

CHAPITRE DEUXIÈME

CADRE TECHNIQUE

Le matériel de laboratoire

Le matériel nécessaire au recueil des selles a été défini précédemment, aussi nous contenterons-nous d'envisager le matériel nécessité par la technique proprement dite.

La microscopie

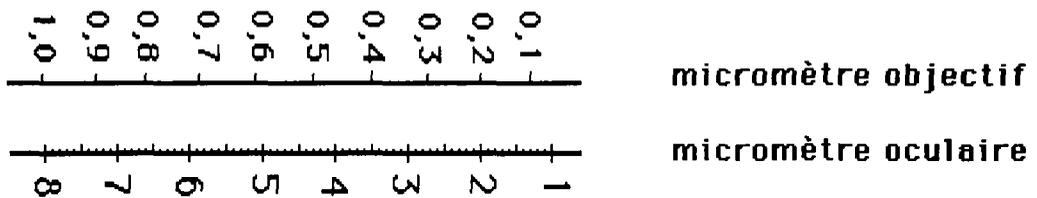
Oculaires du microscope

Dans l'un des oculaires sera disposé un micromètre oculaire dont les graduations seront étalonnées pour chaque grossissement d'objectif en utilisant un micromètre objectif.

Rappelons le principe : un micromètre objectif est une lame sur laquelle est collé un disque gravé finement d'un trait gradué indiquant les dixièmes de millimètre. L'étalonnage consiste à superposer les graduations visibles dans l'oculaire aux graduations du micromètre objectif.

Un calcul simple permet de déterminer quelle longueur représente une graduation du micromètre oculaire.

Exemple :



On voit que de 2 à 5,1 il y a 31 divisions du micromètre oculaire correspondant à 0,4 mm donc 1 division correspond à 12,9 μm et si on mesure un œuf de 12 divisions cela signifie qu'il mesure $12,9 \times 12 = 154,8 \mu\text{m}$.

Objectifs

Étant donné que le coprologiste recherche et étudie aussi bien des protozoaires de quelques microns que des vers visibles à l'oeil nu, il est souhaitable d'avoir un gamme d'objectifs allant de x2,5 jusqu'à x100. En général on travaille à x 2,5 et x 40. Pour un revolver à cinq ouvertures on aura donc x 2,5, x 10, x 25, x 40, x 100.

Platine

Pour explorer soigneusement la totalité d'une lamelle il est souhaitable d'avoir une platine munie d'un chariot; pour bien apprécier la mobilité des protozoaires, une platine chauffante réglée à 37°C ou 37°5C est vivement recommandée.

Dispositif de l'éclairage

Un éclairage normal est le plus souvent suffisant. Le contraste de phase permet de bien voir les flagelles des flagellés, les noyaux des protozoaires et le contenu de certains œufs ; il donne une vision des protozoaires souvent plus originale donc plus agréable.

L'éclairage ultraviolet sera réservé à la recherche de crochets ou d'œufs spontanément fluorescents sous U.V.

Loupe binoculaire

Une loupe binoculaire munie du dispositif de zoom est utile pour rechercher des parasites à la limite de la visibilité optique ou pour suivre des coprocultures helminthologiques.

La verrerie

Lames - lamelles

Les lames porte-objet devront être dégraissées. Les lamelles seront carrées (18 x 18 mm).

Baguettes de verre

Deux types de baguette :

- les unes fines (diamètre 4 à 6 mm), lavables, pour effectuer les prélèvements dans les récipients; elles pourront être remplacées par des pipettes Pasteur boutonnées jetables ;
- les autres larges (diamètre 10 à 12 mm) avec une extrémité aplatie en spatule dans la flamme d'un bec Bunsen à l'aide d'une pince également chauffée; elles servent à écraser et mélanger les matière fécales dans les techniques de concentration.

Verres à pieds

Ces verres à pied assez résistants pour être traités dans les machines à laver n'ont pas besoin d'être gradués; ils sont utilisés pour les concentrations. Ils doivent pouvoir contenir 125 ml de liquide.

Pour certaines techniques (Faust et Ingalls), on emploie des verres de 500 ml.

Ampoules à décanter forme poire

Ces ampoules de 500 à 1 000 ml sont utiles pour les recherches d'œufs dans les urines et pour certaines concentrations.

Tubes à centrifuger à fond conique

Nous préférons les tubes de 30 ml à ouverture de 25 mm aux tubes de 15 ml à ouverture de 15 mm mais ceci est affaire d'habitude. Ne pas utiliser les tubes plastiques jetables sans avoir testé leur résistance à l'éther.

Divers

- Boîtes de Petri et bacs Borrel (colorations).
- Entonnoirs de verre d'un diamètre de 10 cm d'ouverture avec robinet de vidange.

- Tubes à essai.
- Tubes à hémolyse munis de bouchon pour conserver les selles colorées par la technique du MIF.
- Mortier de 1 litre.
- Flacons de grande taille pour pipettes et lames sales (eau de Javel).
- Nous rangeons dans la verrerie les portoirs correspondant à ce type de matériel.

Le gros matériel et divers

- une étuve à 37° pour les cultures mycologiques éventuelles ;
- une étuve à 25° pour certaines cultures ;
- un réfrigérateur pour conserver des selles non utilisées et pour les milieux de culture en attente ;
- une centrifugeuse robuste; comme on doit utiliser de l'éther, pour des raisons de sécurité, il est préférable d'employer une centrifugeuse réfrigérée; certains, étant donné que les vitesses demandées sont faibles, se contentent d'une simple centrifugeuse à main ;
- une machine à laver la verrerie, éventuellement ;
- des bacs à eau de Javel (verrerie sale en attente) ;
- armoire pour produits inflammables ;
- armoire ordinaire pour produits chimiques divers et flacons de solutions spéciales
- flacons à parois foncées ;
- passoires de forme "chinois" à mailles de 1 mm² et de 7 cm d'ouverture ;
- bec Bunsen et bec Mecker, anses métalliques.

Déroulement des examens directs en techniques courantes

Examen macroscopique

Tout compte-rendu d'examen coprologique doit comporter une description des selles :

- leur couleur ;
- leur abondance ;
- leur aspect : selles en billes (en scybales), en fragments, moulées, moulées fermes ou moulées molles, pâteuses, semi-liquides ou franchement liquides.

Les selles sont homogènes ou hétérogènes ; par exemple : selles dures fragmentées dans un liquide fécaloïde ou avec du sang, du mucus, etc...

Sera aussi notée la présence d'éléments nutritionnels macroscopiquement visibles et non mastiqués. Curieusement il arrive que ce soit le coprologiste qui signale au clinicien la mauvaise denture de son patient.

Naturellement les parasites macroscopiquement visibles seront recueillis à l'aide d'une pipette Pasteur ou de pinces souples et disposés dans une boîte de Petri avec un peu de soluté physiologique de NaCl. Ils seront examinés secondairement à la loupe binoculaire et éventuellement subisolés et rincés.

On comprend l'avantage des boîtes transparentes pour repérer les parasites situés dans le fond des boîtes sous les matières fécales (ascaris, oxyures, anneaux de ténia par exemple).

Pour des selles non souillées d'urine la mesure du pH présente un intérêt dans l'étude de la physiologie de la digestion.

Examen microscopique standard

Examen direct en solution salée isotonique

L'examen direct est le temps majeur de l'examen coproparasitologique. On dit parfois que dix examens directs bien effectués sont souvent plus intéressants et plus fiables que deux concentrations hâtivement lues.

A l'aide d'une fine baguette on prélèvera des selles en superficie et en profondeur à différents endroits en privilégiant les zones où des anomalies sont patentées (mucus sanglant).

Ces petites particules de matière fécale seront diluées sur lame dans une goutte de soluté NaCl à 9 ‰, éventuellement tiédi.

La dilution doit être suffisante pour que, après écrasement sous une lamelle, il soit possible de reconnaître les caractères d'un journal à travers la préparation.

L'écrasement se fera avec le doigt protégé par un papier buvard et des doigts ou des gants protecteurs (absorption de l'excès de liquide et hygiène individuelle).

On lira toute la ou les préparations aux objectifs faibles et on regardera au moins une centaine de champs microscopiques à l'objectif x 40. L'objectif à immersion sera réservé pour des études fines d'un parasite déjà repéré.

En solution de Lugol double

Les mêmes dilutions seront effectuées dans une goutte de solution de Lugol double (cf. formule infra) et examinées avec le même soin en sachant que, dans cette solution, les protozoaires s'immobilisent rapidement mais que la chromatine des noyaux colorée en sombre est bien nette.

Avec la solution de Lugol, la flore iodophile du colon apparaît en brun et l'amidon mal digéré en bleu ; l'amidon transformé en érythro-dextrine est coloré en rouge violet.

La dilution en eau distillée

Elle peut être d'un certain secours lorsqu'une grande abondance de blastocystis ou de formes végétatives d'autres protozoaires rend difficile le repérage des kystes éventuels.

Ces derniers résistent bien à l'eau alors que les formes végétatives éclatent rapidement ; parfois avant de mourir elles se gonflent et leur noyau apparaît (*Dientamoeba fragilis*).

Examen microscopique direct après colorations spéciales

Les différentes techniques seront décrites et le formulaire correspondant à chacune d'elles regroupé à la fin du chapitre.

Les colorations spéciales sont effectuées pour préciser la morphologie d'un protozoaire observé et par conséquent pour affiner le diagnostic d'espèce. Elles peuvent correspondre à une recherche spécifique d'un parasite, *Cryptosporidium*, responsable de diarrhées du nourrisson ou des sujets immunodéficients.

Enfin la technique de Kato est plus une décoloration qu'une coloration ; elle permet de mieux repérer certains œufs de parasite et éventuellement de pratiquer une numération de ces œufs.

