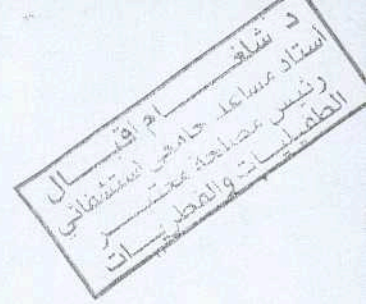


Techniques de concentration en parasitologie



Techniques de concentration des parasites dans des selles :

Principe et intérêt : les nombreux et parfois volumineux débris alimentaires, la masse des cadavres bactériens, tout cela encombra la dilution et gêne l'observation microscopique. En éliminant ces éléments inutiles, en éclaircit les préparation et simultanément on augmente la concentration des parasites. Ainsi, privés des particules sans intérêt parasitaire, les œufs et larves de vers, de même que les kystes de protozoaires éventuellement contenus dans une masse fécale volumineuse se concentrent dans un faible volume et sont immédiatement décelables.

Le principe des méthodes d'enrichissement permet de les classer en 3 groupes :

1. Méthodes physico-chimiques ;
2. Méthodes par éclaircissement ;
3. Méthodes biologiques ;

I- Méthodes physico-chimiques :

Les selles sont diluées dans un liquide dont la densité est soit inférieure à celle des parasites (ces derniers vont sédimenter) soit supérieures à celle des parasites (qui vont flotter à la surface du liquide)

1) Techniques de sédimentation et de centrifugation :

Plusieurs modalités pratiques ont été décrites :

Sédimentations simples en eau physiologique ou en eau glycinée, association sédimentation centrifugation. Toutes ces techniques sont certes de réalisation simple et ne demandent qu'un matériel rudimentaire

En fait elles sont longues à pratiquer car elles exigent de nombreuses manipulations (plusieurs sédimentations ou sédimentations centrifugations) qui les éliminent comme techniques de routine.

De plus quelques soient les modalités d'élimination des débris volumineux ces techniques donnent de mauvais résultats pour les selles riches en résidus de féculents.

Aussi ces techniques sont elles abandonnées et ne nous retiendrons pas davantage

2) Techniques de flottation:

Trois principales techniques :

2-1- Méthode de Willis (1921) : elle utilise une solution saturée de chlorure de sodium (füllborn 1920) en mettant à profit l'adhérence des parasites au verre.

- a) Diluer dans un verre à pied conique 10g de selles dans 200 ml d'une solution saturée de ClNa.
- b) Homogénéiser
- c) Tamiser
- d) Verser dans un tube à centrifuger jusqu'à affleurement du liquide aux bords du tube.
- e) Appliquer une lamelle sur le tube en évitant de laisser des bulles d'air entre la lamelle et le liquide.
- f) Retirer la lamelle au bout de 15 à 45 minutes, la déposer sur une lame et examiner immédiatement (avant la cristallisation des sels).

Indications : Œufs d'ankylostomes et d'ascaris fertiles.

Contre-indications : Larves, kystes, œufs : Douves, schistosomes, ascaris infertiles.

2-2- Technique de Faust (1930)

- a) Diluer soigneusement 10 g de selles dans 100 ml d'eau tiède dans un verre à pied conique.
- b) Tamiser avec de la gaze humide disposée dans un entonnoir qui plonge dans un tube à centrifuger.
- c) Centrifuger 1 minute à 2300 t et décanter le surnageant.
- d) Reprendre le culot de centrifugation par 2 à 3 ml d'eau tiède. Agiter et centrifuger 1 mn à 2300 t.
- e) Répéter (d) 3 à 4 fois jusqu'à ce que le liquide surnageant soit clair.
- f) Mettre le sédiment dans 3 à 4 ml d'une solution aqueuse saturée de $\text{SO}_4 \text{Zn}$ (33g $\text{SO}_4 \text{Zn}$ pour 100 ml eau distillée)
- g) Remplir un ou plusieurs tubes à centrifuger avec (f) : le niveau à 0,5 cm de l'extrémité supérieure du tube.
- h) Centrifuger 1 minute à 2300 t.
- e) Prélever avec une anse de platine à la surface
- j) Examiner immédiatement.

