Les méthodes diphasiques de concentration parasitaire en Coprologie :

Explication de leurs divergences
par l'énoncé de leur principe.

par J. BAILINGER

En 1908, Télémann publiait une méthode de concentration des parasites contenus dans les selles. Elle avait la particularité, pour concentrer les éléments parasitaires, de faire appel ni à la sédimentation au sein d'un liquide de faible densité, ni au flottage rendu possible par l'emploi d'un réactif de poids spécifique élevé. L'auteur avait songé à éliminer les débris fécaux, non pas seulement par des procédés physiques, mais aussi par des moyens chimiques en utilisant des réactifs tels que l'acide chlorhydrique et l'éther. L'acide chlorhydrique présente de multiples inconvénients : distorsion des kystes et de certains œufs, émanation de vapeurs désagréables pour l'opérateur mais surtout néfastes au microscope. De très nombreuses variantes ont donc été apportées à la technique décrite par Télémann. L'intérêt suscité par ces méthodes s'explique par la rapidité et la facilité de leur exécution, la simplicité du matériel et des réactifs qu'elles exigent ainsi que par la possibilité de les utiliser en série.

Les idées responsables des multiples modifications mises au point ont essentiellement pour objet la suppression d'inconvénients (altération des parasites, corrosion des objectifs), des simplifications techniques ou une meilleure concentration. Mais toutes les transformations sont effectuées en partant du principe que *la concentration parasitaire est due à l'influence de la densité et à l'action dissolvante ou précipitante des réactifs*. Ce dernier facteur semble tellement essentiel que Langeron, dans son précis de microscopie (édition 1949), classe la méthode de Télémann et celles qui en dérivent dans un groupe qu'il dénomme « méthodes chimiques » et qui, selon lui, « consistent à dissoudre une partie des éléments non figurés de la masse fécale de manière à rendre visible les éléments figurés ».

Ces dernières années, une tendance nouvelle apparaît avec les travaux de Mansoer et Laarman (6), de Ritchie et coll. (8) qui démontrent l'influence du pH sur la concentration des kystes et des œufs. Mais il s'agit d'un fait que ces auteurs observent sans toutefois l'expliquer.

Cette absence d'une idée directrice guidant les améliorations susceptibles d'être apportées à la technique telle qu'elle fut décrite par Télémann tient à l'ignorance de son principe.

En 1962 (1), nous avons émis une théorie que nous avons appuyée sur des expériences reprises et multipliées dans une publication ultérieure (2) et développées dans le présent mémoire.

Le principe responsable de la concentration parasitaire réalisée par la méthode de Télémann et par celles qui en dérivent, réside dans la mise en présence de deux phases non miscibles, l'une aqueuse, l'autre étherée, qui permettent la réalisation d'un coefficient de partage dont la valeur est conditionnée, pour chaque élément fécal (débris et parasites), par sa balance hydrophile-lipophile (fig. 1). C'est dire, en d'autres termes,

FIG. 1. — *Méthodes diphasiques.* Schéma du principe basé sur l'équilibre hydrophile-lipophile des particules fécales et facteurs susceptibles d'agir sur cet équilibre.

que les éléments dont la balance hydrophile-lipophile penche en faveur des groupements hydrophiles se retrouvent dans la phase aqueuse et se déposent au fond du tube à centrifugation ; au contraire, si la balance penche en faveur des groupements lipophiles, l'élément reste au contact de la couche étherée et participe à la constitution de l'anneau qui se forme à l'interphase eau-éther.

Dans ce mémoire, nous nous proposons de justifier cette théorie *diphasique* en l'utilisant pour essayer de fournir une explication *rationnelle* aux divergences observées par différents auteurs qui évaluent comparativement diverses modifications de la méthode de Télémann.

Schématiquement, toutes les modifications décrites portent sur les trois facteurs que nous a permis d'individualiser la théorie que nous avons posée :

- pH ;
- Nature des ions ;
- Présence d'une substance superficiellement active.

Parfois, la transformation n'intéresse que l'un des facteurs ; mais le plus souvent, elle porte sur plusieurs d'entre eux ce qui nuit à l'analyse de ces méthodes.

I

Influence du pH sur la concentration parasitaire

a) Œufs

Avant de présenter les résultats obtenus par différents auteurs et de discuter l'interprétation qu'ils en donnent, il convient que nous résumions les travaux auxquels nous a conduit la *théorie diphasique* que nous avons énoncée et les résultats qu'ils nous ont fournis (1, 2).

Pour étudier l'influence du pH sur la concentration parasitaire, nous délayons, avec de l'eau distillée, les selles renfermant des éléments parasitaires. Cette dilution mère est fractionnée en huit parties égales. Chacune d'elles est ajustée, à un pH déterminé, par addition d'acide chlorhydrique ou de soude diluée. On réalise ainsi une gamme étalée de pH variés comportant les valeurs suivantes : 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 4,0 ; 6,0 ; 7,0 ; 8,0 ; et 10,0. Après avoir égalisé tous les volumes par addition d'eau distillée, on concentre ces différentes dilutions en les émulsionnant avec de l'éther. Les parasites concentrés dans les culots de centrifugation sont dénombrés.

