

# Optimisation du diagnostic parasitologique des microsporidioses intestinales humaines.

J. M. Sparfel (1), J. L. Auget (2) & M. Miegville (1) (3)

(1) Laboratoire de parasitologie, CHU de Nantes, 1 place Alexis Ricordeau, 44035 Nantes cedex 01, BP 1005. Téléphone 02 40 41 28 42, fax 02 40 41 28 09.

(2) Laboratoire de biomathématiques et biophysique, Faculté de pharmacie de Nantes.

(3) Manuscrit n°1851. "Parasitologie". Accepté le 25 novembre 1997.

**Summary:** Enhancement of Parasitology Diagnosis of Human Intestinal Microsporidiosis.

**Key-words:** Microsporidia - Diagnosis - Uvitex 2 B - Trichrome

*The diagnosis of microsporidiosis by staining stools is known to be fast and cheap. To obtain a specific and sensitive result, two colorimetric methods must be used: staining by the fluorochrome Uvitex 2 B (VAN GOOL) and trichrome. Among the four staining methods of trichrome currently studied, the WEBER coloration could be considered as the most efficient. The density of microsporidia spores could be semi-quantitatively evaluated, because their distribution is homogeneous.*

**Résumé :**

**Mots-clés :** Microsporidie - Diagnostic - Uvitex 2 B - Trichrome

*La recherche parasitologique des microsporidies intestinales à partir de colorations de selles permet un diagnostic rapide et peu coûteux. Afin d'obtenir un résultat alliant spécificité et sensibilité, il est nécessaire de coupler deux techniques colorimétriques : l'une utilisant un agent chimiofluorescent (l'Uvitex 2 B de VAN GOOL), l'autre du trichrome. Parmi les quatre colorations à base de trichrome que nous avons évaluées, la coloration de WEBER est la plus performante. La répartition des spores de microsporidies au sein d'une selle est homogène, permettant une évaluation semi-quantitative de la richesse en spores.*

## Introduction

Le diagnostic des microsporidioses intestinales a considérablement évolué ces dernières années, nécessitant la mise au point de nouvelles techniques de coloration ou d'isolement. L'examen des selles permet aujourd'hui de poser le diagnostic de microsporidiose intestinale sans recourir aux méthodes invasives que constituent les biopsies intestinales. L'amplification génique par PCR est amenée à se développer, mais la coloration directe des selles reste aujourd'hui la technique la plus usitée du fait de sa rapidité d'exécution et de son faible coût. La qualité d'une coloration repose sur sa simplicité, sa rapidité de mise en œuvre, sur une coloration fine et précise de la spore permettant, par une identification sûre, une bonne spécificité et, enfin, sur la qualité du contraste avec le tapis de la lame, ce qui garantit une bonne sensibilité.

Depuis 1992, la recherche des microsporidies au laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes est basée sur deux techniques de coloration ; l'une au trichrome dite technique de WEBER et l'autre à base d'un agent chimiofluorescent se fixant sur la chitine de l'endospore (l'Uvitex 2B), mise au point par VAN GOOL. Notre étude avait trois objectifs :

- vérifier si l'association de deux types de coloration se justifiait,
- évaluer si les trois variantes de la coloration au trichrome proposées par RYAN, KOKOSKIN et DELUOL pouvait apporter une amélioration par rapport à la technique de WEBER (cf. annexe).
- étudier la répétabilité sur la richesse des spores au sein d'une même selle, afin de s'assurer que la réponse semi-quantitative, que nous fournissons aux services cliniques, est fiable et cohérente.

## Matériel et méthodes

### Matériel

Dans cette étude, nous avons utilisé des selles de patients porteurs de spores de microsporidies conservées au réfrigérateur à 4° C. Toutes ces selles provenaient de sidéens hospitalisés dans le service de médecine interne du CHU de Nantes. Des études (1) ont montré qu'il n'y avait pas d'altération, tant dans l'aspect morphologique que dans le nombre de spores après stockage au froid.

Nous avons étudié cinq colorations ; une à l'Uvitex 2B de VAN GOOL (5) et quatre au trichrome : WEBER (6), RYAN (4), KOKOSKIN (3) et DELUOL (2) (cf. annexe).