La technique de Faust nécessite certes plusieurs manipulations mais reste valable tant par son prix de revient que pour son efficacité pour la mise en évidence des œufs d'helminthes.

Néanmoins il faut signaler que cette technique peut déformer les kystes de protozoaires.
 Contre-indications : kystes (déformation) ; œufs d'ascaris infertiles ; œufs operculés (douve + botriocephale) ; œufs de schistosoma et larves (altérées).

2-3- Méthode de Janecko Urbanyi (1931) :

- a) Diluer 3 à 5g de selles dans une solution iodo-mercurique*.
- b) Tamiser dans un tamis métallique à mailles de 1 mn.
- c) Centrifuger 3 mn à 2500 t/mn
- d) Recueillir la partie superficielle avec un petit agitateur de verre à extrémité aplatie ou mieux avec une anse de platine dont l'anse forme un angle droit avec le support.
- e) Mettre le prélèvement entre lame et lamelle
- f) Observer immédiatement (avant l'altération des œufs).

Solution iodo-mercurique :

- Solution mère : Dissoudre 74g d'iodure de K^+ dans 50 ml d'eau.
Ajouter, en agitant, 100g de biiodure de mercure.
Mettre dans un flacon teinté hermétiquement fermé.
- Au moment de l'emploi : Solution mère : 10 ml
Eau distillée : 24 ml

C'est une excellente technique pour concentrer les œufs d'helminthes en général et les œufs de grande douve, d'hymenolepis et d'ankylostomes en particulier. Son inconvénient est d'utiliser un réactif toxique et corrosif : le biiodure de Hg.

Indications : œufs de grande douve (F.h) ; schistosoma mansoni ; ankylostome ; necator ; taenia et hymenolipis ; oxyure ; tricocephale et larves de vers.

Contr-indications : kystes de protozoaires (sauf giardia) ; ascaris et selles riches en lipides ou huiles minérales.

3) Techniques diphasique :

Principe : la concentration parasitaire résulte de 03 phénomènes

1- mise en présence de deux phases non miscibles (l'une aqueuse, l'autre lipophile) qui crée, pour chacune des particules fécales (parasites, débris alimentaires, microbes) un coefficient de partage leur permettent de s'orienter en fonction de leur équilibre hydrophile- lipophile.

Les éléments sur la balance hydrophile-lipophile penchant en faveur des groupements hydrophiles se retrouvent dans la phase aqueuse et se déposent au fond du tube à centrifuger. Au contraire si la

balance penche en faveur des groupements lipophiles, l'élément reste au contact de la couche d'éther et participe à la constitution de l'anneau qui se forme à l'interphase eau - éther.

2- action dissolvante des réactifs qui supprime certains constituants fécaux (lipides notamment).

3- la densité des parasites supérieure à celle de la phase aqueuse.

D'autres facteurs susceptibles d'accroître l'hydrophilie des éléments parasitaires, c'est-à-dire de favoriser leur concentration dans le culot de centrifugation.

- ✓ pH (pH 5 meilleur pour tous les œufs)
- ✓ composition ionique des phases
- ✓ présence ou obtenue dans les dilutions fécales d'agents tensioactifs.

Les principales techniques :

3-1- Méthode de Teleman Rivas modifiée par Bailenger :

1. Triturer dans un verre à pied conique 2 à 5g de selles dans 10 fois leur volume dans du tampon acéto-acétique à pH 5,5.
2. Laisser sédimenter 40 à 50 secondes.
3. Verser le liquide surnageant dans un tube à centrifuger.
4. Ajouter de l'éther sulfurique (1/3 du volume total de liquide) en prenant la précaution de laisser au moins un centimètre de hauteur vide dans le tube
5. Agiter vigoureusement jusqu'à émulsion complète après avoir bouché le tube avec le pouce.
6. Centrifuger immédiatement après l'émulsion 1 minute entre 1500 et 2000 t.
7. Jeter le surnageant et prélever le culot par capillarité avec une pipette Pasteur.
8. Cette méthode reste une bonne technique de routine avec une petite réserve en ce qui concerne les oeufs légers (Ankylostomes et Douves en particulier).

