

Protocole n° 101

Kit Copro-Duo

2 x 3 tests (Réf. : 362370-0000)
2 x 12 tests (Réf. : 362400-0000)
2 x 24 tests (Réf. : 362350-0000)

Kit pour l'examen parasitologique des selles par deux techniques de concentration

Principe :

Le kit Copro-Duo répond aux recommandations de la CCAM concernant la nomenclature des actes de biologie médicale et met en œuvre deux techniques de concentration dite diphasiques : la concentration parasitaire découle de la mise en présence de deux phases non miscibles, l'une aqueuse (solution M.F. ou Tampon acéto-acétique à pH=5.0 selon Bailenger) et l'autre organique (Phase organique à base d'acétate d'éthyle). Ces deux phases permettent de réaliser un coefficient de partage pour chaque particule fécale et ainsi de concentrer les éléments parasitaires dans le culot. La méthode de Concentration selon Blagg et coll. (MIF) permet également la coloration et la conservation des éléments parasitaires. Elle 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*).

Description du kit :

Lugol Coprologie	1 x 3 ou 2 x 3 mL
Mercurothiolate-Formol (solution M.F.)	1 x 50, 200 ou 400 mL
Tampon acéto-acétique à pH=5.0 selon Bailenger	1 x 50, 200 ou 400 mL
Phase organique à base d'acétate d'éthyle	1 x 50, 200 ou 400 mL
6, 24 ou 48 spatules de prélèvement en bois,	
6, 24 ou 48 tubes à sédimenter de 30 ml,	
6, 24 ou 48 tubes à centrifuger de 10 ml,	
3, 12 ou 24 portoirs à tubes (1 par analyse, usage unique)	

Le coffret permet de réaliser 3, 12 ou 24 tests par technique.

Matériel spécifique nécessaire non fourni :

Eau physiologique – Pipettes Pasteur – Centrifugeuse avec nacelle pour tube à centrifuger (10 mL, Ø 16 mm)

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.

Technique 1 : Concentration selon Blagg et coll. (MIF)

- Dans le tube à sédimenter de 30 mL, préparer extemporanément le mélange suivant en respectant l'ordre des réactifs :
 - 4 gouttes de Lugol Coprologie
 - 15 mL de Mercurothiolate-Formol (solution M.F.).
- Ajouter 2 à 3 g de selles (ou 2 à 3 mL si elles sont liquides) au mélange précédent, triturer jusqu'à homogénéisation complète et laisser sédimenter 2 minutes au maximum (ne pas dépasser ce temps de sédimentation).
- Verser 5 mL du surnageant dans le tube à centrifuger de 10 mL, y ajouter 4 à 5 mL de Phase organique à base d'acétate d'éthyle.
- Emulsionner en agitant vigoureusement le tube manuellement ou à l'aide d'un Vortex, dégazer.
- Centrifuger à 1600 tr/min (150 à 200 g) pendant 2 minutes pour concentrer les parasites dans le culot.
Si l'anneau qui s'est formé à l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique est épais, le décoller des parois à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'un ensemeur, en pratiquant deux petits trous diamétralement opposés.
- Eliminer le surnageant par retournement du tube.
- S'il reste des traces de l'anneau, nettoyer le tube avec un coton.
- Reprendre le culot dans quelques gouttes d'eau physiologique et en déposer une goutte sur une lame.
- Examiner au microscope entre lame et lamelle.

Technique 2 : Concentration selon Bailenger

- Dans le tube à sédimenter de 30 mL, délayer 3 à 4 g de selles (ou 2 à 3 mL si elles sont liquides) dans 15 mL de Tampon acéto-acétique à pH=5.0 selon Bailenger.



- Triturer jusqu'à homogénéisation complète du mélange, laisser sédimenter 2 minutes (ne pas dépasser ce temps de sédimentation).
- Verser 5 mL du surnageant dans le tube à centrifuger de 10 mL, y ajouter 4 à 5 mL de Phase organique à base d'acétate d'éthyle.
- Emulsionner en agitant vigoureusement le tube manuellement ou à l'aide d'un Vortex, dégazer.
- Centrifuger à 1600 tr/min (150 à 200 g) pendant 2 minutes pour concentrer les parasites dans le culot.

Si l'anneau qui s'est formé à l'interface entre la phase aqueuse et la phase organique est épais, le décoller des parois à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'un ensemeur, en pratiquant deux petits trous diamétralement opposés.

- Eliminer le surnageant par retournement du tube.
- S'il reste des traces de l'anneau, nettoyer le tube avec un coton.
- Reprendre le culot dans quelques gouttes d'eau physiologique et en déposer une goutte sur une lame.
- Examiner au microscope entre lame et lamelle.

Pour colorer : Mélanger extemporanément une goutte de Lugol Coprologie et 2 mL de Mercuriothiolate-Formol (solution M.F.) en respectant l'ordre des réactifs, ajouter 1 goutte de ce mélange au culot repris avant de déposer sur la lame.

Résultats :

Sans coloration : Les parasites sont observés par réfringence.

Avec coloration : 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.

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

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.

Références Bibliographiques :

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

Bourée P., *Aide mémoire de Parasitologie*, Flammarion, 2^{ème} éd., 1994, p. 282-291.