



Méthodes de laboratoire en parasitologie intestinale

cahier de stage
par
Karine Thivierge

2014

LIVRES DE RÉFÉRENCES

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2005. Procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract; Approved Guideline – Second Edition. CLSI Document M28-A2, Pennsylvania.
2. Garcia, L.S. 2007. Diagnostic Medical Parasitology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Rashed, S., Trudel, L., Luong, T.N. et Pedneault, C. 2007. Médecine tropicale, santé internationale et santé de l'enfant immigrant. Éd. santé internationale, Canada.
4. Versalovic, J. et al. 2011. Manual of Clinical Microbiology, 10th ed., vol. 2. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

CAS CLINIQUES

Heelan, J. S. 2004. Cases in Human Parasitology. ASM Press, Washington, D. C.

ATLAS

Ash, L. R. and T. C. Orihel. 2007. Ash & Orihel's Atlas of human parasitology, 5th ed. American Society for Clinical Pathology Press, Singapore.

GUIDE TECHNIQUE

Garcia, L.S. 2009. Practical Guide to Diagnostic Parasitology, 2nd ed.. ASM Press, Washington, D.C.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS.....	7
FIXATION DES ÉCHANTILLONS.....	7
EXAMEN DIRECT	9
OBJECTIFS	9
MÉTHODE.....	9
EXAMEN MICROSCOPIQUE.....	9
TECHNIQUES DE CONCENTRATION	10
OBJECTIFS.....	10
TYPES.....	10
COLORATIONS PERMANENTES.....	12
OBJECTIFS	12
TYPES.....	12
EXAMEN MICROSCOPIQUE.....	12
STADES DIAGNOSTIQUES RETROUVÉS PAR LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES	13
PARASITES INTESTINAUX – TECHNIQUES VS SPÉCIMENS.....	13
MICROSCOPIE	14
EXPRESSION DES RÉSULTATS.....	15
CONTRÔLE DE LA QUALITÉ	15
COMPÉTENCE DU PERSONNEL.....	15
ÉQUIPEMENT.....	15
RÉACTIFS ET TECHNIQUES	15
SÉCURITÉ EN LABORATOIRE	16
ORGANISMES PRÉSENTS	16
PRODUITS CHIMIQUES UTILISÉS	16

ANNEXE 1	SÉDIMENTATION FORMOL-ACÉTATE D'ÉTHYLE (F-AcE)⁸	17
ANNEXE 2	COLORATION DE KINYOUN²	19
	ANNEXE 2A BLEU DE MÉTHYLÈNE DE LOEFFLER	20
ANNEXE 3	TRICHROME DE WHEATLEY²	21
	TRICHROME MODIFIÉ POUR MICROSPORIDIES ¹⁴	22
	ANNEXE 3A TRICHROME DE WHEATLEY	23
	ANNEXE 3B TRICHROME MODIFIÉ POUR MICROSPORIDIES	24
	ANNEXE 3C ALCOOL ACIDIFIÉ	25
ANNEXE 4	HÉMATOXYLINE FERRIQUE MODIFIÉE¹³	26
	HÉMATOXYLINE FERRIQUE MODIFIÉE – NOTES TECHNIQUES	27
	ANNEXE 4A HÉMATOXYLINE MODIFIÉE 1 %	28
	ANNEXE 4B MORDANT POUR HÉMATOXYLINE	29
	BIBLIOGRAPHIE	31
	NOTES	33

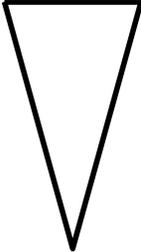
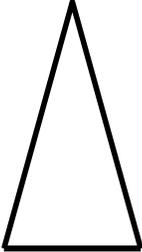
PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

- Utiliser un contenant propre, à large ouverture
- Éviter le contact avec :
 - eau
 - sol
 - urine
- Quantité
 - selles formées : 20-40 g (grosse noix)
 - selles liquides : 5-6 c. à table
- Éléments pouvant interférer avec l'examen et la détection des parasites :
 - antidiarrhéiques
 - antiacides
 - bismuth
 - baryum
 - huile minérale
 - laxatifs
 - antibiotiques (ex. tétracycline)
- Fournir trois (3) spécimens à 2-3 jours d'intervalle. Cependant, pour des raisons pratiques, l'analyse de deux (2) spécimens, prélevés à 2-3 jours d'intervalle, est maintenant considérée acceptable.

FIXATION DES ÉCHANTILLONS

- Immédiatement après l'émission, si l'examen des selles ne peut être fait dans les délais suivants :
 - Selles liquides - moins de 30 minutes
 - Selles molles ou pâteuses - moins d'une heure
 - Selles formées - quelques heures

- Distribution des protozoaires intestinaux dans les selles :

<u>Selles</u>	<u>Kystes</u>	<u>Trophozoïtes</u>
formées		
pâteuses		
molles		
liquides		

- Fixateurs utilisés :
 - SAF
 - Formol 10 %
 - PVA

Les échantillons fixés dans le SAF ou le PVA peuvent être utilisés pour les colorations permanentes.