Les graphiques II et III synthétisent l'ensemble des données fournies par cette expérimentation.

La concentration des œufs de *Trichocéphale* semble n'être que peu influencée par le pH. Par contre, on note, l'importance de ce facteur sur l'enrichissement des œufs d'*Ankylostomes*, d'*Ascaris*, de *Schistosoma mansoni* et des larves de *Strongylus*.

— Les œufs d'*Ankylostomes* (*Ancylostoma*, *Necator*) sont concentrés au maximum dans la zone de pH comprise entre 4 et 7 ainsi que pour une valeur voisine de 0,5. Par contre aucun œuf n'est trouvé à pH 2 et très peu seulement sont observés à pH 1 ;

— Les Larves de *Strongylus* possèdent un comportement voisin ;

— Les œufs d'*Ascaris* ne se concentrent bien qu'au-dessus de pH 4 et d'autant mieux que le pH est plus élevé ;

— Pour *Schistosoma mansoni*, les pH fortement alcalins sont également les plus favorables.

Ces résultats se superposent à ceux qu'obtiennent Ritchie et ses collaborateurs (8) en travaillant avec trois valeurs de pH : 4, 7 et 10 qu'ils réalisent avec le tampon citrophosphorique de Mc Ilwaine (pH 4 et 7) et le tampon chloro-boraté de Clark et Lubs (pH 10) (Voir tableau I). En se plaçant dans ces conditions, les auteurs négligent l'intervention possible de la nature des ions, mais surtout, ils ignorent les phénomènes

FIG. 2. — Méthodes diphasiques. Influence du pH sur la concentration parasitaire

qui se manifestent pour les valeurs intermédiaires du pH et donc la continuité des variations.

TABLEAU I

Pourcentage des infections diagnostiquées en fonction du pH
(d'après Ritchie et ses coll.)

pH			
Parasites	4	7	10
<i>Ascaris</i>	84 %	98 %	98 %
<i>Ankylostome</i>	98 %	94 %	41 %
<i>Trichocéphale</i>	100 %	100 %	100 %
<i>Sch. japonicum</i>	20 %	55 %	78 %

Dans les études comparatives destinées à apprécier le pouvoir de concentration de différentes méthodes à l'égard des œufs de vers, il est très difficile de dégager l'importance du pH car il n'est pas la seule variable introduite par les auteurs. Il faut aussi tenir compte de la nature des ions participant à la constitution des phases hydrophiles et hydrophobes ainsi que de la présence d'agents superficiellement actifs. Ces différents facteurs interfèrent sans qu'il soit possible de mettre en évidence, sans contestation possible, l'intervention de l'un d'eux.

Cependant, tous les auteurs s'accordent à admettre que les méthodes à l'acide chlorhydrique concentrent mieux les œufs d'*Ankylostome* que les techniques effectuant la dilution fécale avec une solution de formol. Indépendamment de la nature des solutions diluantes, ces conclusions s'expliquent par les valeurs de leur pH qui s'établissent à 0 pour l'acide chlorhydrique et aux environs de 3, selon la qualité du formol employé, pour la solution à 10 % de ce réactif (Voir graphiques 2 et 3).

Quant aux œufs de *S. mansoni* et de *S. japonicum* il est bien connu que les méthodes à l'acide chlorhydrique sont sans valeur pour leur recherche. Faust et Ingalls (3) attribuent cette déficience au fait que l'acide chlorhydrique détruirait les œufs calcifiés, immatures et dégénérés. En substituant à la solution chlorhydrique, une solution à 10 % de sulfate de sodium, Faust et Ingalls augmentent la concentration des œufs de ces vers, à partir des selles, et facilitent le diagnostic de ces bilharzioses. Pour Hunter, Ingalls et Cohen (4) l'intérêt de la solution de sulfate de sodium serait dû aux propriétés dissolvantes qu'elle posséderait à l'égard du mucus. Sans nier cette possibilité, nous constatons (fig. 2) que les variations du pH, de 0 (acide chlorhydrique) à 6,2 (sulfate de sodium de 1,8) sont favorables à la concentration des œufs de *Schistosoma*.

Ainsi que pour les œufs de *Schistosoma*, la méthode de Télémann à l'acide chlorhydrique manque d'efficacité pour la recherche des œufs d'*Ascaris*. La substitution, à

l'acide chlorhydrique, d'une solution de sulfate de sodium de même densité permet à Faust, Ingalls et Hunter un diagnostic plus facile de l'ascaridiose. Il convient de le rapporter, selon notre théorie, à la variation du pH qui monte à 6,2. Il en va de même pour toutes les modifications qui élèvent le pH, ce qui est conforme au comportement des œufs d'*Ascaris* dans un système diphasique eau-éther : leur hydrophilie varie dans le même sens que le pH (voir graphiques 2 et 3).

