

LES TECHNIQUES DE CONCENTRATION DES SELLES

1. INTRODUCTION :

Les techniques de concentration ont pour but de réunir dans un faible volume, des parasites dispersés dans une masse de selle.

Elles sont nombreuses et altèrent en général les formes végétatives, chacune ayant ses avantages et ses limites. Elles doivent être pratiquées même si l'examen direct est positif.

Elles se répartissent en deux groupes : Les méthodes physiques et les méthodes physico-chimiques ou diphasiques.

2. LES METHODES PHYSIQUES :

Elles sont basées sur la différence de densité entre le parasite et le réactif diluant, on distingue les techniques de sédimentation et des techniques de flottaison.

2.1. **Technique de sédimentation :**

Elles utilisent comme diluant le réactif dont la densité est inférieure à celle des parasites ; ces derniers plus lourds ils sédimentent et se déposent au fond de tube.

2.2. **Méthodes par flottaison :**

Elles utilisent des diluants dont la densité est supérieure à celles des parasites ces derniers vont flotter à la surface.

Parmi ces techniques :

2.2.1. Méthode de Willis :

Elle utilise également du NaCl à 25%.

Les selles sont diluées avec du Na Cl à 25% dans un verre à pied et on laisse sédimenter quelques secondes. Par la suite on remplit un tube conique jusqu'à l'obtention d'un ménisque à concavité supérieure. On dépose alors une lamelle au dessus et on laisse en contact 15 minutes. Au bout de ce délai on retire la lamelle qu'on dépose sur une lame porte objet pour l'examiner.

Elle présente un intérêt pour les œufs principalement les **œufs d'helminthes**.

3. LES METHODES PHYSICO-CHIMIQUES OU DIPHASIQUES :

Elles consistent à mettre en présence deux phases liquides non miscibles, l'une aqueuses et l'autres lipophile réalisant un coefficient de partage dont la valeur est conditionnée pour chaque particule fécale par sa balance hydrophile/lipophile, les éléments dont la balance penche en faveur de groupement hydrophile se trouvent dans la phase aqueuse et se dépose au fond de tube alors que ceux dont la balance penche vers le groupement lipophile se retrouve au contacte de la phase organique.

Mode opératoire : il est le même pour toutes les techniques diphasiques.

- Faire une dilution de la selle dans le diluant choisi.
- Tamiser à travers un chinois métallique pour les gros débris.
- Remplir un tube conique en verre 2/3 du volume total avec cette suspension.
- Ajouter 1/3 du volume d'éther sulfurique (solvant organique) en laissant 1cm de hauteur vide.
- Emulsionner énergiquement.
- Centrifuger à 1500 tours/minutes pendant 3 minutes.

On obtient un tube avec 4 phases de haut en bas :

- Couche d'éther chargée de graisse.
- Couche épaisse de débris lipophile.
- Couche aqueuse.
- Culot à examiner.

Parmi ces techniques on retiendra: la méthode de Bailenger et la méthode de Ritchie.

3.1. Méthode de Bailenger :

Elle utilise un tampon acéto-acétique à pH 5.

Elle est indiquée pour **les kystes de protozoaires**.

3.2. Méthode de Ritchie modifiée :

Elle utilise le formol à 10% avec lequel la selle est diluée.

Elle est indiquée pour **les œufs d'helminthes et les kystes de protozoaires**.

4. METHODES SPECIALES :

4.1. Méthode de Graham ou scotch test anal :

C'est une technique indiquée dans le **diagnostic de l'oxyurose et téniasis à *Taenia saginata***.

Elle consiste à appliquer un morceau de cellophane adhésive transparente, le matin avant toute défécation et toute toilette, sur le pourtour anal. On retire par la suite le scotch pour le coller sur la lame porte objet.

La lecture se fait au microscope à l'objectif X10.

