

BMDT	COPROPARA/MIF- C Réactif pour la coloration et la concentration des parasites dans les selles selon la technique du MIF par centrifugation
Notice d'utilisation	

Introduction

Classiquement la recherche des parasites dans les selles comprend :

- Un examen macroscopique
- **Un examen microscopique direct avec ou sans coloration,**
- **Un examen microscopique après concentration.**

Les méthodes utilisées pour la concentration des parasites dans les selles sont classées selon leur principe en :

- Méthodes de concentration par sédimentation ou par filtration-centrifugation. Elles utilisent un liquide de densité inférieure à celle des parasites. A la fin des techniques utilisant ce principe, les parasites sont retrouvés dans le sédiment ou dans le culot de centrifugation,
- Méthodes de concentration par flottation. Elles utilisent un liquide de densité supérieure à celle des parasites. A la fin des techniques utilisant ce principe, les parasites sont retrouvés à la surface du liquide,
- Méthodes de concentration diphasiques (ou physico-chimiques). Elles utilisent une solution aqueuse et un solvant non miscible tel que l'éther ou l'acétate d'éthyle. A la fin des techniques utilisant ce principe, les parasites sont retrouvés dans le culot de centrifugation.

Il est recommandé d'utiliser 2 techniques de concentration pour augmenter la sensibilité de la coprologie parasitaire.

Principe

COPROPARA/MIF-C est un réactif contenant du Merthiolate, de l'Iode et du Formol (MIF) et un colorant qui est l'éosine. Il est adapté :

- Pour fixer et colorer les parasites en particulier les protozoaires
- Pour concentrer les parasites (kystes, œufs, larves) présents dans les selles avec une technique de concentration diphasique utilisant comme phase aqueuse la solution du MIF et comme solvant organique l'acétate d'éthyle ou l'éther.

Le dispositif permettant la concentration des parasites comprend 2 parties :

- Un flacon prérempli avec une solution de Merthiolate Eosine Formol (MEF), dans lequel sera ajouté le lugol (iode) pour obtenir la solution de MIF.
- Un tube conique à centrifuger permettant de retenir les parasites dans le culot lors de la centrifugation.

Composition des coffrets COPROPARA/MIF-C

Le coffret COPROPARA MIF 25 tests contient :

- 25 Flacons préremplis avec $6 \pm 0,5$ mL d'une solution de Merthiolate Eosine Formol (MEF).
- 1 flacon de lugol de 3 mL.
- 1 flacon d'acétate d'éthyle 85 ± 5 mL.

- 1 flacon de coproparacolor 0.6 ml
- 25 tubes à centrifuger.
- 25 spatules en bois.
- 1 notice d'utilisation.

Matériel nécessaire non fourni

- Micropipette pour 10 à 50 µL.
- Micropipette pour 100 à 1000 µL.
- Pipettes Pasteur ou ensemeur (Oese ou anse à usage unique).
- Tubes à hémolyse avec bouchon.
- Lames et lamelles.
- Pipettes stériles ou à usage unique (1 à 20 mL).
- Agitateur type Vortex.
- Centrifugeuse avec nacelle pour tube à centrifuger.
- Eau physiologique.
- Ether en remplacement de l'acétate d'éthyle.
- Lames et lamelles pour microscope.
- Microscope.
- Container pour déchets biologiques.
- Container pour déchets chimiques.

Stockage des réactifs

- Les réactifs doivent être stockés à l'obscurité entre +15° et +30°C. Les produits sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur les flacons et le coffret avant et après ouverture.
- Ne pas laisser les réactifs sous une lumière intense.

Conservation des prélèvements de selles

Il est recommandé de traiter les selles le plus rapidement possible après leur recueil car certains stades parasitaires tels que les formes végétatives de protozoaires sont fragiles et peuvent se lyser en absence de fixateur.

Précaution d'utilisation

- Pour usage in vitro.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Respecter les instructions de la notice d'utilisation.
- Utiliser du matériel propre tel que les pointes pour micropipette, les tubes et autre matériel de laboratoire.
- Ne pas utiliser de réactifs périmés.
- En cas de versement accidentel du réactif, nettoyer le plan de travail à l'aide de papier absorbant et rincer avec de l'eau. En cas de contamination de l'environnement par les échantillons, nettoyer à l'aide d'eau de Javel et de papier absorbant.
- Eviter tout contact du réactif avec la peau, les yeux et les muqueuses.
- Ne pas ingérer.
- Les échantillons, les solutions du COPROPARA/MIF-C ainsi que le matériel et les produits contaminés, doivent être éliminés dans un conteneur pour déchets contaminés, selon les recommandations et la réglementation en vigueur.

