystes et les formes végétatives d'amibes et de flagellés, les oocystes de coccidies et les spores de microsporidies. Les cristaux de Charcot-Leyden sont dus à la destruction des polynucléaires éosinophiles du tube digestif. Leur constatation doit inciter à rechercher une helminthiase, mais ils peuvent également se rencontrer au cours de protozooses (amibiase, isosporose) (ANAES, 2003).

I.4.2.1- Examen direct

L'examen direct est indispensable pour détecter les formes végétatives des protozoaires qui sont fragiles. Il consiste à réaliser un examen direct à l'état frais et un autre après coloration. Cet examen direct permet d'apporter un résultat dans l'heure qui suit la réception du prélèvement (EL-Kouraibi, 2011).

A- L'examen direct à l'état frais : Il permet de voir la mobilité de certains parasites et donne une idée sur le degré d'infestation du patient. Selon la qualité des prélèvements et la consistance des selles on pratique les examens suivants :

- Examen sans dilution sur des selles liquides ou glaireuses : il est pratiqué sur des selles émises depuis moins d'1 heure.
- Examen après dilution dans l'eau physiologique (solution salée isotonique: Na CL 9‰) sur des selles moulées ou dures.
- Examen direct après dilution dans l'eau du robinet : il permet grâce à la présence de chlore dans cette eau, de lyser rapidement *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis* et les formes végétatives de *Pseudolimax butshlii* et de laisser intacts les kystes d'amibes ou de flagellés pathogènes (Rahmouni, 2010).

B-L'examen direct après coloration:

➤ **Colorations en tubes:**

- ✓ **Merthiolate Iode Formol (MIF)** :(technique de Sapero, Lawless et Strome):

Une coloration au MIF a été effectuée pour fixer et conserver les protozoaires et les œufs d'helminthes en milieu liquide (Petithory et al., 1998). Cette méthode utilise les mêmes réactifs et technique que celle employée pour la conservation.

- ✓ **coloration Bailenger et Faraggi:**

C'est une technique de réalisation facile.

-Réactifs utilisés (Annexe).

Technique :

- Déposer, sur une lame porte-objet une goutte de la préparation fécale.
- Avec le coin de la lamelle, lui mélanger une petite goutte du réactif, prélevée avec une pipette Pasteur.
- Recouvrir d'une lamelle puis examiner à l'objectif à immersion après avoir déposé une goutte d'huile sur la lamelle (Petithory et al., 1998).

➤ **Coloration sur lame**

- ✓ **Coloration au Lugol** : voir partie pratique
- ✓ **Coloration à l'hématoxyline ferrique** : est la méthode la plus fine, la plus longue et la plus délicate. Elle permet le diagnostic différentiel des formes végétatives des différentes espèces d'amibes (Fall, 2006).

-Réactifs utilisés (Annexe).

-Technique :

- Réaliser un frottis mince de selle sur une lame porte-objet ;
- Plonger la lame dans l'alcool à 70% pendant 5 minutes ;
- Passer ensuite le frottis dans l'alcool à 50% pendant 2 minutes ;
- Rincer avec l'eau de robinet pendant 5 minutes ;
- Colorer avec la solution de l'hématoxyline ferrique préalablement préparée pendant 10 min;
- Décolorer avec l'acide picrique pendant une minute ;
- Rincer à l'eau du robinet pendant 10 minutes ;
- Déshydrater par une gamme montante d'alcool puis le Xylène (OMS, 1994).

✓ **Coloration à l'alcool polyvinylique (APV)- Trichrome** : facilite l'identification des Amibes (Guillaume, 2007).

-Réactifs utilisés (Annexe)

Technique :

- Mettre une goutte de selles et trois fois de volume de solution d'APV ;
- Mélanger avec un petit agitateur, et étaler sur le tiers de la lame ;
- Effectuer un frottis mince ;
- Plonger la lame dans l'alcool iodé à 70% pendant 2 minutes et ensuite dans l'alcool à 50% pendant 2 minutes ;
- Rincer la lame avec de l'eau du robinet ;
- Colorer avec le colorant de Gomori pendant 30 minutes ;
- Faire passer la lame dans une solution d'alcool à 90% avec 0.5% d'acide acétique pendant quelques secondes ;
- Plonger la lame dans l'alcool à 95% pendant 30 secondes et ensuite dans l'alcool absolu pendant 1 minute ;
- Déshydrater par le xylène et lire à l'objectif x100 (Guillaume, 2007).

✓ **Coloration au noir chlorazole de Kohn** : Cette technique permet de colorer les trophozoïtes en gris et de bien voir la structure des noyaux (Rousset, 1993).

-Réactifs utilisés (Annexe 1).

Technique :

- Effectuer un étalement humide mince ;
- Plonger directement le frottis dans le réactif;

- Laisser agir pendant 16 à 18 heures ;
- Laver à l'eau courante ;
- Déshydrater et lire au microscope optique (Belkaid M et al in Kasmi et Saidouni, 2016)
 - ✓ **Coloration de Ziehl-Neelsen** : Pour la détection de *Cryptosporidium* et *Isospora belli* (Trabelsi *et al.*, 2012).

-Réactifs utilisés (Annexe)

Technique: Elle consiste à :

- préparé un frottis mince des selles.
- Sécher à l'air ;
- Fixer au méthanol pendant 5 min ;
- Sécher de nouveau;
- Colorer la lame dans un bain de fuchsine phéniquée environs 1 heure ;
- Rincer à l'eau puis différencier dans de l'acide sulfurique à 2% pendant 20 secondes en agitant la lame ;
- Rincer à l'eau puis colorer dans une solution de verte malachite à 5% Pendant 5mn ou dans une solution de bleu de méthylène à 3% ;
- Rincer à l'eau et sécher à l'air ;
- Les cryptosporidies apparaissent en rouge sur fond vert ou bleu et sont donc faciles à Repérer.
- Leur cytoplasme granuleux renferme quatre sporozoïtes.

Cette technique permet aussi de voir les oocystes d'*Isospora belli* (Bennis, 2001).

I.4.3- Examen après concentration

Si les éléments parasites ne sont pas présents en grand nombre dans l'échantillon des selles examiné, la préparation à l'état frais peut ne pas suffire pour déceler une infestation.

Cette concentration peut mettre en évidence les œufs de vers, les larves et les kystes de protozoaires, mais pas les formes végétatives de protozoaires, car ils sont en général détruits au cours du processus de concentration (Bennis, 2001).

Les méthodes de concentration se repartissent en deux groupes :

- méthodes physiques.
- méthodes diphasiques ou physiques-chimiques.

I.4.3.1-Méthodes Physiques :

Principe : Différence de densité entre les éléments parasitaires et les débris alimentaires (El-kouraibi, 2011). On distingue deux principes :

A-Techniques de sédimentation:

Le principe de cette méthode est la dilution du prélèvement dans une solution aqueuse de densité inférieure à celle des éléments parasitaires afin de les concentrer dans le culot du tube tandis que certains débris flottent.

Les avantages de cette technique résident dans sa simplicité, son faible coût et l'absence de déformation comme lors d'utilisation de solutions denses. De plus elle permet d'obtenir dans le culot les œufs de toutes les espèces de parasites y compris les plus lourds (comme les œufs de trématodes) (Sloss et *al.*, 1994).

❖ sédimentation simple:

Intérêt : Technique recommandée pour les larves d'anguillule et les œufs d'ascaris non fécondés. Elle ne nécessite pas de produits chimiques particuliers.

-Inconvénients : De nombreuses cellules végétales (féculents en particulier) sédimentent aussi vite que les parasites recherchés et l'examen microscopique n'est pas toujours facile.

-technique : Dix à vingt grammes de selles sont dilués dans 250 à 500 ml d'eau du robinet et le filtrat laissé dans un verre à pied. Après une heure, le surnageant est rejeté et le sédiment remis en suspension dans une même quantité d'eau. La même manipulation est renouvelée plusieurs fois jusqu'à obtention d'un liquide surnageant clair, Le culot est alors examiné (Bennis, 2001).

❖ méthode de Faust et Ingalls en eau glycinée

Intérêt : Cette technique est employée pour rechercher les œufs de *Shistosoma mansoni*

Inconvénient : Comme pour la technique précédente, l'examen microscopique peut être rendu difficile par la présence de certains résidus.

Technique : diluer 5g de selle dans 300ml d'eau glycérol à 0,5%, réalise 3 sédimentations successives 1h ,45min ,30min.

Les œufs de schistosomes sont plutôt en superficie du sédiment mais il est recommandé d'effectuer des prélèvements à différents niveaux (Rousset, 1993).

B-Technique de flottation :

Principe : Utilise un liquide dont la densité est supérieure à celle des éléments parasitaires qui se concentrent à la surface [4].

Avantage : technique simple, matériel rudimentaire, réalisable en série.

Inconvénient : Les réactifs hypertoniques utilisés altèrent les œufs operculés volumineux de *Bothriocéphale*, *Fasciola* et même les de *Shistosoma*.

Les œufs d'ascaris infertile ne sont pas bien concentrés par ces méthodes (Achir et Hamrioui, 2001).

❖ Méthode de Willis

Intérêt: Elle concentre bien les œufs d'ancylostomidés et d'hyménolépidés.

Inconvénients: La solution de chlorure de sodium pénètre assez facilement dans les œufs et il ne faut pas dépasser le temps prescrit dans le déroulement de la technique (Rousset, 1993).

Technique: Diluer les selles au 1/10 dans Na Cl saturé (25%), filtrer sur chinois, verser la solution dans un tube à essai pour former un ménisque bombé, placer une lamelle dessus pendant 5 min, retirer la lamelle et déposer sur lame, observer rapidement avant cristallisation (Bennis, 2001).

❖ Méthode de Janeckso et Urbanyi

-Intérêt: technique excellente pour concentrer les œufs d'helminthes en général et les œufs de grande douve, *d'hymenolepis* et *d'ankylostomes* en particulier.

-Inconvénient : utilise un réactif toxique et corrosif : le biiodure de Hg.

Technique : Diluer 3 à 5 g de selles dans une solution iodo mercurique, tamiser dans un tamis métallique à mailles de 1 mn, centrifuger 3 mn à 2500 t/mn, recueillir la partie superficielle avec un petit agitateur de verre à extrémité ou mieux avec une anse de platine dont l'anse forme un angle droit avec le support, mettre le prélèvement entre lame et lamelle, observer immédiatement [5].

I.4.3.2-Méthodes Diphasiques :

Principe : Elles consistent à mettre les selles en présence de 2 phases non miscibles, une aqueuse et l'autre organique. En plus de son action dissolvante, la mise en jeu de 2 phases non miscibles, une hydrophile et l'autre lipophile réalise pour chaque élément fécal (parasite ou non) un coefficient de partage dont la valeur dépend de sa balance hydrophile-

lipophile et conditionne sa position dans les phases obtenues après émulsion. Ce sont des techniques simples et rapides (El-Kouraibi, 2011).

- **MIF Concentration**

Cette technique concentre bien les œufs. Elle offre l'avantage de concentrer les kystes de protozoaires et de colorer leurs noyaux (Bayo, 2001).

- **Technique de Ritchie** recherche des kystes et des œufs sauf pour les œufs d'ascaris, détruite par cette méthode (Pierson, 2008) (voir partie pratique).

Méthode de Thébault simplifiée (Valentin et Solle) : Cette technique concentre bien les kystes de petites amibes et en particulier les *Endolimaxnana* dont les noyaux deviennent nets (grâce au formol du liquide de dilution). Bonne concentration aussi des kystes de *Pseudolimax butschlii*, *E. histolytica*.

Technique : Diluer 10 g de selles dans environ 100 ml de solution d'acide trichloroacétique, tamiser et laisser sédimenter 1 min, verser le filtrat dans une ampoule à décanter, ajouter une quantité égale d'éther, agiter vigoureusement en faisant évacuer l'éther vaporisé par ouverture du robinet tenu en haut, laisser reposer 2 à 10 minutes avant de retirer le bouchon, recueillir la phase inférieure dans un tube à centrifuger à fond conique, centrifuger à 2000 tours / min. pendant 1 min, rejeter le surnageant et examiner le culot (Menan, 2016).

Il existe d'autres méthodes :

- Méthode de Telemann modifiée par Rivas.
- Méthode de Caries et Barthélémy.
- Méthode de Bailenger.

I.4.3.3-Méthodes combinées : Chaque méthode de concentration proposée présente l'inconvénient d'éliminer des parasites. Elle doit donc être choisie en fonction de ce que l'on recherche préférentiellement. Ainsi, pour avoir plus de chance de retrouver le maximum de parasites dans les selles, les méthodes combinées sont plus intéressantes (Menan, 2016).

On a 2 techniques :

- Technique de Junod.
- Technique de Junod modifiée.

I.4.4-Techniques spéciales :

I.4.4.1-Numération des œufs :

Intérêt:

- * Pouvoir mesurer l'importance d'une infestation parasitaire permet:
- * d'apprécier les possibilités de retentissement physiologique des parasites
- * d'évaluer l'efficacité d'une thérapeutique
- * de chiffrer des enquêtes épidémiologiques (Bennis, 2001).

Methode de Kato : (Pour la recherche des œufs d'helminthes).

Imprégner des rectangles de cellophane de 2×3 cm dans la solution suivante :

Glycérine pure..... 100ml.

Eau distillée.....100ml.

Solution de vert malachite a 3%..... 1ml.

-Déposer un pois de selles en étalant sur une lame porte-objet et recouvrir de la cellophane imprégnée de liquide.

-Retourner la lame sur du papier filtre en pressant doucement.

-Laisser 10 à 15 min avant de la lire (Kremer et Molet, 1975).

I.4.4.2-Extraction des parasites

Technique de Baermann : pour la recherche de *Giardia*, d'anguillule et d'ankylostome (Guillaume, 2007).

Technique : elle consiste à :

- De l'eau chauffée à 45° est versée dans l'entonnoir jusqu'à mi-hauteur.
- La passoire métallique est remplie de selles pâteuses.
- Lorsque la passoire est placée dans l'entonnoir, les selles doivent affleurer le niveau de l'eau chaude.
- 2 à 3 heures plus tard, l'eau est soutirée soit dans une boîte de pétri que l'on examine à un fort grossissement soit dans un tube à centrifuger.
- Après 5 mn de centrifugation à 1500 à 2000 tours /min.
- On examine le culot (Bennis, 2001).

I.4.4.3-Culture

➤ **Helminthes :**

Intérêt : rechercher des larves d'anguillules qui peuvent dans certaines conditions se multiplier dans le milieu extérieur.

Diagnostic différentiel entre les différents types de larves provenant d'œufs d'*Ankylostoma necator*. Les œufs évoluent en larves infectieuses au bout de 10 à 15 jours (Guillaume, 2007).

Technique:

-Charbon, en boîte de pétri (BP) : mélanger même quantité de charbon .ajouter peu d'eau stérile pour former une pâte molle. Verser dans un BP, en respectant les bords de la boîte et en faisant au centre un petit monticule qui touche le couvercle de la boîte .Etuver 25°C.Lire les gouttes dans couvercle. Laver la selle avec 2ml d'eau stérile : attendre 10 min et recueillir cette eau au pourtour de la boîte pétrie. Prélever 8 à 10 Fragments de selles.

-Sur un buvard, en boîte de pétri : Envelopper 4 lames dans un papier buvard, étaler 1 à 2 g de selles sur une des faces. Poser ces lames dans une boîte de pétri contenant 10 ml d'eau stérile. Lire les gouttes dans un couvercle et le culot de centrifugation de tout le liquide de la boîte de pétri.

-Sur un buvard, en tube à essai : Etaler 1 g de selle sur toute la longueur d'une bandelette d'un buvard rigide. Introduire le buvard dans un tube a essai contenant 5ml d'eau stérile. La selle ne doit pas toucher l'eau. Etuver à 25°C. Lire le culot de centrifugation du liquide du tube à essais [4].

➤ **Protozoaires**

Intérêt : utilisé pour observer une grande quantité d'amibes ou rechercher des amibes ou des flagellés qui n'ont pas été vus à l'examen direct.

Méthode :

-mettre la solution de Ringer (solution de Ringer + sérum ou Albumine+amidon de riz) dans le sérum coagulé.

-réchauffer le milieu 15 à 20 min à l'étuve a 37°C.

-ensemencer avec des selles prélevées a différents endroit.