- SAF (sodium acetate - acetic acid - formaldehyde) ¹⁵

Acétate de sodium	1,5 g
Acide acétique glacial	2,0 ml
Formol, solution commerciale (formaldéhyde 37 %)	4,0 ml
Eau	92,5 ml

Dissoudre et mélanger tous les ingrédients, dans l'ordre indiqué, par agitation magnétique.

- Formol 10 % ¹

Formol, solution commerciale (formaldéhyde 37 %)	100 ml
Eau	900 ml

Bien mélanger.

NOTES : La solution commerciale de formol contenant 37 % de formaldéhyde, une solution de formol 10 % correspond donc à une solution de formaldéhyde de 3,7 %.

**Proportions suggérées pour la fixation des spécimens :
1 partie de selles / 3 parties de fixateur**

EXAMEN DIRECT (selles fraîches)

OBJECTIFS

- Détecter principalement :
 - les trophozoïtes mobiles des protozoaires
 - les larves mobiles de *Strongyloides* sp.
- Peut permettre également de détecter les parasites qui se concentrent difficilement.

MÉTHODE

- Déposer une petite goutte de saline 0,85 % sur une lame.
- Ajouter une petite portion du spécimen (1-2 mg) et bien mélanger pour obtenir une suspension uniforme.
- Retirer les débris nuisibles avec un bâton applicateur, s'il y a lieu.
- Déposer une lamelle 22 x 22 mm (n° 1) sur la préparation et examiner le plus tôt possible.

La densité du matériel fécal doit être telle qu'on puisse lire avec difficulté des caractères d'imprimerie à travers la préparation.

Si l'examen de la préparation doit être reporté, il est possible de sceller celle-ci à l'aide de vernis à ongles.

NOTES : Les portions de selles contenant du mucus sanguinolent devraient toujours faire l'objet d'un examen direct pour détecter la présence de trophozoïtes.

L'examen direct des selles liquides ou diarrhéiques devrait être fait en dedans de **30 minutes** après l'émission de la selle; celui des selles molles ou pâteuses, moins d'**une heure** après l'émission. Sinon, le matériel devrait être fixé.

L'iode 1 % peut être utilisé dans la préparation des frottis pour préciser les détails morphologiques des organismes (Annexe 1).
Ces frottis peuvent également être préparés à partir des selles fixées.

EXAMEN MICROSCOPIQUE

- OBJECTIF 10X : - Examen systématique de la préparation pour dépister surtout les helminthes.
- OBJECTIF 40X : - Identification plus précise des organismes retrouvés à l'objectif 10X.
- Dépistage et identification des protozoaires.

TECHNIQUES DE CONCENTRATION

OBJECTIFS

- Séparer les parasites des débris fécaux.
- Les concentrer dans un faible volume de fixateur.

TYPES

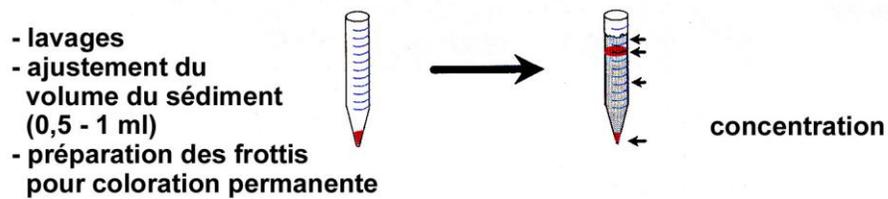
- Sédimentation : parasites plus denses que la solution utilisée retrouvés dans le sédiment.
- Flottation : parasites moins denses que la solution utilisée retrouvés à la surface.

Sédimentation formol-éther (F-E)^{1,2,8} (Annexe 1)

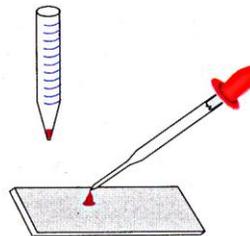
- Récupération générale des parasites.
- Aucune contrainte technique.
- Éther peut être remplacé par des substituts (acétate d'éthyle^{4,16} ou CitriSolv (anc. Hemo-De¹⁰)).

Donc, technique la plus couramment utilisée dans les laboratoires.

SÉDIMENTATION FORMOL-ACÉTATE D'ÉTHYLE



examen des culots
de concentration



COLORATIONS PERMANENTES

OBJECTIFS

- Détecter et identifier principalement les trophozoïtes des protozoaires.
- Confirmer également l'identification des kystes de protozoaires.
- Dépister les parasites qui se concentrent moins bien.

