



# TroCCAP

Tropical Council for Companion Animal Parasites

Procédures opérationnelles standardisées (POS) pour le diagnostic des endoparasites et ectoparasites canins et félins dans les régions tropicales.

Première édition, Mai-2023

Publié pour la première fois par TroCCAP 2023 Tous droits réservés. Cette publication est fournie à condition que toute redistribution ou reproduction d'une partie ou de la totalité du contenu sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit, électronique, mécanique, photographie, enregistrement ou autre, se fasse avec l'autorisation écrite préalable de TroCCAP ©.



## Avertissement

Les lignes directrices présentées dans cette brochure ont été élaborées par des membres du Tropical Council pour Companion Animal Parasites Ltd.

Ces lignes directrices sur les pratiques exemplaires sont fondées sur des données probantes, évaluées par des pairs et publiées dans la littérature scientifique. Les auteurs de ces lignes directrices ont déployé des efforts considérables pour s'assurer que les informations sur lesquelles elles sont fondées sont exactes et à jour.

Les circonstances individuelles doivent être prises en compte, le cas échéant, lors de l'application des recommandations contenues dans les présentes lignes directrices.

## Sponsors

Le Conseil tropical pour animaux de compagnie parasitaires Ltd. tiens à reconnaître le genre des dons de nos sponsors pour faciliter la publication de ces directives librement disponibles



## Table des matières

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES ET RECOMMANDATIONS.....	2
PROCEDURES OPERATIONNELLES STANDARDISEES (POS) POUR L'ANALYSE DES MATIERES FECALES .....	8
POS 1 : FLOTTATION FECALE SIMPLE .....	9
POS 2 : FLOTTATION FECALE PAR CENTRIFUGATION .....	13
POS 3 : TECHNIQUE DE BAERMANN .....	17
POS 4 : TECHNIQUE DE SEDIMENTATION SIMPLE .....	20
POS 5 : COLORATION ACIDO-RESISTANTE POUR LES OOCYSTES DE CRYPTOSPORIDIUM	23
POS D'ANALYSE SANGUINE.....	25
POS 6 : TEST DE KNOTT MODIFIE .....	25
POS 7 : METHODE DE MICROHEMATOCRITE POUR LA DETECTION DES MICROFILAIRES...	28
POS 8 : FROTTIS SANGUIN (Y COMPRIS FROTTIS DE SANG CAPILLAIRE DE L'EMBOUT AURICULAIRE) .....	29
POS 9 : FROTTIS DE PELAGE BUFFY .....	32
POS D'ANALYSE DE LA PEAU .....	34
POS 10 : METHODE DU RUBAN ADHESIF ET DE LA BANDE D'ACETATE .....	34
POS 11 : TRICHOGRAMME / METHODE D'EPILATION DES CHEVEUX .....	35
POS 12 : ÉGRATIGNURE DE LA PEAU POUR LES ACARIENS ET RUBAN ADHESIF .....	36
POS 13 : BIOPSIE CUTANEE .....	37
AUTRES PROCEDURES .....	38
POS 14 : EXAMEN DES ACARIENS.....	38
POS 15 : DEMODECIE PUSTULEUSE.....	40
POS 16 : SEDIMENTATION DE L'URINE.....	41
REFERENCES D'IDENTIFICATION .....	42
RÉFÉRENCES ET VIDÉOS DE MÉTHODES.....	44

