

Les techniques de coloration en parasitologie



Les techniques de coloration des selles

Les techniques de coloration des selles sont régulièrement utilisées dans les laboratoires de parasitologie. Il existe plusieurs types de colorations que l'on peut inclure dans deux grands groupes :

- ✦ Coloration « simples » avec ou sans fixation préalable.
- ✦ Coloration plus « compliqués » de par leur mode d'exécution (habileté du manipulateur, bonne qualité des réactifs) ou de par leur temps d'exécution (souvent supérieur à 24 heures).

I- Colorations simples, immédiates :

Elles se font par dilution d'une particule de selles dans une goutte d'un colorant. Plusieurs colorants peuvent être utilisés :

1- La coloration au Lugol :

Pour l'examen direct on utilise le Lugol à 1 % d'iode, dit Lugol **Double**,

Iode en paillettes.....	1 g
Iodure de potassium.....	2 g
Eau distillée	100 ml

L'iode se dissout bien dans une solution d'iodure de potassium très concentrée. Pour préparer le Lugol on dissout donc d'abord l'iodure de potassium dans très peu d'eau. On ajoute petit à petit l'iode en agitant afin d'obtenir une bonne dissolution. On ajoute alors le reste de l'eau. Filtrer.

Le Lugol se conserve en flacon brun, à l'abri de la lumière. Il ne garde son pouvoir colorant que pendant un mois environ. Il faut donc porter la date sur le flacon, le préparer en petite quantité à la fois, et le renouveler régulièrement.

On utilise le Lugol comme liquide de dilution pour l'examen direct des selles et la coloration de divers éléments. La coloration donne de meilleurs résultats avec les selles fraîches qu'avec les selles fixées au formol.

Cette coloration permet :

- d'étudier les kystes de protozoaires, amibes et flagellés : la vacuole iodophile est colorée en brun acajou, les noyaux deviennent visibles ;
- d'étudier la digestion des féculents : l'amidon mal digéré se colore en bleu ou violet noir ; l'amidon bien digéré est rose ;
- de rechercher la flore iodophile, colorée elle aussi en bleu noir.

Lorsqu'on désire colorer les kystes obtenus après concentration, il est conseillé d'utiliser du Lugol simple de bactériologie, afin d'obtenir une coloration mieux contrastée.

2- Coloration de Bailenger et Faraggi

C'est une technique de réalisation facile.

Réactifs

Violet cristal	0,05 g
Fuchsine basique	0,01 g
Alcool à 95 %	20 ml

Phénol cristallisé fondu 4 ml
Après dissolution, ajouter :
Eau distillée 100 ml

Ce réactif, maintenu en **flacon hermétiquement clos** et à l'abri de la lumière, est de bonne conservation. Prélever le liquide dans les couches supérieures du réactif contenu dans un flacon maintenu au repos.

Mode opératoire

- Déposer, sur une lamé porte-objet une goutte de la préparation fécale ou du culot d'enrichissement.
- Avec le coin de la lamelle, lui mélanger une petite goutte du réactif, prélevée avec une pipette Pasteur.
- Recouvrir d'une lamelle.
- Examiner à l'objectif à immersion après avoir déposé une goutte d'huile sur la lamelle.

N.B. La coloration est immédiate. La rapidité, avec laquelle est atteint son optimum, dépend toutefois de la quantité du réactif. Il est conseillé d'employer une goutte de volume très réduit, ce qui a le double avantage de ne pas diluer la préparation fécale et de fournir une coloration lentement progressive, sans altération des parasites dont l'identification reste possible pendant plusieurs jours, si on a pris la précaution de luter la préparation (vernis à ongles ou, mieux, colle type Scotch).

Résultats

La coloration est aussi facile et aussi bonne avec les kystes qu'avec les trophozoïtes. Le cytoplasme et les bâtonnets cristalloïdes se colorent en rouge. Les structures nucléaires et les rudiments flagellaires ressortent en noir.

Les noyaux des trophozoïtes de *Dientamoeba fragilis* ne se colorent pas avec ce réactif.

3- Coloration au M.I.F :

Technique de Sapero, Lawless et Strome, 1951 et Sapero Lawless 1953.