TYPES

- Coloration de Kinyoun (acido-alcool-résistance) (Annexe 2)
- Trichrome de Wheatley (Annexe 3)
- Hématoxyline ferrique modifiée (Annexe 4)

Coloration de Kinyoun

- Détecter et différencier les oocystes de *Cryptosporidium* des levures présentes dans les selles.
- Identifier les oocystes de *Cystoisospora (Isospora) belli* ou de *Cyclospora cayetanensis*

Trichrome de Wheatley et hématoxyline ferrique modifiée

- Techniques standard de coloration des protozoaires intestinaux.
- Le trichrome de Wheatley est une technique de coloration plus rapide que l'hématoxyline ferrique modifiée.
- L'hématoxyline ferrique modifiée est préférable au trichrome de Wheatley pour les selles fixées au SAF.

Préparation du frottis (selles fixées)

- Préparer le frottis à partir du culot de lavage de la technique de sédimentation F-AcE (avant addition de formol 10 %).
- Déposer une goutte d'albumine de Mayer sur la lame avant d'ajouter la goutte de selles (albumine-glycérine 1:1).
- Étaler le spécimen de façon à retrouver alternativement des zones minces et plus épaisses.

EXAMEN MICROSCOPIQUE

- OBJECTIF 40X OU 50X (huile) - Dépistage des parasites.
- OBJECTIF 100X (huile) - Examen détaillé des parasites.

STADES DIAGNOSTIQUES RETROUVÉS PAR LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES				
TECHNIQUES	PROTOZOAIRES		HELMINTHES	
	Trophozoïtes	Kystes	Oeufs	Larves
Examen direct	X	X	X	X
Concentration		X	X	X
Colorations permanentes	X	X		

PARASITES INTestinaux - TECHNIQUES VS SPÉCIMENS			
SPÉCIMEN	TECHNIQUES		
	Examen direct (ou culot de lavage)	Concentration	Colorations permanentes
Selles formées	(X)	X	X
Selles pâteuses ou molles	(X)	X	X
Selles liquides	X		X

Selles préservées dans le SAF	(X)	X	X
Selles préservées dans le formol 10 %	(X)	X	
Selles préservées dans le PVA			X

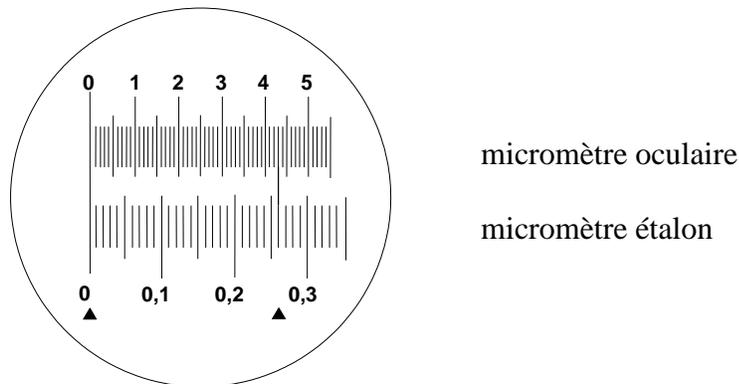
MICROSCOPIE

- Utilisation d'un micromètre oculaire pour mesurer les éléments parasitaires ou autres structures observés au microscope.
- Ajustement du microscope (éclairage de Köhler).
- Étalonnage du micromètre oculaire^{1,2,8}

Un micromètre oculaire est une échelle graduée de 0 à 50 ou 100 unités, gravée sur un disque inséré dans l'oculaire d'un microscope.

La valeur de ces unités variant selon l'objectif utilisé, le calcul de cette valeur doit être fait pour chacun des objectifs du microscope en comparant l'échelle du micromètre oculaire à l'échelle d'un micromètre étalon graduée de 0 à 2 mm avec des subdivisions de 0,1 et 0,01 mm.

Exemple : Objectif 10X



$$\begin{aligned} 43 \text{ unités} &= 0,26 \text{ mm} \\ 1 \text{ unité} &= \frac{0,26 \text{ mm}}{43} = 0,0060 \text{ mm} \end{aligned}$$

$$1 \text{ unité} = 0,0060 \text{ mm} \times 1000 = 6,0 \mu\text{m}$$

EXPRESSION DES RÉSULTATS

- Résultat « positif » :
 - Identification taxonomique (ex. genre et espèce)
 - Stade diagnostique
- Résultat « négatif » :
 - Aucun parasite observé

NOTE : Il peut parfois être difficile d'identifier avec précision les parasites observés. Dans ce cas, rapporter les organismes dans des termes plus généraux et demander un deuxième échantillon pour examen de contrôle.
Ex. présence de trophozoïtes (ou kystes) d'amibes non identifiés
ou
présence de trophozoïtes (ou kystes) d'*Entamoeba* sp. non identifiés