LES TECHNIQUES DE COLORATION DES SELLES

1. INTRODUCTION :

L'examen parasitologique après coloration à **des indications** :

- Identification et diagnostic différentiel entre les espèces d'**amibes** essentiellement **sous formes végétatives**.
- Conservation du matériel didactique ou l'envoi vers un autre laboratoire pour avis.
- Indispensable pour le diagnostic de certains protozoaires tel que : **cryptosporidies et coccidies**.

On décrit les colorations instantanées entre lame et lamelle, les colorations de frottis humides ou secs et les colorations spécifiques.

2. Colorations instantanées entre lame et lamelle :

Elle réussit bien sur les selles contenant des formes végétatives encore vivantes.

2.1. Technique de Sapero-Lawless et Strome (MIF coloration):

2.1.1. Coloration sur lame :

Technique de coloration :

- Déposer une goutte de suspension fécale sur la lame.
- Ajouter une goutte de réactif et mélanger avec le coin d'une lamelle.
- Recouvrir d'une lamelle.
- Attendre 20 à 30 minutes avant d'examiner au microscope.

Résultats :

Les kystes et les formes végétatives d'amibes se colorent immédiatement en **vert jaunâtre** ou un brun plus au moins foncé.

Au bout de quelques heures la coloration initiale due au lugol est remplacée par la coloration à l'éosine. La **membrane nucléaire** devient **rouge** foncé à **noir**, la chromatine n'est pas colorée et apparaît par sa seule réfringence, le **cytoplasme** est **rouge**.

Les préparations ne se conservent que quelques heures.

Indication :

Cette technique est particulièrement indiquée pour les selles contenant des **glaires**.

2.1.2. Coloration en tube à hémolyse :

Technique de coloration :

- Préparer extemporanément le mélange des réactifs dans un tube à hémolyse dans les proportions suivantes :
 - Solution mère de merthiolate.....2,35 ml
 - Solution de lugol à 5%.....0,15 ml environ 3 gouttes.

- Mélanger en retournant le tube.
- Ajouter au fond du tube environ 0,25g de selles avec une baguette de verre.
- Triturer ;
- Laisser sédimenter pendant 20 à 30mn.
- Ne pas agiter le tube et prélever à l'aide d'une pipette de Pasteur dans la couche supérieure du sédiment.

Résultats : La coloration est identique à celle obtenue sur lame, c'est d'abord le lugol qui colore puis il est peu à peu remplacé par l'éosine.

La coloration des protozoaires dans le sédiment est indéfinie si l'on a soin de bien boucher le tube pour empêcher le contenu de se dessécher.

Lorsqu'on veut examiner un sédiment conservé depuis plusieurs semaines, le remettre en suspension par agitation du tube, puis laisser reposer à nouveau quelques dizaines de minutes.

Indication : Cette technique est recommandée dans tous les cas quelle que soit la consistance des selles. Elle permet de fixer une grande quantité de selles et de conserver pendant plusieurs années un matériel de référence.

3. Méthode de coloration de frottis :

Trois groupes de coloration peuvent être utilisées pour les frottis humides, il s'agit de :

- **Technique en 1 temps** : fixation et coloration du frottis en même temps, ex : **technique de KOHN au noir chlorazol**.
- **Technique en 2 temps** : fixation puis coloration du frottis, ex : **technique au trichrome de Wheatley**.
- **Technique en 3 temps** : fixation du frottis puis sa coloration et enfin la différenciation, ex : **méthode de Heidenhain à l'hématoxyline ferrique**.

3.1. Technique de KOHN au noir chlorazol :

Technique de coloration :

- Mettre les frottis encore humides dans la solution de colorant placée dans un récipient de Borrel.
- Maintenir en contact 8 à 10 heures.
- Laver les frottis à l'eau courante, puis les déshydrater par passage successifs dans de l'alcool éthylique de titre croissant : 60, 70, 80, 95 et absolu (éliminer l'excès de colorant) et enfin dans le xylène (éliminé l'alcool).
- Lecture au microscope à l'objectif X100 à l'immersion.

Résultat : Les kystes et les formes végétatives d'amibes sont colorés avec un **cytoplasme très clair sur fond grisâtre** et les **structures cellulaires** se détachent en **noir**.