Colorations en tubes

– Au Merthiolate Iode Formol (technique de Sapero, Lawless et Strome)

Dans un tube à hémolyse on met 0,15 ml d'une solution de Lugol à 5 %. On y ajoute 2,35 ml d'une solution de merthiolate-éosine-formol en respectant bien l'ordre ci-dessus (ne pas ajouter la solution iodée à la solution de merthiolate ; ne préparer le mélange qu'au moment de l'emploi pour éviter les précipités).

Après mélange, la coloration des selles peut s'effectuer en ajoutant dans le tube un gros pois de matières fécales à l'aide d'une tige qui permet d'homogénéiser le tout.

Après vingt à trente minutes, les selles se sont déposées dans le fond du tube. La couche superficielle du sédiment est la plus riche en protozoaires. Les formes végétatives sont fixées immédiatement, pseudopodes encore visibles. La chromatine des noyaux est colorée en brun par l'iode.

Les kystes mûrs apparaissent en clair sur fond rose et semblent donc avoir des reflets verdâtres. Leurs noyaux fixés par le formol sont nets et parfois déjà colorés par l'iode. Ultérieurement l'éosine pénètre à l'intérieur des kystes.

Des selles ainsi fixées peuvent être conservées plusieurs mois voire plusieurs années en boîte obscure. Pour les réétudier, il est nécessaire de bien agiter le tube puis de le laisser de nouveau reposer pendant vingt minutes.

– Coloration au cristal violet de Bailenger

La coloration de Bailenger peut être réalisée en tube ou directement sur la lame en diluant une goutte de la suspension de selles avec le colorant.

Les parasites sont colorés très rapidement. Le cytoplasme des protozoaires devient rose tandis que la chromatine des noyaux apparaît en noir. Cette coloration est stable pendant plusieurs jours.

Coloration sur lame

– Coloration à l'hématoxyline ferrique

Les protozoaires ont été décrits après coloration par cette technique de référence. Il est donc nécessaire de la connaître malgré la difficulté de son exécution.

– Effectuer un étalement humide :

- . sur une lame bien dégraissée, déposer une goutte de selles (ou de mucus) pures si elles sont liquides ou diluées dans du soluté isotonique éventuellement additionné d'un dixième de sérum (meilleure fixation) ;
- . avec le bord d'une lamelle réaliser l'étalement en faisant des zigzags et des changements de vitesse d'exécution pour obtenir des différences d'épaisseur.

– Fixer immédiatement sans laisser sécher :

- . soit par la solution ordinaire de Bouin, fraîchement préparée (durée de fixation : au moins 15 n) puis passer la lame dans deux bains d'alcool à 90° puis un bain d'alcool à 70° où la lame peut rester quelques jours. Il est possible de retirer l'excès (lames jaunes) d'acide picrique restant par du carbonate de lithium à 1% puis de rincer à l'eau
- . soit par le fixateur de Duboscq-Brasil recommandé pour les kystes; durée de la fixation : 15 minutes ;
- . soit par la solution de Schaudinn acétique qui semblerait la meilleure ; durée de la fixation : 1 heure.

Avant la coloration, plonger la lame 10 à 20 minutes dans un bain d'alcool à 70°, additionné d'iode (couleur ambrée) puis rincer dans des bains d'alcool à 70° avant de laver à l'eau.

- Mordancer : plonger la lame dans une solution aqueuse d'alun de fer à 3% : 30 minutes à l'étuve à 37°.
- Colorer à l'hématoxyline : plonger la lame dans les bains d'hématoxyline. A température de la pièce 24 h sont nécessaires pour bien colorer les amibes. Dans l'étuve à 37°, 30 à 60 minutes peuvent suffire. Les parasites sont alors bien noirs.
- Différencier avec la solution aqueuse d'alun de fer à 1% en surveillant au microscope cette différenciation jusqu'à ce que les noyaux apparaissent nettement.
- Arrêter la différenciation par d'abondants lavages à l'eau.

– Déshydrater par passage dans deux bacs d'alcool à 70°, deux bacs d'alcool à 90°, un bac d'alcool à 95°, deux bacs d'alcool absolu; par deux ou trois bacs de toluène (ou xylène) on rend la lame susceptible de recevoir une goutte de baume de Canada ou de baume synthétique et la lamelle est posée définitivement.

– Coloration à l'A.P.V.-Trichrome

L'irrégularité des résultats de cette technique, liée à la difficulté d'obtenir des produits chimiques de qualité, nous fait regretter de ne pouvoir la conseiller dans le cadre des examens systématiques. Les images obtenues sont en effet, quand la coloration est réussie, extraordinaires de pureté.

– Frottis :

- . diluer au quart sur une lame une petite goutte de selles dans la solution d'APV et mélanger avec un petit agitateur ;
- . étaler en couche mince sur environ le tiers de la lame; les colorations seront ultérieurement effectuées en tube Borrel ;

Remarque : la dilution peut être effectuée en tube à hémolyse et le frottis différé de plusieurs mois si nécessaire.

– Coloration :

- . mettre les frottis dans de l'alcool à 70° contenant assez d'iode pour donner une coloration ambrée à la solution : 3 à 10 min ;
- . alcool à 70° : 2 min ;
- . alcool à 50° : 2 min ;
- . rincer à l'eau du robinet
- . solution de Gomori : 30 min ;
- . alcool à 90° contenant 0,5 % d'acide acétique : 5 à 10 secondes ;
- . alcool à 95° : rincer pendant 30 secondes environ.

– Montage

- . alcool absolu : une minute ;
- . xylène : 5 minutes ;
- . montage en baume synthétique.

– Coloration au noir chlorazol de Kohn

Cette coloration permet de colorer les trophozoïtes en gris et de bien voir la structure des noyaux. Les kystes apparaissent en bleu pâle avec des noyaux bien nets. C'est une technique facile à réaliser.

- Effectuer un étalement humide mince si possible (cf. technique ci-dessus).
- Plonger la lame dans le fixateur colorant de Kohn et la laisser 8 à 10 heures.
- Laver à l'eau courante, déshydrater et monter au baume de Canada ou au baume synthétique comme ci-dessus.

– Colorations pour recherche de cryptosporidies

La technique actuellement reconnue comme la plus fiable pour trouver des oocystes de *Cryptosporidium* est la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz.

Elle s'effectue sur frottis mince de selles ou sur le surnageant après centrifugation des selles selon la technique de Janecko-Urbanyi.

- Sécher le frottis à l'air.
- Fixer au méthanol pur pendant 5 minutes
- Sécher de nouveau.
- Colorer la lame dans un bain de fuchsine phéniquée :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 vert malachite à 5 % pendant 5 minutes 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 à l'objectif x 40 et à diagnostiquer à l'immersion (objectif x 100). D'autres techniques proposées ont une valeur certaine (colorations à l'auramine, par anticorps monoclonal fluorescent,...) mais elles nécessitent l'emploi d'un microscope à fluorescence, sont souvent chères et ne sont pas d'un emploi facile pour tout laboratoire et à toute heure.

La coloration par les solutions de May-Grünwald et de Giemsa ne nous semble pas de lecture aisée.

– Coloration pour recherche de microsporidies

Les spores d'*Enterocytozoon bienewisi*, visibles après une coloration générale aux solutions de May-Grünwald et Giemsa, sont plus facilement mises en évidence par la technique de coloration au trichrome :

- Formoler la selle dans une solution de formol à 10%.
- Effectuer un frottis de la selle.
- Fixer le frottis pendant 5 minutes dans un bain de méthanol.
- Plonger dans la solution de chromotrope 2R, 90 minutes.
- Rincer deux fois :
 - . à l'eau du robinet d'abord ;
 - . en solution acide-alcool ensuite :
 - acide acétique : 4,5 ml
 - alcool à 90 % : 995,5 ml

Les spores, recherchées à l'objectif x100, apparaissent en rouge.

Technique de décoloration des selles

La technique de Kato permet de distinguer rapidement à un faible grossissement les œufs de parasites dans une préparation épaisse de selles rendue translucide par la solution de glycérine-vert malachite.

- Des bandes de cellophane de 3 x 2 cm sont immergées pendant au moins 24 heures dans une solution de glycérine-vert malachite.
- Déposer et étaler grossièrement environ 20 à 50 mg de matières fécales (exactement 20 mg pour une numération) sur une lame porte-objet.
- Recouvrir par une des bandes de cellophane préalablement apprêtées.
- Presser à l'aide d'un papier filtre pour répartir régulièrement la couche de selles.
- Laisser la préparation s'éclaircir pendant 10 minutes à une distance de 20 cm d'une lampe de 100 w (ou 1 h à la température ambiante ou 30 minutes à 30° C ou 12 minutes à 42° C).
- Examiner sans plus attendre pour éviter une altération voire une lyse des œufs.

Formulaire

- Solution de Lugol double
 - . iodure de potassium : 0,2 g
 - . iode en paillettes : 0,1 g
 - . eau distillée : 10 ml

Dissoudre l'iode dans très peu d'eau, ajouter l'iode peu à peu et compléter avec le reste de l'eau.

A conserver en flacon brun avec date de fabrication (à renouveler toutes les 2 à 3 semaines).

– Pour la technique du MIF

- Solution de Lugol à 5 %
 - . iode en paillettes : 0,5 g
 - . iodure de potassium : 1,0 g
 - . eau distillée : 10 ml

Préparation : dissoudre l'iodure dans très peu d'eau, ajouter l'iode peu à peu et, lorsque tout est dissous, compléter avec le reste de l'eau.

Cette solution devra être conservée en flacon brun, à l'abri de la lumière et la date de fabrication devra être inscrite sur le flacon. En effet cette solution n'est stable que pendant quelques semaines.