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ ^{1,3,7}

COMPÉTENCE DU PERSONNEL

- Maintien des connaissances théoriques et techniques
- Collection de matériel de référence

ÉQUIPEMENT

- Microscope
- Centrifugeuse

RÉACTIFS ET TECHNIQUES

- Procédés
- Date de péremption des réactifs
- Iode et réactifs des colorations permanentes
- Contrôles positif et/ou négatif (colorations permanentes)

SÉCURITÉ EN LABORATOIRE^{1,2,3,6}

ORGANISMES PRÉSENTS

- SELLES FRAÎCHES - bonne hygiène essentielle.
Sont directement infectants par ingestion :
 - kystes de protozoaires
 - certains oeufs d'helminthes : *Enterobius vermicularis*, *Hymenolepis nana*, *Taenia solium*.
La larve strongyloïde de *Strongyloides stercoralis*, si présente dans les selles, peut être infectante par pénétration cutanée.
- SELLES FIXÉES - danger minime
Les oeufs d'*Ascaris lumbricoides*, entre autres, sont très résistants et peuvent continuer leur développement dans les selles formolées. Ils peuvent donc constituer un risque dans les selles vieilles.

PRODUITS CHIMIQUES UTILISÉS

- SOLVANTS INFLAMMABLES
 - éther (explosif à cause de sa tendance à former facilement des peroxydes)
 - acétate d'éthyle
 - alcool
 - xylène
- PRÉCAUTIONS À PRENDRE pour :
 - Manipulation - À travailler idéalement dans une hotte chimique ou, à défaut, dans un endroit bien ventilé.
 - Entreposage
 - Dans un endroit frais et sombre, bien ventilé, loin de toute source d'ignition.
 - L'éther **ne doit pas** être entreposé dans un réfrigérateur.
 - Ne conserver au laboratoire que de petites quantités de solvants, dans des contenants hermétiques.
 - Éviter le contact avec des produits incompatibles tels que : oxydants forts, acides forts et bases fortes.
 - Élimination - Solvants : élimination par une compagnie spécialisée.

NOTE : Le CitriSolv, produit de substitution suggéré en remplacement du xylène⁹ et de l'éther ou de l'acétate d'éthyle¹⁰, est moins toxique et inflammable que les autres solvants mentionnés.

ANNEXE 1

SÉDIMENTATION FORMOL-ACÉTATE D'ÉTHYLE (F-AcE) ⁸

SELLES FIXÉES AU FORMOL 10 % OU AU SAF ¹⁵

1. Bien mélanger la selle formolée.
2. Selon la densité du spécimen, filtrer, à travers deux épaisseurs de gaze humide, dans un tube conique de 15 ml, une quantité suffisante de selles (environ 4-5 ml) pour obtenir, après centrifugation, le volume de sédiment désiré, soit 0,5 à 1 ml (un entonnoir à treillis peut remplacer la gaze humide pour la filtration).
3. Ajouter de la saline (pour un volume final d'environ 12 ml), bien mélanger et centrifuger à 500 g x 10 minutes.
4. Si le volume du sédiment n'est pas adéquat, décanter le surnageant et réajuster le volume du sédiment de la façon suivante :
 - en ajoutant plus de selles et en centrifugeant de nouveau
 - OU**
 - en ajoutant de la saline, en mélangeant bien, en enlevant le volume de selles superflu et en centrifugeant de nouveau.

Si le volume du sédiment est adéquat, mais le surnageant très foncé, faire un lavage supplémentaire (saline).

5. Préparer les frottis pour colorations permanentes (hématoxyline ferrique modifiée, de préférence).
6. Au sédiment restant, ajouter du formol 10 % pour un volume final de 9 ml et bien mélanger.
7. Ajouter 4 ml d'acétate d'éthyle (ou d'un substitut), boucher le tube et brasser vigoureusement en position inversée pendant 30 secondes. Si l'éther est utilisé, ne pas diriger le bouchon vers soi en brassant pour éviter les accidents. Après brassage, enlever le bouchon lentement pour libérer la pression graduellement.
8. Centrifuger à 500 g x 10 minutes.
Quatre couches différentes devraient être formées : acétate d'éthyle (ou substitut), bouchon de débris, formol et sédiment.

9. Libérer le bouchon de débris à l'aide d'un applicateur et décanter soigneusement les trois premières couches. À l'aide d'un écouvillon, bien nettoyer les parois du tube en position inclinée pour éviter que des gouttelettes de lipides ne se mêlent au sédiment et ne rendent l'examen difficile.
10. Mélanger le sédiment obtenu avec la petite quantité de liquide résiduel (ou ajouter 1-2 gouttes de saline ou de formol, si nécessaire). Si l'examen doit être reporté à plus tard, ajouter une petite quantité de formol et boucher le tube.
11. Préparer les frottis humides (ex. 1 goutte d'iode 1 % + 1 goutte de sédiment) et examiner. Une pipette Pasteur est utilisée pour prélever le sédiment à examiner.