FIG. 3. — Méthodes diphasiques. Influence du pH sur la concentration parasitaire

La méthode originale de Télémann travaille à des pH très bas, qui, indépendamment des altérations que subissent les kystes, sont relativement favorables, exception faite des *Ascaris*. La substitution, par de Rivas, d'acide acétique à 5 % à l'acide chlorhydrique élève le pH aux environs de 3,5, c'est-à-dire au voisinage immédiat de la limite inférieure des pH favorables, de telle sorte que pour les œufs, les avantages ne ressortent pas nettement. Son intérêt majeur, outre la suppression de la manipulation d'acide chlorhydrique est l'absence de distorsions imprimées aux kystes, exception faite des kystes de *Giardia*. Ce protozoaire est d'ailleurs très mal concentré par la méthode de de Rivas. Ainsi la variante apportée par de Rivas, en supprimant les altérations des kystes, présente donc un champ d'application plus vaste que les méthodes à l'acide chlorhydrique et c'est son seul intérêt car pour les œufs et les larves, la concentration qu'elle réalise est du même ordre, sinon moindre (*Giardia* en particulier), et donc insuffisante.

Ainsi, l'influence du pH sur la concentration parasitaire qui a été indiscutablement démontrée par Ritchie et ses collaborateurs, par Mansoer et Laarman, de même que par nous, se retrouve dans les comparaisons empiriques soigneusement effectuées. *Le pH apparaît donc comme l'un des facteurs fondamentaux de la concentration des œufs de vers dans les méthodes diphasiques.*

b) Kystes.

En ce qui concerne la concentration des kystes nous avons pu montrer, en nous plaçant dans les conditions précédemment rappelées, que les pH inférieurs à 4 sont, en règle générale, défavorables à la concentration des kystes d'*Entamoeba* (*E. coli*, *E. histolytica*, *E. hartmanni*) et de *Giardia lamblia*; de sorte que 90 % seulement des sujets porteurs d'*Entamoeba* sont dépistés dans ces conditions; ce pourcentage tombe à 83 lorsqu'il s'agit de *Giardia*.

Pour Ritchie, pH 7 est le plus favorable, pH 4 fournit des résultats légèrement inférieurs et pH 10 réduit la concentration de 50 %.

Pour la détection des kystes des Protozoaires intestinaux, une étude particulièrement précise est l'œuvre de Laarman qui, avec la collaboration de Mansoer, apprécie la valeur de la technique de Schuffner telle qu'ils l'ont modifiée en 1952. Dans ce procédé, la dilution fécale est effectuée avec du liquide de Bayer double * et l'agitation réalisée avec de la benzine. Comme technique de références, Mansoer et Larman s'adressent aux méthodes de concentration suivantes :

Méthode modifiée de de Rivas : Ac. acétique 5 % — benzine ;

Méthode M.G.L. de Ritchie : formol 10 % — Ether ;

Le critère choisi pour comparer l'efficacité des différentes méthodes analysées est la numération des kystes. En se plaçant dans ces conditions, les auteurs peuvent apprécier des variations extrêmement sensibles.

S'adressant aux kystes d'*Ent. histolytica*, *Ent. coli*, *Endolimax nana* et *Giardia lamblia*, la méthode de Schuffner-Laarman est préférée par ses auteurs à celle de de Rivas à la benzine. Celle de Ritchie leur fournit les résultats les moins bons.

Poursuivant leur étude, Mansoer et Laarman notent qu'en modifiant la composition du liquide de Bayer, la concentration parasitaire varie. C'est ainsi qu'elle diminue considérablement par suppression de l'acide acétique mais reste inchangée par élimination du formol. En supprimant le formol, l'eau camphrée et en abaissant à 0,38 % la concentration en acide acétique, Mansoer et Laarman améliorent la technique de Schuffner ** et la rendent équivalentes à celle de Maldonado (Formol 10 % ; Triton NE, éther) tout au moins en ce qui concerne les kystes d'*Entamoeba histolytica* et d'*Ent. coli*.

* Liquide de Bayer double : acétate de cuivre, 0,4 g ; chlorure de cuivre, 0,4 g ; formol (sol. commerciale), 20 ml ; eau camphrée, 100 ml ; acide acétique crist., 2,4 ml ; eau distillée, 80 ml. L'eau camphrée est préparée en pulvérisant 2 g de camphre avec un peu d'alcool ; mélangez avec un litre d'eau distillée ; après macération de 48 heures, filtrez. La solution finale renferme environ 0,75 % de camphre.

** Réactif diluant (Mansoer et Laarman) : acétate de cuivre, 0,4 g ; chlorure de cuivre, 0,4 g ; acide acétique crist., 0,76 ml ; eau distillée Q.S., 200 ml.

Pour comprendre la diversité des résultats liée à la composition des réactifs de dilution, les auteurs pensent tout d'abord à incriminer le facteur densité auquel une place prépondérante est généralement attribuée pour expliquer la concentration parasitaire par les méthodes dites « à l'éther ». Or, il n'existe *aucun rapport* entre la densité du liquide de dilution et le nombre de kystes trouvés. Par contre, celui-ci semble directement lié au pH : l'optimum se situant entre 3,40 et 3,58 *.