La coloration de WEBER constituant la technique de référence, nous nous attacherons à mettre en exergue les modifications apportées dans les trois techniques dérivées. Quelle que soit la technique envisagée, le coût est équivalent.

La coloration de RYAN possède une composition de la solution de trichrome différente, avec le remplacement du vert brillant par du bleu aniline et une concentration en acide phosphotungstique plus faible. Selon les auteurs, cela renforce le contraste entre la spore et l'arrière-plan par une coloration plus intense du fond du champ.

La coloration de KOKOSKIN permet un gain de temps important (40 minutes au lieu des 120 minutes nécessaires à la coloration de WEBER) grâce à une incubation à 50° C.

La coloration de DELUOL comporte une étape supplémentaire de contre-coloration de la spore au vert malachite à 1 %, ce qui porte la durée de préparation à 180 minutes.

Les colorations au trichrome nécessitent un microscope optique équipé d'un objectif à immersion x 100. La technique de VAN GOOL implique un microscope à fluorescence muni d'un filtre d'excitation compris entre 355 et 425 nm et d'un filtre de suppression à 460 nm.

## Méthodes

L'étude a été réalisée en aveugle par deux examinateurs ; l'un très expérimenté dans la lecture des lames de microsporidies (M. MIEGEVILLE, lecteur A), l'autre possédant une expérience plus limitée (J. M. SPARFEL, lecteur B). La présence de deux biologistes pouvait apporter un biais dans l'évaluation des techniques. C'est pourquoi nous avons utilisé des tests statistiques adaptés et procédé à une double analyse. Afin de nous rapprocher des conditions habituelles de dépistage, nous avons toujours ajouté, dans la série d'échantillons examinés, des selles négatives. De plus, la numérotation des lames a été réalisée à l'aide de tables de permutations aléatoires afin d'éviter toute interprétation dans l'identification des lames.

### Analyse qualitative

Le premier des trois volets de cette étude consistait à déterminer la capacité, pour les cinq techniques de coloration susnommées, à détecter les spores dans un échantillon donné, afin de définir la positivité ou la négativité de la selle. Nous avons sélectionné vingt selles à partir desquelles ont été réalisées des suspensions homogènes. Ces suspensions ont servi à préparer cinq frottis, un pour chaque type de coloration. Les cent lames (20 selles x 5 colorations) numérotées aléatoirement de 1 à 100 ont été observées par les deux examinateurs qui donnèrent une réponse binaire (présence ou absence de spore). Cela nous a permis de dégager les notions de sensibilité, de spécificité et de fiabilité pour chacune de ces colorations. La sensibilité se définit comme la capacité d'une méthode à détecter les échantillons positifs. Elle représente le pourcentage de réponses rendues positives sur le nombre total de cas réellement positifs. De même, la spécificité représente la capacité à rejeter les résultats négatifs, c'est-à-dire le pourcentage de réponses rendues négatives sur le nombre total de prélèvements effectivement négatifs. Enfin, la fiabilité découle de deux notions préalablement définies, puisqu'elle représente le nombre de réponses exactes (vrais positifs et vrais négatifs) par rapport à l'ensemble des réponses formulées.

Dans un second temps, nous avons confronté les résultats obtenus par la technique chimiofluorescente (VAN GOOL) à ceux des techniques colorimétriques à base de trichrome, afin de mettre en évidence les éventuelles discordances entre les deux types de techniques et d'évaluer l'utilité de l'emploi de deux colorations pour établir le diagnostic de microsporidiose.

### Comparaison des 4 colorations au trichrome

Le second versant de cette étude consistait à apprécier les qualités respectives de chacune des techniques utilisant du trichrome (WEBER, RYAN, KOKOSKIN, DELUOL), afin de déterminer la plus apte à fournir un diagnostic de certitude. Pour cela, quatre critères ont été étudiés :

- intensité de la coloration de la spore,
- qualité de la morphologie,
- qualité du contraste avec l'arrière-plan,
- impression d'ensemble pour la facilité de dépistage.

Chaque critère était coté de 0 (mauvais) à 4 (excellent). Nous avons éliminé de l'analyse les quatre selles négatives ne procurant aucune information. L'étude a donc porté sur les 16 selles positives représentant 64 lames.