## Considérations générales et recommandations

---

### Diagnostic

- Les chiens vivant dans les régions tropicales et subtropicales doivent être testés pour les parasites gastro-intestinaux au moins une fois tous les 3 mois afin de surveiller l'efficacité des régimes de contrôle des parasites et la conformité des propriétaires.
- Les chats doivent subir des tests de dépistage des endoparasites régulièrement (deux fois par an) afin de surveiller l'efficacité des régimes de contrôle et l'observance des propriétaires.
- Des signes cliniques peuvent apparaître avant l'excrétion des stades parasitaires dans les fèces, auquel cas les antécédents et les signes cliniques devraient guider les décisions de traitement.
- La flottation fécale standard ou modifiée est recommandée pour le diagnostic de la plupart des parasites internes des chats et des chiens, mais pas tous. Dans certains cas, d'autres méthodes telles que la sédimentation fécale ou des méthodes de diagnostic plus sensibles peuvent être appropriées pour des parasites spécifiques et celles-ci sont indiquées dans les lignes directrices pour les chiens et les félins (<https://www.troccap.com/canine-guidelines> et <https://www.troccap.com/feline-guidelines>).
- Les frottis sanguins d'animaux suspectés d'infections hémoparasitaires doivent être effectués à l'aide de sang capillaire frais prélevé par le bout de l'oreille ou le bord externe de la lèvre (voir la vidéo <https://www.youtube.com/shorts/8KCQ1gqX9Hk>) ou de sang veineux frais. Pour les frottis de la couche leucocytaire, on peut utiliser du sang veineux frais ou du sang recueilli dans un tube EDTA. Les frottis sanguins doivent être effectués immédiatement après le prélèvement sanguin afin de préserver au mieux la morphologie du parasite, et aussi parce que certains microbes sanguins peuvent quitter leur cellule sanguine hôte (par exemple les hémoplasmes).
- Les agents pathogènes à transmission vectorielle peuvent être détectés à l'aide de diverses méthodes de laboratoire spécifiques, dont certaines sont disponibles sous forme de tests commerciaux en clinique.
- Dans certains cas, des méthodes complémentaires (ex.: numération globulaire, analyse d'urine, radiographie et échocardiographie) doivent être effectuées pour mieux guider le traitement et la prise en charge du patient. Dans certains cas, les outils d'imagerie peuvent également être utiles pour confirmer le diagnostic ; Par exemple, l'échocardiographie peut révéler la présence de vers du cœur ou des artères droites et la tomodynamométrie peut indiquer la présence d'*Onchocerca lupi* dans l'espace rétrobulbaire.
- Les infestations par des ectoparasites relativement gros (par exemple, les tiques, les puces et les poux) peuvent généralement être observées macroscopiquement.
- Les infestations d'acariens doivent être diagnostiquées par un examen microscopique des grattages cutanés (pour *Demodex* spp., *Sarcoptes scabiei* et *Notoedres cati*), des épilations de poils ou du ruban adhésif (pour *Lynxacarus radovskyi* et *Cheyletiella* spp.) ou un examen de l'oreille à l'aide d'un otoscope (spécifiquement pour *Otodectes cynotis*).
- Aucune technique n'est sensible à 100 %, donc dans certains cas, les infections parasitaires peuvent ne pas être détectées.

## Technique de microscope optimale pour l'examen des lames

- Commencez avec le condenseur près de la platine du microscope. Pendant la numérisation, abaissez-le au besoin pour augmenter le contraste.
- Sous l'objectif 4X, utilisez le bouton de mise au point grossière pour obtenir une vue claire.
- Examinez méthodiquement les objectifs sous 10X et 40X (20X ou 60X, si disponible) en vous assurant que toute la diapositive est numérisée. Assurez-vous que la mise au point fine est constamment ajustée pendant la numérisation pour obtenir une vue nette.
- Assurez-vous que le diaphragme de l'iris est utilisé pour régler l'intensité de l'éclairage et le contraste lors du changement d'objectif.
- Certains échantillons (par exemple les frottis sanguins) doivent être examinés sous immersion dans l'huile pour une évaluation complète (lentille d'objectif 100X). Ce n'est que lorsque le balayage de l'échantillon à des puissances inférieures est terminé que l'objectif 100X doit être utilisé. Pour ce faire, une goutte d'huile doit être placée sur la lamelle/lamelle, puis déplacée dans l'objectif 100X. Il est très important d'éviter de contaminer les autres lentilles sèches (40X, 60X) avec de l'huile. Si cela se produit, la lentille d'objectif contaminée doit être délicatement essuyée avec un mouchoir en papier et, dans certains cas, une petite quantité de solvant est recommandée. Vous devez d'abord vérifier auprès du fabricant du microscope quelle est la meilleure formulation.