Les auteurs sont ainsi conduits à apprécier l'influence du pH, indépendamment de toute autre variation apportée à la composition du milieu. En faisant varier le volume de l'acide acétique participant à la composition du réactif de Bayer, Mansoer et Laarman réalisent une gamme de pH s'étalant de 2,38 à 4,71. Ces réactifs, appliqués à des selles renfermant des kystes d'*Ent. histolytica* et d'*Ent. coli*, permettent une concentration optimum, pour un pH de 3,82 **.

Mansoer et Laarman expliquent l'intervention du pH par l'influence qu'il exerce sur la sédimentation des débris fécaux et des kystes. En disposant d'une gamme de pH variant de 2,2 à 6,6 réalisée par des solutions tampons citrophosphoriques de Mc Ilvaine, ils notent que la sédimentation des kystes d'*Entamoeba invadens* est facilitée par une élévation du pH. Pour Mansoer et Laarman l'acidification du pH favorise la floculation de la dilution fécale tandis qu'inversement, elle est défavorable à la sédimentation des kystes. La notion d'un pH optimum résulte de ces deux influences contraires qu'il engendre.

Mansoer et Laarman aboutissent donc à des résultats qui rejoignent les nôtres. Mais ils ne les expliquent pas. D'ailleurs l'expérience qui les y conduit est critiquable. En effet, pour démontrer l'influence du pH sur la sédimentation des kystes et des particules fécales les auteurs ont employé une phase unique représentée par des solutions tampons de concentrations variables en acide citrique et en phosphate disodique. Or, leurs densités varient de 1,009 (pH 2,2) à 1,017 (pH 6,6). Ce facteur densité suffirait à expliquer l'évolution de la sédimentation. Mansoer et Laarman n'ont pas dégagé la notion d'un équilibre hydrophile-lipophile caractéristique de chaque particule fécale et variable avec le pH. Ils ont par suite négligé l'importance de la mise en présence de deux phases non miscibles.

Il convient de souligner que le pH n'influe pas seulement sur la concentration des kystes, mais qu'il retient considérablement sur leur structure et leur réfringence. Pour les *Entamoeba*, le cytoplasme, granuleux aux pH de 0,5, 1,0 et 2,0 devient progressivement hyalin à partir de cette valeur. La réfringence s'estompe parallèlement et à partir de pH 6, le cytoplasme tend à se décoller de la paroi en se rétractant autour des noyaux. pH 4 paraît être la valeur la plus favorable pour les kystes de *Giardia* ; au-dessous, les noyaux sont visibles, mais les rudiments flagellaires apparaissent mal. Ces éléments sont le plus généralement manifestés à pH 4, ils s'estompent à partir de pH 6, tandis que les kystes deviennent hyalins et que leur réfringence s'atténue. La diminution de la réfringence des kystes, notée aux pH élevés, jointe à la surcharge qui carac-

* Le pH du liquide de Bayer est de 3,48 : la suppression de l'acétate de cuivre l'abaisse à 2,72 ; celle du formol le modifie insensiblement (3,58) et celle de l'acide acétique l'élève à 5,09.

** Ce pH de 3,82 a été retenu pour fixer la composition du réactif de Mansoer-Laarman.

térise les préparations microscopiques dans ces conditions, sont autant d'éléments défavorables au repérage des kystes au faible grossissement.

L'influence du pH semble donc être déterminante pour la concentration par les méthodes « à l'éther » des œufs et kystes présents dans les selles. Toutefois, l'intervention possible d'autres facteurs ne doit pas être exclue.

II

Influence de la nature des ions sur la concentration parasitaire

Mansoer et Laarman, au cours des travaux réalisés pour essayer d'améliorer la technique de Schuffner-Laarman, notent l'influence de la composition du réactif de dilution (liquide de Bayer), sur la concentration des kystes : indépendamment du pH, l'omission de l'un des sels de cuivre diminue la concentration.

Dans une série d'expériences, dont nous avons précédemment publié quelques éléments (1,2), nous avons étudié le problème de l'influence des ions sur la concentration parasitaire.

L'importance du pH pour la concentration parasitaire étant établie, il est indispensable de se mettre à l'abri de cette variable pour apprécier, sur ce même phénomène, l'influence de la nature des ions. Les expériences précédemment exposées nous ayant montré l'intérêt du pH 5, c'est en nous plaçant à cette valeur déterminée que nous avons fait varier les ions hydrophiles et lipophiles participant à la composition soit de la solution diluante, soit de la phase hydrophobe :

TABLEAU II. — Méthodes diphasiques

Influence de la composition des solutions diluantes, à pH 5 sur la concentration parasitaire

	Nombre de selles examinées	Nombre de cas diagnostiqués			Nombre moyen d'éléments comptés par selle		
		AA*	BS*	CP*	AA*	BS*	CP*
<i>Schistosoma mansoni</i> ..	2	2	2	2	43	12	8
Trichocéphale	11	11	11	11	30	21	30
Ankylostomes	9	9	9	9	57	31	37
Strongles	6	6	5	5	7	3	4
<i>Ascaris</i>	8	8	8	8	133	88	64
<i>Taenia</i>	1	1	1	1	8	15	15
Grande Douve	1	1	1	1	5	10	8
Petite Douve	6	6	6	6	27	13	18

(*) AA = tampon acéto-acétique ; BS = tampon boro-succinique ; CP = tampon citrophorique.