- Solution mère de merthiolate :

- . teinture de merthiolate Lilly 1/1000 : 200 ml (formule n°99)
- . formol du commerce : 25 ml
- . glycérol : 5 ml
- . eau distillée : 250 ml

- Si l'on ne peut se procurer la teinture de merthiolate du commerce, la solution mère peut se préparer selon la formule suivante :

Ajouter dans l'ordre :

- . éosine à l'eau : 0,8 g
- . alcool à 100 : 210 ml
- . eau distillée : 650 ml
- . acétone : 40 ml
- . merthiolate : 0,4 g (mercuriothiosalicylate de Na)
- . monoéthanolamine : 0,4 g
- . formol : 50 ml
- . glycérol : 10 ml

Ces solutions sont à conserver en flacons bruns.

- Pour la coloration de Bailenger :

Laisser pendant une nuit en contact :

- . cristal violet : 2 g
- . fuchsine basique : 0,05 g
- . alcool à 95° : 20 ml
- . phénol cristallisé fondu : 10 ml
- . eau distillée : 100 ml

Conserver ce colorant dans un flacon hermétiquement bouché à l'abri de la lumière (verre teinté). Prélever le colorant en surface sans l'agiter (dépôt).

- Pour l'APV Gomori :

- Solution aqueuse saturée à froid $HgCl_2$: dissoudre à chaud 10 % de ce sel, laisser refroidir, décanter le surnageant au fur et à mesure des besoins.

- Solution de Schaudinn

- . solution ci-dessus : 2 volumes
- . alcool éthylique à 95° : 1 volume
- . glycérol : 1,5 ml
- . acide acétique glacial : 5,0 ml

- Solution d'APV : aux 100 ml obtenus ci-dessus ajouter 5 g d'APV (alcool polyvinylique N° 90-50), qui se dissolvent à 75°C au bain-marie, en prenant garde de ne pas enflammer l'alcool.

Cette solution est stable pendant un an au minimum (Petithory et coll.)

Remarque : penser que la solution de $HgCl_2$ est corrosive pour tout métal

- Solution de Gomori

- . chromotrope 2 R : 0,6g
- . vert lumière SF : 0,3 g
- . acide phosphotungstique : 0,7 g
- . acide acétique : 1 ml
- . eau bidistillée : 100 ml

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

– Pour la coloration à l'hématoxyline ferrique

– Fixateurs

- . Fixateur de Bouin ordinaire :
 - solution aqueuse saturée d'acide picrique : 15 ml
 - formol du commerce : 5 ml
 - acide acétique cristallisable : 1 ml
- . Fixateur de Duboscq-Brasil (Bouin alcoolique) :
 - alcool éthylique à 80° : 150 ml
 - formol du commerce : 60 ml
 - acide acétique cristallisable : 15 ml
 - acide picrique : 1 g
- . Solution de Schaudinn acétique :
 - solution aqueuse saturée de sublimé : 200 ml
 - alcool éthylique à 90° : 100 ml

Au moment de l'emploi, ajouter de l'acide acétique cristallisable pour obtenir une solution à 1 %.

. Mordanceur

- alun de fer : 3 g
- eau distillée : 100 ml

. Colorant

- hématoxyline : 1 g
- alcool éthylique à 90 : 10 ml

Après dissolution complète par agitation, compléter à 100 ml par de l'eau distillée.

. Différenciateur

- alun de fer : 1 g
- eau distillée : 100 ml

– Pour la coloration de Kohn

. Solution de base

- alcool éthylique 90° : 170 ml
- alcool méthylique : 160 ml
- acide acétique glacial : 20 ml
- phénol fondu : 20 ml
- acide phosphotungstique (solution aqueuse 1 %) : 12 ml
- eau distillée : qsp 1000 ml

Préparation avec 5 g de noir chlorazol (noir formique Geigy) : dans un mortier réduire le noir en poudre et ajouter progressivement la solution de base jusqu'à obtention d'une pâte bien lisse. Bien mélanger alors cette pâte avec une petite quantité de solution (50 à 100 ml), laisser reposer, recueillir le surnageant et recommencer jusqu'à dissolution complète du colorant qui sera alors en saturation dans la solution de base entièrement utilisée.

Après un à deux mois de maturation à la lumière, la solution colorante d'un rouge foncé, presque noir (cerises très mûres) sera prête à l'emploi après filtration. Elle peut être utilisée telle quelle ou, au moment de l'emploi, diluée aux deux tiers dans la solution de base.

– Pour la coloration de Ziehl-Neelsen-Henriksen-Pohlenz

. Fuchsine phéniquée de Ziehl

- fuchsine basique : 10 g
- phénol : 28 g
- éthanol : 150 ml
- eau : qsp 1000 ml

- . Acide sulfurique à 2 %
 - acide sulfurique : 2 ml
 - eau distillée : 98 ml
 Ajouter goutte à goutte l'acide dans l'eau.
- . Solution de vert malachite
 - vert malachite : 5 g
 - eau distillée : 100 ml
- Pour la coloration au trichrome de Weber et coll. (1992)
 - . chromotrope 2R : 6 g
 - . fast green (Aldrich) : 0,15 g
 - . acide phosphotungstique : 0,7 g
 Ajouter 3 ml d'acide acétique glacial, laisser reposer pendant trente minutes et mélanger à 100 ml d'eau distillée.
- Pour la technique de Kato
 - . Solution glycérine - vert malachite
 - glycérol pur : 100 ml
 - eau distillée : 100 ml
 - solution vert malachite à 3 % : 1 ml

Les concentrations

On appelle concentrations les techniques par lesquelles on essaie, à partir de la grande quantité de matières fécales recueillies, d'obtenir dans un faible volume les œufs, larves, kystes voire formes végétatives fixées de parasites par élimination des résidus de la digestion.

Pour ce faire, on joue sur les densités et affinités différentes de ces résidus et des parasites recherchés.

La grande diversité des constituants des selles et des espèces parasites explique que les concentrations ne puissent être totalement efficaces sauf peut-être les concentrations dites combinées qui sont en réalité la succession de plusieurs techniques sur le même échantillon de selles.

Seront donc envisagées successivement les méthodes physiques, les méthodes physico-chimiques et les méthodes combinées. Dans le grand nombre de méthodes proposées seront présentées celles qui, pour leur commodité et leur efficacité, sont les plus utilisées dans les laboratoires français dont les résultats semblent très fiables sur le plan international.

Techniques générales

Le choix des techniques

– Enquête épidémiologique spécifique

Pour une enquête recherchant une espèce particulière de parasite, on devra choisir une technique plus spécifique pour trouver ce parasite. Il faudra tenir compte de sa facilité d'exécution et de son prix de revient.

– Enquête épidémiologique générale sur le terrain

Pour une étude plus générale, les techniques devront être faisables après transport donc fixation des matières fécales. Le fixateur peut modifier le résultat de certaines techniques par ailleurs très efficaces.

– Analyse coproparasitologique pour un malade

Il est recommandé pour un cas clinique particulier d'effectuer soit une technique combinée soit deux techniques différentes sans hésiter à pratiquer une voire deux autres techniques si l'interrogatoire ou les renseignements cliniques permettent une orientation vers une parasitose donnée.

Prélèvements pour concentration

Aussi bien certains œufs que les kystes sont répartis irrégulièrement dans les matières éliminées en une seule défécation. Il est donc nécessaire de prélever des fragments de selles à différents endroits à l'aide d'un agitateur de verre aplati en palette (cf. matériel verrerie).

Homogénéisation, filtration

– Homogénéisation

Quel que soit le liquide diluant, les selles devront être triturées dans un verre à pied, au début dans une très petite quantité de liquide pour obtenir une pâte qui sera secondairement étendue. Le résultat sera un diluat correspondant à ce qui est recommandé pour la technique choisie.

– Filtration

Pour éliminer les particules alimentaires non fragmentées (peaux de fruits par exemple), le diluat obtenu est filtré à travers une passoire (forme chinois) à mailles de 1 mm² environ et de 7 cm d'ouverture et recueilli dans un autre verre à pied.

Un peu de liquide propre permet de rincer la passoire et d'emporter les éventuels œufs restés dans les mailles.

La passoire, après usage, sera brossée et flambée (destruction d'œufs éventuellement restés accrochés dans les mailles).

– Brève sédimentation

Après moins d'une minute le filtrat sera transvasé lentement dans un autre verre ou directement utilisé. Ces quelques secondes de sédimentation permettent aux petits éléments lourds de tomber dans le fond du verre à pied (cellules scléreuses de poires par exemple).

Concentrations par les méthodes physiques de sédimentation

Sédimentation simple

– Intérêt

Technique recommandée pour les larves d'anguillule et les œufs d'ascaris non fécondés. Elle ne nécessite pas de produit chimique particulier.

– Inconvénients

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

– Déroulement de la 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.

Certains, au lieu d'attendre la sédimentation, gagnent du temps par des centrifugations lentes.

Méthode de Faust et Ingalls en eau glycinée

– Intérêt

Cette technique de terrain est employée pour rechercher les œufs de *Schistosoma mansoni* mais permet aussi de trouver œufs d'*Ascaris* non fécondés et larves d'anguillule.

– Inconvénients

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

– Déroulement de la technique

Cinq grammes de selles sont dilués dans 300 ml d'eau glycérolée à 0,5%. On pratique trois sédimentations successives en verres à pied d'une durée de 1 heure, 45 minutes puis 30 minutes.

Les œufs de schistosomes sont plutôt en surface du sédiment mais il est recommandé d'effectuer des prélèvements à différents niveaux.

Méthode de Van Someren et Grégoire en colonne haute

– Intérêt

Cette technique vétérinaire est utilisée par certains médecins pour rechercher essentiellement les œufs de grande douve.