Cette technique concentre bien les kystes (giardia, amibes) et les œufs (trichocephale et ankylostome) ainsi que les oocystes de cryptosporidies.

3-2- M.I.F concentration :

Lorsque les selles ne peuvent pas être observés dans un bref délai il est recommandé d'utiliser le M.I.F.

Pour cela :

- Mélanger dans un flacon bien bouché une partie de selles pour 10 parties de solution MIF
- Bien agiter
- Faire un examen direct : prendre une goutte de la solution obtenue après mélange et examiner entre lame et lamelle.
- Si l'examen direct est négatif :
 - ✓ Mélanger à nouveau en agitant le flacon.
 - ✓ Laisser décanter
 - ✓ Verser le surnageant dans un tube à centrifuger.
 - ✓ Ajouter de l'éther sulfurique (1/3 du volume total de liquide) en prenant la précaution de laisser au moins un centimètre de hauteur vide dans le tube.
 - ✓ Agiter vigoureusement jusqu'à émulsion complète après avoir bouché le tube avec le pouce.
 - ✓ Laisser décanter deux minutes environ. L'émulsion doit rester stable.
 - ✓ Centrifuger immédiatement après l'émulsion pendant une minute à 2000 t.
 - ✓ Jeter le surnageant et prélever le culot par capillarité avec une pipette Pasteur.
 - si après deux minutes de décantation l'émulsion est instable (présence d'éther surnageant) il faudra ajouter un ml d'eau du robinet agiter et laisser décanter.
 - Cette opération pourra être répétée autant de fois que l'on constatera la présence d'éther surnageant.

Cette technique concentre bien les kystes de protozoaires, les œufs de grande douve, d'ascaris et de schistosome. Sa première étape permet la coloration des protozoaires ainsi que leur conservation éventuelle.

3-3- Méthode de Ritchie modifiée:

La concentration est obtenue en combinant la sédimentation par centrifugation et l'élimination des résidus de la digestion par l'action dissolvante de l'éther éthylique.

Réactifs :

Solution de formol à 10%
Solution d'éther éthylique

Technique :

- Diluer une noisette de selles dans une solution de formol à 10%
- Tamiser à l'aide d'une passoire avec des pores fins
- Laisser sédimenter quelques secondes
- Ajouter l'éther au 1/3
- Agiter vigoureusement jusqu'à l'obtention d'une solution homogène
- Centrifuger à 1500 tours/min pendant 2 minutes
- Rejeter le surnageant
- Examiner le culot entre lame et lamelle aux grossissements 10x puis 40x.

Cette technique concentre bien les kystes de protozoaires ainsi que les œufs d'ascaris et de schistosomes.

II- Concentration par éclaircissement :

Technique de Kato : C'est une technique de décoloration des selles qui permet de distinguer rapidement au faible grossissement les œufs de parasites dans une préparation de selle rendue translucide.

a) Réactifs :

Glycérine	100 ml
Vert malachite à 3%.....	1 ml
Eau distillée.....	100 ml

b) Technique :

- Découper des « lamelles » de cellophane en rectangles de 2 cm x 3cm.
- Les rectangles de cellophane doivent séjourner au moins 24 heures dans la solution.
- En cas d'examen différé les selles peuvent être conservées à + 4° c pendant quelques jours sans inconvénient.

Méthode qualitative :

- Un petit poids de matières fécales (environ 30 mg) est déposé sur une lame de microscope ordinaire puis étalé sous forme de frottis épais. Celui-ci est recouvert d'un rectangle de cellophane imprégné de la solution.
- La préparation est retournée puis écrasée sur une feuille de papier absorbant.
- Les lames sont conservées 15 à 30 minutes à la température du laboratoire avant d'être examinées au microscope. (L'examen ne doit pas être retardé de plus de deux heures : les œufs de schistosomes et d'ankylostomes deviennent rapidement méconnaissables).

Méthode quantitative :

Nécessite l'utilisation de plaques de carton glacé ou de plastique percées d'un trou de diamètre constant.