Ions hydrophiles :

La diversité des ions hydrophiles est obtenue en employant, comme solution diluante, trois sortes de tampons ajustés à pH 5,00 : Acéto-acétique, boro-succinique et citro-phosphorique.

Tampon acéto-acétique : Acétate de sodium crist. 15 g ; acide acétique 3,60 ml ; eau distillée q. s. p. 1.000 ml. Ajuster au pH-mètre à pH 5, avec de l'acide acétique.

Tampon boro-succinique (Kolthoff) : Solution de borate de soude à 19,1 p. 1.000 : 37,5 ml ; Solution d'acide succinique à 5,9 p. 1.000 : 62,5 ml.

Tampon citro-phosphorique (Mc Ilvaine) : Solution d'acide citrique à 21 p. 1.000 : 48,5 ml ; Solution de phosphate disodique, $12 \text{ H}_2\text{O}$ à 71,6 p. 1.000 : 51,5 ml.

Les résultats inscrits au tableau II montrent que, à une exception près constituée par un cas de strongylose, le diagnostic de différentes helminthoses a été posé quelle que soit la composition de la solution diluante employée. Toutefois, le nombre moyen d'éléments comptés par selle conclut en faveur du tampon acéto-acétique.

Quant aux kystes (*Giardia*, *Chilomastix*, *Entamoeba coli*, *E. hartmanni*, *Endolimax nana*), ils se concentrent sensiblement avec le même coefficient quelle que soit la solution tampon diluante. Toutefois, la structure flagellaire des *Giardia*, *Chilomastix* et les noyaux des *Entamoeba* se différencient mieux en milieu acéto-acétique.

Il convient d'ajouter aux observations précédentes qu'avec la solution boro-succinique on obtient un culot plus chargé en débris et moins facilement lisible que les autres.

Pour ces diverses raisons, notre préférence va au tampon acéto-acétique pH 5,0. Mais il est bien évident que les résultats peuvent considérablement varier en se plaçant dans des conditions différentes de pH.

Ions hydrophobes :

Tout en adoptant la solution acéto-acétique pH 5 pour délayer les selles, nous avons substitué, à l'éther, divers solvants organiques.

Un premier groupe nous a donné de très mauvais résultats en ne permettant pas la constitution d'un anneau interfacial eau-solvant organique : la sédimentation est totale ou presque. Ce fait semble dépendre de l'absence d'une miscibilité suffisante avec la phase aqueuse. Dans ce groupe, nous trouvons des solvants à noyau cyclique : benzène, toluène, xylène, ainsi, que des solvants à chaîne linéaire : oxyde de butyle et acétate de butyle. Le mélange xylène (2 volumes)-éther (8 volumes) n'améliore pas les résultats.

L'alcool butylique et plus encore l'alcool amylique donnent souvent lieu à la formation d'un culot très abondant, d'interprétation microscopique très difficile, surtout si, opérant sans un grand soin lors de la décantation, des traces de solvants, organiques glissent le long de la paroi et forment avec le culot une émulsion particulièrement gênante pour l'observation.

De plus, les kystes de Protozoaires (*Giardia*, *Entamoeba coli*) sont altérés et souvent méconnaissables à la suite du traitement par l'alcool butylique : cytoplasme décollé de la membrane et souvent très rétracté. Cet inconvénient est moins important avec l'alcool amylique.

Nous avons ainsi été amenés à limiter notre étude comparative aux systèmes à base d'éther additionné des groupements méthyl, éthyl, propyl et butyl introduits par les alcools correspondants.

Après plusieurs essais tenant compte, entre autres choses, de l'abondance du culot, la composition éther 8 volumes-alcool 2 volumes a été retenue pour chacun des alcools expérimentés. Les résultats auxquels nous sommes parvenus avec les œufs et larves sont résumés dans le tableau III. Ils ne permettent pas d'énoncer de règles générales.

Les différents groupements lipophiles étudiés ne modifient pas le nombre de cas diagnostiqués pour les porteurs d'*Ascaris*, *Ankylostome*, *Ténia* et *Trichocéphale*. Cependant, à l'exception de ce dernier, la concentration semble être influencée comme l'on peut s'en rendre compte en prenant pour critère, non pas le pourcentage de cas diagnostiqués, mais le nombre moyen d'œufs comptés dans le culot d'enrichissement. On note alors que l'hydrophilie des œufs d'*Ascaris* est accrue, de façon progressive et continue, par les ions méthyl, éthyl et propyl tandis qu'inversement l'hydrophilie des œufs d'*Ankylostome* est abaissée par le radical méthyl et plus encore par le radical éthyl.