– Inconvénients

L'inconvénient majeur de cette technique réside dans la nécessité d'utiliser un appareillage spécial c'est-à-dire un tube de verre de 1 cm de diamètre intérieur et de 2,10 m de haut. En bas de ce tube un tuyau de caoutchouc de quelques centimètres peut être fermé par une pince. Il relie le grand tube de verre à un autre tube de verre, court, muni d'un robinet.

– Déroulement de la technique

Le grand tube est rempli de solution de Teepol à 1 % en évitant une forte agitation (bulles). Quatre grammes de selles diluées dans 36 ml de cette même solution sont tamisées à travers la passoire ordinaire voire à travers une deuxième passoire à mailles plus fines (un tiers de millimètre de côté).

Le filtrat est versé lentement dans le liquide de la colonne. Après 20 minutes exactement la pince du tuyau en caoutchouc est serrée et, au robinet, on recueille quelques gouttes de liquide où se sont condensés les œufs de douve particulièrement denses (densité : 1,2).

Concentrations par les méthodes physiques de flottation

Les méthodes de flottation reposent sur le principe que les œufs ont une coque qui les protège pendant un certain temps de la pénétration de liquides plus denses; une dilution avec ces liquides aura tendance à les laisser flotter en surface tandis que les résidus plus lourds ou ceux qui s'imprègnent rapidement tombent dans le fond des récipients.

Comme pour les méthodes de sédimentation, la simplicité des formules pour préparer le liquide de dilution ne nécessite pas un alinéa spécifique pour le formulaire.

Méthode de Willis

– Intérêt

Dans les enquêtes épidémiologiques, cette technique présente l'avantage de la simplicité d'exécution, de la rapidité et d'un faible prix de revient (eau chlorurée sodique). Elle concentre bien les œufs d'ancylostomidés et d'hyménozoaires.

– 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.

– Déroulement de la technique

Les selles sont diluées au dixième environ dans une solution aqueuse de chlorure de sodium à saturation (25 grammes dans 100 ml environ; densité 1 200), puis filtrées rapidement.

La suspension obtenue est versée dans un tube jusqu'à la limite supérieure (léger bombement du liquide au dessus du bord). On place alors délicatement une lamelle qui doit recouvrir tout le tube sans bulle d'air.

Un quart d'heure plus tard on retire la lamelle qui est déposée sur une lame et la lecture de la concentration est effectuée avant évaporation de l'eau et cristallisation du sel ce qui, en pays chaud, peut se produire rapidement.

Méthode de Faust simplifiée**– Intérêt**

Alors que la méthode originale exige plusieurs sédimentations dans l'eau par centrifugation, avant la flottation, dans la méthode simplifiée on se contente d'une seule centrifugation.

– Inconvénients

La densité du liquide de dilution (1,18) est proche de celle de la solution de Willis et n'a pas l'avantage de la simplicité pour se procurer le corps chimique de base (sulfate de zinc). Cette méthode ne permet guère de trouver plus d'œufs que la méthode de Willis. Elle exige l'utilisation d'une centrifugeuse.

– Déroulement de la technique

Les selles sont diluées au dixième environ dans une solution saturée de sulfate de zinc (sulfate de zinc 331 g, eau qsp 1000 ml), tamisées et centrifugées environ une minute à 2300 tours/minute. Dès l'arrêt de la centrifugation, on prélève à l'anse métallique la couche superficielle qui contient les œufs et on la dépose sur une lame pour examen.

Méthode de Janeckso et Urbanyi**– Intérêt**

La technique proposée par Janeckso et Urbanyi concentre bien les œufs de grande douve, de schistosomes et d'ancylostomidés ainsi que les larves d'anguillule dont les déformations éventuelles n'interdisent pas la reconnaissance. Elle concentre assez bien les embryophores de ténia et les œufs de trichocéphale.

– Inconvénients

La solution iodo-mercurique est toxique (étiquette rouge), doit être conservée dans un flacon bien bouché et est très corrosive. Elle forme avec les métaux des balances, des divers matériels (centrifugeuse, tuyaux de plomb) et surtout des bijoux (alliances, montres-bracelets), des amalgames irréversibles. Comme presque toutes les méthodes de flottation, cette technique est inefficace pour trouver les kystes sauf ceux de giardia.

–Déroulement de la technique

Trois à cinq grammes de selles sont triturés dans 20 ml de la solution iodo-mercurique (biiodure de mercure 150 g, iodure de potassium 110 g et eau 400 ml).

Pour préparer la solution : dissoudre l'iodure dans un peu d'eau, ajouter le biiodure en remuant, puis après dissolution complète, ajouter le reste de l'eau. La densité obtenue est de 1 440.

Après tamisage, le filtrat est centrifugé à 2 500 tours/mn pendant 3 à 4 minutes. La couche superficielle recueillie à l'aide d'une anse ou d'une baguette de verre aplatie en spatule est examinée au microscope dans le quart d'heure qui suit.

Méthodes physico-chimiques (méthodes diphasiques)

Principes théoriques

– Principes

Par une solution chimique, certains résidus fécaux sont dissous et d'autres acquièrent une affinité pour l'éther. Le principe de ces techniques est donc de mélanger les selles avec une solution déterminée puis d'agiter le tout avec de l'éther avant de centrifuger pour recueillir œufs et kystes.

Bailenger a montré que le pH de la solution était l'élément déterminant pour la plus ou moins grande efficacité d'une technique selon le parasite recherché. Par exemple, pour les œufs d'ankylostomes, un pH acide est plus favorable mais en revanche, pour les œufs de *S. mansoni*, il recommande un pH basique.

– Détails techniques de la centrifugation

. Préparation

Les selles triturées (mélange au dixième environ) dans la solution choisie sont tamisées à travers une passoire comme cela est décrit pour les techniques physiques puis, après moins d'une minute de brève sédimentation, le filtrat est versé dans un tube à centrifuger à fond conique en le remplissant à moitié ou aux deux tiers.

On ajoute de l'éther en laissant un espace vide au dessus de la couche éthérée pour permettre une bonne agitation.

Le tube bouché à la main protégée d'un gant (matériau non soluble dans l'éther) est alors agité énergiquement pendant au moins trente secondes à une minute et, sauf pour le M.I.F.-concentration, aussitôt centrifugé. Il faudra prendre garde aux possibles petites projections d'éther souillé en retirant la main de l'orifice du tube.

. Centrifugation

La suspension éthéro-liquide obtenue est centrifugée à une vitesse lente de l'ordre de 1500 à 2000 tours/minute pendant une à trois minutes.

– Résultats de la centrifugation

Après centrifugation, les constituants de la suspension sont répartis en quatre couches :

- . couche superficielle d'éther coloré par les corps éthéro-solubles (graisses diverses) ;
- . couche épaisse et adhérent aux parois du tube, contenant les résidus lipophiles ;
- . couche de solution aqueuse de dilution colorée par les corps hydrosolubles ;
- . culot devant contenir les parasites et qui doit être aussi petit que possible voire presque indiscernable à l'oeil nu.

– Suite de la technique

- . Décoller la couche des résidus lipophiles à l'aide d'une baguette de verre.
- . Retourner le tube au dessus de l'évier (en faisant couler de l'eau) ou d'un bac à déchets liquides.

Penser qu'ainsi est jeté de l'éther, donc travailler loin d'une flamme ou... d'une cigarette; penser également que, dans la technique au MIF-concentration (comme précédemment dans la flottation de Janeckso-Urbanyi), sont rejetés des sels de mercure considérés comme toxiques et faisant l'objet d'une réglementation pour le contrôle sanitaire des eaux usées.

En France, les liquides contenant des sels de mercure doivent être recueillis dans des récipients de plastique bouchés, qui seront confiés à des services spécialisés.

- . Essuyer les parois du tube avec un coton tenu à la pince en laissant toujours le tube avec l'ouverture dirigée vers le bas pour éviter de souiller le culot avec les résidus.
- . Retourner alors le tube et ajouter une goutte de solution isotonique pour remettre en suspension le culot qui sera examiné;

– Prélèvement du culot

Le culot sera prélevé à la pipette Pasteur mais il est impératif de ne pas aspirer. Le liquide devra monter par capillarité dans l'effilure, au besoin en penchant légèrement le tube. En aspirant on risquerait, en effet, que le culot ne montât au delà de l'effilure et que les parasites recherchés et le liquide se répartissent sur toute la surface interne de la pipette Pasteur : tout serait alors à refaire.

Formulaire

Il est commode, dans le travail courant, de posséder en une seule page les formules des liquides de dilution; c'est pourquoi est présenté ce formulaire avant l'étude de chaque technique.

– Solution de Telemann modifiée par Rivas

- . acide acétique cristallisable : 5 ml
- . eau : qsp 1000 ml

– Solutions de Carles et Barthélémy

- A) . NaCl : 9 g
 - . formol officinal : 10 ml
 - . eau : qsp 1000 ml
- B) . acide citrique : 100 g
 - . formol officinal : 20 ml
 - . eau : qsp 1000 ml

– Solution de Bailenger

- . acétate de sodium : 15 g
 - . acide acétique : 3,6 ml
 - . eau distillée : qsp 1000 ml
- Ajuster à pH5 avec acide acétique ou soude diluée, à l'aide d'un pH-mètre.