PRÉPARATION DE LA SOLUTION D'IODE 1 % ^{1,2,8}

Iode : solution de Dobell et O'Connor (1 %).

Colorant le plus fréquemment utilisé pour la détection des kystes de protozoaires. Il permet de mieux visualiser les noyaux.

RÉACTIFS	SOLUTION D'IODE DE DOBELL ET O'CONNOR	SOLUTION D'IODE DE LUGOL
Cristaux d'iode (I ₂)	1 g	5 g
Iodure de potassium (KI)	2 g	10 g
Eau purifiée	100 ml	100 ml

Dissoudre l'iodure de potassium dans l'eau. Ajouter les cristaux d'iode et brasser la solution jusqu'à l'obtention d'une couleur rouge-brun et jusqu'à ce que la solution d'iode soit saturée. Filtrer la solution et conserver dans une bouteille ambrée.

La solution d'iode de Dobell et O'Connor peut être préparée directement ou provenir d'une solution d'iode de Lugol diluée 1:5.

La solution d'iode de Dobell et O'Connor doit être fraîchement préparée tous les 10-14 jours et la solution de Lugol toutes les 3-4 semaines.

NOTE : Pour une conservation prolongée de la solution d'iode de Lugol, ne pas filtrer la solution. La qualité de la solution mère sera maintenue jusqu'à dissolution complète des cristaux d'iode en excès. Cependant, la solution de travail (1 %) doit tout de même être éliminée après 10-14 jours⁸.

ANNEXE 2

COLORATION DE KINYOUN²

Coloration spécifique utilisée pour différencier les oocystes de *Cryptosporidium* des levures présentes dans les selles. Pour augmenter la sensibilité du dépistage, elle peut être effectuée sur le culot de lavage de la technique de sédimentation F-AcE et sur le culot de concentration.

1. Étaler le spécimen sur une lame et le laisser sécher.
2. Fixer le frottis au méthanol absolu (1 à 3 minutes selon l'épaisseur du frottis). Laisser sécher.
3. Colorer au « carbol-fuchsin » de Kinyoun x 5 minutes.
4. Laver à l'alcool éthylique 50 % et rincer immédiatement à l'eau du robinet.
5. Décolorer le frottis à l'acide sulfurique 1-2 % jusqu'à clarification du filet de liquide écoulé (maximum 2 minutes).
6. Laver le frottis à l'eau du robinet.
7. Contre-colorer au bleu de méthylène de Loeffler x 1 minute.
8. Laver à l'eau du robinet, laisser sécher et examiner au microscope.

Résultats :

Oocystes de *Cryptosporidium* (acido-résistants) : rose ou rouge brillant
Matériel fécal et levures : bleu ou pourpre

Note : cette coloration peut également être utilisée pour la démonstration des oocystes de *Cystoisospora* (*Isospora*) *belli* ou de *Cyclospora cayetanensis* dans les selles.

ANNEXE 2A

BLEU DE MÉTHYLÈNE DE LOEFFLER

Note : préparer au moins 500 ml de la solution B et éliminer le reste s'il y a lieu.

1. Ingrédients

Solution A

Bleu de méthylène 3 g
Alcool éthylique 95 % 300 ml

Solution B

Hydroxyde de potassium (KOH) 0,1 g
Eau purifiée 1000 ml

2. Préparation

Manipuler dans la hotte chimique avec des gants de caoutchouc et des lunettes de protection.

- Dissoudre complètement le bleu de méthylène dans l'alcool éthylique par agitation magnétique.
- Dissoudre la solution B (attention au dégagement de chaleur).
- Mélanger la solution A avec la solution B par agitation magnétique.

3. Apparence

Liquide, bleu foncé.

4. Format

Bouteille brune avec compte-gouttes.

5. Conservation

Conserver à la température de la pièce : produit stable (5-10 ans).

6. Utilisation

Colorant utilisé dans la coloration de *Cryptosporidium* sp.

7. Élimination

Éliminer directement si possible (<100 ml) dans la cuvette d'une hotte chimique avec beaucoup d'eau, soit 100 fois le volume du réactif.

8. Références

- Smith, J.W. and M.S. Bartlett. 1991. Diagnostic parasitology : Introduction and Methods, pp. 701-716. In A. Balows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrman, H.D. Isenberg and H.J. Shadomy (ed.) Manual of clinical microbiology. 5th ed. American Society for Microbiology. Washington.
- Hendrickson, D.A., and M.M. Krenz. 1991. Reagents and strains, pp. 1289-1314. In A. Balows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrman, H.D. Isenberg and H.J. Shadomy (ed.). Manual of clinical microbiology. 5th ed. American Society for Microbiology. Washington.
- Ash, L.R. and T.C. Orihel. 1987. Parasites : a guide to laboratory procedures and identification. ASCP Press. Chicago.