- soit un carré de carton glacé de 0,26 mm d'épaisseur avec en son milieu un trou de 4,72 mm de diamètre ce qui donne un poids moyen de matière fécale égal à 10 mg (Ripert)
- soit une plaque de plastique de 1 mm d'épaisseur percée d'un trou de 6,5 mm de diamètre donnant un poids moyen de selles de 30 mg (Nozais)
- si les selles renferment beaucoup de débris on aura intérêt à les tamiser quoiqu'il en soit la plaque perforée est appliquée sur une lame, le trou est rempli de selles tamisées.
- La surface est arasée puis la plaque est retirée
- Le prélèvement est étalé sous un rectangle de cellophane imprégné de la solution.
- Examiner la totalité du prélèvement en comptant tous les œufs rencontrés. Le nombre d'œufs retrouvés pour chaque espèce est soit multiplié par 100 (Ripert) soit multiplié par 100 et divisé par 3 (Nozais) et ce pour obtenir une densité d'œufs pour un gramme de selles.

Indications : Tous les œufs et notamment *S.mansoni* ; Coccidies (oocystes, sporocystes).
 Contre-indications : Protozoaires (trophozoïtes, kystes) ; Larves (souvent inidentifiables).

III- Concentration biologique :

Technique de Baermann : Mise en évidence des larves d'anguillules :

- Elle utilise un appareillage simple constitué par un entonnoir de 12 cm d'ouverture et dont la tubulure porte un tube en caoutchouc fermé par une pince.
- Mettre environ 15g de selles fraîches dans une passoire métallique tapissée selon la consistance de la selle par une ou deux couches de gaze.
- Remplir l'entonnoir jusqu'au 1/3 de la hauteur avec de l'eau chaude (environ 45°)
- Placer dans l'entonnoir la passoire contenant les selles dont la partie inférieure doit affleurer l'eau.
- 2 à 3 heures plus tard retirer du dispositif le liquide qui pourra être soit centrifugé à 1500 t/ mn pendant 5 minutes et permettre l'examen du culot au microscope, soit vidé dans une boîte de pétri et examiné à la loupe binoculaire.

C'est une excellente technique pour la recherche des larves d'anguillules en mettant à profit l'hydrothermo-tropisme positif de ces dernières.

N.B : les larves d'anguillule étant contaminantes cette technique doit être pratiquée avec le maximum de sécurité (port de gants en particulier).

Quelquefois d'autres parasites peuvent être observés : jeunes oxyures, *Trichomonas*, miracidium de schistosomes.

Techniques de concentration des parasites dans le sang :

La goutte épaisse : il s'agit d'une microtechnique d'enrichissement qui permet d'observer sur une petite surface beaucoup plus de sang que sur un frottis

Technique :

- ✓ déposer une goutte de sang au centre de la lame
- ✓ tourner régulièrement dans la goutte tout en l'étalant, pendant deux minutes, à l'aide de la pointe d'un vaccinostyle ou le coin d'une lame pour défibriner le sang.
- ✓ Mettre la lame à l'abri des poussières et des mouches pendant 4 à 24 heures selon la température ou mettre à l'étuve à 38-40°C pendant 5 minutes.
- ✓ Plonger la lame pendant 5 à 10 minutes dans un verre à pied contenant de l'eau du robinet jusqu'à ce que la préparation soit claire (hémolyse complète).
- ✓ Retirer la lame et la laisser sécher à plat
- ✓ Fixer par le méthanol
- ✓ Colorer par une solution de Giemsa pendant 20 minutes
- ✓ Rincer à l'eau, laisser sécher et examiner à l'immersion.

Remarques : une technique plus simple consiste à recouvrir la lame de Giemsa diluée à raison d'une goutte par ml, laisser agir pendant 1 heure, laver à l'eau et sécher.
La coloration rapide à l'aide du coffret RAL 555 peut être utilisée.