- Porter des gants appropriés, des lunettes de protection et une blouse de protection.
- Tous les produits biologiques doivent être considérés et traités comme potentiellement infectieux.

Consignes d'hygiène et de sécurité

- Observer les techniques et précautions en vigueur en matière de protection contre les dangers microbiologiques.
- Solution MEF : Xn : Nocif. Contient du formol.
 - R 10 : Inflammable.
 - R 40 : Effet cancérigène suspecté.
 - R 43 : Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.
 - S 24 : Eviter le contact avec la peau.
 - S 37 : Porter des gants appropriés.
- Acétate d'éthyle : Xi : Irritant / F : Inflammable.
 - R 11 : Facilement inflammable.
 - R 36 : Irritant pour les yeux.
 - R 66 : L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau.
 - R 67 : L'inhalation de la vapeur peut provoquer somnolence et vertiges.
 - S 16 : Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles - Ne pas fumer.
 - S 26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.
 - S 33 : Eviter l'accumulation de charges électrostatiques.

Pour connaître les recommandations liées aux risques et les précautions relatives à certains produits chimiques contenus dans le coffret, consulter les pictogrammes figurant sur les étiquettes.

La fiche technique de sécurité est disponible sur demande.

Mode opératoire pour l'examen direct après coloration avec le COPROPARACOLOR

1. Homogénéiser les selles avec une spatule en bois.
2. Prélever une quantité de selles équivalente à la moitié d'un petit pois (500±100 mg) et déposer le prélèvement dans un tube à hémolyse contenant 2 mL d'eau physiologique ou eau distillée.
3. Triturer pour dissocier le prélèvement et agiter pour obtenir une suspension homogène (agitateur de type Vortex).
4. Déposer sur une lame avec une micropipette 2 fois 20 µL (ou 2 fois une goutte, à l'aide d'une pipette Pasteur), de la suspension de selles à examiner.
5. Ajouter à un des dépôts, avec une micropipette, 10 µL de COPROPARACOLOR.
6. Mélanger soigneusement le colorant avec la suspension de selles.
7. Recouvrir chaque dépôt avec une lamelle (22x22 ou 22x32) et observer au microscope avec une lumière blanche (filtre bleu).
8. Les parasites(œufs, larves, trophozoïtes et kystes) apparaissent colorés en jaune ou en orange ou en jaune-brun sur un fond bleu ou bleu-violet plus ou moins foncé, mais les éléments parasitaires naturellement colorés (exemple œufs d'ascaris ou de trichocéphale) gardent leur coloration ou apparaissent plus sombres.

Mode opératoire pour la concentration des parasites

1. Pour chaque selle, identifier de façon identique les 2 parties du dispositif (tube pré-rempli et tube conique à centrifuger).
2. Dans le flacon pré-rempli avec la solution MEF:
 - 2.1. Déposer 3 mL d'acétate d'éthyle.
 - 2.2. Ajouter 70 μ L de lugol.
3. Bien homogénéiser les selles avec une spatule en bois.
4. **Dans le cas de selles molles ou pâteuses :**
 - 4.1. Prélever environ 1 g de selles (quantité équivalente au volume d'un petit pois) avec la spatule en bois.
 - 4.2. Déposer le prélèvement de selles dans le flacon pré-rempli avec la solution MEF/acétate d'éthyle/lugol.
 - 4.3. Fermer le flacon et Agiter vigoureusement (30 à 45 secondes) en secouant manuellement ou agiter avec un agitateur type «vortex».
5. **Dans le cas de selles liquides ou diarrhéiques :**
 - 5.1. Prélever environ 1 mL de selles.
 - 5.2. Déposer directement le prélèvement de selles dans le flacon pré-rempli avec la solution MEF/acétate d'éthyle/lugol.
 - 5.3. Fermer le flacon et Agiter vigoureusement (30 à 45 secondes) en secouant manuellement ou agiter avec un agitateur type «vortex».
6. **Dans le cas de selles fermes ou dures :**
 - 6.1. Prélever environ 1 g de selles (quantité équivalente au volume d'un petit pois) avec la spatule en bois,
 - 6.2. Déposer directement le prélèvement de selles dans le flacon pré-rempli avec la solution MEF/acétate d'éthyle/lugol.
 - 6.3. Dissocier le prélèvement de selles avec la spatule en l'écrasant contre la paroi du flacon,
 - 6.4. Fermer le flacon et Agiter vigoureusement (30 à 45 secondes) en secouant manuellement ou agiter avec un agitateur type «vortex».
7. Déposer le contenu du flacon dans le tube de centrifugation.
8. Placer le tube de centrifugation dans une nacelle pour centrifugation, et Centrifuger 3 minutes à 1100 ± 100 g pour casser l'émulsion.
9. Prélever le tube de centrifugation puis éliminer la partie supérieure surnageant (Décanter le surnageant par retournement du tube conique ou utiliser une micropipette) jusqu'au culot.
10. En cas de gélification de la phase supérieure, décoller le pourtour du gel de la paroi du tube avec une pipette pasteur ou d'un enseigneur.
11. Remettre le culot en suspension avec 100 ± 50 μ L d'eau physiologique (NaCl 0,15 M) (si le culot est très important le remettre en suspension avec 200 ± 50 μ L).
12. Refermer le tube en cas de lecture différée du culot remis en suspension.
13. Effectuer l'examen microscopique après concentration.
 - 13.1. Déposer sur une lame une quantité connue (20 à 30 μ L) de la suspension après concentration.
 - 13.2. Recouvrir chaque préparation avec une lamelle adaptée (20x20 ou 24x24 ou 24x36) à la quantité de la suspension déposée.
 - 13.3. Observer les préparations au microscope.
 - 13.3.1. avec l'objectif 10 (grossissement de 100) pour la recherche des œufs ou des larves.