L'analyse statistique a été réalisée par une analyse de variances non paramétriques à deux facteurs croisés (l'un, parasite, représentant les 16 selles ; l'autre constitué des différents types de colorations). Le test de FRIEDMAN a été employé pour définir si, pour chaque critère étudié, apparaissait une différence significative entre les quatre colorations. Dans ce cas ( $p < 0,05$ ), nous approfondissons l'analyse par une méthode de comparaisons multiples de rangs moyens. Le test de BONFERRONI a été retenu pour procéder à une comparaison 2 à 2 des rangs moyens. Précisons que le score total (coté de 0 à 16) qui est l'addition des quatre critères analysés (coloration, morphologie, contraste, dépistage) a été considéré comme quantitatif, alors que les autres critères (cotés de 0 à 4) étaient, par essence, de nature qualitative ordinale.

### Etude de la répétabilité des résultats

Il restait à évaluer la fiabilité de nos résultats sur un prélèvement, afin de s'assurer que les microsporidies étaient suffisamment bien réparties dans les selles pour justifier une réponse semi-quantitative (absence, rares, quelques, nombreuses) et, ainsi, pouvoir suivre l'évolution de la charge parasitaire chez les patients sidéens.

Pour cela, nous avons sélectionné quatre selles, l'une riche, la seconde moyennement riche, la troisième très pauvre et la quatrième négative. Nous avons prélevé, dans chaque pot de selle, dix échantillons dans dix endroits différents. La suspension obtenue était répartie sur deux lames, l'une destinée à la coloration au trichrome (WEBER), l'autre colorée par l'Uvitex 2 B (VAN GOOL). Nous avons obtenu 80 lames (4 selles x 10 prélèvements x 2 colorations), dont la richesse a été évaluée de 0 à 4 [0 : absence de spore, 1 : rares spores (moins de 10 par lame), 2 : quelques spores (plus de 10 par lame et moins de 1 par champ), 3 : modérés (2 à 5 spores par champ), 4 : nombreuses spores (plus de 5 spores par champ)].

## Résultats - discussion

### Analyse qualitative

L'étude consistait à détecter la présence ou non de spores de microsporidies sur les 100 lames réalisées à partir des 20 selles. La répartition de ces selles ne fut dévoilée qu'après la lecture des lames et se composait de quatre selles négatives et de 16 selles positives de richesses variables. Les lames se répartissaient donc en 80 lames positives et 20 négatives. Les réponses obtenues à partir des quatre colorations à base de trichrome (WEBER, RYAN, KOKOSKIN et DELUOL) ont été regroupées sous l'appellation trichrome.

Tableau I.

Etude des réponses qualitatives à partir de une ou deux colorations.

	lecteur	Uvitex	trichrome	2 colorations Uvitex-trichrome
lames		20	80	80
sensibilité %	A	100	96,8	100
	B	87,5	89	98,4
spécificité %	A	100	100	100
	B	50	93,7	93,5
fiabilité %	A	100	97,5	100
	B	50	90	97,5

Le lecteur A concède deux erreurs de diagnostic (2 faux négatifs aux colorations à base de trichrome) et le lecteur B réalise une erreur de diagnostic sur 12 lames (3 faux positifs et 9 faux négatifs). La fiabilité globale ainsi obtenue à partir d'une seule coloration (Uvitex 2B ou trichrome) atteint respectivement 100 et 97,5 % pour A et 50 et 90 % pour B.

Les résultats de l'Uvitex 2B ne portent que sur 20 lames. Le lecteur A obtient une fiabilité de 100 %. Les réponses du lec-

teur B présentent quatre erreurs de diagnostic dues à des spores peu fluorescentes (faux négatifs) ou, au contraire, à des bactéries très fluorescentes, à la forme évoquant des microsporidies (faux positifs). Ceci met en exergue un manque de spécificité de cette technique.

Pour les colorations au trichrome, les erreurs de diagnostic étaient 9 fois sur 10 des faux négatifs dans des selles généralement pauvres. Ceci s'explique par la difficulté pour ces techniques à distinguer les spores de microsporidies lorsqu'elles sont en nombre réduit, ce qui traduit un manque de sensibilité.

Il en résulte que la confrontation de deux colorations basées sur des principes chimiques différents (le trichrome et l'Uvitex 2B) pour poser le diagnostic de microsporidiose permet de conjuguer leurs qualités respectives et procure un gain significatif sur le plan de la fiabilité (100 % pour le lecteur A et 97,5 % pour le lecteur B).

## Comparaison des quatre colorations au trichrome

L'ensemble des résultats représente 640 données chiffrées. Ces données sont explicitées sous forme de moyenne, dans un but descriptif, alors que les tests (FRIEDMAN et BONFERRONI) ont manipulé des rangs moyens.

Le lecteur A possède une opinion plus tranchée, puisqu'une différence significative ( $p < 0,05$ ) avec le test de FRIEDMAN se dégage dans les cinq analyses. L'analyse descriptive des moyennes montre également une prédominance du WEBER, qui obtient toujours les meilleures moyennes, alors que le DELUOL est systématiquement classé en quatrième position. Le lecteur B, qui n'avait préalablement utilisé aucune de ces colorations, a ainsi une analyse, certes moins tranchée, mais plus objective. Une différence significative ne se dégage que sur deux des cinq paramètres envisagés (morphologie et facilité de dépistage). La technique de WEBER ne possède la meilleure moyenne que dans trois des cinq analyses. Cependant, le profil général de l'étude est le même quel que soit l'examineur, ce qui valide l'analyse.

Tableau II.

Comparaison des colorations au trichrome.

	lecteur	WEBER	RYAN	KOKOSKIN	DELUOL	p*
coloration	A	2,50	1,81	2,00	1,50	0,049
	B	2,19	2,25	2,25	1,94	0,80
morphologie	A	2,81	1,31	1,94	0,75	<0,001
	B	2,37	1,94	1,69	0,75	0,005
contraste	A	2,37	1,56	1,56	1,06	0,001
	B	2,37	2,12	2,00	2,62	0,165
dépistage	A	2,87	1,69	1,81	1,25	<0,001
	B	2,62	2,00	1,81	1,19	0,028
score total	A	10,56	6,37	7,31	4,56	<0,001
	B	9,69	8,31	7,75	6,50	0,070

\* Les valeurs de cette colonne inscrites en gras indiquent que le test de FRIEDMAN montre une différence significative à 5 %.

Détaillons maintenant les différents paramètres.

Sur le critère de la qualité et de l'intensité de la coloration, seul A obtient une différence significative des rangs moyens avec le test de FRIEDMAN ( $p = 0,049$ ). Une comparaison 2 à 2 des colorations par le test de BONFERRONI implique six combinaisons possibles (WEBER-RYAN, WEBER-KOKOSKIN, WEBER-DELUOL, RYAN-KOKOSKIN, RYAN-DELUOL, KOKOSKIN-DELUOL). Il en ressort une différence significative en faveur du WEBER vis-à-vis du DELUOL ( $p = 0,022$ ), alors que les 5 autres associations se comportent de manière homogène entre elles.

L'analyse de la morphologie de la spore montre que la coloration de DELUOL ne permet pas une bonne visualisation des

spores (avec une moyenne identique pour les deux lecteurs de 0,75 sur 4).

Pour la qualité du contraste, B crédite la coloration de DELUOL de la meilleure moyenne (2,62), alors que pour A, la coloration de DELUOL est la moins performante. Les opinions divergentes entre les deux biologistes s'expliquent par le fait que B privilégie le contraste colorimétrique entre la spore et l'arrière-plan, alors que, pour A, les imperfections de morphologie obtenue avec la coloration de DELUOL empêchent toute certitude diagnostique.

Les résultats concernant la facilité de dépistage sont identiques pour les deux lecteurs, avec des différences significatives ( $p < 0,001$  et  $p = 0,028$ ) au test de FRIEDMAN, entraînant pour le test de BONFERRONI la même interprétation (WEBER > RYAN # KOKOSKIN > DELUOL).

L'analyse statistique des cotations obtenues permet donc de définir la meilleure méthode (le WEBER) et la moins performante (le DELUOL), alors que le RYAN et le KOKOSKIN obtiennent des valeurs intermédiaires. Signalons que la technique de DELUOL, moins efficace pour analyser les caractères morphologiques des spores d'*Enterocytozoon bienewisi*, a cependant été appréciée pour la lecture des lames négatives, car le contraste de l'arrière plan, fortement coloré en vert, permet de "balayer" rapidement l'ensemble de la lame à la recherche des spores de microsporidies roses.

