

## Parasitologie

Key words: Microsporidia, Trichrome Blue stain,  
Uvitex 2B, HIV.

# APPORT DU TRICHROME BLEU DANS LE DIAGNOSTIC DES MICROSPORIDIOSES

Par S. HONORÉ (1), S. HOUZE (2), C. SARFATI (1), S. CHALLIER (2),  
G. KAC (1), J. LE BRAS (2) & F. DEROUIN (1) (3)

### Contribution of Trichrome Blue stain in diagnosis of microsporidiosis.

**Summary:** Detection of microsporidia belongs to the usual coprologic and urine detection of parasites from HIV seropositive patients. To improve the identification of microsporidial spores, several stains have been used. Trichrome Blue stain has been evaluated in this study. We first compared Trichrome Blue stain to Weber's trichrome for the detection of microsporidia in smears of stools received from HIV seropositive patients. No difference of sensibility has been demonstrated between the two stains, and Uvitex 2B used on the same samples has confirmed these results. Then, Trichrome Blue stain has been used for the detection of microsporidial spores in other specimens (40 samples of nasal mucus, conjunctival samples, duodenal biopsy and urine), also Giemsa and Uvitex 2B. The advantage of Trichrome Blue stain is its ready-to-use presentation, and faster realisation at higher temperature. Trichrome Blue stain is interesting as a confirmation technique or for laboratories which do not have fluorescent microscopy equipment.

**Résumé :** La recherche des microsporidies dans les selles et les urines fait partie de l'examen parasitologique de routine des patients infectés par le VIH. Notre étude se propose d'évaluer le trichrome bleu (Trichrome Blue stain, BMD) nouvellement commercialisé. Nous avons comparé cette coloration avec le trichrome décrit par Weber et réalisé en parallèle une coloration à l'Uvitex 2B. Nous n'avons pas mis en évidence de différence de sensibilité entre le trichrome bleu et le trichrome de Weber sur 60 échantillons de selles de patients VIH positif. Nous avons observé des spores de microsporidies au trichrome bleu sur d'autres types de prélèvements : 40 échantillons de biopsie duodénale, de mucus nasal, de prélèvements conjonctivaux et d'urine. L'Uvitex 2B a confirmé les résultats pour tous les prélèvements. Les avantages du trichrome bleu par rapport au trichrome de Weber sont la standardisation du colorant, sa préparation prête à l'emploi et sa réalisation plus rapide à une température plus élevée (37° C). Si l'Uvitex 2B semble mieux adapté à la détection des spores de microsporidies en routine, le trichrome garde son intérêt comme technique de confirmation ou pour les laboratoires ne disposant pas d'équipement de fluorescence.

## INTRODUCTION

La recherche des microsporidies fait partie de l'examen parasitologique de routine chez les patients VIH positif. Des méthodes non invasives permettent de faire le diagnostic de microsporidiose, à partir de prélèvements de selles et d'urine, et plusieurs techniques de coloration ont été mises au point pour rechercher les spores. L'objectif de notre étude est d'évaluer le trichrome bleu (Trichrome Blue stain, BMD) nouvellement commercialisé.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cent prélèvements ont été étudiés dans le cadre d'une recherche de microsporidies. Sur 60 échantillons de selles de patients VIH positif, nous avons comparé le trichrome bleu et le trichrome de WEBER à partir d'un frottis réalisé selon la technique de WEBER (6) et nous avons réalisé en parallèle une coloration à l'Uvitex 2B selon la technique de VAN GOOL (5). Les lames sont lues indépendamment les unes des autres et l'évaluation du nombre de spores est réalisée selon ce schéma :

- plusieurs spores par champ : + + +
- une spore par champ : + +
- moins d'une spore par champ : +
- absence de spore : 0

(1) Laboratoire de parasitologie, Hôpital Saint-Louis, Paris.  
(2) Laboratoire de parasitologie, Groupe hospitalier Bichat-Claude-Bernard, Paris.  
(3) Manuscrit n° 1720. "Parasitologie". Accepté le 22 février 1996.

Les 40 autres échantillons comprenant 8 biopsies duodénales, 6 frottis de mucus nasal et 4 frottis de prélèvement conjonctival, 4 expectorations pulmonaires et 18 culots de centrifugation d'urine ont été colorés au trichrome bleu et en parallèle au Giemsa et à l'Uvitex 2B.

## RÉSULTATS

Au trichrome bleu, les spores de microsporidies apparaissent comme des éléments ovoïdes, réfringents. Elles sont colorées en rouge avec une vacuole incolore; on distingue parfois une strie rouge. Dans les selles, les autres éléments ne prennent pas la coloration et apparaissent en bleu-gris. Les spores d'*Enterocytozoon bieneusi* ont une taille moyenne de  $1,5 \times 0,9 \mu\text{m}$ , alors que les spores d'*Encephalitozoon intestinalis*, plus grosses, sont ovales parfois réniformes et ont une taille approximative de  $2,5 \times 1,5 \mu\text{m}$ . Dans les autres types de prélèvements, les microsporidies du genre *Encephalitozoon* ont pu être observées: les spores sont extracellulaires ou intracellulaires bien colorées en rouge et les différents stades parasitaires peuvent être observés dans la vacuole parasitaire mais prennent moins bien la coloration. Les cellules sont colorées en bleu-gris.