13.3.2.avec l'objectif 40 ou 50 (grossissement de 400 ou 500) pour la recherche des kystes

Interprétation des résultats

Les parasites

1.1. Les éléments parasitaires naturellement colorés gardent leur coloration (exemple œufs d'ascaris ou de trichocéphale),

1.2. Les éléments parasitaires naturellement non colorés apparaissent colorés en rose à brun. Pour les protozoaires les structures nucléaires sont brun foncé.

Avec cette technique de concentration, le culot remis en suspension contient essentiellement des œufs ou des larves ou des kystes ou des oocystes. Cette suspension étant fixée, elle peut être conservée entre +2°C et 30°C pendant au moins 7 jours pour une lecture différée ou pour un contrôle.

Pour le compte rendu des résultats, l'interprétation est effectuée par le biologiste. Elle dépend :

1. de certains éléments concernant le patient tels que : le statut immunitaire, les signes cliniques (diarrhée, prurit, douleurs abdominales, fièvre ...).
2. de l'identification du (des) parasite(s) observé(s) et de leur pathogénicité.
3. de l'intensité d'une infestation.

Performances du COPROPARA/MIF- C pour la concentration des parasites

Recherche des parasites

Des études comparatives ont été réalisées entre le COPROPARA/MIF-C et un réactif commercialisé (utilisant la technique du MIF) marqué CE aux performances reconnues.

Elles ont été effectuées avec 160 selles adressées à des LBM qui ont recherché des parasites en réalisant (I) un examen direct (état frais ou après coloration avec le MIF ou le lugol) (II) la technique de Kato (III) des techniques de concentration diphasique (Bailenger et/ou MIF concentration) ou une technique de flottation (Technique de Willis – solution saturée de chlorure de sodium). Les résultats obtenus par les LBM avec l'ensemble des techniques avaient été considérés comme le « gold standard ». Les résultats obtenus, résumés dans le tableau 1, montrent une bonne corrélation entre le réactif COPROPARA/MIF-C et le réactif marqué CE

Tableau 1 : selles positives et négatives testées pour la recherche de parasites avec COPROPARA/MIF-C et une technique diphasique d'un réactif commercialisé et marqué CE.