– Solutions de Thébault

- A . acide trichloracétique à 20 % : 10 ml
 - . formol officinal : 100 ml
 - . eau : qsp 1 000 ml
- B . bromure de sodium cristallisé : 622 g
 - . eau distillée : 1000 ml

– Solutions de Ritchie

- . eau chlorurée sodique à 9 ‰
- . eau formolée à 10 % (formol officinal)

– Solution de MIF (cf. page 15)

Méthode de Telemann modifiée par Rivas

– Avantages

Facile à pratiquer, rapide, cette technique concentre bien les parasites les plus courants (*Giardia*, *Entamoeba* et œufs de trichocéphale). La coque des kystes d'*Entamoeba histolytica* se dédouble lors de la centrifugation ce qui est un argument diagnostique intéressant.

– Inconvénients

Les œufs de bilharzies, d'ascaris ou de grande douve restent dans la couche lipophile: c'est donc une méthode à déconseiller dans les pays où sévissent ces parasitoses.

– Déroulement de la technique

Aucune particularité n'est à signaler par rapport à la technique générale des concentrations diphasiques.

Méthode de Carles et Barthélémy

– Avantages

Par cette technique le culot obtenu est très faible et, débarrassés de la majorité des bactéries des selles, les parasites apparaissent "propres". Les œufs de trichocéphale ou d'ankylostome et les kystes amibiens sont retrouvés aisément et facilement identifiables.

– Inconvénients

Le pH particulièrement bas (1,8) est défavorable pour retrouver les œufs de schistosomes ou les larves d'anguillule. Par ailleurs la technique exigeant deux centrifugations est plus longue que les techniques en un temps.

– Déroulement de la technique

Une première centrifugation du filtrat obtenu après dilution dans le liquide A (eau isotonique formolée) permet d'éliminer, avec le surnageant, des bactéries et des substances hydrosolubles.

Une seconde centrifugation est effectuée après mise en suspension du culot dans le liquide citrique B et agitation avec une quantité égale d'éther. Seul le culot est examiné.

Méthode de Bailenger

La méthode proposée par Bailenger tient compte de l'importance du pH mais la technique ne diffère pas de celle de Telemann et Rivas.

– Avantages

Elle est beaucoup plus fiable dans la recherche des kystes et des œufs se concentrant bien dans un pH aux environs de 5 (giardia, amibes, trichocéphale, ankylostome).

– Inconvénients

Pour rechercher les œufs de schistosome une autre technique est nécessaire.

– Déroulement de la technique

Les manipulations sont identiques à celles de la méthode de Telemann et Rivas.

Méthode de Thébault simplifiée (Valentin et Solle)

La méthode de Thébault est en réalité une méthode combinée mais rares sont les techniciens qui n'utilisent pas la méthode simplifiée proposée par Valentin et Solle.

– Avantages

L'émulsion avec l'éther est pratiquée dans une ampoule à décanter et par conséquent il est possible de techniquer sur une plus grande quantité de selles.

Cette méthode est particulièrement intéressante pour concentrer les kystes des petites amibes et en particulier les *Endolimax nanus* dont les noyaux deviennent, grâce au formol du liquide de dilution, extraordinairement nets. On retrouve également, fixées, des formes végétatives d'amibes et les œufs de trichocéphale.

– Inconvénients

Les kystes d'*Entamoeba coli* et surtout de *Giardia* descendent assez mal. C'est donc

une excellente méthode à utiliser seulement pour préciser le diagnostic de rares kystes observés à l'examen direct ou après une méthode altérant leur morphologie.

– Déroulement de la technique

On dilue 10 g de selles environ dans 100 ml de solution d'acide trichloracétique. Le filtrat obtenu après tamisage doit reposer une minute avant d'être versé dans une ampoule à décanter (forme ballon ou forme poire). On ajoute une quantité égale d'éther et on agite vigoureusement en faisant évacuer l'éther vaporisé par ouverture du robinet *tenu en haut* (risques de projection du bouchon si ce geste n'est pas effectué).

On laisse reposer 2 à 10 minutes avant de retirer le bouchon et de soutirer quelques centimètres cubes que l'on centrifugera. Le culot sera examiné au microscope. Dans la technique originelle le culot est repris par la solution bromurée. Une deuxième centrifugation permet, par flottation, de recueillir les parasites en surface. La technique originelle de Thébault est donc une méthode combinée.

Méthode de Ritchie simplifiée

– Avantages

Cette méthode peut être utilisée sur les selles formolées donc sur des selles collectées pour enquêtes épidémiologiques. Elle concentre bien les œufs d'ascaris et de schistosome.

– Inconvénients

Le culot souvent volumineux est de lecture difficile.

– Déroulement de la technique

Mis à part le liquide de dilution, la technique est la même que pour la concentration de Telemann-Rivas.

Méthode de Blagg et al.

– Avantages

Cette méthode permet de concentrer les œufs de schistosome et d'ascaris. Les kystes de protozoaires voire les formes végétatives sont colorés et ainsi facilement identifiables.

– Inconvénients

Le culot obtenu est souvent important. La manipulation de grandes quantités de liquide coloré à l'éosine augmente les risques de taches et surtout la présence de mercure souille les effluents du laboratoire.

– Déroulement de la technique

Les selles sont diluées au dixième dans la solution de merthiolate-formol, pure ou additionnée de Lugol à 5 % (cf. coloration des selles). Après tamisage le filtrat est versé dans un tube à centrifuger où l'on ajoute moitié moins d'éther. Une agitation énergique permet d'obtenir une suspension qu'on laisse reposer deux minutes.

Si la suspension reste stable la centrifugation (1700 tours/minute pendant 1 minute) permet d'obtenir un culot qui sera prélevé avec les soins habituels et examiné.

Si l'éther forme une couche superficielle libre il faut ajouter un millilitre d'eau et recommencer l'agitation.

On remet de l'eau jusqu'à l'obtention d'une suspension stable après deux minutes et c'est alors seulement que la centrifugation peut être effectuée.

Méthodes combinées

Chaque méthode de concentration proposée présente l'inconvénient d'éliminer des parasites et doit donc être choisie en fonction de ce que l'on recherche préférentiellement.

Les méthodes les plus intéressantes pour la diversité des kystes ou œufs concentrés laissent souvent à examiner un culot relativement important.

En combinant flottations et méthodes diphasiques, C. Junod obtient d'excellents résultats.

Première méthode de Junod

– Avantages

Les statistiques publiées par l'auteur de cette méthode montrent sa productivité. C'est certainement l'une des méthodes les plus intéressantes tant pour les recherches d'œufs que pour celles de formes végétatives ou kystes de protozoaires. Elle remplace l'exigence de plusieurs techniques différentes pour trouver des parasites de densité différente.

– Inconvénients

Cette technique nécessitant cinq centrifugations demande un temps assez long. D'autre part l'utilisation d'une solution d'iodo-mercurate présente les inconvénients déjà signalés pour la méthode de Janeckso et Urbanyi (solution toxique et corrosive).

– Déroulement de la technique

- . Concentration diphasique (MIF Concentration ou Bailenger) en utilisant peu d'éther et en agitant modérément pour obtenir volontairement un culot important (première centrifugation).
- . Le culot est remis en suspension dans une solution de sulfate de zinc à saturation. On pratique alors une deuxième centrifugation pendant 30 secondes à faible vitesse ce qui permet d'obtenir un surnageant et un culot (deuxième centrifugation).
- . Ce surnageant est dilué au quart avec de l'eau distillée et centrifugé (troisième centrifugation); le culot est examiné.
- . Le culot de la deuxième centrifugation est repris dans une solution d'iodomercurate de potassium de densité 1,5 (cf. formulaire) et la suspension est de nouveau centrifugée (quatrième centrifugation). Le surnageant est repris et dilué. Ce dernier diluat est centrifugé (cinquième centrifugation) et le culot est examiné.

Deuxième méthode de Junod (Junod simplifiée)

– Avantages

C. Junod considère que sa technique simplifiée donne autant de bons résultats que la technique complète.

– Inconvénients

Quoique simplifiée, la technique impose encore quatre centrifugations et l'emploi d'une solution de iodomercurate.

– Déroulement de la technique

- . Mettre en suspension environ 8 g de selles dans 50 ml de solution de NaCl à 8,5 ‰, éventuellement formolée à 8 %. Tamiser, centrifuger à 1200 tours/minute pendant une minute, éliminer le surnageant, faire une préparation d'une microgoutte du culot, l'examiner et remettre en suspension le reste du culot dans 20 ml d'une solution isotonique formolée (par exemple la solution A ci-dessous).

Remarque : quand cette méthode combinée intervient en complément d'une technique polyvalente usuelle, cette première centrifugation peut être supprimée.

- . Ajouter 5 à 7 ml d'éther éthylique, agiter modérément, centrifuger à 1200 tours/minute pendant une minute et conserver le culot.
- . Remettre le culot en suspension dans 4 à 6 ml de solution d'iodomercurate (solution B ci-dessous de densité 1,40), centrifuger à 1200 tours/minute pendant deux minutes; évacuer le surnageant et examiner le culot en totalité au microscope.

Méthode de sédimentation-flottation pour œufs et larves

– Avantages

Pour une recherche spécifique d'œufs ou de larves, Junod considère que la méthode ci-dessous est plus productive.

– Inconvénients

Quand la teneur des selles en lipides est anormalement élevée, les concentrations sans éther sont encombrées de graisses neutres, savons et acides gras.

– Déroulement de la technique

- . Première centrifugation (1200 tours/minute, une minute) de la suspension fécale en eau à 8,5 % de NaCl; culot conservé.
- . Mise en suspension du culot dans 20 ml de solution acéto-acétique formolée sans adjonction d'éther et centrifugation à 1200 tours/minute pendant une minute; aspirer le surnageant et la partie superficielle du culot.
- . Mise en suspension du culot dans 5 à 7 ml de solution d'iodomercurate de potassium de densité 1,35 et centrifugation (1200 tours/minute pendant une minute).
- . Transfert (décantation) du surnageant dans un autre tube conique, adjonction de 20 ml d'eau et centrifugation (1200 tours/minute pendant deux minutes).
- . Examen du culot.

