

BASES ET PRINCIPES DU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES PROTOZOSES

1. Introduction

Le diagnostic biologique vise à confirmer une suspicion diagnostique basée sur la clinique, c'est-à-dire sur l'interrogatoire et l'examen du patient. Pour ce qui concerne les maladies parasitaires, cette confirmation est le plus souvent indispensable. Elle peut être directe ou indirecte (selon la maladie ou selon son stade), c'est-à-dire qu'elle va être basée :

- soit sur la mise en évidence directe du parasite sur des prélèvements adaptés (= examen microscopique, recherche d'antigènes ou de l'ADN du parasite, cultures),
- soit sur des preuves indirectes mais spécifiques de sa présence dans l'organisme (= recherche d'anticorps spécifiques).

Or, en Parasitologie (et Mycologie) peut-être plus qu'ailleurs, le contexte clinique et les indications que le clinicien donne au biologiste sont essentiels pour parvenir à effectuer l'examen complémentaire le mieux adapté à la suspicion de diagnostic clinique. En effet, les techniques mises en œuvre sont souvent spécifiques du parasite recherché. Or chaque technique va « consommer » une partie du prélèvement adressé au laboratoire, alors que la quantité de matériel correspondant est limitée (ex : LCR). Si ces indications font défaut (et c'est souvent le cas), il peut en résulter une orientation inadéquate ou incomplète du prélèvement et, par conséquent, une perte d'informations néfaste à la prise en charge du patient. Tous ces éléments sont évidemment tout aussi valables pour les protozoaires que pour les helminthes.

La prescription correcte d'examens complémentaires adaptés en Parasitologie est basée sur la connaissance de l'épidémiologie de la maladie et de la biologie du parasite, en particulier de son cycle. Plus précisément, cette connaissance va indiquer au praticien :

- la distribution géographique de la maladie – s'il s'agit d'une parasitose à distribution spécifique (par opposition à "cosmopolite") ;
- le mode de transmission de la maladie ;
- la durée d'incubation – bien que le cycle n'indique pas toujours cette notion ;
- la localisation préférentielle du parasite dans l'organisme ;
- le moment où le parasite ou bien sa trace immunologique sont détectables, ou bien ne le sont plus.

Ainsi, loin de constituer une charge inutile pour la mémoire, la connaissance du cycle parasitaire constitue un allié précieux pour une mémorisation plus logique des stratégies diagnostiques (et thérapeutiques) et donc pour une prescription intelligente au sens large. En effet, la prescription de un ou quelques

examens ciblés constitue une attitude responsable et satisfaisante pour l'esprit, car plus adaptée : à la réalité de la maladie, au respect du patient, et au coût de la santé dans la société.

2. Les bases de la stratégie de diagnostic biologique des Protozooses

2.1. Le raisonnement

Selon la maladie suspectée, le raisonnement du clinicien doit viser à :

- (1) déterminer si recherche directe ou indirecte
- (2) déterminer le prélèvement le plus adapté selon la pathologie ;
- (3) estimer le délai de rendu de la réponse de l'examen.

Ce dernier va dépendre en premier lieu du degré d'urgence de la pathologie, et en second des techniques utilisées pour cette recherche. Ainsi, pour un accès de paludisme (risque d'aggravation rapide et fatale), il y a urgence et l'organisation du laboratoire et les techniques (frottis sanguin) sont adaptées à ce degré d'urgence, avec un délai de réponse court (1 à 2 heures). A l'inverse, pour une leishmaniose viscérale (évolution subaiguë), on peut attendre un délai plus long (quelques jours), temps nécessaire pour pouvoir réaliser une sérologie spécifique et une PCR au laboratoire ; le résultat de la culture *in vitro*, lui, ne peut être obtenu qu'au bout de 1 à 6 semaines.

A noter : chaque type d'examen a ses avantages et ses inconvénients, aucun n'est fiable¹ à 100%.

2.2. Recherche (directe) du parasite

Elle possède l'énorme avantage d'apporter une preuve directe de la présence du parasite dans le tissu concerné. Elle couvre plusieurs types de méthodes différentes. Elle peut ainsi être très simple et bon marché (examen direct au microscope) ou plus complexe et coûteuse (recherche d'antigènes et méthodes moléculaires).

Elle est indispensable si il s'agit :

- d'une maladie aiguë ; ex : paludisme (*Plasmodium*), toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*) chez l'immuno-déprimé ;
- d'une infection subaiguë ou chronique mais sans traces immunologiques spécifiques (en général sans invasion de tissus) ; giardiose (*Giardia lam-*

¹La fiabilité d'un examen est la résultante de la sensibilité, spécificité, reproductibilité,...

La **sensibilité** d'un test réfère au pourcentage d'individus ayant une maladie spécifique pour qui le test est positif.

La **spécificité** réfère au pourcentage d'individus qui n'ont pas la maladie pour qui le test est négatif.



blia), [trichomonose](#) (*Trichomonas*), [amibose intestinale](#) (*Entamoeba sp.*), [leishmaniose cutanée](#) ;

- d'un patient présentant un déficit de l'immunité ;
ex : [leishmaniose viscérale](#) ou [toxoplasmose](#) chez l'immuno-déprimé.