ANNEXE 3

TRICHROME DE WHEATLEY ²

Coloration rapide et facile à réaliser qui donne des résultats satisfaisants, particulièrement avec les selles fixées dans le PVA. Cependant, l'hématoxyline ferrique est préférable au trichrome de Wheatley pour les selles fixées dans le SAF (voir Annexe 4).

RÉACTIFS	DURÉE	ACTION
Alcool 70 %	1 minute	lavage, hydratation
Alcool 70 %	1 minute	lavage, hydratation
Trichrome	2-8 minutes	coloration
Alcool 90 % acidifié	immersion rapide	décoloration
Alcool 95 %	bref rinçage	arrêt de la décoloration
Alcool 95 %	rinçage	déshydratation
Alcool 100 %	1 minute	déshydratation et clarification
CitriSolv	1-3 minutes	clarification
Permout ou autre		montage permanent

Résultats :

Cytoplasme des kystes et trophozoïtes	:	bleu-vert teinté de pourpre
Chromatine nucléaire, inclusions chromidiales, globules rouges ingérés et bactéries	:	rouge ou pourpre
Matériel fécal	:	vert
Kystes de <i>E. coli</i>	:	pourpre plus foncé
Oeufs et larves (distorsion très fréquente)	:	rouge
Leucocytes, macrophages, autres cellules	:	variable (semblable aux protozoaires)
Kystes incomplètement fixés	:	rouge
Organismes dégénérés avant fixation	:	vert pâle

TRICHROME MODIFIÉ POUR MICROSPORIDIES ¹⁴

1. Faire un frottis très mince (environ 10 µl de selles), directement à partir d'un échantillon de selles fixées (formol 10 % ou SAF), étalé sur une surface d'environ 45 mm x 25 mm.
2. Fixer dans le méthanol pendant 5 minutes.
3. Colorer au trichrome modifié pendant 90 minutes (Cf. Note 1).
4. Rincer avec l'alcool acidifié pendant 10 secondes.
5. Rincer brièvement dans l'alcool 95 %.
6. Placer dans l'alcool 95 % pendant 5 minutes.
7. Placer dans l'alcool 100 % pendant 10 minutes.
8. Placer dans le CitriSolv pendant 10 minutes.
9. Monter les frottis au Permount et examiner à l'objectif 100X.

Résultats :

Microsporidies : spores ovoïdes, rosées à rouges (1-2 µm) avec zones claires à l'intérieur
Débris et bactéries : vert pâle, parfois rose

NOTES :

1. Le temps de coloration peut être diminué à 10 minutes en chauffant le colorant à 50 °C⁵.
2. Les réactifs sont éliminés après coloration, sauf le trichrome qui peut être conservé 1 mois.
3. Les frottis peuvent être colorés en jarres de Coplin lorsque peu nombreux.
Dans ce cas, lors des étapes de rinçage dans l'alcool acidifié et l'alcool 95 %, passer chaque frottis individuellement dans chacun de ces bains jusqu'au bain d'alcool 95 % (5 minutes) en laissant les frottis non décolorés en attente dans le colorant.
4. Temps de lecture des frottis recommandé : au moins 10 minutes ou 300 champs microscopiques⁸. La lecture des frottis devrait être faite par au moins deux examinateurs.
5. Une modification à la composition du colorant a été apportée par certains auteurs, modifiant ainsi la coloration de fond des frottis¹².

ANNEXE 3A

TRICHROME DE WHEATLEY1. Ingrédients

Chromotrope 2R	6,0 g
Light green SF yellowish	1,5 g
Fast green FCF	1,5 g
Acide phosphotungstique (4 °C)	7,0 g
Acide acétique glacial	10 ml
Eau purifiée	1000 ml

2. Préparation

Travailler sous la hotte avec des gants de caoutchouc, un masque et des lunettes de protection.

- Déposer tous les produits en poudre (chromotrope 2R, light green, fast green, acide phosphotungstique) dans un bécher.
- Ajouter lentement l'acide acétique glacial.
- Laisser reposer 30 minutes.
- Ajouter lentement l'eau purifiée et mélanger par agitation magnétique.

3. Apparence

Liquide, pourpre.

4. Format

Bouteille brune - BV.

5. Conservation

Conserver à la température de la pièce pendant environ 1 an (délais de péremption déterminés pour usage au LSPQ).

6. Utilisation

Colorant utilisé pour le diagnostic des parasites intestinaux.

7. Élimination

Incinérer par une firme spécialisée.