Le nom de cette technique vient de ses 3 réactifs principaux :

- Merthiolate sous forme de teinture au 1/1000
- Iode sous forme de Lugol à 5 %
- Formol du commerce

Réactifs

Se procurer la « teinture de merthiolate 1/1000 » Lilly, formule n° 99®, ou une préparation équivalente, qui contient du merthiolate, de l'alcool, de l'acétone et de l'éosine. A partir de cette teinture, préparer 480 ml de solution mère M.F. :

Solution mère « M.F. »

Teinture de merthiolate 1/1000 Lilly®.....	200 ml
Formol du commerce	25 ml
Glycérine.....	5 ml
Eau distillée.....	250 ml

Cette solution est stable pendant quelques mois. A conserver en flacon brun.

Lugol 5 %

Iode en paillettes.....	0,5 g
Iodure de potassium.....	1 g
Eau distillée.....	10 ml

Pour la préparation du Lugol, voir pages ci-dessus.

Solution stable pendant 3 à 4 semaines seulement.

A conserver en flacon brun à l'abri de la lumière.

On peut procéder de 2 façons pour la coloration, selon les besoins, entre lame et lamelle ou en tube.

3-1- Coloration entre lame et lamelle :

Préparation du réactif

Préparer le mélange suivant :

Teinture de merthiolate de 1/1000 pure ...	7,75 ml
Lugol 5 % frais.....	1 ml
Formol du commerce	1,25 ml

Ce mélange n'étant stable que pendant 6 à 8 heures, il faut donc le préparer au fur et à mesure des besoins. On peut diviser par dix par exemple les quantités de réactifs en fonction du volume nécessaire. Si la solution de Lugol n'est pas fraîche il faut en augmenter la dose aux dépens de celle de la teinture de merthiolate.

Mode opératoire

Sur une lame, faire une dilution de selles dans de l'eau physiologique comme pour un examen direct, mais un peu plus épaisse, en utilisant moitié moins d'eau par exemple. On dépose sur cette dilution une goutte de la solution qu'on vient de préparer. Mélanger soigneusement avec le coin d'une lamelle l'appliquer ensuite sur la préparation. Luter avec de la vaseline ou du vernis à ongle et laisser colorer 20 à 30 minutes. Examiner la préparation.

Intérêt

- Examen presque extemporané, directement sur lame.
- Examen des glaires sanglantes contenant des amibes qui risquent d'être dispersées dans une coloration en tube, ou qui risquent de ne pas être prélevées.
- Coloration d'une suspension en CINa 9p. mille dans laquelle on a vu préalablement des amibes et des kystes à identifier.
- Mais la préparation n'est pas permanente et se dessèche vite.

3-2-Coloration en tube :

Préparation des réactifs

Dans un tube à hémolyse, préparer extemporanément, le mélange suivant :

Solution mère MF.....	2,35 ml
Lugol 5 %	0,15 ml

On peut préparer à l'avance des tubes de solution mère MF bouchés dans lesquels on ajoute 0,15 ml de Lugol au moment de l'emploi.

Mode opératoire

Fermer le tube. Le retourner doucement, juste une fois, pour bien mélanger. Déposer immédiatement dans le fond du tube, avec une petite baguette de verre, gros comme un pois de taille moyenne de selles (environ 0,25 g), soit une dilution au 1/10. Bien triturer pour obtenir une dilution homogène. Laisser déposer. Dès que la sédimentation est complète, la coloration est achevée. Prélever alors à la pipette Pasteur, à la partie supérieure du sédiment où sont concentrés les protozoaires.

Lorsqu'on veut examiner un tube coloré depuis plusieurs semaines, il faut remettre le sédiment en suspension en secouant le tube assez énergiquement et laisser de nouveau déposer pendant 15-20 minutes.

Intérêt

- Fixation et conservation des protozoaires et oeufs d'helminthes en milieu liquide. Ce matériel reste en bon état pendant des années et peut servir comme matériel d'enseignement, de référence, ou comme document pour un malade. On peut, en multipliant les doses citées ci-dessus, fixer une grande quantité de selles.
- Coloration des protozoaires grâce à l'action conjuguée de l'iode et de l'éosine, permettant leur identification.