2.2.1. La logique de la prescription de la recherche passe obligatoirement par la question : quel est le prélèvement le plus adapté ?

La réponse à cette question découle de la connaissance du cycle du parasite : le parasite peut-il être présent dans cet organe ? a-t-il eu le temps nécessaire pour y parvenir ?

2.2.2. Les méthodes de recherche directe du parasite peuvent être classées en quatre types.

N.B. L'étudiant pourra utilement se référer au chapitre plus technique « Diagnostic biologique des Parasitoses » en Annexe, qui détaille les indications des différents prélèvements ainsi que les techniques qui peuvent s'y appliquer.

➤ **L'examen direct** au microscope est rapide et bon marché. Il est cependant coûteux en termes de main d'œuvre (nécessité d'un observateur spécialisé et expérimenté, temps d'observation parfois prolongé). Il peut manquer de sensibilité, par contre sa spécificité est absolue. C'est la méthode la plus classique. Le délai de rendu du résultat est court de 1-2 heures à 24 heures (temps de concentration, de coloration). Il doit être privilégié dans toute parasitose où cela est possible. Il peut se faire :

- soit directement à partir du prélèvement, entre lame et lamelle : selles, liquides pathologiques, sécrétions (ex : recherche de [Trichomonas](#) à partir d'un écouvillonnage vaginal) ; coût ≈ 8 euros.
- soit plus souvent après coloration d'un frottis : celui-ci concerne en général le sang (paludisme, leishmaniose...) mais peut être un frottis de moelle osseuse (recherche de Leishmanies), un frottis de selles (recherche de Coccidies) ... ; la coloration la plus utilisée pour les protozoaires est celle de [May Grünwald-Giemsa](#) qui colore le noyau en pourpre et le cytoplasme en violet ; d'autres colorations spécifiques peuvent être utilisées, en particulier : coloration de Ziehl-Nielsen modifiée pour les coccidies des selles ([Cryptosporidium](#)), de Weber pour les [microsporidies](#), APV-trichrome pour les amibes ... ; coût ≈ 25 euros.
- soit également après coloration d'appositions, faites sur lame à partir d'un prélèvement de tissu (foie, ganglion, peau...).
- soit enfin après des techniques de concentration pour ce qui concerne les parasites des selles ; coût ≈ 25 euros.

➤ **La PCR (Polymerase Chain Reaction)**, principale méthode moléculaire appliquée au diagnostic, a également apporté de grands changements dans le diagnostic de certaines protozooses. Elle met en évi-

dence l'ADN du parasite². Elle est surtout intéressante dans les infections où l'agent pathogène est difficile à observer ou à cultiver *in vitro*, et *a fortiori* si le patient est immuno-déprimé. La sensibilité et la spécificité sont très élevées. Ses applications principales en protozoologie sont le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale, la toxoplasmose chez l'immuno-déprimé et la leishmaniose viscérale (en particulier chez l'immuno-déprimé). Le délai de rendu est de 24 h à une semaine. Les méthodes moléculaires, dans ces applications, sont pour l'instant réservées aux C.H.U. et à quelques grands centres de soins et de diagnostic. Leur coût est très élevé (≈ 120 à 160 euros).

➤ **La culture *in vitro*** est peu répandue pour les protozoaires. C'est un moyen d'amplifier le nombre de parasites pour les rendre détectables. En ce sens, on la qualifie souvent de recherche "indirecte" du parasite. Le parasite devient "observable", la spécificité est donc "absolue". La sensibilité est variable. Le délai est long de 4 à 6 semaines. On peut la diviser en deux groupes, correspondant à :

- d'une part des techniques moyennement coûteuses (≈ 40 euros) et pratiquées dans quasiment tous les laboratoires de C.H.U. = cultures sur gélose ; indications : Acanthamibes (prélèvement de cornée et lentilles de contact) et Amibes (selles).
- d'autre part des techniques coûteuses (≈ 80 euros) pratiquées uniquement dans quelques C.H.U. en France = culture cellulaire (recherche de Toxoplasmes), culture sur milieux au sang (recherche de Leishmanies) ...

➤ **La culture *in vivo*** consiste à inoculer le prélèvement (après traitement spécial) à un animal (en général souris). Elle est encore réalisée presque exclusivement pour le diagnostic de la toxoplasmose, et uniquement en C.H.U. (coût ≈ 80 euros). Le délai est long de 4 à 6 semaines.

➤ **La recherche d'antigènes** fait appel à des "trousses" commerciales d'un coût relativement élevé. Cette recherche se classe cependant en "intermédiaire" entre la recherche directe et la recherche indirecte en raison de la possible persistance d'antigène pendant un temps plus ou moins (quelques semaines) après la disparition du parasite. Sa principale application pour ce qui concerne les protozoaires est la détection d'antigènes spécifiques de *Plasmodium falciparum*, l'espèce responsable du paludisme le plus dangereux. Délai de rendu est long de 4 à 6 semaines.