Sédimentation-flottation au saccharose pour protozoaires

– Avantages

Également mise au point par C. Junod, cette technique, bien exécutée, permet de trouver de rares formes végétatives de protozoaires alors que les kystes sont inexistantes. Elle est d'exécution rapide et surtout recommandée quand l'examen direct a prouvé la présence de rares formes végétatives et qu'aucun kyste n'a été retrouvé pour pouvoir affirmer le diagnostic. Elle est utilisable sur des selles fixées au M.I.F.

– Inconvénients

Une certaine technicité est indispensable pour ne pas confondre les amibes et flagellés avec les blastocystis et champignons qui sont un peu déformés. De plus une selle trop riche en lipides ne peut être ainsi concentrée. Noter en outre que des sels de mercure sont encore utilisés.

– Déroulement de la technique

- . Fixation :
 - triturer 3 à 4 grammes de selles dans 50 ml de solution acéto-acétique formolée fraîchement préparée (solution AAF) ;
 - tamiser et recueillir en tube bouché ;
 - attendre au moins 2 à 3 heures avant de poursuivre.
- . Sédimentation
 - centrifuger 10 à 15 ml de la suspension à 1800-2000 tours/minute pendant 90 secondes dans un premier tube (T1) ;

- rejeter le surnageant ;
- prélever (lame 1) et garder en milieu humide (boîte avec coton hydraté) la couche supérieure du culot.
- . Flottation
 - verser, dans le tube T1, 8 à 10 ml de solution de saccharose (cf. formulaire) puis 0,5 ml de solution de chlorure mercurique à 1,5 % en eau distillée ;
 - agiter très doucement (éventuellement avec un agitateur) ;
 - centrifuger à 1000 tours/minute pendant 45 secondes ;
 - décanter le surnageant dans un tube T2 (si une partie est peu limpide ne garder que 1 ou 2 ml de la partie supérieure) ;
 - prélever et garder la surface du culot (lame 2).
- . Précipitation
 - ajouter 20 à 30 ml d'eau dans le tube T2 et diluer le culot ;
 - centrifuger à 2000 tours/minute pendant 90 secondes ;
 - examiner le culot (lame 3).
- . Lecture dans l'ordre des lames 3 puis 1 et 2 si la lame 3 n'est pas satisfaisante.

Formulaire

- Première technique de Junod (densité 1,5)
 - . liqueur de Thoulet (Prolabo) de densité 3,17 : 100 ml
 - . eau distillée : 334 ml
- Deuxième technique de Junod
 - . Solution A (acéto-acétique formolée)
 - acétate de sodium : 15 g
 - acide acétique cristallisable : 20 ml
 - formol : 40 ml
 - eau : qsp 1000 ml
 - . Solution B (densité 1,40)
 - liqueur de Thoulet : 1 volume
 - eau : 4,42 volumes
 - . Solution de densité 1,35
 - liqueur de Thoulet : 1 volume
 - eau : 5,20 volumes
- Sédimentation-Flottation en saccharose
 - . saccharose : 120 g
 - . eau : 200 ml
- Si le surnageant est trop chargé, reprendre la suspension initiale en AAF et utiliser alors :
 - . saccharose : 90 à 100 g
 - . eau : 200 ml

Les techniques spéciales

Numération des œufs

Intérêt - généralités

Pouvoir mesurer l'importance d'une infestation parasitaire permet d'apprécier les possibilités de retentissement physiologique des parasitoses (anémie due ou non aux ankylostomes présents), d'évaluer l'efficacité d'une thérapeutique

(élimination de tous les vers ou d'un certain pourcentage de ceux-ci) et de chiffrer des enquêtes épidémiologiques. Bien évidemment si le nombre d'œufs trouvés dans les selles est généralement proportionnel au nombre de vers, pour les protozoaires, la numération des kystes est sans intérêt puisque leur nombre varie en fonction des conditions locales de multiplication.

On a l'habitude d'exprimer les résultats en nombre d'œufs par gramme de selles pâteuses. Quand les selles ont un autre aspect, on applique les coefficients de correction suivants :

- . selles solides : x 0,5
- . selles semi-liquides : x 1,5
- . selles liquides : x 2

Méthodes utilisées

– La méthode d'éclaircissement de Kato

Elle peut être employée (cf page 29) pour compter les œufs; il suffit de peser une quantité fixe de selles (20 mg) et de multiplier par 50 le nombre obtenu pour avoir le nombre d'œufs par gramme avant la correction due à l'aspect de la selle.

– La méthode de L.C. Brumpt

Elle a le mérite de la facilité. Dans un flacon de Becher on pèse une certaine quantité de selles moulées (4,6 grammes par exemple) et on la dilue au 1/10 avec de l'eau ordinaire ou de la soude décinormale (dans cet exemple par 41,4 ml). Après homogénéisation voire tamisage s'il y a de grosses particules, le liquide est agité et aspiré dans une pipette graduée. On laisse tomber le liquide goutte à goutte. La première goutte est recueillie sur une lame. On compte le nombre de gouttes contenues dans 1 ml (exemple 23 gouttes).

Les œufs sont comptés dans la totalité de la goutte recueillie (exemple 8). Il suffit alors de poser la multiplication : nombre trouvé x nombre de gouttes x dilution x coefficient de correction :

$$. 8 \times 23 \times 10 \times 0,5 = 920 \text{ œufs par gramme de selles pâteuses.}$$

Tableau I
Quelques résultats de numération d'œufs

Espèces	Nombre d'œufs/gramme/femelle	Nombre de vers au total (mâles et fem.)
Ankylostome	125	2
Ascaris	1000	2
Nécator	50	2
Trichocéphale	75	2,7
Fasciolopsis	126	1 (hermaphrodite)

Extraction de parasites

Méthode de Baermann et Lee modifiée

– Principe

Les larves rahbditoïdes d'anguillule ont un hydrothermotropisme positif. En mettant en contact des selles contenant des larves avec de l'eau chaude celles-ci seront attirées vers l'eau où elles seront facilement repérées.

– Appareillage

Le plus simple est d'utiliser un entonnoir à robinet (cf. verrerie); à défaut pourra être employé un entonnoir ordinaire se terminant par un tuyau de caoutchouc fermé d'une pince de Mohr.

Dans cet entonnoir sera disposée une passoire métallique tapissée d'une voire deux couches de papier fin (papier Kleenex dédoublé).

– Technique

De l'eau chauffée à 45° est versée dans l'entonnoir jusqu'à mi-hauteur. La passoire métallique est remplie de selles, pâteuses de préférence. Lorsque la passoire est placée dans l'entonnoir les selles doivent affleurer le niveau de l'eau chaude.

Deux à trois heures plus tard, l'eau est soutirée soit dans une boîte de Petri que l'on examine à un fort grossissement de loupe binoculaire soit dans un tube à centrifuger. Après 5 minutes de centrifugation à 1500 à 2000 tours/minute, on regarde le culot.

– Résultat

Si les selles sont assez récemment émises, si leur consistance permet la circulation des larves, les chances de déceler ces dernières sont considérablement augmentées par rapport aux méthodes de concentration habituelles.

Des trichomonas, des miracidiums de schistosome sont parfois également observés dans le culot de centrifugation.

Méthode de I. de Carneri (recherche de *Balantidium coli*)

Les selles sont, comme dans la technique de Baermann, mises au contact d'eau chaude. La particularité de la méthode d'I. de Carneri repose sur le fait que l'eau doit être tamponnée à pH 7,2. L'eau est ensuite centrifugée et le culot examiné.

Nous signalons pour mémoire que Lubinsky propose d'attirer le *Balantidium* par galvanotaxie. Cette méthode, à notre connaissance, n'est pas utilisée.

Cultures des selles

En protozoologie (sans les sporozoaires)

– Intérêt

La culture des selles en milieux spécifiques pour protozoaires permet la multiplication de rares amibes ou flagellés observés à l'examen direct et dont le diagnostic n'a pu être établi d'une façon certaine. Cet artifice technique est aussi un moyen pour mettre en évidence des protozoaires qui n'auraient pas été décelés d'emblée en particulier certains flagellés sans kystes (*Pentatrichomonas*) ou à kystes rares (*Enteromonas*). On ne devra pas toutefois s'imaginer que la coproculture pallie les insuffisances techniques. En effet certains parasites, *Blastocystis* par exemple, peuvent envahir le milieu et gêner la multiplication des autres protozoaires par des phénomènes de concurrence vitale.

Il faut en outre souligner que *Giardia intestinalis* ne se multiplie pas sur les milieux ordinaires pour amibes et flagellés.

– Milieux utilisés

On trouve dans le commerce le milieu de Dobell et Laidlaw vendu en deux parties, d'une part en tube contenant du sérum de cheval coagulé incliné et d'autre part des ampoules de 5 ml de solution de Ringer enrichie au sixième par du sérum de cheval et contenant une suspension de grains d'amidon de riz. Au moment de l'emploi on verse stérilement les 5 ml de l'ampoule dans le tube de sérum coagulé. Après l'avoir réchauffé à l'étuve à 37° le milieu peut êtreensemencé.

Les laboratoires Difco offrent un milieu déshydraté (Cleveland et Collier) qu'il faut reconstituer et stériliser avant l'emploi.

– Ensemencements

On prélève proprement (éviter l'addition de germes non fécaux) 0,5 g environ de matière fécale à la pipette ou à la baguette de verre selon la densité des selles (sur des selles moulées prélever à divers endroits).

Ces prélèvements seront dissociés dans le liquide de culture (deux tubes de préférence au minimum) en évitant d'oxygéner le liquide (pas de bulles) et les tubes disposés dans l'étuve à 37°.