## Etude de la répétabilité des résultats

L'étude des quatre selles a nécessité 80 lames (4 selles x 10 prélèvements x 2 colorations). L'évaluation de la richesse de ces lames a engendré les moyennes présentées dans le tableau III.

Tableau III.

Etude de la répétabilité des résultats sur quatre selles.

coloration	VAN GOOL	WEBER
selle riche	3,70	4
selle moyenne	3,05	3,15
selle pauvre	2,15	1,10
selle négative	0	0

Ces résultats permettent de tirer quatre enseignements :

- sur le plan qualitatif, il n'y a eu aucune erreur d'interprétation entre la selle négative et les trois selles positives ;
- on remarque une très bonne homogénéité des résultats pour une même selle, ce qui confirme la pertinence de l'évaluation de la richesse des selles et démontre la répartition homogène des microsporidies dans les trois selles examinées ;
- cela justifie l'évaluation semi-quantitative fournie aux services cliniques, car la selle riche a toujours été affectée d'un score de 3 ou 4 et, inversement, les 40 résultats obtenus à partir de la selle pauvre sont imputés d'un score compris entre 1 et 2, à l'exception de trois examens cotés à 3 (richesse modérée) pour le VAN GOOL ;
- enfin, les perceptions de richesse des lames entre les deux colorations sont proches et ne diffèrent que dans les prélèvements pauci-parasitaires, où les résultats de l'Uvitex 2B sont supérieurs (2,15) à ceux du trichrome (1,10). Cela confirme la meilleure sensibilité du VAN GOOL qui permet aisément la détection des spores dans les prélèvements pauvres. Cette propriété est mise à profit dans certains centres hospitaliers, qui opèrent un screening des lames au VAN GOOL, suivi d'une confirmation des lames positives par le WEBER. Cette démarche nous semble nécessaire, car seule une coloration à base de trichrome permet, par sa spécificité, d'affirmer la présence de microsporidies.

## Conclusion

Cette étude démontre la nécessité de deux colorations basées sur des principes chimiques différents pour fournir une réponse fiable. Parmi les différentes techniques au trichrome, la coloration de WEBER nous apparaît la plus apte à distinguer spécifiquement les spores de microsporidies. Ainsi, l'emploi d'une coloration chimiofluorescente, telle que l'Uvitex 2B de VAN GOOL, garantit une excellente sensibilité et son association avec une coloration au trichrome de WEBER, qui se caractérise par une bonne spécificité, permet un dépistage parasitologique satisfaisant tant sur le plan de la spécificité, de la sensibilité, que sur celui de la fiabilité. Ce type d'approche diagnostique apparaît à la fois rapide, simple et d'un coût peu élevé.

## Références bibliographiques

1. DE GIROLAMI PC, EZRATTY CR, DESCRIBI G, MC CULLOUGH A, ASMUTH D *et al.* - Diagnosis of intestinal microsporidiosis by examination of stool and duodenal aspirate with WEBER's modified trichrome and Uvitex 2B stains. *J Clin Microb*, 1995, **33**, 805-810.
2. DELUOL AM & CENAC J - Les microsporidioses *microsporidiosis*. *Ann Biol Clin*, 1994, **52**, 37-44.
3. KOKOSKIN E, GYKOS T, CAMUS A, CEDILLOTTE L, PURVILL T. & WARD B - Modified technique for efficient detection of microsporidia. *J Clin Microb*, 1994, **32**, 1074-1075.
4. RYAN N, SUTHERLAND G, COUGHLAN K, GLOBAN N, DOULKRER J & MARSHALL J - A new trichrome-blue Stain for detection of microsporidial species in urine, stool and nasopharyngeal specimens. *J Clin Microb*, 1993, **31**, 3264-3269.
5. VAN GOOL T, SNIJDERS F, REISS P, EEFINCK SCHATTENKERK JKM, VAN DEN BERGH WEERMAN MA *et al.* - Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidia infections in patient with HIV by a new rapid fluorescence technique. *J Clin Pathol*, 1993, **46**, 694-699.
6. WEBER R, BRYAN RT, OVEN R, WILCOX CM, GORELKIN L & VISVERSVARA G - Improved light Microscopical detection of Microsporidia Spore in stool and duodenal aspirate. *New Engl J Med*, 1992, **326**, 161-166.