## Méthodes basées sur les matières fécales

- Les méthodes basées sur les matières fécales sont « un instantané dans le temps ». C'est-à-dire que les méthodes d'analyse des matières fécales ne représentent qu'un certain moment dans le temps, le temps de cette collecte fécale. Par conséquent, les agents pathogènes excrétés par intermittence ou en faible nombre peuvent être manqués. De plus, les chiens et les chats peuvent avoir des stades immatures au moment de l'analyse et commencer à excréter des œufs dans les jours suivant un résultat fécal négatif.
- L'excrétion intermittente d'oocystes/kystes/œufs/larves ou leur absence dans les fèces, même dans les cas symptomatiques, complique le diagnostic.
- L'analyse de 3 à 5 échantillons, prélevés un jour sur deux (de préférence) ou consécutifs, peut augmenter la probabilité de trouver des stades diagnostiques dans les fèces.
- Un matériau frais donne les meilleurs résultats. Si les matières fécales ne peuvent pas être examinées au moment de leur collecte, elles peuvent être conservées au réfrigérateur à 3-5°C (pas congelées !) pendant plusieurs jours.
- Les fèces doivent être examinées macroscopiquement pour détecter la présence de sang, de mucus, de proglottis et de nématodes avant l'analyse. La consistance et la couleur (qui peuvent indiquer un saignement gastro-intestinal supérieur ou inférieur) doivent également être prises en compte dans l'interprétation des résultats.

## Méthodes de flottation fécale

- La sensibilité des méthodes de flottation est déterminée par la densité (S.G.) de la solution de flottation utilisée et par l'oocyste/kyste/ovule détecté. Une différence

suffisante entre les deux est nécessaire pour que les oocystes/kystes/œufs flottent. Voir tableau 1.

- Les solutions de flottaison avec un S.G. compris entre 1,18 et 1,28 sont recommandées pour le diagnostic de la plupart des parasites internes des chats et des chiens. Voir le tableau 2.
- Certaines solutions de flottaison peuvent déformer les oocystes, les kystes, les œufs et les larves.
- Les solutions plus visqueuses nécessitent une centrifugation.
- Le choix de la solution de flottation dépend de la méthode de flottation utilisée et des parasites ciblés.
- L'utilisation de quantités pesées de matières fécales et de quantités mesurées de solution de flottation peut permettre des évaluations quantitatives.
- La récupération des stades parasitaires peut être altérée si les fèces sont congelées avant l'analyse ou conservées avec du formol (2 % de formaldéhyde)

**Tableau 1. Capacité à faire flotter certains œufs de parasites en fonction de la S.G. moyenne.**

<p><u>Flottez relativement facilement avec toutes les solutions de flottaison</u></p> <p><i>Cystoisospora</i> spp. (coccidies)  <i>Ancylostoma</i> spp. et <i>Uncinaria</i> sp. (ankylostomes)  <i>Toxocara canis</i> (ascaride ascaride)  <i>Toxocara cati</i> (ascaridé ascaridé)  <i>Toxascaris leonina</i> (ascaridé-ascaridé)</p>
<p><u>Nécessite une solution et une centrifugation à S.G. plus élevées</u></p> <p><i>Trichuris vulpis</i> (trichocéphale)  Certains œufs de trématodes, par exemple <i>Opisthorchis</i> spp., <i>Clonorchis</i> spp., <i>Haplorchis</i> spp., <i>Platynosomum</i> sp. (Douves du foie et de l'intestin grêle chez les chats) N.B. Faux négatifs fréquents ; La sédimentation peut être plus sensible  <i>Taenia</i> spp., <i>Echinococcus</i> spp., N.-B. Faux négatifs fréquents  <i>Linguatula</i> spp. (ver de la langue)</p>
<p><u>Difficile à flotter ; soit s'effondrent dans les solutions, soit trop lourds</u></p> <p><i>Physaloptera</i> spp. (ver de l'estomac) ; s'effondre  <i>Spirocerca lupi</i> (ver de l'œsophage) ; s'effondre  <i>Dipylidium caninum</i> (ténia commun) ; lourd N.B. Faux négatifs fréquents  Oeufs de trématodes, p. ex. <i>Diphylobothrium</i> spp., <i>Spirometra</i> spp., <i>Paragonimus</i> spp. , <i>Echinostoma</i> spp., <i>Alaria</i> spp.; des matières lourdes et liquides peuvent pénétrer dans l'œuf si l'opercule s'ouvre</p>