-mettre à l'étuve a 37°C pendant 24 à 48 heures.

-prélever au fond du tube avec une pipette pasteur.

-déposer sur une lame et observer entre lame et lamelle.

Si la culture contient des amibes on peut les colorer (Guillaume, 2007).

II - Examen parasitologique du sang

II.1- Définition

L'examen parasitologique du sang recherche les parasites qui se multiplient ou qui séjournent pendant une phase de leur cycle dans le sang ou dans les organes hématopoïétiques [6].

II.2-Localisation des parasites dans le sang :

Les parasites sanguicoles sont recherchés dans :

✓ **les hématies:**

-plasmodies à différents stades sont : trophozoïtes, schizontes, rosaces, gamétocytes;
-babésia ou piroplasmes qui des hématozoaires des chiens, bovins retrouvés chez l'Homme notamment les sujets splénectomisés.

✓ **les leucocytes :**

- leishmanies : *Leishmania donovani*;
- les toxoplasmes : *Toxoplasma gondii*;

✓ **le plasma :**

- les trypanosomes : *Trypanosoma brucei gambiense*, *T.b. rhodesiense*, *T. cruzi* ;
- les microfilaires sanguicoles : *Loa loa*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Dipetalonema (Mansonella) perstans*, *M. ozzardi*...etc. (Menan, 2016).

II.3-Prélèvement : Le prélèvement se fait soit par piqûre au bout du doigt soit par ponction veineuse sur anticoagulant (Citrates de Sodium ou EDTA)[2].

II.4. Techniques de recherche des parasites sanguicoles :

II.4.1- Méthode directe :

II.4.1.1- examen à frais : on dépose une petite goutte de sang sur la lame et on recouvre immédiatement d'une lamelle ensuite on examine au microscope (Lamy, 1980).

II.4.1.2- Frottis sanguin (FS) :

Technique : Déposé sur une lame porte objet dégraissée, le sang on étalé en couche fine mono-érythrocytaire par un geste rapide et régulier à l'aide du petit bord mousse d'une autre lame (tenue à 45° de la lame portant la goutte de sang). Le frottis doit être séché et fixé 30 secondes au méthanol.

Coloration : La technique originelle de coloration du May Grunwald Giemsa (MGG) consiste à recouvrir le frottis d'une solution de May Grunwald et laisser agir 3 minutes. Laver ensuite rapidement à l'eau tamponnée. Recouvrir d'une solution de Giemsa diluée à 3 % dans du tampon phosphate a pH 7,2 et laisser agir 15 minutes. Laver à l'eau du robinet et sécher (Duong et Richard-Lenoble, 2008).

II.4.1.3- Goutte épaisse (GE) :

La technique dite de GE, décrite par Ross en 1903 (Ross, 1903 in Miraz, 2012), est une technique de concentration utilisable également pour les recherches de trypanosomes, plasmodies et microfilaires, elle consiste au :

- Dépôt du sang: déposer, sur une lame de verre dégraissée, une grosse goutte de sang (2 fois le volume utilisé pour un frottis).
- Défibrination : en cas de prélèvement capillaire, pour empêcher la coagulation, avec le coin d'une autre lame ou la pointe d'un vaccinostyle, étaler régulièrement le sang sur une surface de 1 cm de diamètre, en tournant régulièrement pendant 2 min.
- Séchage : retourner la lame et laisser sécher à plat sur un support, soit pendant 24 heures à la température ambiante soit pendant 1 heure à l'étuve à 37 °C.
- Déshémoglobinsation: recouvrir abondamment la GE du mélange : Giemsa : 3 gouttes, eau neutre : 2 ml et laisser agir pendant 5 a 10min (Deluolet *al.*, 1998).
- Coloration au Giemsa.
- Sortir la GE de l'eau, égoutter, verser sur toute la lame la solution de Giemsa et laisser colorer 20min au moins (Petithoryet *al.*, 2001).
- La lame est enfin rincée puis séchée à l'air (Trudel, 2005).

II.4.1.4-Association GE/FS sur une même lame :

-technique : elle consiste à :

Recueillir au centre de la lame une petite goutte de sang et faire le frottis. Bien sécher par agitation, recueillir ensuite une grosse goutte de sang au centre de la partie inoccupée de la lame et faire une goutte épaisse et laisser sécher à plat.

-coloration :

- fixer d'abord le frottis à l'alcool méthylique, laisser sécher.

- hémolyse la GE : en plongeant la lame dans un borrel contenant juste assez d'eau pour recouvrir GE et non frottis. laisser sécher, colorer ensemble avec la solution de Giemsa (Petithory *et al.*, 2001).

II.4.1.5- la technique de leucoconcentration à la saponine

Intérêt : la leucoconcentration est une technique de concentration des microfilaires. Elle permet de conserver vivants ces parasites à l'état frais (Menan, 2016).

Technique : Elle consiste à :

- Mettre dans un tube à centrifuger conique : 5 ml de sang citraté
- Ajouter 10 ml de sérum physiologique et mélanger par retournement du tube
- Ajouter quelques gouttes de saponine à 2% jusqu'à l'obtention d'un sang rouge laqué
- Retourner le tube plusieurs fois et s'assurer que l'hémolyse est complète (le liquide au niveau du cône doit être limpide)
- Laisser reposer 5 min
- Centrifuger à 1500 tours/mn pendant 10 min
- Rejeter le surnageant et recueillir à l'aide d'une pipette Pasteur le culot qui renferme les leucocytes et les parasites vivants.
- Examiner le culot entre lame et lamelle et après coloration au Giemsa (Iyane Sow, 2008).

II.4.1.6- Quantitative Buffy-Coat (QBC) :

La technique du *Quantitative Buffy-Coat* (QBC) proposé par la firme Becton Dickinson Diagnostics, repose sur le principe de la concentration des parasites par centrifugation du sang dans un tube à hématocrite dont les parois sont recouvertes d'acridine orange et d'oxalate de potassium. L'examen porte sur un volume de 55 à 65 ul de sang récolté à la pulpe du doigt ensuite, le tube est scellé à une extrémité tandis qu'un flotteur cylindrique est introduit à l'autre extrémité.

Une centrifugation à 12 000 tours par minute pendant 5 minutes sépare les éléments figurés du sang en fonction de leur densité, formant ainsi des bandes distinctes.

Comme le flotteur occupe environ 90% de la lumière du tube, la zone comprenant le haut de la bande des globules rouges et la bande des globules blancs, c'est-à-dire la zone où se concentrent les parasites, est élargie d'environ 10 fois. Après centrifugation, le tube est placé sur un porte tube spécial et examiné en microscopie à fluorescence pour recherche des parasites.

Ce procédé initialement prévu pour la recherche des plasmodies, puisque les hématies parasitées sont moins denses que la normale et se concentrent juste en dessous des leucocytes, a pu également être testé sur les trypanosomes (Frezil, 1995).

II.4.1.7-Triple centrifugation :

Intérêt : technique de recherche des trypanosomes (Menan, 2016).

Technique :

- le prélèvement de 20 ml est placé dans tube à centrifuger.
- une première centrifugation s'effectue à 1500 tr/min pendant 10 min.
- le plasma est décanté, placé dans un tube à centrifuger et une deuxième centrifugation est effectuée dans la même condition.
- le plasma est à nouveau décanté et une troisième centrifugation est effectuée à 3000tr/minute pendant 20min.
- le culot est examiné après chaque centrifugation entre lame et lamelle [5].

II.4.2-Méthode indirecte :

- Méthodes immunologiques : l'immunofluorescence indirecte, l'hémagglutination, les tests de précipitation, immunodiffusion et électrosynérèse), la méthode immuno-enzymatique (ELISA) ont été appliqués au dépistage sérologique du paludisme (Bayo, 2001).

III-Examen parasitologique d'une biopsie de la muqueuse rectale (BMR) :

III.1-Méthode

Un lavement évacuateur ou un laxatif doux, la veille de l'examen, sont indiqués mais ne sont pas indispensables en enquête de masse.

Le sujet est placé en position genu-pectorale et le rectoscope, lubrifié, est introduit dans le rectum.

La biopsie peut être effectuée, soit sur la paroi antérieure du rectum, soit sur le bord libre d'une valvule de Houston, soit au niveau d'érosions punctiformes, lorsqu'elles existent. On obtient ainsi un petit fragment de muqueuse, de 1 mm environ de diamètre. Une partie ou la totalité en est déposée sur une lame (éventuellement, dans une goutte de gomme au chloral qui éclaircit la biopsie) et écrasée à l'aide d'une autre lame qui sera laissée en place.

III.2-Résultat :

La B.M.R permet de retrouver aisément les œufs de *Schistosoma mansoni*, de *Schistosoma japonicum*, de *Schistosoma intercalatum*, dans de très nombreux cas, les œufs de *Schistosoma haematobium* (Tandia, 2006).

IV-Examens parasitologiques d'une ponction de moelle osseuse

Ces examens sont indiqués dans les cas de : *Leishmaniose viscérale*, *Trypanosomes africaines*.

La recherche des parasites s'effectue sur un frottis de moelle coloré au MGG.

Le cas de la Leishmaniose viscérale, les parasites sont intra ou extracellulaires ; ils sont souvent peu abondants ce qui nécessite une recherche prolongée (Larivière *et al.*, 1987).

V-Examens parasitologiques d'un tissu mou (foie, rate) :

La biopsie prise avec une pince est légèrement pressée à plusieurs endroits sur une lame porte-objet. On obtient ainsi des tâches de cellules sur la lame. Après séchage, et fixation au méthanol, la préparation est colorée comme un frottis sanguin, au Giemsa ou au MGG. Cette technique est principalement utilisée pour la recherche de *Leishmania* sp (Gillet *et al.*, 2008).

VI-scotch test de Graham:

Cet examen est indiqué pour la recherche d'oxyurose (*Enterobius vermicularis*) et de cestodose à *Taenia* sp (Durand *et al.*, 2005).

VI.1-Conditions du prélèvement :

Le prélèvement doit être effectué le matin avant toute toilette ou défécation ; le scotch doit être transparent et adhésif et le praticien doit être une personne ayant compris les nécessités techniques de la méthode (Kvitko MA *et al.*, 1979 in El Tahiri, 2008).

VI.2-Technique: Elle consiste à :

- Faire pencher le malade en avant, et écarter les fesses de manière à bien déplier les plis anaux.
- Appliquer le morceau de scotch sur tous les plis autour de l'anus.
- Appliquer le scotch sur la lame et y inscrire le nom, le prénom et la date de naissance du patient.
- Faire parvenir au laboratoire dans les meilleurs délais [7].

VII-Examen parasitologique des urines :

Cet examen est indiqué pour la recherche des œufs de *Shistosoma haematobium* parfois de *shistosoma mansoni*, *Trichomonas vaginalis* [3] et microfilaires dues à une filariose lymphatique (*Wuchereria bancroftii* *Brugia* sp) (Pierson, 2001).

Technique :

Examen direct : observer les éléments macroscopiques.

Examen après centrifugation : utilise une grande quantité d'urine (urine de 24h), laisser sédimenter puis centrifuger à 2500tr/mn pendant 10min.

Cas particulier : *Trichomonas vaginalis*

Examen à l'état frais plus frottis colorés au Giemsa ou MGG [3].

VIII-Examen parasitologique du suc ganglionnaire :

Il consiste à recueillir par ponction, à l'état frais et après coloration au Giemsa pour la recherche de trypanosomes ou de toxoplasmes (Aubry et Gaüzère, 2015).

IX-Examen parasitologique de l'expectoration (crachats) :

Il consiste pour la recherche d'œufs de parasites comme *Paragonimus* sp (Aubry et Gaüzère, 2015).

IX.1-Coloration au RAL-555 :

Technique plutôt utilisée pour la recherche de *Pneumocystis jiroveci* dans un produit de lavage alvéolaire ou dans une biopsie ou une ponction pulmonaire. Cette coloration permet de mettre l'intérieur des kystes en évidence. Elle peut être remplacée par une coloration au Giemsa (identique à celle d'un frottis sanguin).

IX.2-Coloration au Bleu de toluidine O :

Technique plutôt utilisée pour la recherche de *Pneumocystis jiroveci* dans un produit de lavage alvéolaire ou dans une biopsie ou une ponction pulmonaire. Cette coloration permet de mettre les parois des kystes en évidence (Gillet *et al.*, 2008).

X. Examen parasitologie des liquides céphalorachidiens (LCR) :

X.1-Examen direct :

Rarement, des parasites mobiles peuvent être retrouvés à frais, lors de la numération des leucocytes du L.C.R. Il peut s'agir de trypanosomes, indiquant alors un stade II de la

trypanosomiase, des trophozoïtes amiboïdes de *Naegleria* ou d'*Acanthamoeba* sp. (qu'il ne faut pas confondre avec des macrophages, mobiles également par leurs pseudopodes).

X.2-Examen après centrifugation :

Il consiste à centrifuger quelques millilitres de LCR pendant 10 min à 3.000 rpm dans un tube à centrifuger à fond conique. Décanter délicatement le surnageant, sans toucher le sédiment (invisible si la cellulorachie est basse). Le surnageant peut être utilisé pour la détermination de paramètres biochimiques (glycorachie, protéinorachie, etc.). Le culot de centrifugation, remis en suspension dans la dernière goutte du surnageant est déposé sur une lame, recouvert d'une lamelle et est examiné complètement et systématiquement au microscope pour rechercher des agents pathogènes mobiles (confirmation à l'objectif 40 x).

Une coloration au Gram, au bleu de méthylène, à l'encre de Chine ou au Giemsa du sédiment peuvent aussi être utiles pour détecter d'autres agents pathogènes ou pour identifier la nature des cellules présentes.

X.3-Examen après double centrifugation :

La sensibilité de la recherche des trypanosomes dans le LCR peut être améliorée par une double centrifugation. Cette méthode consiste à centrifuger quelques millilitres de LCR pendant 10 minutes à 3.000 rpm dans un tube à centrifuger à fond conique. Décanter délicatement le surnageant, sans toucher le sédiment. Le culot de centrifugation, remis en suspension dans la dernière goutte du surnageant est aspiré dans un ou deux tubes capillaires à hématocrite. Sceller à la flamme l'extrémité qui n'est pas entré en contact avec le LCR et centrifuger les micro-capillaires (Centrifugation de 5 minutes à 12.000 rpm). L'extrémité inférieure des capillaires bouchés est examinée sous microscope (Gillet *et al.*, 2008).

CHAPITRE II
DIAGNOSTIC MYCOLOGIQUE

Les mycoses, situées au premier rang des infections cutanées, représentent une pathologie fréquemment évoquée en pratique dermatologique. Mais porter un diagnostic clinique est souvent difficile, car plusieurs affections cutanées peuvent se présenter sous un même aspect sémiologique alors qu'elles nécessiteront des traitements différents (O S F D et A D, 2005).

1-Objectifs de l'examen mycologique :

L'objectif de l'examen mycologique est :

- de mettre en évidence le (ou les) Champignon(s) à l'état parasitaire « **examen direct** » dans les tissus, mucosités, liquides biologiques, etc. ... prélevés correctement et en quantité suffisante chez le patient « **prélèvement** ».
- d'isoler et d'identifier le (ou les) Champignon(s) impliqué(s) « **cultures** ».
- de savoir utiliser les outils techniques nécessaires à leur mise en évidence et leur identification dans les produits pathologiques (Hadji *et al*, 2013).
- de confirmer l'origine mycosique.
- d'éliminer les diagnostics différentiels.
- de connaître l'origine de contamination.
- d'adapter le traitement (Anane, 2008).

2-Avant le prélèvement :

- Faire un interrogatoire détaillé : notion de voyage récent en zone tropicale, métier exercé, animaux de compagnie, loisirs (piscine, cheval).
- s'assurer que le malade n'est pas sous traitement antifongique local ou général. Si c'est le cas, arrêter le traitement et attendre au moins une semaine avant d'effectuer le prélèvement.
- La suspicion d'une mycose d'importation doit être signalée au biologiste car des précautions particulières de manipulation des échantillons et des cultures doivent être impérativement respectées (Raoult, 2013).

3-Prélèvement

3.1 Prélèvements des mycoses superficielles :

Le préleveur (clinicien ou biologiste) doit connaître parfaitement la séméiologie des dermatophyties afin de réaliser le prélèvement approprié aux lésions observées.