TABLEAU III. — Méthodes diphasiques

**Influence de la nature des radicaux hydrophobes à pH = 5
sur la concentration parasitaire**

Parasites	Nombre de selles examinées	Nombre de cas diagnostiqués					Nombre moyen d'éléments comptés par cas diagnostiqués				
		E	E + M	E + e	E + P	E + B	E	E + M	E + e	E + P	E + B
<i>Schistosoma mansoni</i> *	7	3	2	4	2	2	29	38	7	33	34
<i>Ascaris</i>	11	11	11	11	11	11	82	172	214	270	229
<i>Trichocéphale</i>	11	11	11	11	11	11	36	31	35	39	41
<i>Ankylostomes</i>	12	12	12	12	12	12	64	58	40	65	63
<i>Strongles</i>	8	8	7	8	8	8	5	4	4	4	4
<i>Taenia</i>	3	3	3	3	3	3	5	8	8	16	6
Grande Douve	11	6	6	7	7	8	2	5	6	8	4
Petite Douve	7	7	7	7	5	6	85	65	65	159	118

E = éther ; M = alcool méthylique ; e = alcool éthylique ; P = alcool propylique ; B = alcool butylique.

* *S. mansoni* : le nombre moyen d'éléments est abaissé dans le système éther-alcool éthylique alors qu'il semble particulièrement favorable si l'on tient compte du nombre de cas diagnostiqués. Ceci tient au fait que l'une des observations a permis de trouver 75 œufs dans presque tous les systèmes et seulement 18 en présence d'alcool éthylique.

Parmi les autres parasites que nous avons soumis à l'expérimentation, on peut noter que la présence du radical éthyl facilite le diagnostic de la bilharziose à *S. mansoni*. Cette observation nous rapproche de celle qui conduisit Jahnes et Hodges (1947) à décrire, pour la recherche des œufs de Schistosomes, une technique de concentration par sédimentation dans une solution aqueuse à 10 % d'alcool éthylique.

A cette analyse des résultats portant sur les œufs et larves d'Helminthes, nous ajoutons que les kystes de *Chilomastix*, *Giardia* et *Entamoeba hartmanni* sont moins nombreux dans les culots obtenus en présence de l'un quelconque des quatre alcools en expérience. L'alcool butylique à la concentration de 20 % dans l'éther, a toutefois l'effet le plus défavorable. L'action néfaste des radicaux méthyl, éthyl et propyl à l'égard des kystes de *Giardia* fait poser, dans un cas sur huit, un diagnostic faussement négatif ; avec le radical butyl, l'erreur entache 4 observations sur 8. En outre, ces quatre radicaux altèrent les kystes de *Giardia*, d'*E. hartmanni* et de *Chilomastix* au point de les rendre inidentifiables.

L'addition à l'éther, d'alcool méthylique, éthylique, propylique ou butylique ne semble pas affecter la concentration des kystes d'*Entamoeba coli* dont le cytoplasme devient toutefois plus granuleux.

Les résultats auxquels nous avons abouti et que nous venons d'énoncer rejoignent ceux auxquels Ritchie a été conduit. Ayant remarqué l'efficacité de la technique de concentration de Blagg, Schloegel, Mansoer et Khalaf employant la solution M.I.F. (merthiolate, iode, formol) de Sapéro et Lawless, Ritchie et ses collaborateurs essayent de déterminer la nature des éléments importants. Ils ont ainsi l'attention attirée sur l'alcool éthylique qui entre dans la composition de la teinture de merthiolate Lilly et en étudient l'influence sur la concentration parasitaire. Pour les œufs, cette influence dépend du pH : nulle à pH 4 pour les ankylostomes, elle est défavorable à pH 7 et 10 ; elle est favorable à tous les pH pour *Ascaris lumbricoides* et *Schistosoma japonicum* ; les œufs de trichocéphale occupent une position intermédiaire avec une concentration légèrement accrue par l'alcool à pH 4 et 7 et nettement diminuée à pH 10. La concentration des kystes est légèrement inhibée par la présence d'alcool éthylique.

Ritchie et ses collaborateurs attribuent l'influence favorable de l'alcool éthylique à l'abaissement de densité qu'il provoque. Cette interprétation est identique à celle que donnent Blagg, Schloegel, Mansoer et Khalaf pour expliquer la valeur de leur technique.

Une telle hypothèse n'est pas satisfaisante. Si la densité est le seul facteur à intervenir, son abaissement, dans certaines limites tout au moins, devrait être favorable à la concentration de tous les parasites. Mais surtout, on comprend mal que l'abaissement de la densité exerce, sur un même élément parasitaire, son influence dans des sens opposés selon le pH comme c'est le cas pour les œufs d'ankylostome et de trichocéphale dans les expériences de Ritchie.

Pour nous, l'explication est tout autre. Elle est fournie par la notion de groupements hydrophiles et lipophiles. Son importance découle de faits qui peuvent être schématisés comme suit, en prenant comme exemple le cas où l'éther employé est additionné d'alcool éthylique.