- Permet l'envoi d'un échantillon de selles à un laboratoire spécialisé pour confirmation d'un diagnostic.

Causes d'échecs

- Si le mélange est préparé longtemps à l'avance, il se forme un précipité et la coloration se fait mal. Pour les prélèvements à domicile, donner au malade deux tubes, l'un contenant le Lugol et l'autre la solution mère M.F. Le malade fait lui-même le mélange en versant la solution mère M.F. dans le Lugol et y met le prélèvement.
- La quantité de selle est trop élevée : la dilution étant au 1/10, il faut qu'après la sédimentation, le dépôt de selles corresponde à ce rapport. Si l'on met trop de selles (cas des selles dures par exemple), il n'y a pas assez de colorant. Un mélange non homogène donne les mêmes résultats : certaines amibes sont bien colorées et d'autres pas. Il vaut mieux mettre moins de selles que trop.
- Le Lugol perd rapidement son pouvoir colorant : avec une vieille solution la coloration se fait mal.
- Les selles ne sont pas fraîches : ceci n'a aucune importance pour les kystes, mais les protozoaires vivants doivent être colorés immédiatement : les détails morphologiques sont ainsi plus nets et la fixation peut les surprendre en attitude de locomotion avec les pseudopodes ou les formes caractéristiques.

Résultats de la coloration

Lorsque l'on examine la préparation à la fin de la sédimentation :

- le liquide surnageant est brun,
- les formes végétatives d'amibes et de flagellés sont jaune clair, ou brun clair. Les noyaux de *Dientamoeba fragilis* ne sont pas très bien colorés,
- les kystes sont incolores sur fond rouge, ce qui en facilite la recherche,
- les masses chromatiniennes des noyaux, les corps sidérophiles sont incolores et apparaissent par réfringence,
- la membrane nucléaire est par contre colorée en brun noir,
- les hématies libres ou phagocytées sont rouge vif,
- les levures par contre sont rose pâle ou rose saumon,
- les cristaux de Charcot Leyden sont bien conservés.

Par la suite, l'iode disparaît progressivement et est remplacée par l'éosine, les kystes se colorent en rose au bout d'un temps plus ou moins long tandis que les formes végétatives perdent leur coloration brune très rapidement. Notons que la coloration acajou des vacuoles iodophiles des kystes disparaît en quelques heures. Mais les noyaux restent très nets et l'identification aisée.

II- Colorations simples a examen retardé :

Coloration au Noir Chlorazol :

En 1960, Kohn a mis au point une coloration rapide des protozoaires, coloration récemment modifiée par Gleason et Healy et étudiée par L. Lamy en France.

Cette technique à l'avantage de réunir dans une seule opération la fixation, la coloration et la différenciation des protozoaires. Les résultats seraient comparables à ceux de l'hématoxyline ferrique.

Réactifs

- Colorant

Noir chlorazol (Noir formique Geigy = Noir Erié) 5 g

- Préparer une solution de base

Alcool éthylique 90 %.....	170 ml
Alcool méthylique	160 ml
Acide acétique glacial.....	20 ml

Phénol liquide.....	20 ml
Acide phosphotungstique à 1 %	12 ml
Eau distillée q.s.p.....	1 000 ml

N.B. On peut préparer une quantité moindre de colorant en divisant les quantités par 2, pour 500 ml par exemple ou par 10 pour préparer 100 ml.

Préparation de la solution de fixation et de coloration

Mettre les 5 g de Noir chlorazol dans un mortier. Broyer pendant au moins 3 minutes. Ajouter un peu de solution de base. Broyer à nouveau de manière à former une pâte lisse. Ajouter encore la solution de base par petite quantité. Broyer à chaque fois pendant plusieurs minutes.

Recommencer avec le sédiment comme précédemment, jusqu'à ce que tout le colorant soit dissout.

Laisser sédimenter. Recueillir le surnageant clair dans une bouteille d'un litre.