Pour les teignes du cuir chevelu, le prélèvement sera précédé d'un examen sous lampe de Wood dans une pièce où l'obscurité est totale. Une fluorescence verte orientera le diagnostic vers une teigne tondante microscopique ou une teigne favique (Boucharaet *al.*, 2004).

3.1.1 Prélèvement des ongles : le prélèvement consiste à :

Nettoyer l'ongle avec de l'alcool à 70°, de manière à éliminer les contaminants et laisser sécher. Couper toute la partie de l'ongle atteint avec la pince et/ou les ciseaux jusqu'à la limite de l'ongle sain et l'éliminer puis gratter au cœur de la lésion avec la curette de Brocq. En cas d'onychomycoses superficielles, racler les îlots blanchâtres à la surface de l'ongle (leuconychies) à l'aide d'une curette de Brocq. Récolter les divers prélèvements dans une boîte de Pétri stérile [1]. En cas de périonyxis, une légère pression est exercée sur la tuméfaction située au niveau de la zone matricielle et du repli sus-unguéal pour faire sourdre du pus qui sera récupéré à l'écouvillon stérile (Sbay, 2010).

3.1.2 Prélèvement du cuir chevelu

On procède à :

- Examiner les cheveux sous une lampe de Wood.
- Arracher avec une pince à épiler les cheveux fluorescents (cas des teignes microsporiques et faviques). Sinon, prélever les cheveux cassés à la loupe à proximité du bulbe.

Pour les squames, il faut :

- Gratter les squames et les croûtes éventuelles en raclant à la curette.
- Puis frotter avec une compresse stérile.
- Recueillir les échantillons dans une boîte de Pétri.

En cas de lésion inflammatoire suppurée, prélever le pus avec un écouvillon (Piarroux, 2015).

3.1.3 Prélèvement de la peau :

▪ Lésion cutanée :

- Lésions sèches: recueillir les squames par grattage à l'aide d'une curette ou de la lame d'un scalpel au niveau de la bordure ou périphérie de la lésion, là où le champignon est le plus abondant (le centre de la lésion étant en voie de guérison). Les produits biologiques sont récupérés dans un récipient stérile (boîte de Pétri). En cas de folliculite, des poils et du duvet peuvent aussi être prélevés à la pince à épiler.

- Lésions suintantes: recueillir le pus ou l'exsudat avec 2 écouvillons (un pour l'examen direct, un pour la culture).

- Lésions discrètes et squames peu abondantes: prélever à l'écouvillon et appliquer un ruban adhésif sur la lésion puis le retirer d'un coup sec pour l'examen direct. Cette méthode, appelée le scotch test, est surtout utilisée pour le diagnostic de Pityriasis versicolore (Chabasse *et al.*, 1999).

3.1.4 Muqueuses : Deux écouvillons sont nécessaires : l'un pour l'examen direct à l'état frais, l'autre est mis en culture sur milieu de Sabouraud (Benchellal *et al.*, 2011 ; Pihet *et al.*, 2013).

3.1.5 Biopsies: examen plus rarement utilisé, pour recueillir des fragments tissulaires (Chabasse *et al.*, 1999).

3.2 Prélèvement des mycoses profondes

Pour les urines, le LCR, les selles, et autres liquides de ponction ou d'aspiration, ces prélèvements feront l'objet d'un examen à l'état frais à partir de leurs produits de centrifugation, un frottis sur lame porte-objet est effectué avec coloration de préférence au MGG. Pour le LCR, l'application de l'encre de chine est indispensable en cas de suspicion de cryptococcose. Les modalités du prélèvement dépendent de la localisation des lésions. En outre, les produits pathologiques devront être acheminés au laboratoire et y être traités le plus rapidement possible. Le laboratoire indiquera donc aux services cliniques les protocoles de prélèvement et les conditions de transport des prélèvements (Aoufi, 2005) (Tableau 01).

4-Examen Direct :

C'est une étape importante et obligatoire. Il permet de visualiser le champignon et de s'orienter sur son identité et son abondance et des fois de poser le diagnostic, la plupart des prélèvements contenant de la kératine, qui est opaque donc, empêche l'observation des champignons (Aissaoui, 2016).

Intérêt : L'examen direct permet de :

- fournir rapidement un rapport préliminaire au médecin;
- détecter une infection fongique en l'absence d'une culture positive;
- faciliter l'interprétation du résultat de la culture (Dufresne, 2014).

Tableau 01 : Différents Types des prélèvements profonds selon la localisation des mycoses (Aoufi ,2005).

Localisations des mycoses	Types de prélèvement
Localisations broncho-pulmonaires	Lavage broncho-alvéolaire (LBA) Aspiration bronchique, Crachats
Localisations pleurale, articulaire et péritonéale.	Ponction pleurale, Liquide de ponction Liquide de dialyse, Redons et drains
Localisation cérébrales	Ponction lombaire (PL)
Septicémie	Sang ou cathéters centraux
Tissus profonds	Biopsie

4.1 Examen direct après éclaircissement :

On ajoute au prélèvement un réactif éclaircissant qui rend plus visible les éléments fongiques éventuellement présents dans les cheveux ou dans les squames. les réactifs éclaircissants utilisés sont KOH (40%) ou NaOH (20%) ou la Lactophénol. L'hydroxyde de potassium en solution aqueuse digère les débris protéinés, blanchit plusieurs pigments et

dissout le «ciment »qui retient les cellules kératines ensemble. Il permet, le cas échéant, de repérer plus facilement les hyphes lors de l'examen microscopique (Dufresne, 2014).

Le prélèvement de cheveux ou de squame est déposé sur une lame dans une goutte de réactif éclaircissant et recouverte d'une lamelle. Après 5 min, on examine la lame au microscope. Le Lactophénol est meilleur, car il conserve et ne détruit pas le prélèvement contrairement à la KOH .dans le cas d'une recherche du pityriasis versicolore, on utilise la technique du scotch test cutané. on découpe une bande de ruban adhésif (scotch) de 5 cm de long environ. On l'applique sur la lésion cutanée de telle manière que la face adhésive soit bien au contact avec la lésion décolle la bande de scotch et on l'applique sur une lame qu'on examine au microscope [2].

4.1.1 Lampe De Wood

Certains dermatophytes qui infectent l'enveloppe externe des cheveux produisent un métabolite (ptéridine) qui donne une fluorescence vert jaune lorsqu'elles sont à une lampe de Wood (366 nm). Il s'agit principalement de *Malassezia canis* et *M. audouinii*. On peut utiliser la lampe de Wood en laboratoire pour sélectionner des cheveux infectés pour la culture. (Dufresne, 2014).

4.1.2 KOH

Placer les squames ou le matériel à examiner dans une goutte de réactif KOH 10 % sur une lame. Recouvrir d'une lamelle. Laisser réagir 30 minutes; chauffer légèrement si l'on veut accélérer la digestion. Examiner au microscope. Fermer le diaphragme du condenseur pour obtenir un meilleur contraste. Utiliser un objectif 10 X pour faire un balayage de la lame. Confirmer avec un objectif 40 X (Dufresne, 2014).

4.1.3 Blanc de calcofluor

Le blanc de calcofluor est un fluorochrome non spécifique qui démontre, entre autres, une affinité pour la chitine retrouvée dans la paroi cellulaire des champignons. À l'examen au microscope à fluorescence, les champignons produisent une fluorescence vert pomme.

Cette méthode consiste à : Déposer les squames ou le matériel à examiner dans une goutte de réactif KOH 10 % auquel on a préalablement ajouté une goutte de la solution de blanc de calcofluor. Recouvrir d'une lamelle, laissé réagir pendant 10 minutes et examiner au microscope à fluorescence (Dufresne, 2014).

4.2 Examen direct après Coloration

Il n'est pas fait systématiquement, mais dans certaines lésions cutané-muqueuses, il peut être intéressant (candidose). On étale le prélèvement sur une lame propre. Après l'avoir fixé à la chaleur, on le colore par la technique de Gram, au Bleu de méthylène ou le Giemsa et on procède à sa lecture au microscope au fort grossissement (x 100) [2].

4-2-1 Coloration acide périodique-schiff (Pas) :

Cette technique permet de colorer certains polysaccharides retrouvés dans la paroi cellulaire des champignons (Dufresne, 2014).

5- La culture

Intérêt : La culture est un complément indispensable de l'examen direct (augmente la sensibilité de l'examen direct). en effet ; l'isolement en culture du champignon responsable et son identification (qui ne peut être réalisée par le seul examen direct ; réaliser une numération des levures) sont importants puisque le traitement peut être différent en fonction de l'espèce isolée (Nekkache et al, 2015).

Les prélèvements sont ensemencés sur divers milieux de culture. On dispose les fragments de poils ou des squames en six ou huit points à la surface des milieux de culture de géloses en tube, on touche à plusieurs reprises la surface du milieu de culture coulé en boîte de Pétri avec les poils qui a servi au prélèvement.

Les milieux utilisés sont le Milieu de Sabouraud Glucose/ le Milieu de Sabouraud + Actidione + Chloramphénicol à incuber à 27°C pendant 21 jours. Lorsqu'on suspecte une candidose, on incube ces milieux de culture à 27°C et à 37°C. [2].

Les champignons des mycoses superficielles se développent à la température du laboratoire (20°C à 37°C). Les champignons des mycoses profondes doivent être incubés à 37°C.

La durée d'incubation est variable selon le champignon.

- Les levures (2j à 7j).
- Les moisissures (2j à 10 j).
- Les dermatophytes (21 j) [2].

6-Identification

L'identification se déduit habituellement directement sur le milieu d'isolement de Sabouraud et repose sur un certain nombre de paramètres :

- La vitesse de positivité des cultures qui varie selon le champignon de 48 heures en moyenne pour les levures et les moisissures de croissance rapide comme les *Aspergillus* et les mucorales ; de 3 jours à 3 semaines pour d'autres moisissures pathogènes comme *Fusarium*, *Scedosporium* ou *Acremonium*, et de 1 à 4 semaines pour les dermatophytes.
- La thermo-tolérance du champignon et son optimum thermique de croissance.
- Les caractères macroscopiques et microscopiques des colonies (Chabasse *et al.*, 2008 ; Chabasse *et al.*, 2009).

6.1 Examen macroscopique et microscopique :

L'examen macroscopique des cultures comporte l'analyse de l'aspect macroscopique des colonies (au recto et au verso) : couleur, forme (rondes, étoilées ...), relief (plates, plissées...), caractéristiques de leur surface (duveteuse, poudreuse, granuleuse, glabre,...), consistance (molle, élastique, cartonnée,...) et taille (réduite, ou au contraire étendue). On recherchera également la présence d'un pigment diffusant dans la gélose (Goita, 2012). L'aspect microscopique (forme et taille des champignons) réalisé à partir de la méthode du drapeau de Roth dans le bleu de lactophénol (El Hassani, 2013).

6.2 Identification d'un dermatophyte et de levure

6.2.1-Dermatophyte : il existe des techniques complémentaires et à des repiquages sur des milieux spécifiques, qui favorisent la conidiogénèse (formation des spores) et/ou la production d'un pigment caractéristique. De nombreux milieux ont été mis au point, on peut citer parmi les plus fréquemment utilisés les suivants :

- Le milieu de Borelli (milieu au lactrimel), stimule la fructification de la majorité des dermatophytes et renforce la production de pigments (rouge vineux pour *Trichophyton rubrum* et jaune pour *M. canis*).
- Le milieu à l'urée indole (gélose à l'urée de Christensen) permet de différencier la variété duveteuse de *Trichophyton rubrum* de *T. mentagrophytes var interdigitale*.
- Le milieu au Bromocrésol pourpre (BCP caséine),

- La recherche d'organes perforateurs, technique simple et peu coûteuse, qui permet de différencier les souches de *T. rubrum* de *T. mentagrophytes* (Kamil, 2015).
- Milieu Potato Dextrose Agar (P.D.A) : pour le pigment de *M. canis* (Fathallahet *al.*, 2008).

6.2.2-Les levures : Un certain nombre de tests, plus ou moins rapides sont à l'identification des *Candida* (Kamil, 2015).

Test de blastèse : il consiste à :

- Emulsionner une pointe de pipette de levures dans un tube en verre contenant un millilitre de sérum de veau.
- Mettre e à l'étuve à 37°C pendant 3 à 4 heures maximum.
- Prélever une goutte du culot et regarder au microscope entre lame et lamelle (Niang, 2001).

Test de chlamydosporulation : reposant sur une subculture de 24 à 48h à 25-28°C de l'isolat en strie profonde dans un milieu pomme de terre, carotte (PCB), bile ou Riz Agar Tween (RAT). *C. albicans* est alors identifié par la production de chlamydozoospores, structures arrondies produites à l'extrémité du pseudo mycelium. Par ailleurs, s'il y a des pseudo filaments sans présence de chlamydozoospores, il s'agit d'une levure du genre *Candida* (Pihet, 2013).

– Technique RAT ou AT.

- Couler le milieu en boîte de pétrie de 5cm d'épaisseurs du milieu doit être d'environ 5mm.
 - Ensemencer directement les levures à l'aide d'une pipette stérile, en surface et au centre de la boîte.
 - Recouvrir d'une lamelle passée à la flamme.
 - Incuber à 27°C.
 - Lire après 24 heures en posant directement la boîte sans le couvercle sur la platine du microscope.
- PCB: Plusieurs techniques possibles.
- En tube: à l'aide d'une spatule, ensemencer à partir du fond du tube, en surface, puis, arrivé au tiers de la pente, couper dans la gélose en faisant une strie jusqu'en haut de la gélose, afin d'ensemencer les levures en profondeur. Après 24 ou 48 heures d'étuve à 27°, découper à la spatule un petit cube de gélose de part et d'autre de la strie. Déposer sur une

lame avec une goutte de bleu de lactophénol. Poser une lamelle en écrasant doucement le cube de gélose. Lire au microscope.

- En boîte : couler un tube de PCB en boîte de 5cm Ensemencer à l'aide d'une pipette un peu de levures en surface. Puis terminer par 3 stries en profondeur dans la gélose Recouvrir d'une lamelle. Lire après 24 ou 48 heures d'incubation à 27°C, directement sur la platine du microscope.
- En culture sur lame: La lame est posée dans une boîte fermée hermétiquement afin d'éviter la dessiccation Mettre à l'étuve à 27°. Lire après 24 heures et 48 heures (Niang ,2001).

6.2.3- Identification des autres espèces: Les autres levures sont étudiées par des tests d'assimilation et de fermentation des sucres (El Hassani, 2013).

- Auxanogramme: étude de l'assimilation des sucres (Koenig, 1995).

la levure est incorporée dans un milieu dépourvu de sucre (milieu ynb), puis on dépose des disques de sucres a la surface de la gélose .on laisse incuber a 27 "c pendant 24 a 48 heures. L'assimilation du sucre se traduit par la croissance de la levure autour du disque correspondant.