## Annexe.

### Technique de WEBER

- Diluer les selles au tiers dans le formol à 10 %.
- Aliquoter 10 ml des selles formolées à l'extrémité de la lame, étaler en frottis mince, laisser sécher.
- Fixer la lame au méthanol pendant 5 minutes.
- Colorer la lame en l'immergeant dans la solution de trichrome pendant 90 minutes à température ambiante  
[Composition du trichrome : chromotrope 2 R : 6 g ; vert lumière : 0,15 g ; acide phosphotungstique : 0,7 g ; ajouter 3 ml d'acide acétique glacial ; attendre 30 minutes ; ajouter progressivement 100 ml d'eau distillée ].

- Différencier durant 10 secondes dans l'alcool acétique (5 ml acide acétique + 995 ml alcool à 90°).
- Déshydrater en quatre étapes : 30 secondes dans éthanol à 95° ; 5 minutes dans éthanol à 95° ; 10 minutes dans éthanol à 100° ; 10 minutes dans toluène.
- Lecture à l'immersion à l'objectif 100.

### Technique au trichrome bleu de RYAN

- Diluer les selles au tiers dans le formol à 10 %.
- Aliquoter 10 ml des selles formolées à l'extrémité de la lame, étaler en frottis mince, laisser sécher.
- Fixer la lame au méthanol pendant 5 minutes.
- Colorer la lame en l'immergeant dans la solution de trichrome pendant 90 minutes à température ambiante  
[Composition du trichrome bleu : chromotrope 2 R : 6 g ; aniline bleu : 0,5 g ; acide phosphotungstique : 0,25 g ; ajouter 3 ml d'acide acétique glacial ; attendre 30 minutes ; ajouter progressivement 100 ml d'eau distillée ; ajuster au pH 2,5 avec HCL 1 M].
- Différencier durant 10 secondes dans l'alcool acétique (5 ml acide acétique + 995 ml alcool à 90°).
- Déshydrater en 4 étapes : 30 secondes dans éthanol à 95° ; 5 minutes dans éthanol à 95° ; 10 minutes dans éthanol à 100° ; 10 minutes dans toluène.
- Lecture à l'immersion à l'objectif 100.

### Technique au trichrome de gomori modifié de DELUOL

- Diluer les selles au tiers dans le formol à 10 %.
- Aliquoter 10 ml des selles formolées à l'extrémité de la lame, étaler en frottis mince, laisser sécher.
- Fixer la lame au méthanol pendant 5 minutes.
- Colorer la lame en l'immergeant dans la solution de trichrome pendant 180 minutes à température ambiante  
[Composition du trichrome : chromotrope 2 R : 2,6 g ; acide phosphotungstique : 2,6 g ; ajouter 1 ml d'acide acétique cristallisable ; attendre 30 minutes ; ajouter progressivement 100 ml d'eau distillée].
- Rincer largement à l'eau acétique à 0,2 %.
- Contre-colorer avec une solution de vert malachite à 1 % pendant 30 secondes.
- Rincer les lames à l'eau du robinet.
- Sécher et lecture à l'immersion à l'objectif 100.

### Technique au trichrome modifié de KOKOSKIN

- Diluer les selles au tiers dans le formol à 10 %.
- Aliquoter 10 ml des selles formolées à l'extrémité de la lame, étaler en frottis mince, laisser sécher.
- Fixer la lame au méthanol pendant 5 minutes.
- Colorer la lame en l'immergeant dans la solution de trichrome pendant 10 minutes à 50° C  
[Composition du trichrome : chromotrope 2 R : 6 g ; vert lumière : 0,15 g ; acide phosphotungstique : 0,7 g ; ajouter 3 ml d'acide acétique glacial ; attendre 30 minutes ; ajouter progressivement 100 ml d'eau distillée ].
- Différencier durant 10 secondes dans l'alcool acétique (5 ml acide acétique + 995 ml alcool à 90°).
- Déshydrater en quatre étapes : 30 secondes dans éthanol à 95° ; 5 minutes dans éthanol à 95° ; 10 minutes dans éthanol à 100° ; 10 minutes dans toluène.
- Lecture à l'immersion à l'objectif 100.

**NB : les passages en caractères gras sont ceux où la technique diffère de celle de WEBER.**