2.3. Recherche d'anticorps (ou sérologie spécifique)

La recherche de la trace immunologique produite par le parasite dans l'organisme présente deux avanta-

² Il est important de noter que la présence de cet ADN est essentiellement liée à la présence de parasites vivants, et qu'il ne semble pas persister plus de quelques heures/jours après la mort des parasites. En ce sens, il s'agit donc bien d'une détection directe.



ges : la simplicité (simple prise de sang pour recueillir le sérum) et le faible coût (autour de 10 euros, parfois jusqu'à 25 ou 50 €), surtout lorsque les techniques sont automatisables (ELISA). Il s'agit toujours d'une preuve indirecte de la présence du parasite. Délai de rendu est court de 1 à 3 jours. Ne pas oublier que la trace immunologique peut persister longtemps après l'infestation, et en particulier après le traitement. Elle peut toutefois être la mieux indiquée pour certaines protozooses, y compris pour une confirmation rapide.

La recherche d'anticorps est logique si :

- elle est aussi, voire plus, efficace que la recherche du parasite : essentiellement si il y a invasion des tissus et/ou si la recherche directe du parasite est difficile ; ex : amibose tissulaire.

- il n'y a pas d'urgence, c'est-à-dire en cas d'infection subaiguë ou chronique, lorsque le parasite a eu le temps de produire une réaction immunologique : ex : toxoplasmose, leishmaniose viscérale, trypanosomose américaine (phase chronique).

- le patient ne présente pas de déficit immunitaire.

Elle a lieu en règle générale dans le sérum ; mais elle peut aussi être réalisée sur certains liquides biologiques (LCR, humeur aqueuse) sur indication spécifique. Ex : humeur aqueuse pour la toxoplasmose oculaire, en comparaison avec le sérum.

Plusieurs techniques sont disponibles avec des sensibilités et spécificités variables (ELISA, immunofluorescence indirecte, hémagglutination ou agglutination au latex, et plus récemment Western blot ...).

Le taux d'anticorps spécifique s'exprime de façon quantitative ou semi-quantitative, et doit être supérieur à un seuil donné, défini pour une infection et une technique données. En l'absence d'interprétation par le biologiste, il est important d'accorder la plus grande attention à interpréter la sérologie en fonction des valeurs seuil fournies. Attention, les techniques et les seuils varient selon les laboratoires.

Il est important de se rappeler que ce diagnostic sérologique doit obligatoirement comporter un examen dit "de dépistage", et un autre "de confirmation". Le Western blot ou immuno-empreinte constitue de plus en plus (malgré son coût élevé, ≈ 50 euros)) l'examen de référence en matière de confirmation.

3. Exemples de stratégies de diagnostic évidentes³

- Accès de paludisme (phase aiguë) : notion de séjour en zone d'endémie, période d'incubation: frottis sanguin (cf. Cycle de Plasmodium en Annexe).
- Trichomonose vaginale : le cycle est simple car le parasite passe de partenaire à partenaire sans passage dans le milieu extérieur (extrême sensibilité du parasite à la dessiccation) → écouvillonnage, examen direct.

- Giardiose (*Giardia lamblia*) : selles, examen direct (cf. trophozoïtes de Giardia intestinalis en Annexe).

4. Exemples de stratégies différentes pour une pathologie identique

4.1. Le paludisme (cf. Cycle de Plasmodium en Annexe)

Diagnostic de l'accès de paludisme (phase aiguë) : frottis sanguin / goutte épaisse / recherche d'antigènes.

Diagnostic d'un accès décapité par un traitement incomplet ou inadapté, ou d'un accès de façon rétrospective (après traitement efficace) : sérologie.

Enquêtes épidémiologiques : sérologie, goutte épaisse.

4.2. Les leishmanioses (cf. Cycle de Leishmania en Annexe)

4.2.1. Les leishmanioses cutanées

Examen direct d'une biopsie ou d'un grattage.

4.2.2. La leishmaniose viscérale

- Chez l'immuno-compétent : sérologie spécifique et recherche directe sur moelle osseuse.
- Chez l'immuno-déprimé : recherche directe sur le sang, la moelle osseuse...

4.3. La toxoplasmose (cf. Cycle du Toxoplasme en Annexe)

[Voir également Annexes Protozoaires]

4.3.1. La toxoplasmose acquise chez l'immuno-compétent

Sérologie ++++. En particulier femme enceinte ⇒ indications et mise en route du diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale (chez le fœtus).

4.3.2. La toxoplasmose congénitale

En diagnostic prénatal : recherche directe du parasite par PCR sur liquide amniotique.

Après la naissance : sérologie ++++

4.3.3. La toxoplasmose oculaire

Recherche sur humeur aqueuse d'anticorps spécifiques d'une part, du parasite par PCR d'autre part.

4.3.4. La toxoplasmose chez l'immuno-déprimé

- Toxoplasmose cérébrale : recherche du parasite par PCR dans le LCR et le sang.
- Toxoplasmose pulmonaire : recherche du parasite par PCR dans le liquide de lavage bronchiolo-alvéolaire et le sang.
- Toxoplasmose disséminée : recherche du parasite par PCR dans le sang.

³ Les parties 3 et 4 seront développées en cours.