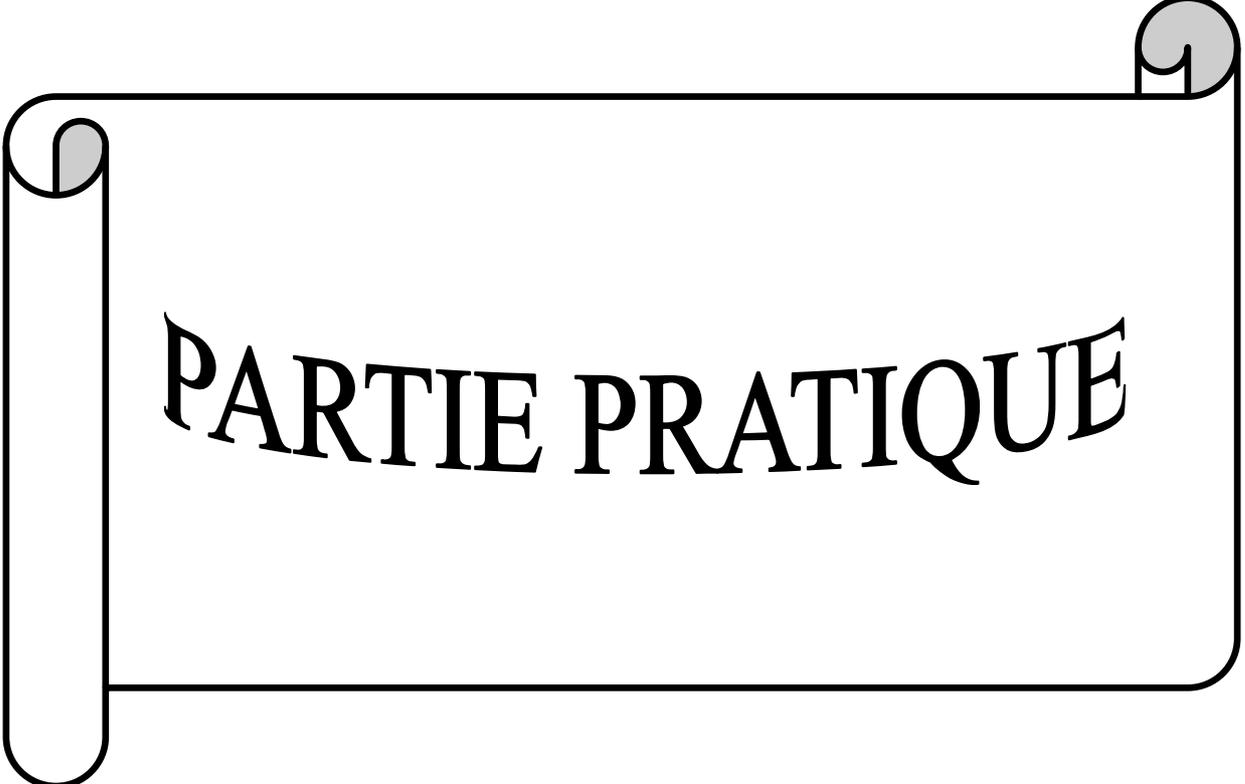
-Zymogramme : étude de la fermentation des sucres: une batterie de tube de milieu de gélose molle pour fermentation dans lesquels on introduit 1 ml du sucre a étudié (Cardinale, 2001).

- Api 20C Aux ® : elle étudie l'assimilation de 19 sucres.

-ID 32 C ® : étudie l'assimilation de 29 sucres.

-Auxacolor: utilise des réactions colorées pour la mise en évidence de l'assimilation des sucres.

-Fungichrom: associe la mise en évidence de 6 enzymes, de l'uréase, de la phénoloxydase et de la résistance de l'actidismeà L'assimilation de 7 sucres (Niang, 2001).



PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE III
MATERIEL ET METHODES

1-Objectif :

Notre travail est une étude prospective concernant les techniques parasitologiques dans la région de Guelma. En fait, après une enquête réalisée au début de notre étude dans tous les hôpitaux de la wilaya de Guelma, nous avons découverts que tous les échantillons dirigés pour la recherche des parasites dans notre wilaya sont orientés vers le laboratoire de Microbiologie au niveau de l'hôpital Ibn Zohr de Guelma.

L'objectif de ce travail est de connaître les différents techniques de diagnostic utilisées en parasitologie –mycologie au laboratoire Ibn Zohr de Guelma. En but de l'évaluation de l'efficacité de ces techniques dans la préservation de la santé public.

2. Matériel et méthodes :

2.1 Lieu et période d'étude :

Il s'agit d'une étude concernant les examens parasitologiques et mycologiques des patients adressés au niveau du laboratoire de microbiologie, paillasse de parasitologie-mycologie du Ibn Zohr de Guelma, sur une période de 2 mois allant du 12 Mars 2017 au 12 Mai 2017.

2.2 Patients :

Les sujets inclus sont des patients, de différentes tranches d'âge. Ces malades sont soit hospitalisés au niveau du Ibn Zohr (internes) soit externes (orientés pour examen parasitologique des selles ou examen mycologique ou leishmaniose ou examen des urines).

2. 3 Diagnostic parasitologique :

2.3.1 Matériel et réactifs du laboratoire :

➤ Matériel :

- Le matériel utilisé ;
- Récipient propre ;
 - pipette pasteur ;
 - Lame et lamelle ;
 - Micropipette et embouts ;
 - Microscope optique ;
 - Tubes coniques ;
 - Centrifugeuse.

-Flacons d'eau de Javel : Pour la décontamination des embouts, et des lames utilisés (Figure 01).

➤ Réactifs utilisés

-Lugol ;

-Eau physiologique ;

-Eau distillée ;

-Solution de formol

-Ether;

-Colorant Giemsa ;

-Colorant vert de malachite (Figure 02);



Figure 01 : Le matériel du laboratoire utilisé.



Figure 02 : Les réactifs utilisés

2.3.2 Examen parasitologique des selles :

✓ Le prélèvement des selles :

- Chaque patient reçoit un récipient propre et sec pour le recueil des selles matinales fraîchement émises à domicile (Figure 03).



Figure 03: Prélèvement des selles.

-Pour chaque prélèvement de selles, nous avons réalisé un examen macroscopique et un examen microscopique à l'état frais, après colorations (Lugol, Giemsa) et après concentration (technique physico-chimique de Ritchie modifiée), et méthode de kato.

✓ Examen macroscopique :

Il s'effectue à l'œil nu et il permet d'avoir une appréciation sur :

-la consistance des selles (molles, dures, pâteuses, liquides hétérogènes ou liquides homogènes).

-La couleur

✓ Examen microscopique : il comporte

❖ Examen direct :

➤ Examen à l'état frais :

La préparation à l'état frais est la technique la plus simple à mettre en œuvre pour examiner les selles.

▪ Technique :

-A l'aide d'une anse de platine, prélever des selles en superficie et en profondeur à différents endroits.

-Ces petites particules de matière fécale sont diluées dans de l'eau physiologique dans un tube à essai (la préparation ne doit pas être trop concentrée ni trop diluée).

-Ensuite, on prélève à l'aide d'une micropipette ou pipette pasteur une goutte de la dilution on la dépose sur une lame et la couvrir d'une lamelle (Figure 04).

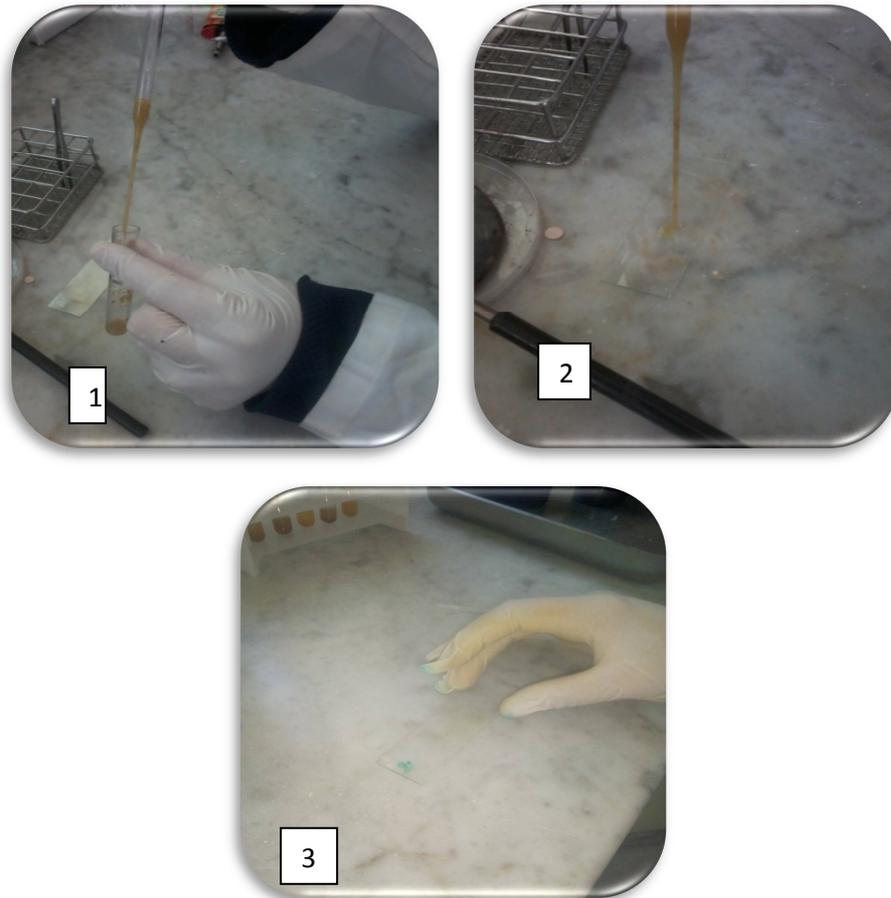


Figure 04 : Les étapes de l'examen parasitologique des selles à l'état frais

- **Lecture microscopique :**

Lire au microscope optique au grossissement x10 puis x40.

- **Examen direct après coloration :**

- **Coloration au lugol : Réactifs : Annexe 1**

- **Technique :**

La même dilution en eau physiologique préparée dans l'examen à l'état frais est utilisée dans cet examen en déposant sur une lame porte objet une goutte de cette dernière et on ajoute une goutte de la solution de Lugol et on couvre avec une lamelle.

▪ **Lecture microscopique :**

La lame est observée ensuite au microscope optique à l'objectif $\times 10$ puis $\times 40$.

○ **Coloration au Giemsa :**

▪ **Technique :**

-Réaliser un frottis fécal à partir de la dilution de la selle en eau physiologique et la déposer une goutte sur une lame puis l'étaler à l'aide d'une pipette pasteur et laisser sécher quelques min.

-Fixer à l'aide de MG pendant 3 min.

-Préparer une dilution du Giemsa avec de l'eau de robinet (9ml eau et 1ml Giemsa).

-Recouvrir les frottis par la solution diluée.

-Laisser agir 30min.

-Laver à l'eau de robinet.

-Laisser sécher les lames à l'air, en position inclinée.

▪ **Lecture microscopique :**

Les lames colorées au Giemsa sont examinées au microscope.

➤ **Examen microscopique après concentration : La technique de Ritchie simplifiée :**

▪ **Technique :**

-Dans un bécher diluer un volume de selle dans une solution de formol 10%.

- Laisser sédimenter quelques min.

- Dans un tube conique verser le surnageant.

-Ajouter l'éther au 1/3.

-Ensuite fermer le tube conique et agiter vigoureusement jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.

- Centrifuger à 1500 tours/min pendant 3 min.

-Après centrifugation, on obtient obligatoirement la formation de quatre phases et qui sont citées par ordre de haut en bas :

Une couche supérieure représentée par l'éther ;

Une couche intermédiaire faite de résidus de bactérie et de débris alimentaires ;

Une couche aqueuse faite par le formol ;

Le culot qui nous intéresse et qui contient les éléments parasitaires

- Jeter le surnageant et examiner le culot (Figure 05).

▪ **Lecture microscopique :**

Le culot est examiné entre lame et lamelle au microscope optique à l'objectif x40

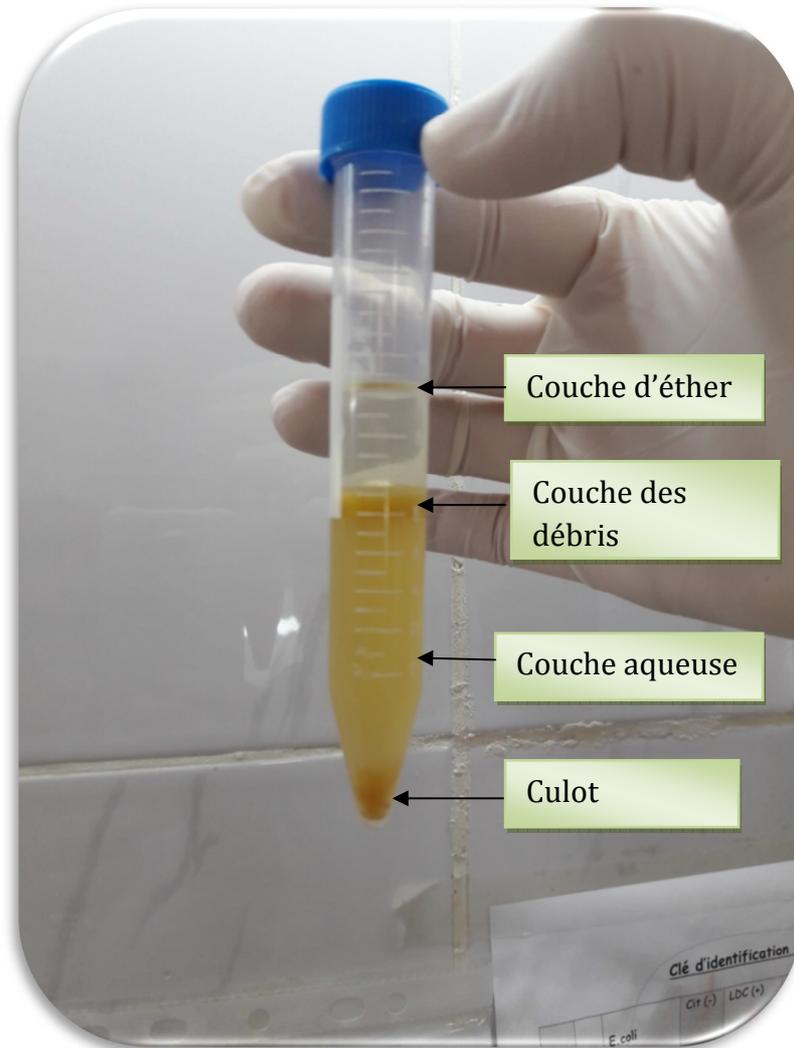


Figure 05 : Les quatre couches obtenues après centrifugation par la technique de Ritchie.

➤ **Méthode de kato :**

▪ **Technique :**

-découper des morceaux de cellophane en rectangle de 2cm×3cm et laisser séjournée 24 heures dans la solution : Glycérine 100ml, Vert malachite à 3%, Eau distillée 100ml.

-déposer un petit fragment de selle sur une lame puis recouvrir d'un rectangle de cellophane imprégné de la solution.

-Ensuite, retournée puis écrasée sur une feuille de papier absorbant.

-laisser les lames 30 à 45 min.

▪ **Lecture microscopique :**

Les lames sont examinées au microscope.

2.3.2 Scotch-test

- **Technique**

Appliquer le morceau de scotch sur tous les plis autour de l'anus, puis coupe le scotch sur la lame et y inscrire le nom, le prénom et la date de prélèvement.

- **Lecture microscopique:**

Les scotchs test ont été observés au microscope optique à l'objectif×10 puis ×40 pour la confirmation.

2.3.3 Examen parasitologique des urines :

- ✓ **Le prélèvement des urines :**

Recueillir les urines du premier jet matinal dans un tube propre.

- ✓ **Examen à l'état frais:**

- **Technique :**

-A l'aide d'une pipette pasteur prélever les urines, poser des gouttes sur une lame.

-Recouvrir la lame par une lamelle.

-Procéder à la lecture au microscope.

- ✓ **Examen après centrifugation:**

- **Technique :**

-On a versé une quantité des urines dans un tube sec.

-centrifuger (5000tours/min).

-A l'aide de l'ance de platine étaler le culot sur les lames.

-Sécher les lames à l'aide de bec benzène.

-Examiner le culot directement et après coloration MGG.

-Procéder à la lecture au microscopique.

2. 4 Diagnostic mycologique :

2.4.1 Matériel et réactifs du laboratoire :

- **Matériel :**

Le matériel utilisé :

-Anse de platine.

-Bec benzène.

-Boîtes pétri.

-Ecouvillons

- Etuve
- lames et lamelles
- Micropipettes
- Microscope optique

➤ **Réactifs :**

- Eau oxygénée ;
- Eau physiologique ;
- Bleu de méthylène ;
- Huile de paraffine ;
- KOH ;
- Vert de malachite ;

➤ **Milieux de culture :**

- Sabouraud simple
- Sabouraud chloramphénicol
- Sabouraud chloramphénicol actidione

2.4.2 Les prélèvements :

Les prélèvements sont effectués au laboratoire par un médecin parasitologue, qui réalise plusieurs types de prélèvement et ceci selon la localisation des lésions :

-Cuir chevelu : on prélève à l'aide d'un vaccinostyle les cheveux suspects et les squames du cuir chevelu et on met dans une boîte de pétri (Figure 06).