Laisser sédimenter à nouveau 24 heures et mûrir 4 à 6 semaines, on obtient alors un liquide noir cerise qu'on filtre avant usage.

Mode opératoire

La technique convient pour les frottis et pour les coupes histologiques. Faire des étalements minces de selles. Les plonger humides dans le colorant. Le colorant peut être utilisé pur ou dilué avec le liquide de base soit moitié-moitié, soit 2 volumes de colorant pour un volume de liquide de base. Il faut, pour chaque nouveau colorant, déterminer la dilution et le temps de coloration optimum. A titre indicatif : coloration pendant 2 à 4 heures (éventuellement pendant une nuit) à la température du laboratoire dans une solution pure ou diluée aux 2/3.

A la fin de la coloration, les retirer, les laver, les déshydrater et les monter au baume.

La déshydratation : Le frottis humide est déshydraté par l'alcool éthylique à titre croissant (60, 70, 80, 90, absolu) puis par le xylène.

Ces divers produits sont contenus dans des flacons de Borrel., et le frottis passe de l'un à l'autre en séjournant pendant une à deux minutes dans chacun d'eux.

Sur le frottis encore imprégné de xylène, on dépose une lamelle dont la face inférieure porte une petite goutte de baume du Canada. Le baume, en se dissolvant dans le xylène, imprègne le frottis en formant une couche mince.

Résultats

La coloration est plus belle avec les selles fraîches.

Le fond de la préparation est gris-vert clair lorsque le frottis est mince. Il est plus ou moins rouge si le frottis est épais.

Chez les protozoaires : les noyaux et caryosomes, les corps sidérophiles et la membrane cellulaire vont du vert clair au noir,

Les hématies vont du rose au rouge foncé. Les fibres musculaires sont également colorées en rouge.

Les levures et bactéries sont par contre vert foncé-noir.

Peuvent être colorés avec cette technique

Toutes les amibes et leurs kystes : *Entamoeba histolytica*, *E. hartmanni*, *Ent. coli*, *E. gingivalis*, *Endolimax*, *Iodamoeba*.

Les Flagellés: *Dientamoeba*, *Enteromonas*, *Chilomastix*, *Pentatrichomonas*, *Giardia*.

Les coupes d'intestin avec amibes, *Balantidium*, Coccidies.

À noter également que les coupes avec helminthes, par exemple des schistosomes, donnent de très bons résultats.

III- Coloration spéciale :

Hématoxyline ferrique de Heidenhain (1892) :

Il s'agit d'une technique histologique : pendant toute sa durée la préparation ne doit pas sécher.

Réactifs

Préparer les deux réactifs suivants :

1- Mordant. - Solution aqueuse à 3 p. 100 d'alun de fer.

Pour préparer la solution d'alun de fer. Il ne faut employer que des *cristaux violets bien clairs* : s'ils présentent une teinte jaunâtre ; ils sont altérés et doivent être rejetés. Pour avoir sûrement du bon alun de fer, il ne faut pas de petits cristaux, ni de l'alun de fer pulvérulent ; mais exiger de *gros cristaux* qui se conservent parfaitement en bocaux bien bouchés. Au moment de faire la solution, on racle avec un scalpel ou on pulvérise au mortier la quantité nécessaire et on obtient ainsi une dissolution immédiate. Le liquide, qui est jaunâtre, doit être absolument limpide. Il ne faut pas préparer à l'avance une grande quantité importante de solution, car elle ne se conserve pas. Faire la solution à froid.

2- Colorant - Solution aqueuse d'hématoxyline à 1p. 100, préparée en mélangeant 10 ml de solution d'hématoxyline à 10 p. 100 dans l'alcool à 90 %, avec 90 ml d'eau distillée.

Il existe des variantes à cette solution colorante.

La solution d'hématoxyline est d'autant meilleure qu'elle est plus ancienne. Elle devient noire, par suite de l'immersion des coupes ou frottis imprégnées d'alun de fer, mais cela ne présente pas d'inconvénient.

H.F. Shortt a indiqué un procédé très simple pour préparer une solution d'hématoxyline immédiatement mûre. On dissout lentement à ébullition 1 gramme d'hématoxyline en cristaux dans 95 ml d'eau distillée.