Prélèvements	Nombre	Résultats obtenus par les LBM ou avec le réactif de COPRAPARA/MIF-C ou avec le réactif marqué CE			
		Examens directs		Examens après concentration	
		Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs
Selles négatives	50	50	0	50	0
Selles positives (Toutes techniques confondues)	116	64	52	0	116
Kystes d' <i>Entamoeba coli</i>	24	7	17	0	24
Kystes d' <i>E. histolytica/dispar/moshkovskii</i>	7	6	1	0	7
Kystes d' <i>Endolimax nanus</i>	4	3	1	0	4
Kyste de <i>Pseudolimax butschlii</i>	3	2	1	0	3
Kystes de <i>Giardia duodenalis</i>	26	10	16	0	26
Kystes/Formes végétatives <i>Giardia duodenalis</i>	3	0	3	0	3
Kystes de <i>Chilomastix mesnili</i>	4	4	0	0	4
Oocystes de cryptosporidies	11	NA	NA	NA	NA
Oocystes de <i>Cyclospora</i>	1	0	1	0	1
Œufs d' <i>Ascaris lumbricoides</i>	5	4	1	0	5
Œufs d'ankylostomidés	8	5	3	0	8
Embryophores de <i>Taenia</i> sp	7	5	2	0	7
Œufs d' <i>Hymenolepis nana</i>	6	5	1	0	6
Œufs de <i>Schistosoma mansoni</i>	6	6	0	0	6
Œufs de <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	1	1	0	0	1

Limites du COPROPARA/MIF-C

La concentration des parasites dans les selles dépend (I) de la composition (riche ou pauvre en débris fécaux notamment les débris végétaux ou en lipides) et de la nature des selles (fermes, moulées, pâteuses diarrhéiques ou liquides) (II) des parasites à rechercher (kystes, œufs ou larves). Pour les techniques diphasiques cette concentration est fonction de la phase aqueuse notamment de son pH et du type de solvant organique utilisé (éther ou acétate d'éthyle par exemple).

Des résultats faussement négatifs peuvent être obtenus, avec COPROPARA MIF-C, pour la recherche de certains parasite. Il est donc recommandé d'utiliser deux méthodes de concentration.

Le COPRAPARA/MIF-C permet la recherche des parasites dans les selles par examen direct ou après concentration en utilisant une technique diphasique (éther ou acétate d'éthyle). Cependant pour la mise en évidence de certains parasites tels que les kystes de protozoaires, la technique de Bailenger est plus adaptée.

Bibliographie

1. Anofel. Parasitologie et mycologie médicales : guide des analyses et pratiques diagnostiques. Elsevier Masson. 2018.
2. Alum A, Rubino JR, Ijaz MK. The global war against intestinal parasites—should we use a holistic approach? Int J Infect Dis. 2010; 14:732–738
3. Amin OM. Evaluation of a new system for the fixation, concentration, and staining of intestinal parasites in fecal specimens, with critical observations on the trichrome

- stain. J Microbiol Methods. 2000; 39:127-32.
4. Bailenger J. Coprologie parasitaire et fonctionnelle. Drouillard, Editeurs, Bordeaux, 1973.
 5. Benouis A, Bekkouche Z, Benmansour Z. Etude épidémiologique des parasitoses intestinales humaines au niveau du C.H.U. d'Oran (Algérie). International Journal of Innovation and Applied Studies. 2013; 4 :613-620
 6. Bourée P. Fréquence de l'ascaridiose chez les enfants. Med Sante Trop. 2017;27:145.
 7. Bourée P, Lançon A, Resendec P. Parasitoses intestinales émergentes. Revue Francophone des Laboratoires. 2008; 399 ; 23-28
 8. Cofrac. Guide technique d'accréditation : contrôle en biologie médicale. SH GTA 06, Révision 00.
 9. Cofrac. Les contrôles de la qualité analytique en biologie médicale. Document LAB GTA 06, Révision 00 – Juillet 2005.
 10. Gotfred-Rasmussen H, Lund M, Enemark HL, Erlandsen M, Petersen E. Comparison of sensitivity and specificity of 4 methods for detection of *Giardia duodenalis* in feces: immunofluorescence and PCR are superior to microscopy of concentrated iodine-stained samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;84:187-90.
 11. Khanna V, Sagar S, Khanna R, Chawla K. A comparative study of formalin-ethyl acetate sedimentation technique and Mini Parasep(®) solvent-free method in the rapid diagnosis of intestinal parasites. Trop Parasitol. 2018; 8:29-32.
 12. Koltas IS, Akyar I, Elgun G, Kocagoz T. Feconomics®; a new and more convenient method, the routine diagnosis of intestinal parasitic infections. Parasitol Res. 2014; 113:2503-2508.
 13. Laoprom N, Laithavewat L, Kopolrat K, Kiatsopit N, Kaewkes S, Chantalux S, Mongkolsin C, Chanmaha B, Andrews RH, Petney TN, Sithithaworn P. Evaluation of a commercial stool concentrator kit compared to direct smear and formalin-ethyl acetate concentration methods for diagnosis of parasitic infection with special reference to *Opisthorchis viverrini* sensu lato in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2016; 47:890-900.
 14. Leger N, Nottenghem MJ, Pesson B. Guide de parasitologie pratique. SEDES ed. Paris 1981
 15. Manet L, Savel J. Parasitologie (Techniques usuelles de biologie clinique). Flammarion éd. Paris 1971.
 16. Manser M, Granlund M, Edwards H, Saez A, Petersen E, Evengard B, Chiodini P; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group on Clinical Parasitology. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in clinical laboratories in Europe--a comparative study. Clin Microbiol Infect. 2014;20:O65-71.
 17. Manser MM, Saez AC, Chiodini PL. Faecal Parasitology: Concentration Methodology Needs to be Better Standardised. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0004579.
 18. Methanitkorn R, Sukontason K, Sukontason KL, Piangjai S. Evaluation of the formalin-tween concentration technique for parasitic detection. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45:289-291.
 19. Neimeister R, Logan AL, Gerber B, Egleton JH, Kleger B. Hemo-De as substitute for ethyl acetate in formalin-ethyl acetate concentration technique. J Clin Microbiol. 1987; 25:425-6.
 20. Ng-Nguyen D, Stevenson MA, Traub RJ. A systematic review of taeniasis, cysticercosis and trichinellosis in Vietnam. Parasit Vectors. 2017;10:150.
 21. Perry JL, Matthews JS, Miller GR. Parasite detection efficiencies of five stool concentration systems. J Clin Microbiol. 1990;28:1094-1097.