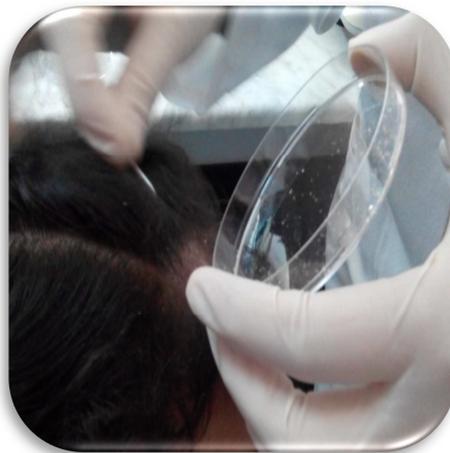


Figure 06 : prélèvement du cuir chevelu en vue de l'examen mycologique

-Les ongles des pieds et des mains : nettoyer l'ongle avec de l'eau oxygénée ou l'alcool et laisser sécher couper toute la partie de l'ongle atteint jusqu'à la limite de l'ongle sain puis gratter l'ongle avec vaccinostyle et récolter les débris dans une boîte de Pétri stérile.

Dans le cas des lésions inflammatoires ou suppurées, on prélève la sérosité à l'aide d'un écouvillon de coton.

2.4.3 Examen direct :

➤ Technique :

L'examen direct a été fait comme suit :

Une partie des squames prélevées (ongle ou cuir chevelu) a été placée au centre d'une lame sur laquelle a été déposée 2 à 3 gouttes de KOH et on le recouvre par une lamelle. Flambée très doucement au bec benzène. Puis on examine au microscope (Figure 07).

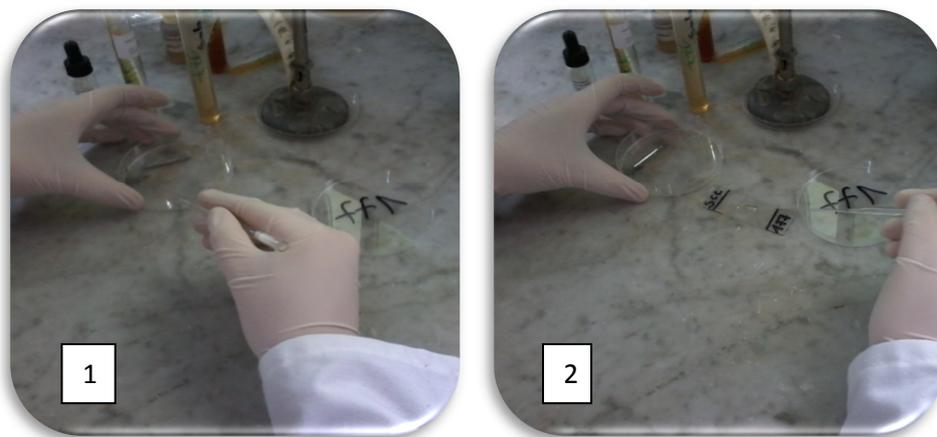


Figure 07 : Les étapes de l'examen direct (cuir chevelu, ongle)

2.4.3-La culture :

Pour chaque prélèvement, trois milieux de cultures ont été utilisés :

- Sabouraud simple
- Sabouraud + Chloramphénicol
- Sabouraud + Chloramphénicol + Actidione

➤ Technique :

A l'aide d'une pipette pasteur procéder à l'ensemencement (faire des points en zigzag) du reste des prélèvements précédent. Les tubes sont incubés pendant 1 à 4 semaines dans l'étuve à 27°C (Figure 08).

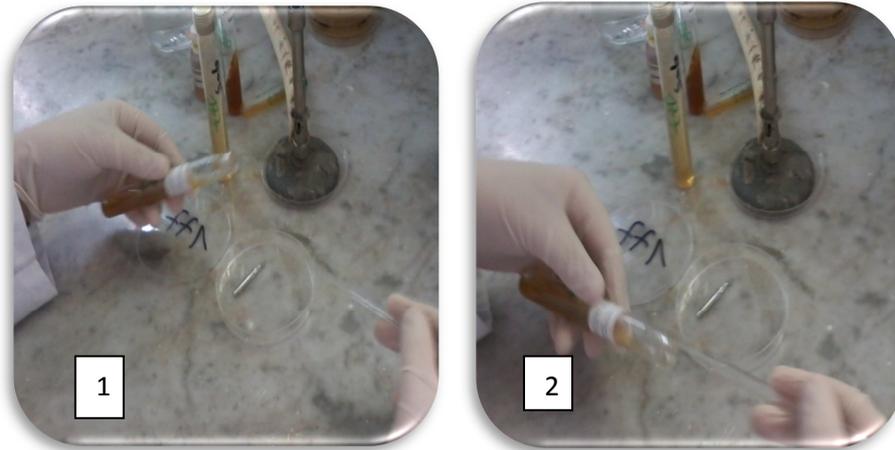


Figure 08 : Les étapes de la préparation un culture en mycologie

2.4.3-Identification

Elle repose sur :

- l'aspect macroscopique des colonies : forme, aspect, dimensions, couleur, pigment, vitesse de croissance.....etc.
- l'aspect microscopique : forme, dimension, ramification, pigmentation, formation de cloisons, des organes de fructification (Figure 09).

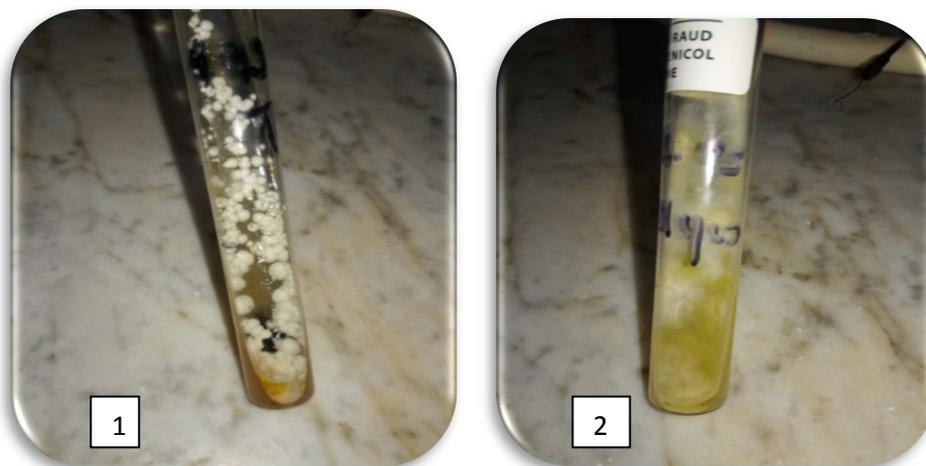


Figure 09: l'aspect macroscopique au recto verso des cultures des champignons sur sabouraud en tubes.

Pour l'identification on a réalisé les techniques suivantes :

- ❖ Technique de drapeau : dans notre étude on a utilisé le bleu de méthylène et la verte malachite. Le déroulement des étapes doit se faire juste près du bec benzène :

- Couper une bande adhésive et coller cette bande sur une pipette pasteur (forme de drapeau).
- Rentrer la pipette dans le tube, et coller le scotch sur le milieu qui contient des colonies.
- A l'aide d'une autre pipette pasteur poser une goutte de bleu méthylène sur une lame.
- Poser la bande scotch sur le bleu méthylène.
- Nettoyer les bords de la lame avec une compresse.
- lecture au microscope (Figure 10).

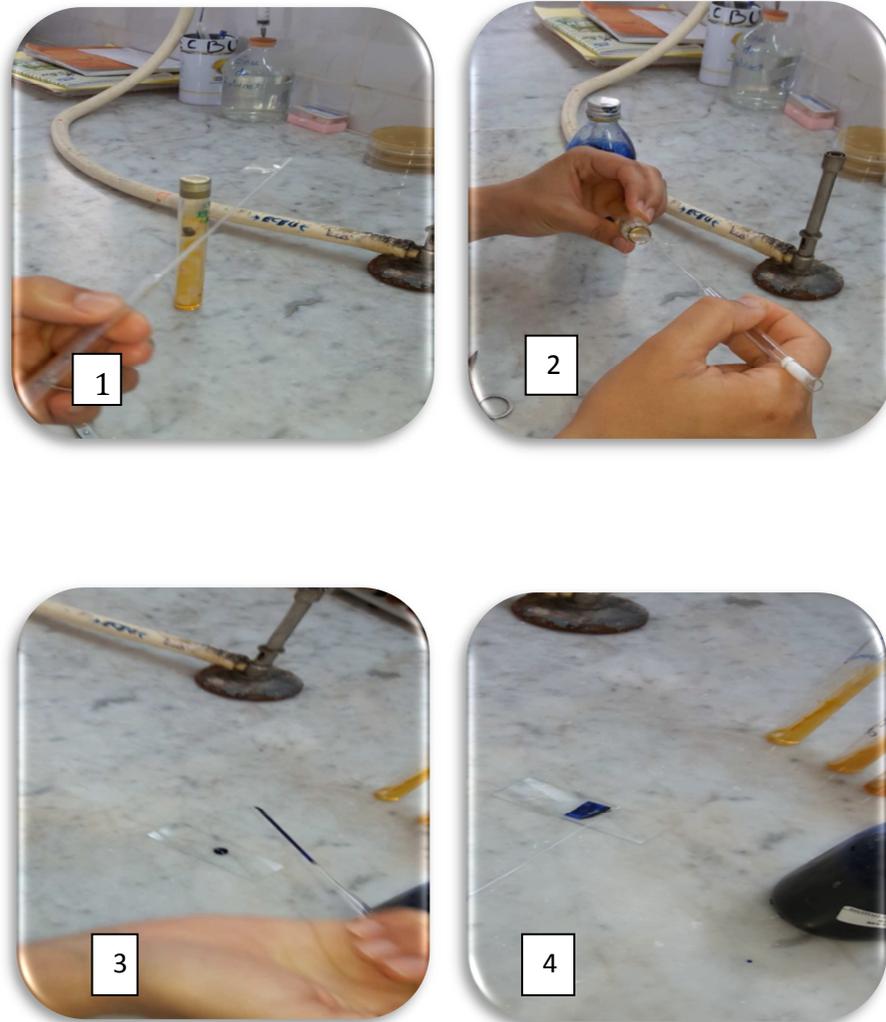


Figure 10 : Les étapes du test de drapeau

❖ Repiquage sur deux types de milieux ; les milieux RAT et DTA.

-A l'aide d'une pipette pasteur pointue et stérile, prendre quelques colonies des champignons.

-Poser les colonies sur les milieux dans une boîte de pétri.

-Incuber les boîtes à 27 °C (Figure 11).

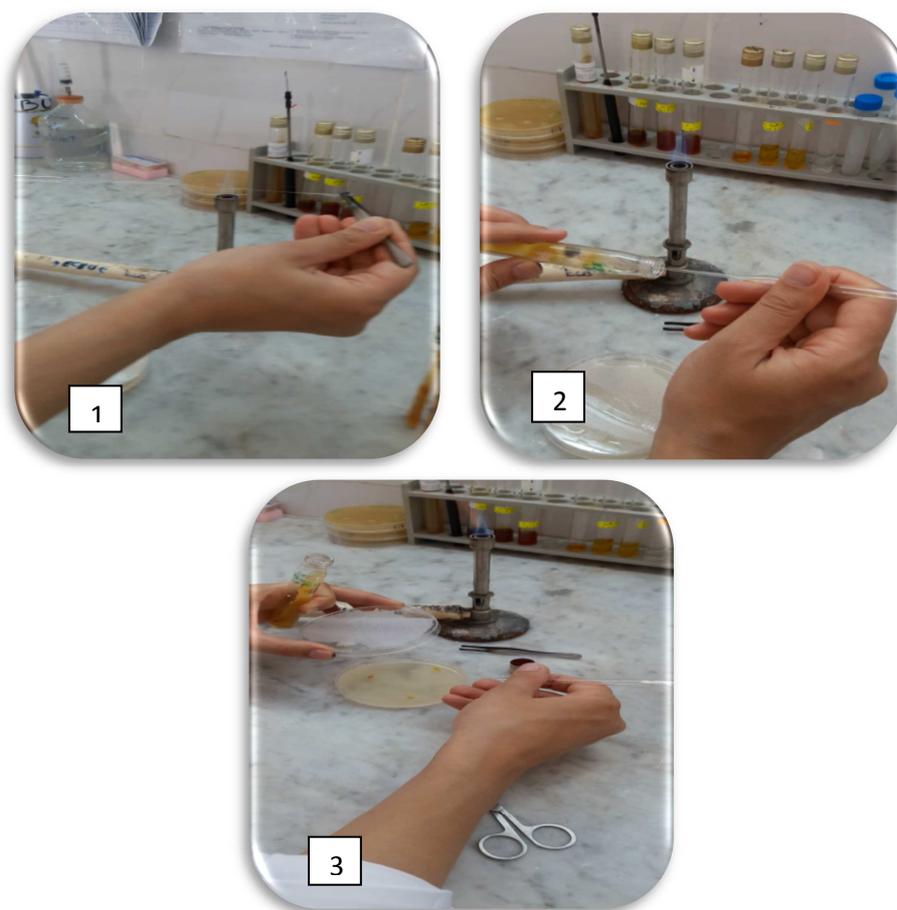


Figure 11 : Les étapes du repiquage sur le milieu PDA.

2.5 Diagnostic de la leishmaniose cutanée :

➤ **Matériel :**

-lame bistouri.

-pince.

-lamelle.

➤ **Réactif :**

-colorant MGG.

Prélèvement - Désinfecter de site du prélèvement à l'aide de l'eau oxygénée et une compresse à l'aide d'une pince soulever la croûte ; en cas de saignement, éponger à l'aide d'une compresse.

-Gratter les bords internes et le fond avec une lame de bistouri.

- Faire des frottis les plus minces possibles sur 2 à 4 lames (Figure 12).



Figure 12 : Les étapes du prélèvement de la leishmaniose cutanée.

Coloration : En utilisant la coloration de MGG.

- La fixation : placer les frottis horizontalement sur un support dans une cuvette et verser 15 à 20 gouttes de colorant May Grünwald de façon à recouvrir totalement la lame. Attendre 03 minutes.

-Rinçage avec de l'eau neutre

-Coloration au Giemsa ; Diluer le Giemsa immédiatement avant l'utilisation. Verser le contenant sur les lames prêtes, laisser agir 30 minutes et rincer à l'eau neutre.

-Séchage : laisser les lames sécher à l'air.

-Les lames sont examinées au microscope.

CHAPITRE IV

RESULTATS

Notre travail vise à connaître les différentes techniques de diagnostic utilisées en parasitologie –mycologie au laboratoire Ibn Zohr de Guelma.

Pendant une période de 02 mois et 8 jours allant du 12 mars au 20 mai, le laboratoire a reçu les prélèvements de 92 patients répartis comme suit :

- 38 prélèvements soit 41,30% pour l'examen des selles.
- 03 prélèvements soit 3,26% pour l'examen du scotch test.
- 12 prélèvements soit 13,4% pour l'examen des urines.
- 10 prélèvements soit 10,86% pour la recherche de leishmanies.
- 29 prélèvements soit 31,52% pour l'examen mycologique.

En fait, on note que la majorité des prélèvements sont effectuées pour l'examen parasitologique des selles avec un pourcentage 41.30%.

1- Examen parasitologique des selles

1-1 Type de consultation :

Notre travail porte sur un échantillon de 38 malades dont 14 représentent les patients consultant en externe et 24 patients hospitalisés au niveau de l'hôpital Ibn Zohr : service d'infectiologie (patients internes).

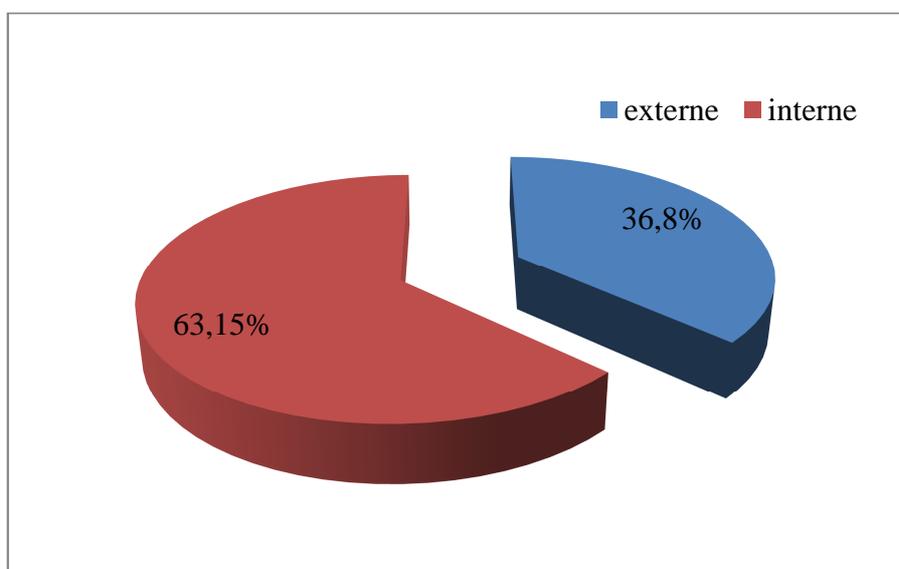


Figure 13 : Répartition des patients étudiés selon le type de consultation.