Quand la dissolution est complète, on ajoute 5 ml d'acide phénique liquide.

Après refroidissement le liquide est prêt pour l'usage.

Étalement et fixation de selle :

Mode opératoire

On opère avec une batterie de cylindres de Borrel.

1- Mordancer les frottis ou les coupes dans l'alun de fer pendant trente minutes à douze heures.

2- Laver rapidement à l'eau distillée.

3- Colorer dans la solution d'hématoxyline pendant trente minutes à vingt-quatre heures. La préparation doit prendre une coloration noire encre de Chine.

On accélère beaucoup le mordantage et la coloration dans l'étuve à 50°.

4- Laver rapidement à l'eau distillée.

5- Différencier dans l'alun de fer. Il faut prendre un liquide différent de celui qui sert à mordancer.

La concentration peut être la même ou plus faible (1 p. 100), s'il y a intérêt à ralentir le processus pour le suivre plus exactement. En effet, il est indispensable de retirer les coupes de temps en temps, pour contrôler la différenciation : on les lave rapidement à l'eau distillée et on les examine au microscope avec un grossissement approprié.

Si la différenciation est trop poussée, la préparation n'est pas perdue. Il suffit de la colorer de nouveau dans le bain d'hématoxyline.

6- Après différenciation, laver soigneusement à l'eau distillée, puis déshydrater et monter au baume.

Le temps consacré au mordantage et à la coloration diffère beaucoup, il est fonction du résultat souhaité. Pour une simple coloration nucléaire topographique, il suffit d'un mordantage et d'une coloration de trente minutes à une heure, tandis que, pour les différenciations cytologiques, les bains doivent être prolongés pendant douze et même vingt-quatre heures. Dans le premier cas, la coloration obtenue est bleue, tandis que dans le second, elle est parfaitement noire.

La différenciation peut varier dans de très larges limites ; on la pousse plus ou moins loin, suivant les parties qu'on veut mettre en évidence. C'est là à la fois l'avantage et l'écueil de la méthode de Heidenhain ; elle permet au biologiste exercé de différencier les plus fins détails cytologiques, mais elle expose le débutant à de graves erreurs d'interprétation. En effet, non seulement le résultat obtenu varie suivant la durée de la coloration et de la différenciation, mais encore il ne faut pas prendre tous les corpuscules sidérophiles pour des inclusions nucléaires ou cytoplasmiques, ni tirer des conclusions erronées d'une différenciation incomplète ou trop poussée. Il faut savoir aussi que l'épaisseur des frottis influe beaucoup sur le résultat final de la différenciation. Par conséquent, dans une même préparation, les noyaux ne seront pas tous au même point : les uns seront trop différenciés, les autres pas assez et il faudra savoir choisir ceux qui se présentent à l'état voulu, pour le détail à mettre en évidence.

Dans une préparation bien réussie, les structures nucléaires ressortent en noir intense sur un fond incolore ou à peine coloré. La coloration est à la fois très énergique et très précise ; au point de vue optique, elle présente donc des avantages considérables.

Les techniques de coloration du sang : (voir cour sur le Paludisme)

Annexes

1-Étalement et fixation de selle :

Étalement

Sur la lame porte-objet, déposer une petite goutte de selles liquides ou de glaire. Avec le bord d'une lamelle ou une allumette, on fait un étalement mince en zigzag afin d'obtenir des épaisseurs différentes. Il faut confectionner plusieurs lames pour chaque selle (3 au minimum).

NE PAS LAISSER SÉCHER. Fixer immédiatement.

Bailenger recommande dans tous les cas, glaires y comprises, de délayer la parcelle fécale avec une petite goutte d'une solution aqueuse d'alginate de sodium (0,5 à 2 p. 100) qui, au contact des fixateurs acides, forme une pellicule gélifiée adhérente au support et de réaliser l'étalement à l'aide d'une lamelle, maintenue entre les doigts de la main droite, que l'on amène au contact de la lame, en avant de la goutte fécale. Celle-ci diffuse le long du bord de la lamelle à laquelle on imprime un mouvement de translation *lent et uniforme*, en la maintenant inclinée à 45° sur la lame.