– Lecture

Les tubes sont examinés tous les jours pendant trois jours.

Les prélèvements sont effectuées :

- . pour les flagellés dans le liquide ;
- . pour les amibes à la surface du sérum coagulé en la raclant légèrement.

Dans tous les cas la zone la plus riche en protozoaires est celle située immédiatement au-dessus du sédiment d'amidon de riz (milieu de Dobell).

La ou les gouttes disposées sur une lame sont traitées comme un examen direct avec possibilités de coloration vitale ou après fixation.

En protozoologie (coccidies)

Lorsqu'on observe des oocystes de coccidie dans les selles, pour affirmer le diagnostic de genre et d'espèce, il est nécessaire de provoquer leur maturation par une coproculture à température du laboratoire. Les selles, légèrement réhydratées par addition d'eau distillée pourront être mélangées avec un peu de poudre de charbon ou de solution d'acide chromique à 0,5 % pour éviter les fermentations.

La lecture sera effectuée tous les jours. C'est après 48 à 72 heures que les sporozoïtes seront formés.

En helminthologie

– Intérêt

Les progrès de la thérapeutique rendent moins nécessaire la différenciation sur larves strongyloïdes, après coproculture, entre les œufs de *Necator americanus* et d'*Ancylostoma duodenale*. Un souci d'exactitude diagnostique ou des enquêtes épidémiologiques peuvent encore inciter à effectuer des coprocultures.

Quoique la multiplication in vitro des anguillules (cycle sexué) ne soit pas toujours observée, une coproculture positive peut permettre d'affirmer un diagnostic qu'une concentration ou une extraction de Baermann n'auraient pu prouver.

– Matériel utilisé

. Culture sur buvard en boîte de Petri

Trois ou quatre lames porte-objets sont enveloppées d'un buvard assez épais et disposées en paquet au centre d'une boîte de Pétri dans laquelle on verse 10 ml d'eau distillée stérile.

. Culture sur buvard en tube à essai

Dans les tubes à essai à large ouverture on introduit quelques millilitres d'eau distillée stérile.

On prépare par ailleurs des bandes de papier buvard assez rigide dont la largeur est inférieure au diamètre intérieur des tubes et d'une longueur égale à celle du tube.

. Culture sur charbon

On utilise du charbon de bois grossièrement réduit en poudre et déposé dans une boîte de Petri.

– Technique

. Généralités

Quelle que soit la technique utilisée, les boîtes de Petri ou tubes seront placés dans une étuve à 25° et la lecture sera effectuée :

- au deuxième jour pour trouver des larves rhabditoïdes d'ancylostomidés et des larves strongyloïdes infestantes d'anguillule ;

- aux troisième, quatrième et cinquième jours pour rechercher les larves strongyloïdes d'ancylostomidés et d'anguillule et d'autre part des adultes mâles et femelles du cycle externe de l'anguillule ;
- aux septième, huitième et neuvième jours, les larves infestantes d'ancylostomidés et d'anguillule.

On remarque que, constamment, peuvent exister des larves strongyloïdes, donc infestantes, d'anguillule et, par conséquent, des précautions devront être prises pour éviter que des gouttes d'eau contaminées soient au contact de la peau non seulement des techniciens mais aussi du personnel d'entretien non averti.

. Culture sur buvard en boîte de Petri

Sur la face libre du paquet de lames on étale quelques grammes de selles. Les larves auront tendance à gagner l'eau libre du fond de la boîte où elles sont repérées à la loupe ou dans le culot de centrifugation du liquide recueilli.

. Culture sur buvard en tube

Quelques grammes de selles sont étalés sur les bandes de buvard en respectant le haut et le bas du papier. Le buvard sera alors plongé dans l'eau des tubes qui ne sera pas souillé par les matières fécales. Les tubes seront fermés pour éviter odeurs et dessiccation. Les larves circuleront sur le papier buvard humide et gagneront le fond du tube. Au moment d'examiner les tubes il suffit de retirer à la pince la bande de papier dont le haut affleure l'extrémité du récipient.

. Culture en charbon de bois

Quelques grammes de selles seront malaxés avec de l'eau et le charbon de bois pour former une pâte homogène qui sera disposée au centre de la boîte de Pétri sans atteindre les bords en formant une petite éminence qui devra toucher le couvercle après fermeture de la boîte.

Les larves (géotropisme négatif) se retrouvent dans les gouttelettes d'évaporation condensées dans le couvercle et facilement observées à la loupe. En cas de coproculture d'anguillules positive, avec multiplication, leur nombre est parfois tel que l'on peut, à l'oeil nu, distinguer leur flux migratoire au gré d'un rayon lumineux (phototropisme positif).

Quand les larves sont peu nombreuses (ancylostomidés ou anguillules) il est possible de pratiquer une extraction de Baermann sur la coproculture.

En mycologie

– Intérêt

La culture mycocoprologique n'a pratiquement d'intérêt que dans le cadre d'une numération de colonies ce qui implique la nécessité d'effectuer lesensemencements le plus rapidement possible après la défécation.

De rares arthrospores de *Geotrichum* et des levures à l'examen direct correspondant à quelques colonies sur milieux de culture ne témoignent pas d'un processus pathologique. En revanche des filaments mycéliens ou pseudo-mycéliens à l'examen direct et un tapis de colonies de *Candida albicans* en culture correspondent à un déséquilibre de flore préjudiciable au patient. On devra donc ensemenecer les tubes avec une quantité relativement fixe de matière fécale (une anse de platine par exemple).

– Milieux de culture

Les milieux seront les classiques milieux de Sabouraud additionnés d'antibiotiques. L'un des deux tubes (minimum) ensemencés contiendra en outre de l'actidione. La culture s'effectuera à 37° et les colonies observées après 24 h et 48 h seront comptées et identifiées.

– Ensemencement

Le contenu de l'anse de platine sera dissocié dans le peu de liquide du fond du tube

et l'ensemencement se fera sur la pente en partant du fond selon la technique de l'épuisement de la semence (étalement en stries).

Pour mieux compter les colonies, on préfère souvent couler le milieu en boîte de Petri. Quand les selles sont trop fermes, le contenu de l'anse sera dissocié dans quelques gouttes d'eau stérile dans un petit tube à hémolyse.

– Pour le diagnostic des colonies observées

Pour ce diagnostic, on se reportera à des livres spécialisés de mycologie. Rappelons que *Candida albicans* est considéré comme un saprophyte du tube digestif mais que plus de dix colonies par anse de platine doit inciter à interpréter le résultat en fonction de la clinique (mycose orificielle ou de voisinage ? état immunitaire du malade ? antibiothérapie ? etc...) et éventuellement à pratiquer un antifongogramme.

Biopsie

Généralités

Pour la recherche d'œufs de schistosomes en général il est commode pour le gastro-entérologue de pratiquer des biopsies rectales ou sigmoïdiennes. Il sera plus productif d'effectuer cette biopsie au niveau de microlésions (érosions en coup d'ongle ou hypertrophie muqueuse localisée).

Rappelons à ce sujet que prélever à la pince coupante un fragment de muqueuse n'est absolument pas douloureux pour le patient. On peut également trouver ainsi des amibes dans la muqueuse. D'autres prélèvements peuvent parvenir au laboratoire (biopsies vésicales). Il est important que ces fragments ne soient pas fixés au liquide de Bouin ou au formol qui les durcissent plus ou moins et n'autorisent qu'une technique anatomopathologique. Les fragments devront être rapidement transmis dans quelques millilitres d'eau salée isotonique.

Utilisation des prélèvements

– Recherche de protozoaires

Pour les biopsies rectosigmoïdiennes, il peut être utile d'effectuer un examen direct de raclage de muqueuse à la recherche en particulier d'amibes hématophages.

– Recherche d'œufs de schistosome

Le fragment biopsique en entier ou partagé en quelques morceaux est placé sur une lame posée sur une surface plane et solide. Une deuxième lame écrase le fragment en appuyant fortement.

Une lamelle recouvre ensuite le fragment écrasé pour l'examen microscopique.

Les œufs sont recherchés au faible grossissement. Si la masse muqueuse est trop dense optiquement il est possible de l'éclaircir par un montage dans la gomme au chloral :

- . eau distillée : 50 ml
- . hydrate de chloral : 50 g
- . glycérine : 20 ml
- . gomme arabique : 30 g

Dissoudre à froid le chloral, ajouter la glycérine et suspendre dans le liquide la gomme placée dans un nouet de mousseline.

La lecture sera effectuée 24 à 48 h après le montage de la préparation.

Techniques spécifiques

Nous regroupons dans ce chapitre les techniques qui ne sont employées que pour chercher certains parasites particuliers et sont donc à effectuer en plus des techniques habituellement pratiquées dans le laboratoire.

Recherche d'œufs d'oxyure par la cellophane adhésive (Scotch-test de Graham)

– Principes, avantage

La femelle de l'oxyure vient mourir sur la marge anale en libérant les œufs qu'elle contient. Ces œufs entourés d'un peu de mucosités restent souvent collés pendant quelques heures dans les petits plis de la marge anale avant de tomber dans les draps ou sous-vêtements.

C'est le plus souvent la nuit, alors que les contractions intestinales diminuent, que les oxyures femelles sortent du rectum.

Les œufs seront donc retrouvés sur la marge anale plus que dans les selles. Pour les prélever, on utilise du papier adhésif transparent; les œufs sont recherchés à travers le papier qui sert de lamelle.

– Inconvénients

Il est difficile au technicien de laboratoire d'effectuer lui-même le prélèvement au moment propice (nuit ou petit matin). Réalisée plus tard la méthode a plus de risques d'être infructueuse.

– Technique du prélèvement

Plusieurs matins de suite, au réveil, avant la défécation il faut essuyer la marge anale, en la dépliant si possible, avec le côté adhésif d'une bande de cellophane transparente du type "scotch" large de 2 cm et longue de 5 cm environ. Ne pas employer le scotch dit invisible qui a une certaine opacité. Le fond de tube en verre recommandé par certains est avantageusement remplacé par un doigt ganté.

Cette recherche étant souvent effectuée chez les enfants, il faudra expliquer à la mère comment "torcher" avec la cellophane adhésive dès le réveil et en expliquant bien le moment où le prélèvement doit être effectué. Après le prélèvement, la bande est collée sur une lame porte-objets qui sera transmise au laboratoire.

– Technique de l'examen

Les œufs seront recherchés directement à travers le papier adhésif. Les plicatures de celui-ci, obligatoires au moment du prélèvement - et prouvant que la technique a été bien réalisée - peuvent gêner l'observation microscopique. Il est recommandé alors de décoller presque totalement la bande, de déposer une goutte d'huile à immersion sur la lame et de replacer le papier en ne recollant que l'extrémité. D'autres utilisent une goutte de toluène. Le but de cette manoeuvre est d'éliminer les bulles d'air. Les œufs sont alors facilement repérés.

Indépendamment des œufs d'oxyure, il est possible de trouver des embryophores de *Taenia* (migration transanale des proglottis) voire d'autres œufs (trichocéphale).

Tubage duodéal

– Principes, avantages

Pour des parasites duodénaux, pour des œufs de douve éliminés dans la bile, certains recommandent de transmettre au laboratoire de parasitologie, le liquide d'aspiration duodénale ce qui élimine la dilution par la masse des matières fécales.

Pour la recherche des œufs de douve, on prélève séparément la bile A d'origine cholédocienne, la bile B d'origine vésiculaire et la bile C d'origine hépatique.

– Inconvénients

Le tubage duodéal, quoique couramment pratiqué dans les services cliniques, est assez désagréable pour le patient.

– Utilisation du liquide d'aspiration

. Examen direct d'une goutte de liquide et d'une parcelle de mucosités (recherche de *Giardia*).

. Décantation, centrifugation

Dans des ampoules à décanter, on laisse sédimenter quelques heures les différents prélèvements, au besoin après dilution dans de l'eau salée isotonique. Les sédiments sont recueillis et centrifugés. Les culots sont examinés.

On peut alors trouver des œufs de douve, d'ancylostomidés ou d'ascaris, des œufs ou larves d'anguillule. S'il y a trop de mucus, on peut l'éliminer par de la soude caustique diluée à 5 %.

. Frottis du reste du culot de centrifugation pour coloration spécifique à la recherche de *Cryptosporidium* ou de *Microsporidia*.

"Entérotest"

– Principe, avantages

L'entérotest est un système de prélèvement duodénal moins importunant pour le patient. Un fil lesté est avalé par le malade jusqu'à ce qu'il atteigne le duodénum (repère sur le fil). C'est ce fil qui est envoyé au laboratoire.

– Utilisation

A l'aide des doigts gantés, on essuie le fil et on recueille ainsi le mucus déposé le long de celui-ci. C'est dans ce mucus que seront recherchés essentiellement giardias et larves d'anguillule (examens directs voire dilution et centrifugation).

Examen des urines

– Généralités

Dans les urines sont éliminés les œufs de *S. hæmatobium* car, volontairement, nous ne parlons pas des autres œufs exceptionnels. Par ailleurs il est possible de trouver des *Trichomonas vaginalis* dont on connaît les possibilités de survie prolongées dans l'urine (plusieurs heures).

– Recueil des urines et techniques

. Pour une recherche de *Trichomonas*

Recueillir les urines du premier jet matinal, les centrifuger et examiner le culot à l'examen direct à frais et après coloration de May-Grünwald-Giemsa en utilisant une eau légèrement alcaline.

. Pour une recherche d'œufs de bilharzie

Ou bien on recueille les urines de toute une miction dans un grand verre (importance des urines de fin de miction) ou bien on demande l'apport des urines de 24 heures.

Sera prélevé à la pipette et examiné au microscope tout filament visible en suspension dans l'urine d'autant plus si ce filament est plus ou moins imprégné de sang.

Après une heure de sédimentation dans des verres à pied, une partie du surnageant est rejetée et le reste versé dans de grandes ampoules à décanter forme poire.

Quelques heures plus tard le sédiment est soutiré, centrifugé et examiné au microscope. Les cristaux urinaires peuvent souvent être dissous par acidification progressive de l'urine à l'acide acétique dilué.

. Dans les enquêtes épidémiologiques

Une seringuée d'urines est filtrée à travers un papier millipore secondairement éclairci. Il s'agit plus d'une technique d'approche diagnostique que d'une technique vraie de diagnostic. La quantité d'urines filtrées dépend des auteurs (quantité fixe ou totalité de la miction).

Conservation, transmission des selles et parasites

Des vers vivants ou morts peuvent être éliminés par des patients. Certains malades mentaux, ou seulement des personnes anxieuses, apportent au laboratoire

des vers ou arthropodes qu'ils prétendent avoir expulsés et l'avis d'un spécialiste lointain est parfois nécessaire.

Certains kystes ou œufs de parasite trouvés ne correspondent pas à des éléments connus chez l'homme et un autre avis est indispensable. Ceci se produit lorsque les consultants viennent de régions aux parasitoses mal connues (canaques de Nouvelle-Calédonie par exemple) ou qu'ils ont absorbé avec leur alimentation des parasites animaux dont les œufs sont alors en simple transit mais posent un problème diagnostique au coproparasitologiste en médecine humaine.

Arthropodes

Les arthropodes ont une couche chitineuse externe dure et des organes riches en eau.

La fixation se fera à l'alcool à 90° et surtout pas au formol qui durcit irrémédiablement les parties molles.

Vers

– Cestodes

Les anneaux des cestodes lavés à l'eau doivent être étalés entre deux lames que l'on maintient serrées à l'aide d'un fil. Le tout est plongé dans le fixateur de Bouin, de Dubosq-Brasil ou dans le mélange alcool-formol (alcool à 90° : 90 ml et formol du commerce : 10 ml).

Ainsi fixés, les anneaux peuvent être colorés ultérieurement et exactement diagnostiqués par un spécialiste.

– Trématodes

Une fixation dans l'alcool à 70°, en extension si possible, permet toujours au spécialiste de reprendre la fixation si nécessaire et de colorer le ver.

– Nématodes

On chauffe de l'alcool à 70° jusqu'à ce que des bulles apparaissent (50 à 60° C) et on le verse sur le nématode préalablement lavé à l'eau salée isotonique ; il meurt ainsi en extension. Si le ver est mort, il est inutile de chauffer l'alcool.

Selles

La conservation des selles parasitées est toujours aléatoire et dépend de facteurs peu contrôlables en particulier en ce qui concerne la conservation des kystes de protozoaires.

Une coprothèque doit être révisée avant chaque utilisation pour l'enseignement et même dans ce cas l'oxygénation des suspensions liée à l'ouverture des flacons peut altérer rapidement une selle que l'on croyait bien conservée.

– Formes végétatives de protozoaires

Si l'eau dite physiologique (à 0,9 % de NaCl) et formolée à 5 % peut conserver les formes végétatives de protozoaires, celles-ci deviennent assez vite difficiles à reconnaître même en y ajoutant de la solution de Lugol pour colorer les noyaux.

En revanche les suspensions de selles dans le colorant MIF permettent de garder pendant des années voire une décennie de nombreux protozoaires parfaitement identifiables.

Les formes végétatives d'entéromonas et les trichomonas sont, comme les autres protozoaires, bien conservées mais les flagelles ont tendance à adhérer à la paroi cellulaire et rien n'est plus diagnosticable.

Pour un conseil diagnostique, il est donc possible d'envoyer un tube de MIF coloration à condition que ce tube parvienne au spécialiste dans les deux ou trois semaines qui suivent la fixation-coloration.

Pour envoi d'échantillons ou pour conservation simple en coprothèque, Junod

propose la solution acéto-acétique formolée (voir les méthodes de concentration de Junod).

– Formes kystiques de protozoaires

Là encore le MIF coloration en tube et la solution de Junod peuvent être utilisés mais la seule fixation à l'eau salée isotonique formolée à 5 % permet une très longue conservation.

Nous possédons des kystes d'amibes et des sporocystes de *Sarcocystis* ainsi fixés depuis vingt ans.

– Œufs

La plupart des œufs peuvent être fixés et conservés dans la même solution de NaCl formolée à 5 %; toutefois il est parfois difficile d'affirmer qu'il s'agit bien d'une fixation étant donné que la coque de certains œufs est tellement épaisse et résistante que l'on peut croire morts des œufs en survie (embryophores de *Taenia* par exemple).

Pour les œufs d'ascaris, il est illusoire d'espérer tuer les cellules embryonnaires par du formol à 5 %. Il faut en effet atteindre des concentrations en formol de 15 % dans le liquide de dilution des selles moulées pour empêcher un œuf de s'embryonner.

Envoi des échantillons

Rappelons que, pour respecter la loi et faire preuve de bon sens, il ne faut expédier que des selles fixées et incapables de fermenter. Tout élément posant problème devra être décrit avec soin, donc mesuré, pour permettre au consultant d'identifier rapidement la cause de l'interrogatoire diagnostique. Un maximum de renseignements cliniques devra accompagner l'échantillon en songeant qu'un biologiste est un consultant et non un distributeur de résultats.

Le tube contenant le prélèvement sera disposé dans un étui métallique et le tout placé dans une boîte en bois ou en carton robuste (triple emballage).