On remarque que les patients hospitalisés sont plus nombreux que ceux externes avec un pourcentage de 63,15% (Figure 13).

1-2 Fréquence des cas positifs selon l'examen parasitologique des selles

Parmi les 38 sujets examinés, 07 cas (18,42%) sont porteurs de parasites intestinaux (Figure 14).

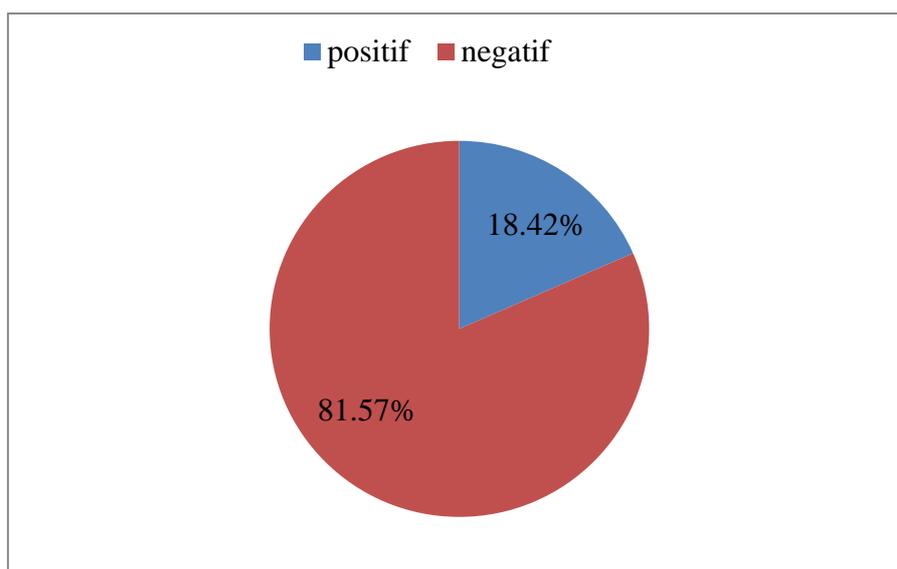


Figure 14: Fréquence des cas positifs concernant l'examen parasitologique des selles.

1 -3 Les techniques utilisées pour l'examen parasitologique des selles:

04 types d'examens ont été utilisés pour la découverte des parasites dans les selles :

- L'examen direct : les selles de tous les patients (38) ont subi un examen direct
- la technique de Ritchie a été utilisée pour 19 patients.
- la coloration au lugol a été utilisée pour 12 patients
- la Technique de Kato a été utilisée pour 04 patients.

a- Fréquence des cas positifs selon l'examen direct :

La figure 15 montre le taux de positivité enregistré par l'examen direct. On remarque que parmi les 38 échantillons de selles, 7 sont positifs (à savoir 18,42% de tous les échantillons).

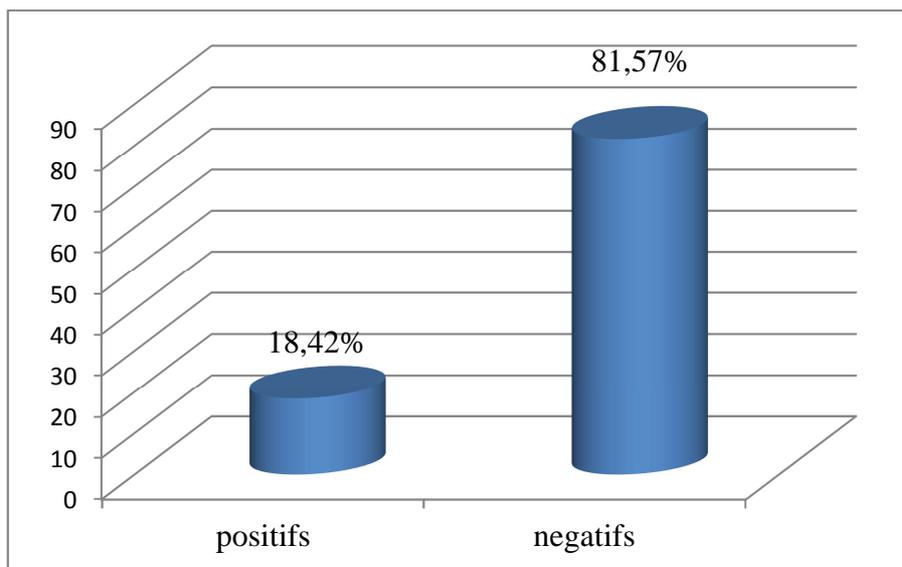


Figure 15: fréquence des cas positifs découverts selon l'examen direct.

b- Fréquence des cas positifs selon la technique de Ritchie :

La figure 16 montre le taux de positivité selon la technique de Ritchie. On remarque que la technique de Ritchie a permis de découvrir les parasites intestinaux chez 7 cas sur les 19 patients examinés (à savoir 36,84%).

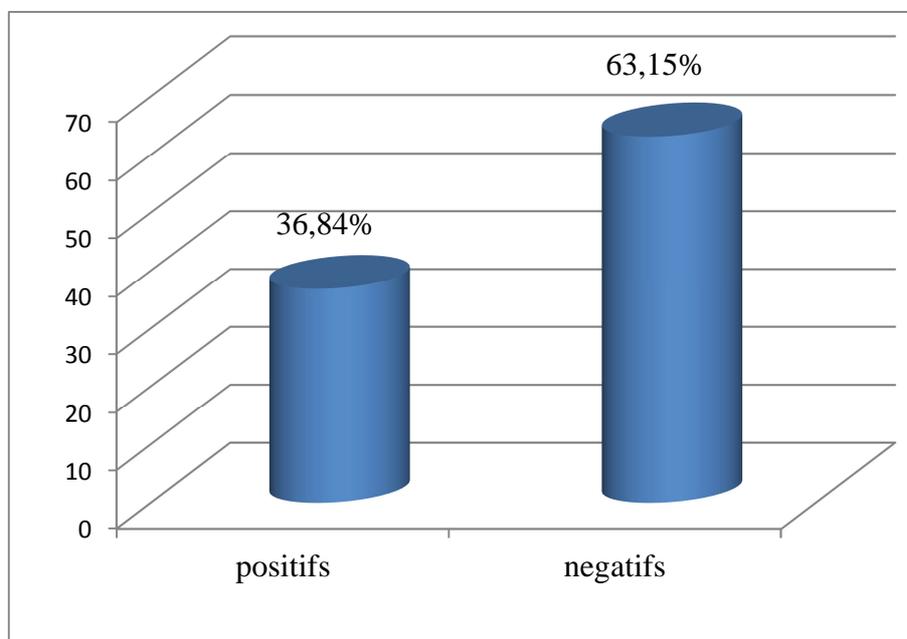


Figure 16: fréquence des cas positifs selon la technique de Ritchie.

c- Fréquence des cas positifs selon la coloration de lugol :

La figure 17 montre le taux de positivité des parasites intestinaux selon la coloration de lugol. On note que la technique de la coloration au lugol a permis d’observer les parasites intestinaux chez 3 patients sur les 12 patients examinés (à savoir 25%).

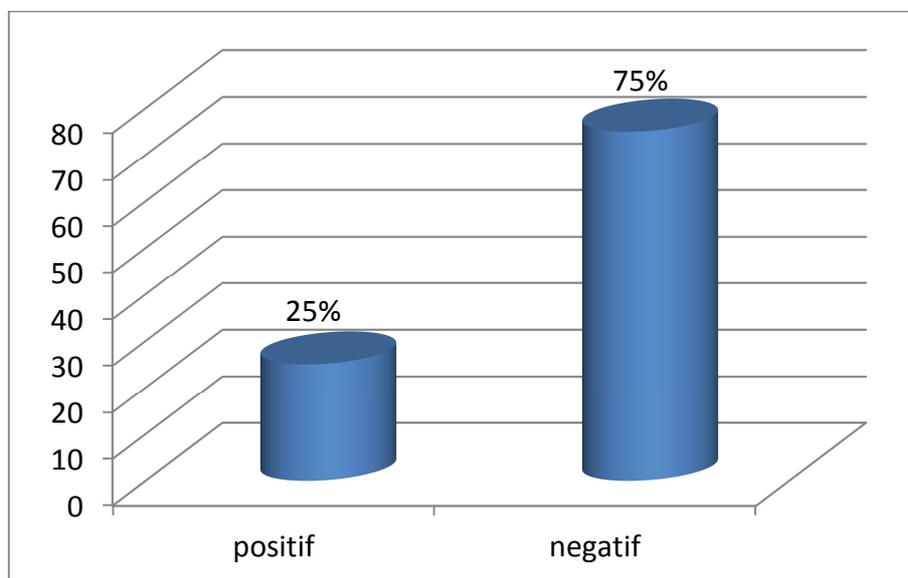


Figure 17 : fréquence des cas positifs selon la coloration de lugol.

d- Fréquence des cas positifs selon la technique de Kato :

Tous les examens des selles réalisés par la technique de Kato étaient négatifs.

2- Technique du scotch test :

Pendant toute la période de notre étude au niveau du laboratoire de Microbiologie, 03 cas seulement ont été reçus pour un examen de scotch test. Parmi ces cas un seul était positif.

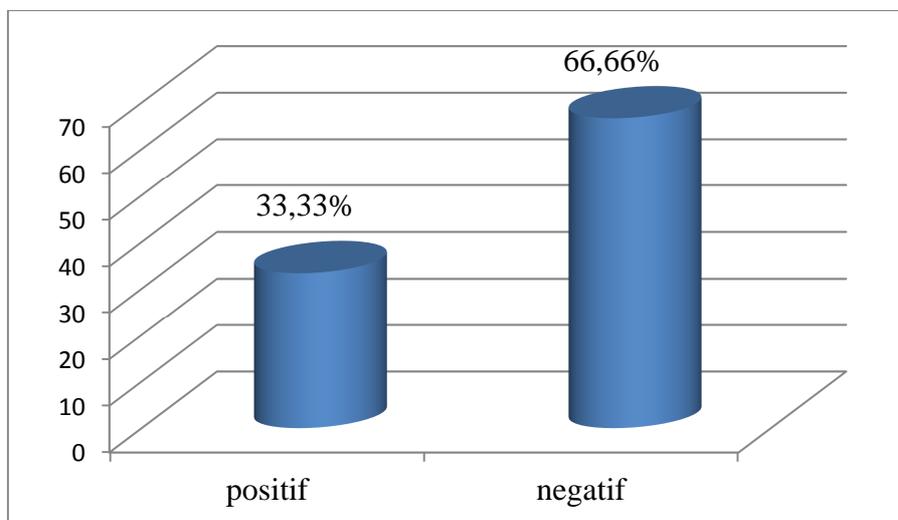


Figure 18 : fréquence des cas positifs selon la technique de scotch test.

3-Examen parasitologique des urines :

Le nombre total de prélèvements d'urine est de l'ordre de 12 effectués à titre d'externes et hospitalisés.

3-1 Fréquence des cas positifs concernant l'examen parasitologique des urines

Selon les données du tableau 02, on remarque que la majorité des prélèvements sont négatifs (83,33%). Il y a seulement 02 cas positifs (16,67%).

Tableau 02 : fréquence des cas positifs selon l'examen parasitologique des urines.

	Nombre	Pourcentage(%)
Positif	02	16,67
Negative	10	83,33
Total	12	100

3-2 Les techniques utilisées pour l'examen parasitologique des urines :

Parmi les 12 prélèvements reçus au laboratoire pendant la période de notre étude, on a réalisé les techniques suivantes pour la découverte des parasites dans les urines :

- la technique de centrifugation (02 fois),
- la coloration de MGG (02 fois)
- et l'examen direct pour tous les prélèvements.

3-2-1 Examen direct

La figure 19 montre le taux de positivité enregistré par l'examen direct. On remarque que parmi les 12 échantillons des urines, 2 sont positifs (à savoir 16,67% de tous les échantillons).

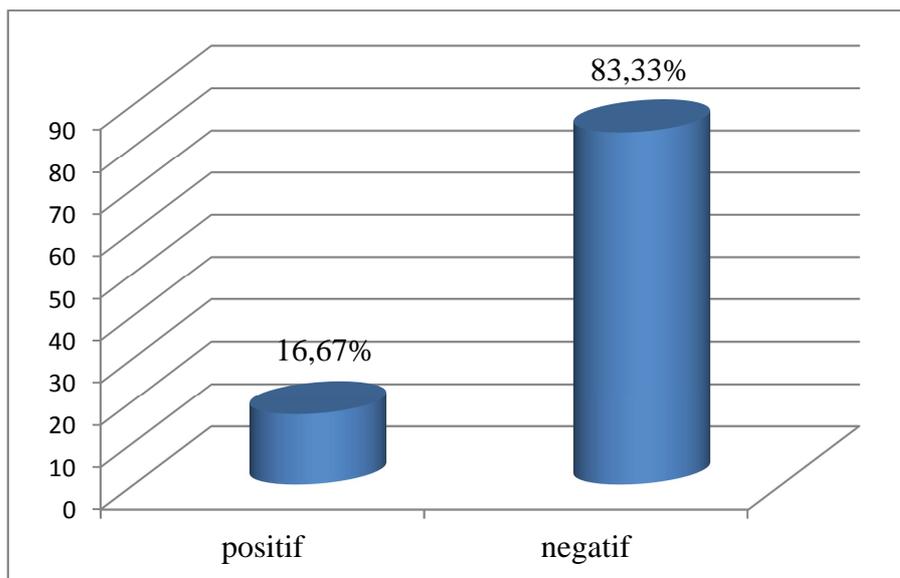


Figure 19: fréquence des cas positifs découverts selon l'examen direct.

2-3-2 Techniques de centrifugation

La figure 20 montre le taux de positivité selon la technique de centrifugation. On remarque que la technique de centrifugation a permis de découvrir les parasites chez 2 cas sur les 2 patients examinés (à 100%).

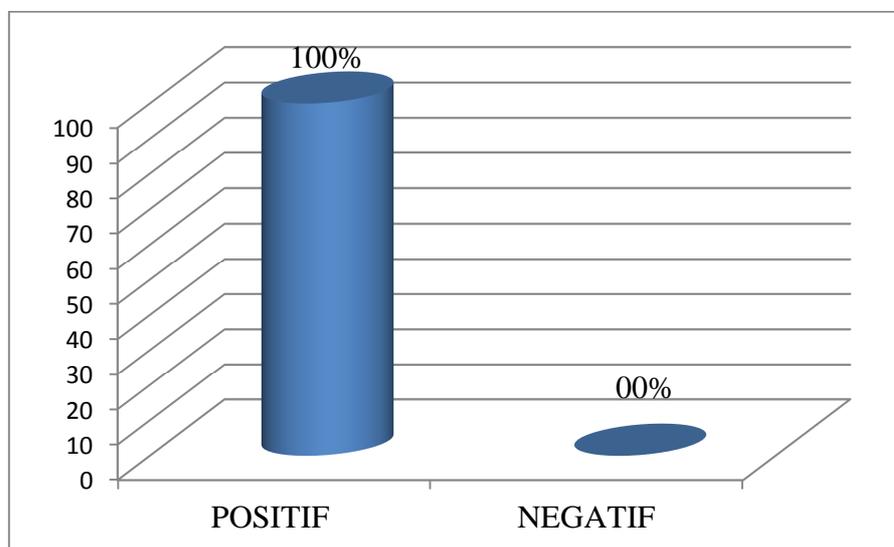


Figure 20: fréquence des cas positifs découverts selon technique de centrifugation

2-3-3 Coloration de MGG

La figure 21 montres le taux de positivité selon la technique de coloration MGG. On remarque que la technique de coloration a permis de découvrir les parasites chez 2 cas sur les 2 patients examinés (à 100%).