I. *En l'absence d'alcool*, deux phases sont en présence. L'une est caractérisée par des groupements hydrophiles — OH — et l'autre par des groupements lipophiles — C₂, H₅. Une particule, élément parasite ou débris alimentaire, est hérissée de groupements dont les uns sont hydrophiles et les autres lipophiles. Leur importance relative est fonction, entre autres, du pH qui conditionne la dissociation électrolytique. Si les groupements hydrophiles prédominent, l'attraction a lieu vers l'éther ; si au contraire, la prédominance appartient aux groupements hydrophiles, l'attraction a lieu vers l'eau et l'élément participe à la constitution du culot de centrifugation.

II. *L'addition d'alcool* introduit des groupements hydrophiles dans l'éther et inversement des groupements lipophiles dans l'eau. A égalité de pH, les modifications créées par l'alcool se font dans un sens conditionné par la résultante qui se développe entre l'attraction exercée par les OH introduits dans la phase éthero-alcoolique et l'attraction exercée par les C₂, H₅ de la phase hydro-alcoolique. Si la résultante est dirigée vers la couche éthero-alcoolique, les parasites seront moins abondants dans le culot de centrifugation ; si au contraire, la résultante est dirigée vers la couche hydro-alcoolique, la concentration sera accrue.

III

Influence des substances superficiellement actives sur la concentration parasite

Les substances superficiellement actives, plus communément appelées « mouillants » ou « détergents », sont caractérisées par une double polarité (structure amphipatique) laquelle, par la propriété qu'elles ont de former des associations moléculaires leur permet de modifier la structure des particules, autant dire leur équilibre hydrophile-lipophile.

La liste des composés superficiellement actifs est considérable. On les classe en trois catégories : anioniques, cationiques et non ionisés. Les deux premiers groupes ont en commun la particularité de donner des ions en solution aqueuse ; l'ion actif étant soit l'anion (agent anionique), soit le cation (agent cationique).

La diversité des substances superficiellement actives, jointe à la multiplicité des particules fécales, nous permettent de concevoir la variabilité des résultats qui dépendent aussi bien de la nature du mouillant que de celle du parasite. Mais il faut aussi considérer l'influence de ces composés sur les débris et microbes fécaux dont l'hydrophilie accrue peut entraîner leur concentration, dans le culot de centrifugation, à un degré tel que l'observation des parasites en soit gênée.

On entrevoit ainsi la complexité de cette étude d'autant que l'aspect qualitatif ne doit pas faire négliger l'élément quantitatif, c'est-à-dire la concentration pour laquelle le composé superficiellement actif conduit aux meilleurs résultats.

Dans cette série expérimentale, nous avons tenu compte des conclusions auxquelles nous ont conduit les travaux précédents afin d'éliminer les variables dont ils nous ont démontré l'existence.

Les selles examinées sont homogénéisées. Quatre prélèvements sont effectués et délayés à l'aide de solutions répondant aux compositions suivantes :

- Tampon acéto-acétique de pH 5,0 ;
- Tampon acéto-acétique pH 5,0 + 1 p. 1.000 de Tinovétine N R Geigy (mouillant non ionique) ;
- Tampon acéto-acétique pH 5,0 + 1 p. 1.000 de Laurylsulfonate de sodium (mouillant anionique) ;
- Tampon acéto-acétique pH 5,0 + 1 p. 1.000 de Bradosol Ciba (mouillant cationique).

Les quatre dilutions fécales sont ensuite émulsionnées par agitation avec l'éther.

TABLEAU IV

**Influence des substances superficiellement actives
sur la concentration parasitaire**

Parasites	Nombre de selles examinées	Nombre de cas diagnostiqués				Nombre moyen d'éléments comptés par cas diagnostiqués			
		AA	0	—	+	AA	0	—	+
Strongles	8	8	8	7	0	10	10	8	0
<i>Ascaris</i>	10	10	10	10	7	30	34	42	12
<i>Taenia</i>	3	3	3	3	3	5	6	184	81
Ankylostome	10	10	9	10	9	32	14	11	17
Grande Douve	11	6	6	11	9	2	3	11	10
<i>Schistosoma mansoni</i>	4	2	2	4	2	44	10	80	41
Petite Douve	3	3	3	2	3	12	27	10	24
Trichocéphale	7	7	7	7	7	75	51	64	75

AA = acéto-acétique.

0 = non ionique (tinovétine NR 1 ‰) ; — = anionique (lauryl sulfonate de sodium 1 ‰) ; + = cationique (bradosol Ciba 1 ‰).

Les résultats qui font l'objet du tableau IV ne sont valables que pour pH = 5,0. Il est possible et même vraisemblable que dans des conditions différentes de pH l'influence des agents superficiellement actifs se fasse diversement sentir.