Fixation

Plonger la lame humide dans l'un des trois fixateurs suivants :

Bouin picroformol (solution aqueuse) (Bouin 1897) :

Solution aqueuse saturée d'acide picrique	15 volumes
Formol du commerce à 40 p. cent	5 volumes
Acide acétique cristallisable.....	1 volume

Cette solution doit être fraîchement préparée pour bien fixer.

Fixation pendant 15 minutes au moins.

Avant de colorer : enlever l'excès d'acide picrique par deux bains d'alcool à 90 %, puis un bain d'alcool à 70 %, dans lequel on peut conserver les lames quelques jours. Puis laver à l'eau courante pour enlever tout l'alcool.

Picroformol acétique :

Formol du commerce à 40 p. cent	1 volume
Eau.....	3 volumes
Acide picrique	à saturation

Au moment de l'emploi, ajouter 5 p. 100 en volume d'acide acétique cristallisable.

L'avantage de ce fixateur tient à sa plus grande richesse en acide picrique et à sa plus grande facilité de préparation. Laisser en contact pendant trente minutes ; laver par deux bains successifs d'alcool à 90 %, puis à l'eau courante.

Duboscq-Brasil (1905) = Bouin alcoolique :

Alcool à 80 %	150 ml
Formol du commerce à 40 p. 100.....	60 ml
Acide acétique cristallisable.....	15 ml
Acide picrique	1 g

À préparer au moment de l'emploi. Cette solution fixe mieux les kystes. Durée de fixation 30 minutes, puis plonger directement dans l'alcool à 90 %. Préparer les lames comme précédemment en vue de la coloration.

2- Comment luter une lame :

1- A la paraffine :

- On utilise la paraffine pour inclusions cytologiques.
- Faire fondre la paraffine dans une cupule de verre ou de porcelaine soit sur la veilleuse d'un bec bunsen soit à l'étuve à 56°C.
- Déposer la paraffine le long des 4 cotés de la lamelle avec un fer à luter, chauffé que l'on plonge dans la paraffine qui fond doucement au contact du chaud : il est souhaitable de procéder comme suit :
- Déposer une goutte de paraffine aux 4 coins de la lamelle pour la fixer (la solidification est presque immédiate)
- Appliquer ensuite le fer chargé de paraffine le long des 4 cotés de la lamelle en débordant tant sur la lame que sur la lamelle sur une largeur totale d'environ 3 millimètres.
- Vérifier l'étanchéité au centre de la lamelle avec une pointe de crayon.

2- Au Rondeau :

Lanoline :..... 20 g
Colophane :80 g

C'est le même principe que celui utilisant la paraffine

Cependant, si l'étanchéité est bonne, la conservation des lames est supérieure à celle obtenue par la paraffine et peut durer des années.

3- Au vernis a ongle :

- après avoir recouvert l'étalement de selles avec une lamelle laisser sécher quelques instants afin d'éliminer toute trace d'humidité tant sur la lame que sur la lamelle (le vernis n'adhère pas sur la verre humide)
- déposer au pinceau une mince pellicule de vernis le long des 4 cotés de la lamelle en débordant largement tant sur celle-ci que sur la lame.
- Laisser sécher
- Vérifier l'étanchéité par pression légère sur le centre de la lamelle avec la pointe d'un crayon
- Appliquer éventuellement une deuxième couche de vernis et laisser sécher
- C'est un procédé rapide. Si l'on réussit une bonne étanchéité on pourra obtenir une bonne conservation surtout pour les œufs d'helminthes (les kystes et formes végétatives se conservant mal).

4- Au goudron : (même que la paraffine).

3- Références :

Coprologie parasitaire et fonctionnelle : J Bailenger

Conduite des examens en parasitologie : G Mougeot

Guide pratique du laboratoire de parasitologie : Tome 1, Examens directs :M Belaid et Col.

Médecine tropicale : M Gentilini

Cahier de formation n° 11 : Amibes et flagellés intestinaux, Amibes oculaires : leur diagnostic microscopique : J.C.Petithory.