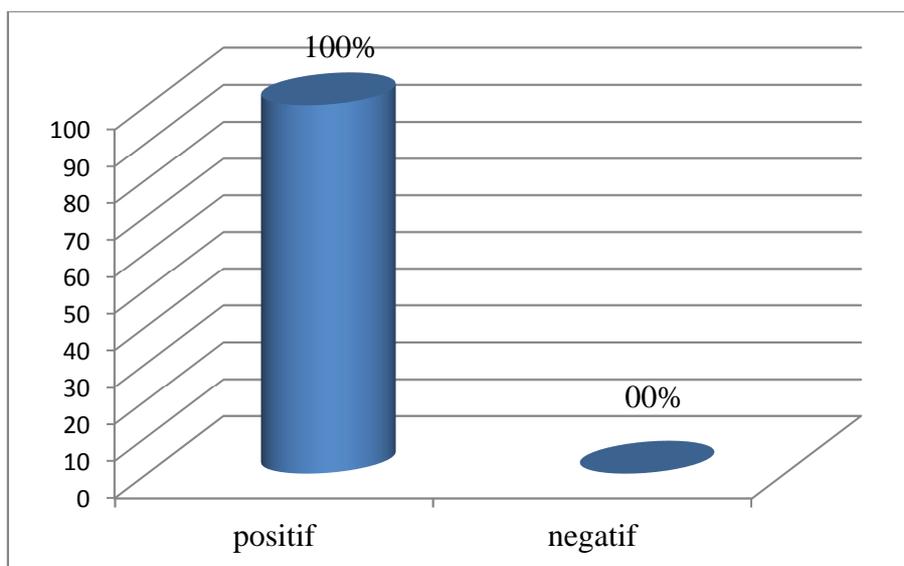


Figure 21: fréquence des cas positifs découverts selon la technique de coloration MGG

4- La recherche de leishmaniose cutanée :

10 échantillons externes ont été reçus au laboratoire de Microbiologie pour la découverte de leishmaniose cutanée. Ces échantillons ont été colorés au MGG.

Selon le tableau 03, on note que sur les 10 échantillons 04 étaient positifs (40%) et 06 négatifs.

Tableau 03: Fréquence des cas positifs dans la recherche de leishmanies.

	Coloration MGG	
	Nombre	Pourcentage(%)
Positif	04	40
Négatif	06	60
Total	10	100

5- Analyses mycologiques

5.1 Localisation des mycoses et leur fréquence

Tous les patients adressés au laboratoire pour le diagnostic biologique de mycoses sont des externes, le nombre total est de 29 prélèvements différents. Selon la localisation de la mycose, on a 13 cas pour les ongles et 16 cas pour le cuir chevelu.

Tableau 04 : Répartition des mycoses selon leur localisation.

Localisation	Nombre	Pourcentage (%)
les ongles	13	44,82
Teignes du cuir chevelu	16	55,17
Total	29	100

D'après le tableau 04, on remarque que les prélèvements du cuir chevelu sont les plus répandues dans notre série avec 16 cas soit 55.17% par rapport aux ceux des ongles (13 cas soit 44.82 %).

5.2 Techniques utilisées pour l'examen mycologique

a-Examen direct :

Le tableau 05 nous montre que pour l'examen des ongles 6 cas étaient positifs et pour l'examen du cuir chevelu on a enregistré 10 cas positifs sur 16 prélèvements.

Tableau 05: Fréquence de la positivité pour l'examen mycologique selon l'examen direct.

	Ongles	Cuir chevelu
Positifs	6	10
Négatifs	7	6
TOTAL	13	16

b-Culture :

Le tableau 06 nous montre que la culture nous a permis de découvrir la positivité de 10 échantillons sur 13 pour les ongles et 10 cas pour le cuir chevelu.

Tableau 06: Fréquence de la positivité de l'examen mycologique selon la technique de la culture.

	Ongles	Cuir chevelu
Positifs	10	10
Négatifs	3	6
TOTAL	13	16

c-Association de l'examen direct et la culture :

Tableau 07: Fréquence de la positivité des ongles et du cuir chevelu selon l'association de l'examen direct et la culture.

	Ongle	Cuir chevelu	Total
ED+ C+	6	10	16
ED- C+	04	00	04
ED+ C-	00	00	00
ED- C-	03	06	09
Total	13	16	29

Les résultats globaux des analyses mycologiques montrent que:

- L'examen direct a montré la positivité de 16 cas soit 55,17%.
- La culture a montré la positivité de 20 échantillons soit 68,96%.
- L'association des deux techniques a montré la positivité de 68.96% des cas.

CHAPITRE V DISCUSSION

Notre travail vise comme objectif à étudier et de comparer entre les différentes techniques de diagnostic utilisées en parasitologie dans le laboratoire Ibn Zohr de Guelma et ceci pendant une période de deux mois et 8 jours allant du 12 mars au 20 mai.

5.1 Type de consultation :

Parmi les patients reçus au laboratoire de parasitologie, 36.8% étaient des externes, ce chiffre est inférieur à celui retrouvé par **Benouis et al. (2012)** à Oran et dont le pourcentage des consultations externes est de 87.23% et également inférieur à celui noté par **Kasmi et Saidouni (2016)** à Tlemcen. Ces résultats discordants peuvent s'expliquer par la nature des laboratoires (CHU, EPH), ainsi que les habitudes de prescription des examens par les praticiens de ces deux régions.

5.2 Fréquence des cas positifs selon l'examen parasitologique des selles

Notre étude a estimé que 18.42% des patients étudiés sont infestés. Cette fréquence est comparable aux résultats retrouvés par **Ouraibi et Seghir (2014)** dans la région de Tlemcen où 15,14% des prélèvements étaient positifs. Elle est aussi comparable à ceux retrouvés par **Benzalim (2010)** dans la région de Marrakech (23.8%). Cependant, la fréquence des cas positifs dans notre étude est plus élevée que celle relevée par **Kasmi et Saidouni (2016)** dans la région de Tlemcen (11 %) et inférieure à celle enregistrée par **Cheikhrouhou et al (1998)** dans la région de Sfax en Tunisie (26.6%), et **Ndiaye (2006)** dans la région de dakar (54.4%).

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les autres études étaient effectuées sur une période plus large (entre 07mois et 9 ans) et un échantillonnage plus grand (entre 167 et 30573 patients).

5.3 Les techniques utilisées pour l'examen parasitologique des selles:

Parmi les 38 échantillons de selles reçus au laboratoire de parasitologie, 7 sont positifs (à savoir 18,42%) à l'examen direct.

Nos résultats sont restreints par rapport à ceux observés par **Kasmi et Saidouni(2016)** dans la région de Tlemcen où 89%des échantillons sont positifs à l'examen direct. Par contre, ils sont concordants avec ceux retrouvés par **Ouraibi et Seghir(2014)** où 15.24% des prélèvements était positifs.

Concernant la technique de Ritchie réalisée sur 19 spécimens de selles reçus au laboratoire de parasitologie, nos résultats montrent une positivité de 36,15%. Ces résultats sont inférieurs à ceux observés par **Kasmi et Saidouni** qui ont observé 58% de cas positifs. Cependant ils sont supérieurs à ceux d'**Ouraibi et Seghir** (2014) qui ont noté une positivité dans 17,14% des échantillons de selles seulement.

Ceci peut être expliqué par le fait que la technique de Ritchie permet d'augmenter le taux de positivité de l'examen direct qui est passé de 18.42% à 36.15 %, et corriger la négativité de l'examen direct.

D'après notre étude des résultats de la technique de Kato, tous les examens des selles réalisées taient négatifs. En fait, ceci peut être expliqué que cette technique n'a pas été exercée pour tous les échantillons, en effet, 4 spécimens seulement ont subi cette technique. En plus, cette technique s'applique pour la recherche des œufs d'helminthes (Kremer et Molet, 1975). En fait, elle n'a pas pu être réalisée à cause de la non disponibilité des réactifs nécessaires, ce qui pourrait sous-estimer la fréquence de certains parasites.

5.4 Technique du scotch test :

Pendant toute la période de notre étude, 03 cas seulement ont été reçus pour un examen de scotch test. Parmi ces cas un seul était positif (33,33%). Ces résultats sont comparables à ceux trouvés par **Ouraibi et Seghir (2014)** qui ont noté 28.6%. En effet, cette technique augmente le taux de positivité des oxyures.

5.5 La recherche de leishmaniose cutanée :

Bien que l'examen direct après coloration soit l'examen le plus adapté pour le diagnostic de la leishmaniose en zone d'endémie (**Marty et al., 2002**), les résultats obtenus dans notre étude sont comparables à ceux retrouvés par **Djezzar-Mihoubi (2006)** dans la région de Constantine où 42% des patients étaient positifs. De même, nos résultats sont concordants avec ceux enregistrés par **Mihoub et al (2006)** dans le foyer de Tlemcen où un taux de positivité de 44.75% a été noté. Ceci est dû au fait que l'examen direct après coloration est plus facile et plus efficace pour la recherche des formes amastigotes de *Leishmania*.

5.6 Analyses mycologiques

Les prévalences retrouvées dans notre étude concernant les analyses mycologiques du cuir chevelu étaient comparables à celles rapportées dans d'autres études. Le nombre de

patients dans notre série est inférieur par rapport à ceux enregistrés par **Berth (2006)** avec 873 cas dans la région du Mali. Il est de même pour l'étude d'**El idrissi (2009)** avec 2962 cas dans la région de Rabat

La fréquence des cas positifs quand l'examen direct est négatif et la culture est positive est de 62%. Quand l'examen direct et la culture sont négatifs le taux de positivité est de 37,5%. Néanmoins, La culture n'est jamais négative et l'examen direct positif. Ces résultats sont concordants avec ceux observés par **El Idrissi (2009)** dans la région de Rabat au Maroc et **Berth (2006)** au Mali. Les prélèvements considérés comme positifs ont montré un développement fongique positif (présence des colonies) après culture même si l'examen direct s'est montré négatif. Nous constatons aussi que 6 prélèvements se sont révélés négatifs (37,5%), ce qui signifie que l'examen direct et la culture étaient à la fois négatifs.

Les résultats des analyses mycologiques des ongles de notre étude étaient comparables à ceux rapportés dans d'autres travaux trouvés dans la littérature. **Essamkaoui (2012)** dans la région de Rabat a noté des taux de positivité inférieurs par rapport aux nôtres. En fait, pour un nombre de patients de 924, le pourcentage des cas positifs de l'examen direct est de 28,1%. Pour ceux de la culture un pourcentage de 42,85% a été enregistré.

Ces résultats seraient expliqués en partie par les progrès connus dans les techniques utilisées pour le diagnostic des onychomycoses, de la qualité du prélèvement mycologique et de la bonne interprétation des examens mycologiques réalisés. Nous signalons une absence totale de contamination de nos échantillons prélevés et analysés. Ceci est peut être dû à la localisation stratégique du laboratoire et les conditions d'asepsie rigoureuses, ainsi que l'usage de milieux très sélectifs, ce qui a limité la contamination bactérienne. D'autre part, il est important de signaler que la réalisation des prélèvements à la salle du prélèvement qui se trouve au sein du laboratoire de mycologie a joué un rôle important dans la prévention des contaminations.

5.7 L'examen parasitologique des urines

D'après notre étude, la technique de centrifugation et coloration MGG ont donné des résultats satisfaisants avec une fréquence de positivité de 100%. Ceci peut être expliqué

par le fait que la concentration permet la découverte des parasites même s'ils sont en nombre restreint (Bayo, 2001).

De même, la coloration permet d'observer les parasites même s'ils sont transparents ou de petite taille et augmente ainsi le taux de positivité par rapport à l'examen direct.

CONCLUSION

Le diagnostic parasitaire de certitude est basé sur la mise en évidence et l'observation directe du parasite, avec ou sans coloration, dans un produit biologique tel que les selles, le sang, les urines, la peau, les sécrétions vaginales, les expectorations ou les crachats, le liquide duodénal, le liquide broncho-alvéolaire, le liquide céphalorachidien, les produits de biopsie ou de ponction, le pus et les cheveux. De même, lorsque l'examen direct s'avère négatif, la mise en culture du produit biologique sert à mettre en évidence le parasite dont l'identification permettra le diagnostic parasitaire

Le laboratoire est un pilier pour une meilleure prise en charge des maladies. Les analyses effectuées permettent la prise en charge thérapeutique. Il est très important de bien maîtriser les étapes des examens parasitologiques et mycologiques à partir d'un prélèvement.

Durant les 02 mois de stage au laboratoire de Microbiologie au sein de l'Hôpital Ibn Zohr de Guelma, nous avons recensé au total 92 échantillons. Parmi ceux-ci les examens parasitologiques des selles constituent les examens les plus demandés avec 38 examens soit (41,30%).

A partir des résultats obtenus, il ressort que (32,60%) des sujet examinés sont positifs, alors que la mycologie arrive à la tête de la liste de positivité suivie par l'examen des selles soit (23,33%) puis la leishmaniose (13,33%), ensuite les urines soit (6,66%) et enfin scotch test soit 3,33%.

Cette étude prouve à nouveau l'intérêt que revêt les examens parasitologiques et mycologiques dans le diagnostic des parasitoses et des mycoses. Cet intérêt est encore majoré quand cette analyse est réalisée à l'aide de méthodes sûres, rapides et faciles. Néanmoins, une baisse du nombre d'examens parasitologiques et mycologiques effectué au laboratoire a été constaté. Ceci pourrait s'expliquer par l'insuffisance du matériel et des réactifs nécessaires pour ce type d'analyse.

Quelques recommandations peuvent être données :

- Provision des bonnes qualités de matériels et les réactifs nécessaires pour réaliser plusieurs techniques parasitologiques et mycologiques.
- L'agrandissement des locaux avec création d'une salle pour l'examen parasitologique et une autre pour l'examen mycologique.
- La mise en place d'un contrôle de qualité en collaboration avec des laboratoires externes de référence.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

-A-

Achir I & Hamrioui B., 2001. Coprologie parasitaire. Grand cours Institut Pasteur d'Alger. Édition Pirates. 36p.

Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES), 2003. Indication des examens de selles chez l'adulte. *Gastro enterol Clin Biol.* **27**:627-642.

Aissaoui I., 2016. Introduction a la mycologie médicale. Cours destiné à l'enseignement gradué en 3^{ème} année médecine. Université de Mentouri Constantine, faculté de médecine, département de pharmacie. 5p.

Anane S., 2008. Diagnostic des mycoses superficielles. *Faculté de Médecine de Tunis* : 54p.

Aoufi H., 2005. Le profil épidémiologique et diagnostique des mycoses au CHU de Rabat (étude menée à partir des services de parasitologie 2001-2003). *Thèse Médecine.* 242p.

Aubry P & Gaüzère B L., 2015. Le diagnostic biologique des maladies infectieuses en zones tropicales. Actualités. Médecine tropicale. Diplôme de médecine tropicale des pays de l'Océan Indien : 9p.

Deluol A. M., H. Levillayer & Poirrot J. P., 1998. Diagnostic du paludisme. Développement et Santé. Paris. **138**p.

-B-

Bayo G., 2001. Analyse quantitative et qualitative des examens parasitologiques, effectués au laboratoire d'analyse médicale du centre de santé 'Khadimou Rassoul du district De Mbao, De 1996 A 2000. *Thèse Doctorat Pharmacie, université Cheikh, AntaDiop de Dakar, N°92* :97p.

Benchellal M., Guelzim K., Lemkhente Z & Jamili H., 2011. La candidose vulvo-vaginale à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V (Maroc). *Journal de Mycologie Médicale.* **21** : 106-112.

Bennis I., 2001. Evaluation quantitative et qualitative des examens parasitologiques et Mycologiques effectués au laboratoire de parasitologie-mycologie de l'hôpital Ibn-Rochd de Casablanca-maroc- de 1996 à 2000. *Thèse Doctorat Pharmacie, université Cheikh AntaDiop de Dakar, faculté de médecine, de pharmacie et d'Odonto Stomatologie.* 82p.

Bouchara JP., Brun S., Chabasse D., De Gentile L & Penn P., 2004. Les dermatophytes. *Cahier de Formation Biologie Médical.* **31.** 158p

-C-

Cardinale V., 2001. Les candidoses vaginales récidivantes à candida albicans. Thèse pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université Henri Poincare - Nancy 1 faculté de pharmacie : 131p.

Chabasse D & Pihet M., 2008. Les dermatophytes: les difficultés du diagnostic mycologique. *Revue francophone des laboratoires* –**406** : 29-38.