La lecture de ce tableau montre que la concentration parasitaire n'est pas indifférente à l'emploi des agents superficiellement actifs. Leur influence varie selon leur signe et la nature des parasites. A pH 5,0 l'effet le plus spectaculaire est observé avec les larves de Strongles dont la concentration est totalement empêchée par le bradosol (mouillant cationique). Celui-ci inhibe également la concentration des œufs d'ascaris contrairement au laurylsulfonate. Ce dernier semble particulièrement intéressant pour ce parasite, de

même d'ailleurs que pour la Grande Douve et *S. mansoni*. Les ankylostomes semblent être défavorablement influencés par les agents superficiellement actifs que nous avons employés et dans les conditions où nous nous sommes placés.

Plusieurs techniques de concentration parasitaire utilisant des réactifs renfermant des agents superficiellement actifs ont été publiées. La multiplication des variables ne permet pratiquement pas d'isoler l'influence de l'agent superficiellement actif employé. Mais il est un point sur lequel cette étude désire attirer l'attention : *l'emploi inconsidéré, non expérimentalement contrôlé, des mouillants est dangereux*. Leur choix doit être établi selon les caractéristiques des phases en présence et la nature des parasites recherchés. Favorable à la concentration d'un parasite dans des conditions déterminées, un mouillant peut-être défavorable pour un autre parasite.

Conclusions

En coprologie, la concentration parasitaire par les méthodes utilisant deux phases non miscibles, n'est pas la conséquence de l'action dissolvante des réactifs employés, selon la conception admise depuis Télémann, non plus que de la densité comme le pensent certains auteurs. *Elle résulte des forces d'attraction qu'exercent les deux phases sur les particules fécales hérissées de groupements hydrophiles et lipophiles*.

Pour un même élément (débris, parasites, microbes), les forces d'attraction dépendent, en particulier, de la dissociation électrolytique, de la nature des ions et des molécules présentes dans le milieu au sein duquel sont dispersées les particules fécales.

Il est donc possible de modifier les rapports entre les forces hydrophiles et lipophiles qui s'exercent sur les particules (débris, parasites, microbes), en faisant varier le pH, en introduisant dans le système diphasique des ions hydrophiles, lipophiles ou des substances bipolaires « superficiellement actives ».

L'expérimentation confirme la réalité du principe que nous avons énoncé ; le pH est un facteur fondamental de concentration parasitaire. Son influence varie selon les parasites. Des variations dans la composition des phases aqueuses ou organiques entraînent des perturbations favorables ou défavorables, selon la nature et le parasite considéré.

En pratique, les résultats acquis sont en faveur d'une méthode employant comme diluant une solution tampon acéto-acétique pH 5 [acétate de sodium (15 g) ; ac. acétique (3 ml 60) ; eau distillée q.s.p. 1.000 ml] et, comme solvant organique, l'éther. Ce système diphasique est intéressant dans le sens où il concentre moyennement tous les parasites fécaux. Mais on ne peut pas lui attribuer une valeur générale et le considérer comme étant capable de permettre la découverte de n'importe quel parasite avec une sécurité absolue. Il est toutefois possible d'améliorer son rendement pour un parasite donné en introduisant, dans l'une des phases, un groupement déterminé.

L'énoncé du principe des méthodes que l'on peut appeler « diphasiques » (dont la plus ancienne est celle décrite par Télémann) a des répercussions pratiques considérables en permettant des recherches rationnelles et non plus empiriques. De plus, la connaissance de ce principe et des facteurs qui en découlent permettent d'établir la cause des différences observées entre certaines méthodes.

Bibliographie

1. BAILENGER (J.), 1962. — Valeur comparée des méthodes d'enrichissement en coprologie parasitaire humaine. Etude des facteurs de concentration dans les méthodes à l'éther. *Le Pharmacien Biologiste*, 3, 249-259.
2. BAILENGER (J.), 1963. — Mécanisme et facteurs de concentration parasitaire dans les méthodes « diphasiques » en coprologie. *Ann. Biol. clin.*, 21, 805-816.
3. FAUST (E. C.) et INGALLS (J. W.), 1946. — The diagnosis schistosomiasis japonica. III) Technics for the recovery of eggs of *S. japonicum*. *Am. J. Trop. Med.*, 26, 559-584.
4. HUNTER (G. W.), INGALLS (J. W.) et COHEN (M. G.), 1946. — Comparison of methods for recovery of eggs of *S. japonicum* from feces. *Ann. J. Clin. Path.*, 16, 721-724.
5. LANGERON (M.). — *Précis de Microscopie*. Masson éd. 1949.
6. MANSOER et LAARMAN, 1959. — An effective concentration method for the detection of protozoal intestinal infections. *Trop. Geogr. Med.*, 11, 361-375.
7. RITCHIE (L. S.), 1948. — Ether sédimentation technique for routine stool examination. *Bull. U.S. army Med. Dept.*, 8, 326.
8. RITCHIE (L. S.), et Coll., 1960. — The possible effects of pH and specific gravity on the ether sedimentation procedure in concentration eggs and cysts. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.*, 9, 444-449.
9. TELEMANN (W.), 1908. — Eine Methode zur Erleichterung der Auffindung von Parasiteneiern in den Faeces. *Dtsch. Med. Woch.*, 34, 1.510.

[Laboratoire de Zoologie et Biologie animale (P^r J. BAILENGER)
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux]