

Protocole n° 89

Kit MIF-Color

(Réf. : 361410-0000)

Kit pour l'examen parasitologique des selles

Principe :

En coprologie parasitaire, la coloration de MIF (Mercuriothiolate, Iode, Formol) est utilisée simultanément comme une technique de conservation, de coloration et de concentration des éléments parasitaires.

Il existe deux techniques de coloration par le MIF simple et par le MIF diphasique.

La variante I utilisant la technique de coloration par le MIF simple est particulièrement recommandée pour la mise en évidence des amibes et autres protozoaires. C'est une méthode basée sur la différence de densité entre les débris gênants et les parasites : les selles sont délayées dans une solution de densité déterminée telle que les parasites plus denses se déposent spontanément – sédimentation – ou d'une façon accélérée – centrifugation – tandis que les particules alimentaires non digérées et les bactéries surnagent ou restent en suspension.

La variante II utilisant la technique de coloration par le MIF diphasique est particulièrement recommandée pour la mise en évidence des parasites les plus fragiles (trophozoïtes), des kystes et des œufs (œufs de *Schistosoma* et œufs non fécondés d'*Ascaris*). C'est une méthode physico-chimique, dite diphasique : la concentration parasitaire découle de la mise en présence de deux phases non miscibles, l'une aqueuse, l'autre lipophile. Ces deux phases permettent de réaliser un coefficient de partage dont la valeur est conditionnée, pour chaque particule fécale (parasites et déchets), par sa balance hydrophile-lipophile.

Description du kit :

Lugol Coprologie	1 x 20 mL
Mercuriothiolate-Formol (solution M.F. pour kit MIF)	2 x 125 mL

Le coffret permet de réaliser : entre 50 et 100 tests (Variante I)
environ 20 tests (Variante II)

Matériel spécifique nécessaire non fourni :

Verre à pied - Baguette de verre – Eau physiologique – Ether ou Acétate d'éthyle –
Pipettes Pasteur – Centrifugeuse avec nacelle adaptée pour tube à centrifuger

Préparation des échantillons :

Les échantillons doivent être préparés conformément aux méthodes en vigueur dans le laboratoire, en l'application de l'Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale, J.O. n°287 du 11 décembre 1999.

Mode opératoire :

Veillez lire attentivement l'intégralité des informations qui suivent avant d'utiliser le produit.

Variante I : Coloration par le MIF simple

- Dans un verre à pied, préparer extemporanément le mélange suivant en respectant l'ordre des réactifs :
 - 3 volumes de Lugol Coprologie (soit 0,15 mL ou 3 gouttes environ)
 - 47 volumes de Mercuriothiolate-Formol (solution M.F. pour kit MIF) (soit 2,35 mL ou 2 mL + 7 gouttes).
- Mélanger la solution puis ajouter un petit pois de selles (0,25 g environ) avec une baguette de verre. Triturer.
- L'observation se fait après sédimentation. Il existe 3 possibilités :
 - Sédimentation pendant 20 à 30 minutes.
 - Sédimentation de 24 heures.
 - Centrifugation 3 minutes à 1500 trs/min.
- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur dans la couche supérieure du sédiment.
- Examen du sédiment.

Variante II : Coloration par le MIF diphasique

- Dans un tube à centrifuger, préparer extemporanément le mélange suivant en respectant l'ordre des réactifs :
 - 3 volumes de Lugol Coprologie (soit 0,75 mL)
 - 47 volumes de Mercuriothiolate-Formol (solution M.F. pour kit MIF) (soit 11,75 mL).
- Ajouter 1 volume de selles (2 à 3 g environ ou 2 à 3 mL si elles sont liquides) pour 10 volumes du mélange précédent. Triturer jusqu'à homogénéisation du mélange.
- Eliminer les débris volumineux par la technique habituelle (sédimentation ou tamisage). Emulsionner la dilution.
- Recueillir le filtrat dans un tube à centrifuger.
- Ajouter un volume égal d'Ether ou d'Acétate d'éthyle.
- Centrifuger à 1600 trs/min.
- Vider le surnageant et remettre en suspension le culot de centrifugation.
- Examen du sédiment

Résultats :

Les kystes, œufs et parasites apparaissent en vert jaunâtre ou en brun plus ou moins foncé. Après quelques heures, la coloration initiale due au Lugol Coprologie est remplacée par la coloration due à l'Eosine. La membrane nucléaire devient rouge foncé à noire, la chromatine n'est pas colorée et apparaît par sa seule réfringence, le cytoplasme est rouge.

Recommandations et/ou notes d'utilisation :

Produit destiné à un usage exclusivement professionnel pour le Diagnostic in vitro. L'enlèvement et le traitement des déchets chimiques et biologiques doivent être effectués par une entreprise spécialisée et agréée.

Température de stockage : 15 - 25 °C.

L'examen des selles à l'état frais est complémentaire des méthodes de concentration et doit toujours être pratiqué sur des selles à +37°C afin d'éviter la destruction de certaines formes végétatives.

Après examen à l'état frais, les selles se conservent pendant 24 heures à +4°C.

Ne dépasser en aucun cas le temps de sédimentation. En effet, certains gros œufs de parasites pourraient sédimenter et ainsi entraîner un faux-négatif.

Dientamoeba fragilis ne se colore pas par la Variante I.

La technique de coloration par le MIF simple est recommandée dans tous les cas quelle que soit la consistance des selles au départ. Elle permet de fixer une grande quantité de selles et de conserver pendant plusieurs années un matériel de référence. En effet, la conservation des parasites colorés dans le sédiment est infinie 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.

Pour éviter l'apparition d'un fin précipité qui réduirait la coloration des parasites, il est recommandé de :

- préparer extemporanément le mélange du Lugol Coprologie et Mercuriothiolate-Formol.
- respecter l'ordre des réactifs pour réaliser le mélange (mettre d'abord le Lugol Coprologie puis le Mercuriothiolate-Formol).

Références Bibliographiques :

Bailenger J., *Coprologie parasitaire et fonctionnelle*, Imp. E. Drouillard, 3^{ème} éd., 1973, p. 87-91.

BOUREE P., *Aide-mémoire de parasitologie et de pathologie tropicale*, Flammarion, Médecine-Sciences, 2^{ème} éd., 1994, p. 280-281