Chabasse D., 2011. Place du laboratoire dans le diagnostic mycologique d'une onychomycose. *Revue francophone des laboratoires*– **432**: 43-50.

Chabasse D., Guiguen C & Contet-Audonneau N., 1999. Mycologie médicale, Masson, Paris : 320p.

Chabasse D., Pihet M & Bouchara J-P., 2009. Emergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine : revue générale. *Revue francophone des laboratoires*. **416** : 71-86.

-D-

Dufresne P. H., 2014. Identification des champignons d'importance médicale. Laboratoire de santé publique du Québec. Guy st-germain: 55p.

Durand F., Brenier-Pinchart M P & Peloux H., 2005. Parasitoses digestives : lamblia, taeniasis, ascaridiose, oxyurose, amibiases et hydatidoses. Corpus médical – faculté de médecine de grenoble. 15p.

-E-

El- Hassani I., 2014. Profil du portage parasitaire intestinal observé au laboratoire de parasitologie de l'hôpital militaire Moulay Ismail, Meknès. *Mémoire De Fin D'étude Pour L'obtention Du Diplôme National De Spécialité En Médecine*, option : biologie médicale-Maroc-40p.

El hassani N., 2013. Les mycoses : étude d'une série répertoriée au service de parasitologie-mycologie médicale de l'hôpital Ibn Sina de rabat sur une période de 5 ans (2007-2011). *Thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie. Université Mohammed V-Soussi, faculté de médecine et de pharmacie -Rabat- N° 32*:150p.

El idrissi H., 2009. Mycose du cuir chevelu : étude rétrospective au laboratoire de parasitologie et mycologie médical de l'hôpital d'enfants de Rabat sur la période 1993-2007. *Thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie. Université Mohammed, faculté de médecine et de pharmacie-Rabat-12* :90p.

El-Kouraibi S., 2011. Portage parasitaire intestinal chez la femme enceinte. *Thèse Doctorat Pharmacie, université Mohammed v faculté de médecine et de pharmacie - Rabat- N°48:55p.*

El Tahiri F., 2008.Oxyurose et hypereosinophilie chez l'enfant hospitalisé à l'hôpital d'enfants du C.H.U de rabat. *Thèse Doctorat Pharmacie, université Mohammed v facultés de médecine et de pharmacie -Rabat-, N° 17. 72p.*

-F-

Fathallah A. &Saghrouni F., 2008.Le diagnostic des mycoses superficielles. Hôpital Farhathached de Sousse. Tunis : 117p.

Frezil J-L., 1995. De la technique du quantitative buffycoat selon les données de la littérature. Dix-septième conférence technique.*Bull. His. Doc.* **28**(3) :194-196.

-G-

Gillet P., Potters I., Jacobs J., 2008.parasitologie humaine tropicale (notes pratiques). Prins LeopoldInstituutvoorTropischeGeneeskunde Institut de médecine Tropicale Prince Léopold prince Leopold Institute of tropical médecine Instituto de Medicina Tropical principe Leopoldo. *Biologistes Mod.* (155) :138p.

Goita SM., 2012. Prévalences des mycoses superficielles en milieux scolaire périurbain et rural au mali. *Thèse pour obtenir le grade de docteur en médecine (diplôme d'état), faculté de médecine de pharmacie et d'odontostomatologie du Mali* : 102p.

Guillaume V., 2007.parasitologie : Auto- évaluation manipulation. Eition de Boeck et larcier. Notions sur les parasites du tube digestif, Paris: ESTEM.182p.

-H-

HadjiA., ben Abderrahmane A &Hanafi M., 2013. Intérêt de l'antifongigramme dans le traitement des mycoses superficielles et profondes. *Mémoire de fin d'étude Pour obtenir diplôme d'état en pharmacie. Université Abou bekrbelkaid Tlemcen, faculté de médecine de Tlemcen* : 76 p.

-I-

Iyane Sow A., 2008. Manuel de procédures techniques laboratoires d'analyses médicales. Réseau national de laboratoires du Sénégal. Rapport de réseau national de laboratoires du Sénégal. 1ère Edition Sénégal.97p.

Larivière M., Beauvais B., Derouin F & Traoré F., 1987.Parasitologie médicale .C.H.U. Edition Paris Lariboisière Saint Louis. 239p.

-K-

Kamil N., 2015. Les mycoses superficielles selon une série de l'hôpital Ibn sina de rabat. *Thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie, université Mohammed V rabat, faculté de médecine et de pharmacie-Rabat– N° 28:124 P.*

Kasmi H., Saidouni A., 2014.Etude de la prévalence des protozooses intestinales diagnostiquées au sein du laboratoire de parasitologie-mycologie du chu de Tlemcen. *Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie, université Abou BekrBelkaïd faculté de médecine Dr. b. Benzerdjeb – Tlemcen.p77.*

Koenig H., 1995.Guide de mycologie médicale. Collection ellipses : 284p.

Kremer M., Molet., 1975.Intérêt de la technique de kato en coprologie parasitaire.Soc.beige med.trop.55, 5 :427-430.

-L-

Lamy L.H., 1980. Protozoaires et helminthes parasites recherche et identification au laboratoire. Techniques de base. Edition Paris.620p.

LarivièreM., Beauvais B., Derouin F & Traoré F., 1987.Parasitologie médicale .C.H.U.Paris Lariboisière Saint Louis : 239P.

-M-

Magatte N., 2001. Prévalence des mycoses chez les sujets vivant avec le VIH. *Thèse pour obtenir le grade de docteur en pharmacie (diplôme d'état), université Cheikh AntaDiop de Dakar, faculte de médecine de pharmacie et d'odontostomatologie –N° 18 :92 P.*

Menan H., 2016. fascicule de cours de parasitologie et mycologie cliniques. UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques département de parasitologie-mycologie-zoologie-biologie animale-zoologie. Université Félix Houphouët boigny : 196p.

Miraz B., 2012. Evaluation externe de la qualité du diagnostic biologique du paludisme réalisée dans 20 laboratoires du secteur privé de la région de Rabat. *Thèse Doctorat Pharmacie, université Mohammed v faculté de médecine et de pharmacie -Rabat-N°31* :58p.

-N-

Nekkache S., Achouri S & Reguig F., 2015. Les mycoses. *Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de master. Université des frères Mentouri Constantine, faculté des sciences de la nature et de la vie* : 129p.

-O-

Organisation mondiale de la santé (OMS), 1993. Parasitologie médicale : technique de base pour le laboratoire. Genève, p

OMS., 1994. Planches pour le diagnostic des parasites intestinaux. 75-128.

Organe de la Société Française de Dermatologie et de l'Association des Dermatologistes Francophones., 2005. Annales de dermatologie et de vénéréologie : 8s96.

-P-

Petithory J C., Ardoin-Guidon F., Chaumeil C., 1998. Amibes et flagellés intestinaux amibes oculaires leur diagnostic microscopique. Cahier de formation biologie médicale, N°11 : 237p.

Petithory J C., Ardoin-Guidon., Euzéby J., 2001. Parasites sanguins diagnostic biologique .cahier de formation biologie médicale. **23** :353p.

Phetsouvanh R., 2002. Parasitologie introduction générale.

Piarroux R., 2015. Fiche technique de prélèvement de parasitologie et mycologie. AP-HM LBM service de parasitologie-mycologie, CHU la Timone. **2** :4P.

Pierson A., 2001. Biologie clinique « installation d'un laboratoire d'analyses médicales autonome dans un pays en développement » :230p.

Pierson A., 2008. Techniques et procédures de laboratoires Techniques Parasitologiques Concentration selon Ritchie. Version 1.

Pihet M. & Agnes M., 2013. Diagnostic biologique des candidoses. *Revue Francophone des laboratoires* - **450** :47-61.

-R-

Raoult D., 2013. Manuel de prélèvement : laboratoire de biologie médicale du pôle infectiologie, Hôpital de la Timone de Marseille. **3** : 27p.

Rahmouni H., 2010. Portage parasitaire intestinal chez l'enfant scolarisé dans la Wilaya de Rabat Salé. *Thèse Doctorat Pharmacie, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.* Maroc. 58p.

Rousset JJ., 1993. copro-parasitologie pratique. Intérêt et méthodologie. Edition ESTEM, Paris. 88p.

-S-

Sbay SA., 2010. Épidémiologie des onychomycoses à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de Rabat. *Thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie, université Mohammed V, faculté de médecine et de pharmacie–Rabat.* **25** : 70p.

Sloss MW., Kemp RL & Zajac A M., 1994. *Veterinary clinical parasitology.* 6th ed. Ames : Iowa state university press: 198 p.

-T-

Tandia., 2006. Volet Hygiène /Santé. Centre régional pour l'eau potable et l'assainissement à faible coût (CREPA). *Rapport du CREPA.* 49p.

Duonga H T & Richard-Lenoble D., 2008. Diagnostic des parasitoses à parasites sanguicoles. *Revue francophone des laboratoires.* **399** : 29-39.

Trabelsi S., Aouinet A., Khaled S., 2012. Procédure et indications d'un examen parasitologique des selles. *La Tunisie Médicale.* **06** (90) :431-434.

Traore A., 2013. Paludisme et grossesse au centre de santé de référence de Kati. *Thèse pour obtenir le grade de docteur en médecine (diplôme d'état), université des sciences des techniques et des technologies de Bamako, Mali.* 113p.

Trudel L., 2005. Identification morphologique des parasites de la malaria. Rapport de l'Institut national de sante publique, QUEBEC. 33p.

Les sites web

- [1] <https://www.mmt-fr.org/maladies-parasitaires/> (consulté 23 04 2017 à 14:36).
- [2] <https://laboratoire.jimdo.com/parasitologie/examen-parasitologique-des-selles/> / (consulté 23 03 2017 à 23 :15).
- [3] http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/pharm_parasito05-prelevements.pdf / (consulté 3 04 2017 à 11:36).
- [4] <https://fr.scribd.com/doc/82315150/copro-parasitaire-080307/> (consulté 25 02 2017 à 17:00).
- [5] http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/pharm_parasito05-techniques_concentration.pdf / (consulté 17 03 2017 à 18:06).
- [6] <https://laboratoire.jimdo.com/parasitologie/examen-parasitologique-du-sang/> (consulté 04 02 2017 à 12:45).
- [7] http://guidelabo.chniort.fr/procedures_GBEA/selles_scothtest_V2bMO_11_%2003.pdf / (consulté 02 2017 09:05).
- [8] <http://www.mesanalyseslpa.fr/assets/kcfinder/upload/files/ESPACEpro/fiche-de-renseignements-cliniques-prelevement-mycologique.pdf> (consulté le 28-3-2017 à 11:49).
- [9] <https://laboratoire.jimdo.com/parasitologie/examen-mycologique-des-cheveux-et-de-la-peau/> (consulté 3 04 2017 à 11:36)

Tableau 1 : Composition des colorants utilisés

Colorant	Composition
M.I.F (Petithory, 1998)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Teinture de merthiolate : <ul style="list-style-type: none"> -merthiolate. -alcool. -acétone. - eosine. ➤ Solution MF (a conserver en flacon brun) : <ul style="list-style-type: none"> -teinture de merthiolate : 200ml. -formol du commerce 25ml. -glycérine 5ml. -eau distillée 250ml. ➤ MIF : <ul style="list-style-type: none"> -merthiolate sous forme de teinture. - iode sous forme de lugol à 5 %. - formol du commerce.
Coloration de Bailenger et Farragi(Petithory, 1998)	<ul style="list-style-type: none"> -Violet cristal 0,5 g -Fuchsine basique 0,1 g -Alcool à 95 % 20 ml -Phénol cristallisé fondu 4 ml <p>Après dissolution, ajouter :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Eau distillée 100 ml
Coloration au lugol (Rousset, 1993)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Solution de lugol double : <ul style="list-style-type: none"> -Iode en paillettes : 0.1g -Iodure de potassium : 0.2g -Eau distillée : 10ml <p>Dissoudre l'iodure dans très peu d'eau, puis ajouter l'iode peu à peu et compléter avec le reste de l'eau.</p> <p>Le colorant doit être conservé en flacon brun et renouveler régulièrement.</p>
Coloration au noir chlorazole de Kohn (Achir et Hamrioui., 2001)	<ul style="list-style-type: none"> -Noir chlorazol : 5 g. -Alcool éthylique à 90° : 170 ml. -Alcool méthylique : 160 ml.

	<ul style="list-style-type: none">-Acide acétique : 20 ml.-Phénol liquide : 2 ml.- Acide phosphotungestique à 1% : 12 ml.-Eau distillée qsp 100 ml.
Coloration de Ziehl-Neelsen (Achir et Hamrioui., 2001)	<ul style="list-style-type: none">-Solution A : 15g de fuchsine sont solubilisés dans 100 ml d'éthanol à 95%.-Fuchsine phéniquée : 10ml de la solution A sont additionnés à 90ml d'eau phéniquée à 5%.-Acide sulfurique à 2% : 2ml d'acide sulfurique sont additionnés à 98ml d'eau distillée.-Vert malachite à 5% : 5g de Vert malachite sont dissous dans 100ml d'eau distillée.
Coloration APV- Trichrome (Guillaume V., 2007)	<ul style="list-style-type: none">➤ Trichrome :-Chromotrope 2R : 0.6g.-Vert lumière : 0.3g.-Acide phosphotungestique : 0.7g.-Acide acétique : 1 ml.- Eau distillée qsp 100 ml.

Résumé

Sur une période de 2 mois et 8 jours, allant du 12 mars au 20 mai, quatre vingt douze (92) prélèvements pathologiques de nature différente ont été analysés au laboratoire de Microbiologie, à l'hôpital Ibn Zohr de Guelma. L'objectif de cette étude est de connaître les différentes techniques mises en œuvre dans le cadre du diagnostic des parasitoses et des mycoses, chez des patients hospitalisés et des patients à consultation externe.

En effet, on a constaté que la démarche diagnostique des parasitoses comporte l'examen des selles (techniques de l'examen direct, Richie et Kato) des urines, technique du scotch test, diagnostic de la leishmaniose cutanée. D'autre part, les analyses mycologiques concernent les ongles et le cuir chevelu.

Malgré les imperfections surtout concernant le manque de produits et de réactifs, ainsi que l'espace restreint au niveau du laboratoire, nos résultats sont concordants avec ceux de la littérature.

Mots-clés : Guelma, technique, diagnostic, parasitologie, mycologie.

Abstract:

Over a period of 2 months and 8 days, from 12 March to 20 May, ninety-two (92) pathological samples of a different nature were analyzed at the Microbiology Laboratory At the Ibn Zohr Hospital in Guelma. The objective of this study is to know the different techniques used in the diagnosis of parasitoses and mycosis.

Indeed, it has been found that the diagnostic procedure of parasitoses includes examination of stools (techniques of direct examination, Richie and Kato) urine, scotch test technique, diagnosis of cutaneous leishmaniasis. On the other hand, the mycological analyzes concern the nails and the scalp.

In spite of the imperfections especially concerning the lack of products and reagents, as well as the limited space at the level of the laboratory, our results are concordant with those of the literature.

Key words: Guelma, technique, diagnostic, parasitology , mycology.

الملخص:

على مدى فترة دامت 2 أشهر و 8 أيام، ابتداء من مارس إلى غاية 20 ماي تم تحليل اثنان وتسعون عينة مرضية من أنواع مختلفة في مختبر علم الأحياء الدقيقة بمستشفى ابن زهر قالمة. والهدف من هذه الدراسة هو معرفة مختلف التقنيات المستخدمة لتشخيص الأمراض الطفيلية والفطرية للمرضى المقيمين بالمستشفى والمرضى الخارجيين القادمين من عيادات خارجية. في الواقع تبين أن نهج تشخيص الطفيليات تتضمن فحص البراز (تقنيات الفحص المباشر. ريتشي و كاتو) البول، وشريط الفحص الفني، تشخيص داء الليشمانيات الجلدي وزيادة على ذلك، الفطريات التي تضمن التهاب الأظافر و فروة الرأس. وعلى الرغم من عيوب وخاصة فيما يتعلق عدم وجود منتجات والكواشف، وكذلك المساحة المحدودة في المختبر، نتأجنا تتفق مع تلك الموجودة في الدراسات العلمية السابقة.

كلمات البحث: قالمة، تقنية، التشخيص، علم الطفيليات، علم الفطريات.