La comparaison entre le trichrome bleu et le trichrome de Weber montre qu'il n'y a pas de différence de sensibilité; sur 60 échantillons de selles, 43 sont positifs et 17 négatifs avec les deux techniques (37 sont positifs à *E. bieneusi* et 6 à *E. intestinalis*). Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative dans la quantification des spores (tableau I). Des résultats identiques ont été observés avec l'Uvitex 2B, cependant cette technique permet de détecter un plus grand nombre de spores (tableau I).

Tab. I. — Comparaison semi-quantitative du trichrome bleu, du trichrome de Weber et de l'Uvitex 2B.

	trichrome bleu	trichrome de Weber	Uvitex 2B
positifs			
+++	26	29	34
++	13	9	7
+	4	5	2
total	43	43	43
négatifs	17	17	17

## DISCUSSION

La technique du trichrome modifiée selon WEBER est une des premières techniques employée pour la recherche des microsporidies. Des modifications ont été proposées pour améliorer cette technique, longue et de lecture difficile. RYAN *et al.* (4) ont proposé initialement le trichrome bleu qui diffère du trich-

rome de WEBER par une diminution de la quantité d'acide phosphotungstique, permettant une meilleure coloration du fond, et l'emploi du bleu d'aniline comme contre-colorant. La technique de Gomori modifiée proposée par DELUOL (2) utilise le vert malachite comme contre-colorant et modifie les concentrations des réactifs. KOKOSKIN *et al.* (3) ont montré qu'une augmentation de la température et une réduction du temps de coloration permettaient de faire ressortir les spores de microsporidies plus intensément; DATRY (1) préconise ainsi une technique rapide de WEBER (coloration 10 min à 50° C) qui permet un gain de temps et facilite la lecture par rapport à la technique initiale. Dans notre étude, nous avons employé une solution commercialisée de trichrome bleu, dont l'utilisation à chaud (37° C) permet de réduire le temps de coloration. Nous n'avons pas montré de différence de sensibilité entre trichrome bleu et trichrome de WEBER. Le trichrome bleu permet la recherche des microsporidies dans tout type de prélèvements, la visualisation des parasites intracellulaires. Sa présentation prête à l'emploi permet de ne pas manipuler des réactifs toxiques et d'avoir toujours la même qualité de coloration. La technique est plus rapide (30 min contre 90 min pour le trichrome de WEBER).

La technique employant l'Uvitex 2B, étudiée en parallèle, a un temps de réalisation plus court, est utilisable sur tout type de prélèvement; la lecture est plus aisée et on détecte un plus grand nombre de spores.

Si l'Uvitex 2B semble la technique la mieux adaptée pour la recherche de microsporidies en routine, le trichrome bleu nouvellement commercialisé garde son intérêt comme technique de confirmation et pour les laboratoires ne pouvant investir dans un équipement de fluorescence.

## BIBLIOGRAPHIE

- DATRY (A.), BILIGUI (S.), AOUN (K.), ACCOCCEBERRY (I.), CARRIERE (J.), OLIVIER (C.), KATLAMA (C.) & DANIS (M.). — Congrès de la Société Française de Parasitologie, Angers, mai 1995, communication orale.
- DELUOL (A. M.) & CENAC (J.). — Les microsporidioses *Microsporidiosis*. *Ann. Biol. Clin.*, 1994, **52**, 37-44.
- KOKOSKIN (E.), GYORKOS (T. W.), CAMUS (A.), CEDLOTTE (L.), PURTILL (T.) & WARD (B.). — Modified technique for efficient detection of microsporidia. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, **32**, 1074-1075.
- RYAN (N. J.), SUTHERLAND (G.), COUGHLAN (K.), GLOBAN (M.), DOULTREE (J.), MARSHALL (J.), BAIRD (R. W.), PETERSEN (J.) & DWYER (B.). — A new Trichrome Blue stain for detection of microsporidian species in urine, stool and nasopharyngeal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, **31**, 3264-3269.
- VAN GOOL (T.), CANNING (E. U.) & DANKERT (J.). — An improved practical and sensitive technique for the detection of microsporidian spores in stool samples. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994, **88**, 189-190.
- WEBER (R.), BRYAN (R.), OWEN (R.), WILCOX (M.), GOREKLIN (V.) & VISVESVARA (G. S.). — Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N. Engl. J. Med.*, 1992, **326**, 161-166.