22. Petithory JC, Ardoin-Guidon F. Vrais et faux parasites en coprologie microscopique, Bioforma, Paris 1995.
23. Petithory JC, Ardoin-Guidon F, Chaumeil C. Amibes et flagellés intestinaux, amibes oculaires leur diagnostic microscopique. Bioforma, Paris 1998.
24. Ribeiro SR, Furst C. Parasitological stool sample exam by spontaneous sedimentation method using conical tubes: effectiveness, practice, and biosafety. Rev Soc Bras Med Trop. 2012;45:399-401.
25. Rousset JJ. Copro-parasitologie pratique : intérêt et méthodologie : notion sur les parasites du tube digestif, Estem, Paris 1993.
26. Robert R. Les étapes importantes pour la réalisation d'une coprologie parasitaire, Spectra Biologie.2003; 133: 49-53.
27. Saez AC, Manser MM and Chiodini PL. Comparison between the Midi Parasep and Midi Parasep Solvent Free (SF) faecal parasite concentrators. J Clin Pathol. 2011; 64:901-904.
28. Sapero JJ, Lawless DK. The MIF stain-preservation technic for the identification of intestinal protozoa. Am J Trop Med Hyg. 1953; 2: 613-619.
29. Shetty N, Prabhu T. Evaluation of faecal preservation and staining methods in the diagnosis of acute amoebiasis and giardiasis. J Clin Pathol. 1988;41:694-699.
30. Sow D, Dieng Y, Haouchine D, Niang K, Niang T, Sylla K, Tine RC, Ndiaye M, Ndiaye JL, Faye B, Faye O, Gaye O, Dieng T, Izri A. Comparison of Para-Selles Bailenger/Kop-Color Fumouze, Para-Selles-Iodésine/Kop-Color II Fumouze diagnostic kits with conventional microscopic methods in identifying intestinal parasitic diseases in Senegal. J Parasit Dis. 2017;41:814-822.
31. Uga S, Tanaka K, Iwamoto N. Evaluation and modification of the formalin-ether sedimentation technique. Trop Biomed. 2010;27:177-184.
32. Wang LC. Improvement in the identification of intestinal parasites by a concentrated merthiolate-iodine-formaldehyde technique. J Parasitol. 1998; 84:457-8.
33. Won EJ, Kim J, Ryang DW. Evaluation of Modified Formalin-Ether Concentration Method Using Para Tube in Clinical Settings. Ann Lab Med. 2015;35:445-448.
34. Young KH, Bullock SI, Melvin DM and Spruill CI. Ethyl Acetate as a Substitute for Diethyl Ether in the Formalin-Ether Sedimentation Technique. J Clin Micro. 1979; 10: 852-853.

Sites consultés le 11/12/2017

- 1) www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en/ (Soil-transmitted helminth infections)
- 2) www.end.org/whatwedo/ntdoverview/intestinalworms (Intestinals Worms)
- 3) <https://fr.scribd.com/doc/40477266/COPROLOGIE-PARASITAIRE>

Notice version 1 (2020)