QBC : Quantitative Buffy Coat) (Becton Dickinson), consiste à concentrer les hématies parasitées par centrifugation à haute vitesse dans un tube à hémocrite (100µl) contenant de l'acridine orange. Les hématies parasitées contenant moins d'hémoglobine sont de densité supérieure et se concentrent au contact des globules blancs. Cette technique nécessite un matériel spécial pour la réalisation et la lecture (microscope à épifluorescence, porte-tube)

Technique de leucoconcentration :

Il existe de nombreuses techniques de concentration des microfilaires dont certaines très récentes. Ces techniques sont délicates rarement mise en œuvre, il faut donc utiliser une méthode facile. On peut conseiller la technique de Ho-Thi Sang et J. Petithory, appelée technique à la saponine

Réactifs : eau physiologique à 0,9%, solution de saponine à 2% (saponine pure 0,2 g, eau physiologique à 0,9 % 10 ml, conservation à +4 °C quelques jours).

Technique. Dans un tube transparent conique :

- mettre 5 ml de sang (1 volume)
- ajouter 10 ml d'eau physiologique à 0,9 % (2 volumes),
- ajouter la solution de saponine goutte à goutte, boucher le tube et agiter par retournement plusieurs fois pour s'assurer que l'hémolyse est complète,
- centrifuger 10 minutes à 2000 tours/ minutes,
- verser le surnageant, essuyer les parois avec un mouchoir papier tortillé,
- lire la totalité du culot de centrifugation à l'objectif 10.
- Si on note la présence de rares microfilaires (parfois une seulement enlever délicatement la lamelle, laisser sécher et colorer. Les microfilaires sont parfois altérés mais leur étude morphologique reste la plupart du temps réalisable.
- Attention, les causes d'erreur sont nombreuses, en particulier avec les résidus textiles.

Technique de triple centrifugation :

- Le prélèvement de 20 ml est placé dans un tube à centrifuger.
- Une première centrifugation s'effectue à 1500 tr/min pendant 10 minutes.
- Le plasma est décanté, placé dans un tube à centrifuger et une deuxième centrifugation est effectuée dans les mêmes conditions.
- Le plasma est à nouveau décanté et une troisième centrifugation est effectuée à 3000 tr/minute pendant 20 minutes.
- Le culot est examiné après chaque centrifugation entre lame et lamelle.
- C'est une bonne technique, facilement réalisable qui s'applique dans les mêmes conditions à un prélèvement de liquide céphalo-rachidien.

D'autres techniques sont apparues, difficiles à réaliser en pratique courante :

Leucoconcentration en tube à microhémocrite (WOO),

Faire 3 à 4 tubes à hémocrite, centrifuger, regarder la couche de globules blancs au grossissement 250. On observe la mobilité des trypanosomes.

QBCAT ou technique de filtration du sang sur DEAE cellulose à Ph 7,9 pour le diagnostic des trypanosomes africains.

Techniques de concentration des parasites dans les urines :

Sédimentation :

- ✓ Laisser sédimenter les urines
- ✓ Prélever 20 ml dans le fond du flacon

- ✓ Centrifuger à faible vitesse dans un tube conique
- ✓ Prélever 1 ml du culot de centrifugation et le verser dans un verre de montre
- ✓ Examiner la préparation à la loupe ou entre lame et lamelle à faible grossissement.

Concentration :

- ✓ Agiter le flacon de prélèvement
- ✓ Prélever 10 ml d'urine dans le fond du flacon et le verser dans un tube à centrifugation
- ✓ Centrifuger pendant 2 minutes à 2000 tours par minute
- ✓ Prélever le culot à l'aide d'une pipette pasteur, le verser dans un verre de montre.
- ✓ Examiner la préparation à la loupe ou entre lame et lamelle à faible grossissement.
- ✓ Lorsque l'examen est différé, les urines doivent être conservées en ajoutant 5 ml d'un liquide conservateur.

Liquide conservateur	
Formol	10 ml
Glycérine	10 ml
Eau distillée	80 ml

Références :

- 1- Coprologie parasitaire et fonctionnelle : J Bailenger.
- 2- Conduite des examens en parasitologie : G Mougeot.\$
- 3- Guide pratique du laboratoire de parasitologie : Tome 1 : Examens directs