8. Référence

Balows, A. *et al.* 1991. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

ANNEXE 3B

TRICHOME MODIFIÉ POUR MICROSPORIDIES

1. Ingrédients

Chromotrope 2R	60,0 g
Fast green FCF	1,5 g
Acide phosphotungstique (4 °C)	7,0 g
Acide acétique glacial	30 ml
Eau purifiée	1000 ml

2. Préparation

Travailler sous la hotte chimique avec des gants de caoutchouc, un masque et des lunettes de protection.

- Déposer tous les produits en poudre dans un bécher.
- Ajouter lentement l'acide acétique glacial et laisser reposer 30 minutes.
- Ajouter ensuite l'eau purifiée graduellement et mélanger par agitation magnétique (s'assurer que la poudre soit décollée de la paroi du verre pour bien dissoudre).
- Filtrer sur Whatman n° 4.

3. Apparence

Liquide, bourgogne.

4. Format

Bouteille brune - BV.

5. Conservation

Conservé à la température de la pièce pendant environ 1 an (délais de péremption déterminés pour usage au LSPQ).

6. Utilisation

Colorant utilisé pour la coloration des microsporidies dans les selles.

7. Élimination

Incinérer par une firme spécialisée.

8. Référence

Weber, R. *et al.* 1992. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N. Engl. J. Med.* 326 : 161-166.

ANNEXE 3C

ALCOOL ACIDIFIÉ1. Ingrédients

Acide acétique glacial	4,5 ml
Alcool éthylique 95 %	945,5 ml
Eau purifiée	50 ml

2. Préparation

Travailler sous la hotte chimique avec des gants de caoutchouc, un tablier et des lunettes de protection.

- Mélanger l'alcool éthylique à l'eau purifiée.
- Ajouter l'acide acétique glacial et bien mélanger.

3. Apparence

Liquide, incolore, transparent.

4. Format

Erlenmeyer - BV.

5. Conservation

Conservé à la température de la pièce pendant environ 6 mois (délais de péremption déterminés pour usage au LSPQ).

6. Utilisation

L'alcool acidifié est un décolorant utilisé dans les techniques de coloration du trichrome de Wheatley et du trichrome modifié pour microsporidies.

7. Élimination

Éliminer directement si possible (<100 ml) dans la cuvette d'une hotte chimique avec beaucoup d'eau, soit 100 fois le volume du réactif.

8. Référence

Balows, A. *et al.* 1991. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

ANNEXE 4

HÉMATOXYLINE FERRIQUE MODIFIÉE ¹³

Technique standard de coloration des protozoaires intestinaux dans les selles fixées, entre autres, dans le SAF.

RÉACTIFS	DURÉE	ACTION
Alcool 70 %	5+ minutes	lavage, hydratation
Eau du robinet	10+ minutes	lavage
Hématoxyline-mordant (soln de travail 1:1)	10 minutes	coloration
Eau purifiée	30 secondes	lavage
Acide picrique (solution à <u>demi</u> saturée)	7-10 minutes	décoloration
Eau courante	10+ minutes	lavage
Alcool 70 % + NH ₄ OH	10+ minutes	déshydratation
Alcool 95 %	5-10 minutes	déshydratation
Alcool 100 %	5-10 minutes	déshydratation finale
CitriSolv	5-10 minutes	clarification
Permout ou autre		montage permanent

Résultats :

Organismes et matériel fécal : bleu gris

Structures nucléaires, inclusions chromidiales et autres inclusions : bleu nuit

HÉMATOXYLINE FERRIQUE MODIFIÉE - NOTES TECHNIQUES1. Solution de travail hématoxyline-mordant :

La solution de travail préparée peut habituellement être utilisée pendant 7 à 10 jours. Il est cependant préférable de prendre l'habitude de vérifier si la solution est encore utilisable avant chaque série de coloration :

- remplir un bécher de 100 ml d'eau du robinet
- prélever un volume de solution hématoxyline-mordant équivalent à celui contenu dans une pipette Pasteur
- l'ajouter à l'eau du robinet
- la solution est encore bonne si le filet de colorant demeure bleu (ou si la solution aqueuse se colore en bleu); on doit la remplacer si le filet de colorant devient brun (ou si la solution aqueuse devient brune)

2. Acide picrique :

La solution à demi saturée (environ 0,6 %) est préparée dans l'eau purifiée.

3. Alcools :

Alcool 70 % et 95 % : l'éthanol est habituellement utilisé.

Alcool 100 % : alcool vendu commercialement, contenant 90 % d'éthanol, 5 % de méthanol et 5 % d'isopropanol.

4. Alcool 70 % + NH₄OH :

Le volume de NH₄OH à ajouter est arbitraire. Il sert seulement à rendre encore plus alcaline la solution d'éthanol pour bleuir le frottis et accentuer les contrastes.

À titre de référence, nous avons pris l'habitude d'ajouter 1 ml de NH₄OH dans un bain de 250 ml d'éthanol 70 %.

5. Alcool 100 % et CitriSolv

L'alcool 100 % remplace le carbol-xylène de la technique originale.

Le CitriSolv remplace le xylène de la technique originale.

ANNEXE 4A

HÉMATOXYLINE MODIFIÉE 1 %

1. Ingrédients

Hématoxyline	10 g
Alcool éthylique 95 % - compléter à	1000 ml

2. Préparation

Travailler avec des gants de caoutchouc et des lunettes de protection.

- Dissoudre l'hématoxyline dans l'alcool par agitation magnétique.
- Filtrer sur Whatman no 4 avant de livrer.

3. Apparence

Liquide, orange-brun.

4. Format

Erlenmeyer - BV.

5. Conservation

Conservé à la lumière, à la température de la pièce, durant 2 semaines, avant d'utiliser. Par la suite, conservé à la température de la pièce pendant environ 18 mois (délais de péremption déterminés pour usage au LSPQ).

6. Utilisation

L'hématoxyline modifiée 1 % est utilisée pour la coloration permanente des parasites intestinaux.

7. Élimination

Éliminer directement si possible (<100 ml) dans la cuvette d'une hotte chimique avec beaucoup d'eau, soit 100 fois le volume du réactif.

8. Références

- Spencer, F.M. and L.S. Monroe. 1982. The color atlas of intestinal parasites. Charles C. Thomas. Publ., Illinois.
- Palmer, Jo. 1991. Modified iron hematoxylin/Kinyoun stain. Clin. Microbiol. Newsl. 13 : 39-40.

ANNEXE 4B

MORDANT POUR HÉMATOXYLINE1. Ingrédients

Sulfate d'ammonium ferreux ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	10 g
Sulfate d'ammonium ferrique ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	10 g
Acide chlorhydrique concentré (HCl)	10 ml
Eau purifiée	1000 ml

2. Préparation

Travailler sous la hotte chimique avec des gants de caoutchouc, un tablier, un masque et des lunettes de protection.

Dissoudre tous les ingrédients dans l'ordre indiqué par agitation magnétique.

3. Apparence

Liquide, incolore à jaune très pâle, transparent.

4. Format

Bouteille brune - BV.

5. Conservation

Conservé à la température de la pièce pendant environ 6 mois (délais de péremption déterminés pour usage au LSPQ).

6. Utilisation

Le mordant pour hématoxyline est utilisé en combinaison avec l'hématoxyline modifiée 1 % pour la coloration permanente des parasites intestinaux.

7. Élimination

Éliminer directement si possible (<100 ml) dans la cuvette d'une hotte chimique avec beaucoup d'eau, soit 100 fois le volume du réactif.

8. Référence

Spencer, F.M. and L.S. Monroe. 1982. The color atlas of intestinal parasites. Charles C. Thomas, Publ., Illinois.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ash, L.R. and Orihel, T.C. 1987. Parasites : a guide to laboratory procedures and identification. American Society of Clinical Pathologists Press, Chicago.
2. Balows, A. *et al.* 1991. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Ellis, R.J. 1981. Quality control procedures for microbiological laboratories, 3rd ed. Centers for Disease Control, Atlanta.
4. Erdman, D.D. 1981. Clinical comparison of ethyl acetate and diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J. Clin. Micr.* 14 (5) : 483-485.
5. Kokoskin, E. *et al.* 1994. Modified technique for efficient detection of Microsporidia. *J. Clin. Micr.* 32 (4) : 1074-1075.
6. Miller, B.M. *et al.* 1986. Laboratory safety : principles and practices. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Miller, J.M. and Wentworth, B.B. 1985. Methods for quality control in diagnostic microbiology. American Public Health Association, Washington, D.C.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract; Approved Guideline. NCCLS Document M28-A, Pennsylvania.
9. Neimester, R. *et al.* 1985. Modified trichrome staining technique with a xylene substitute. *J. Clin. Micr.* 22 (2): 306-307.
10. Neimester, R. *et al.* 1987. Hemo-De as substitute for ethyl acetate in formalin-ethyl acetate concentration technique. *J. Clin. Micr.* 25 (2) : 425-426.
11. Palmer, Jo. 1991. Modified iron hematoxylin/Kinyoun stain. *Clin. Microbiol. Newsl.* 13 : 39-40.
12. Ryan, N.J. *et al.* 1993. A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool and nasopharyngeal specimens. *J. Clin. Micr.* 31 (12) : 3264-3269.
13. Spencer, F.M. and Monroe, L.S. 1982. The color atlas of intestinal parasites. Charles C. Thomas Publ., Illinois.
14. Weber, R. *et al.* 1992. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N. Engl. J. Med.* 326 (3) : 161-166.
15. Yang, J. and Scholten, T. 1977. A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures. *Am. J. Clin. Pathol.* 67 (3) : 300-304.
16. Young, K.H. *et al.* 1979. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J. Clin. Micr.* 10 (6) : 852-853.