**Tableau 2. Les solutions de flottation courantes et leurs solutions S.G.**

Solution	S.G.	Formulation
Sucre de bruyère	1.27-1.3	454 g de sucre granulé dissous dans 355 mL d'eau chaude et 6 mL de formaldéhyde (37-40 % de formaldéhyde)  Remarque : 30 mL de formol à 10 % peuvent être utilisés à la place ; diminuer les 355 mL d'eau à 325 mL
Sel saturé	≈ 1,2	350 à 400 g de NaCl dans 1 L d'eau
Sulfate de magnésium	≈ 1,2	350 à 400 g de MgSO <sub>4</sub> dans 1 L d'eau ; 700 g de MgSO <sub>4</sub> en cas d'utilisation d'heptahydrate
Sulfate de zinc	≈ 1,18 à 1,2 (1,25)	330 à 390 g de ZnSO <sub>4</sub> dans 900 mL d'eau
Nitrate de sodium	≈ 1,18 à 1,2	315 à 400 g dans 700 mL d'eau

Toutes les formulations sont approximatives. Un densimètre doit être utilisé pour confirmer le S.G. Les solutions doivent être à température ambiante pour tester le S.G.

Pour un exemple de préparation et de mesure de la S.G. d'une solution de flottation, reportez-vous à : <https://youtu.be/Skx7JDUL6IE>

### La technique Baermann

- Cette méthode est destinée à la collecte et à l'identification des larves de nématodes à partir des fèces.
- La quantité de fèces utilisée a un impact sur la sensibilité de cette méthode, avec moins de fèces, ce qui entraîne une sensibilité plus faible lorsque le nombre de larves présentes est faible.
- La réfrigération des fèces avant un Baermann pourrait diminuer la récupération des larves.
- La température de l'eau et de la pièce dans laquelle le Baermann est placé peut avoir un impact sur la récupération des larves. Les températures doivent être semblables à celles que les larves rencontreraient dans l'environnement.
- L'eau utilisée dans l'appareil Baermann doit être chaude (par exemple, 42 °C ou à une température encore tolérable pour la peau).
- L'étamine est préférée à la gaze et le nombre minimal de couches doit être utilisé pour éviter que les larves ne soient piégées.

### Technique de sédimentation

- Bien que la sédimentation soit le plus souvent utilisée pour les œufs lourds de grande taille, tels que ceux des douves et des sachets d'œufs de *Dipylidium*, toutes les étapes du diagnostic coulent dans l'eau.
- Le défi de la sédimentation est la capacité de voir des objets plus petits. Par conséquent, ce n'est pas la méthode préférée pour de nombreuses étapes de diagnostic dans les fèces. Envisager d'utiliser la flottation centrifuge avec une solution avec un S.G. >1,25 ou de filtrer l'échantillon fécal homogénéisé à travers un filtre de 0,1 mm avant la sédimentation.
- La quantité de fèces utilisées et de sédiments examinés influe sur la sensibilité de la sédimentation.
- Cette méthode est également utilisée pour la collecte et l'identification des larves à partir des fèces.

### Techniques de détection des hémoparasites

- Les hémoparasites comprennent les microfilaires des nématodes et les différents stades des protozoaires, dont beaucoup sont à transmission vectorielle. Il existe également d'importantes bactéries hémotropes à transmission vectorielle telles que *Ehrlichia* et les haemoplasmas.
- En général, les méthodes qui utilisent une certaine forme de concentration sanguine (ex.: le test de Knott modifié pour les microfilaires, le frottis de la couche leucocytaire pour les agents pathogènes intraleucocytaires) et la coloration sont plus sensibles que les frottis directs.
- En plus d'examiner le sang à la recherche d'organismes, les trousse commerciales et les laboratoires de référence peuvent identifier la présence d'anticorps, d'antigènes



ou d'ADN de différents parasites. Les résultats des anticorps doivent être interprétés en tenant compte du cycle de vie, car ils peuvent indiquer une exposition au parasite et non sa présence. Les anticorps dirigés contre les agents pathogènes peuvent être conservés jusqu'à un an après la guérison. Consultez les directives pour les chiens/chats pour plus d'informations sur leur utilisation pour le diagnostic.

### **Techniques de diagnostic des ectoparasites**

- Lors de la détermination de l'emplacement de l'examen et du prélèvement de l'échantillon (épilation, ruban adhésif), le site de prédilection du parasite doit être pris en compte.
- Chez les chiens et les chats à poil de sous-poil ou à pelage long, il est important de séparer les poils pour trouver des parasites sur les bouts des oreilles et la peau.

## Procédures opérationnelles standardisées (POS) pour l'analyse des matières fécales

---

### Collecte et stockage des matières fécales

Une bonne analyse des matières fécales commence par la méthode de collecte des matières fécales. Les matières fécales doivent être collectées immédiatement après la défécation (au sol ou dans un bac à litière), conservées entre 3 et 5 °C avant l'analyse (sauf si un test de Baermann est effectué) et analysées dans les 5 jours suivant la collecte. Le ramassage immédiatement après la défécation permet de s'assurer que le chien ou le chat source est dégagé et réduit le risque de contamination par les nématodes du sol. Le prélèvement rectal est possible, mais la plus grande quantité généralement obtenue à partir de fèces vidées peut augmenter le nombre d'essais réalisables et assurer une quantité adéquate pour la flottation, la sédimentation et/ou un Baermann.

Les excréments doivent être placés dans un récipient propre, étiqueté avec l'identification de l'animal et la date de collecte.

Les clients doivent être priés d'apporter les matières fécales recueillies dès que possible à la clinique pour analyse. Après le prélèvement et pendant le transport vers la clinique, les matières fécales doivent être conservées dans un environnement frais. Une fois à la clinique, la réfrigération jusqu'à l'analyse ralentira le développement des parasites, ce qui facilitera l'identification.

Bien que de nombreux parasites ne soient pas infectieux dans les matières fécales fraîches, dans les zones géographiques où se trouvent *les espèces du genre Echinococcus*, des précautions supplémentaires doivent être prises lors de la collecte et de l'analyse.

### Tours par minute (tr/min) par rapport à la force g

Pour de nombreuses centrifugeuses, un tableau est disponible pour déterminer la force g (ou force centrifuge relative) obtenue en fonction du régime (tours par minute). Toutefois, si cette option n'est pas disponible, elle peut être calculée comme suit :

$$\text{Force g} = 1,12 \times \text{Rayon du rotor en mm} \times (\text{tr/min}/1000)^2$$

Il est également possible d'utiliser des calculatrices en ligne (ex.: [http://insilico.ehu.es/mini\\_tools/rcf\\_rpm.php](http://insilico.ehu.es/mini_tools/rcf_rpm.php)).

### S.G. (densité spécifique)

S.G. est le poids par unité de volume par rapport à l'eau et peut être déterminé par le poids d'une solution ou via un densimètre. Les densimètres doivent être utilisés à température ambiante.

Si vous utilisez un poids, une solution de 1 L qui pèse 1,2 kg a un S.G. de 1,2.

Si vous utilisez un densimètre, assurez-vous que la plage est adaptée à la solution. Les plages typiques des densimètres sont de >1,0 à 1,22 et de 1,2 à 1,4.

Pour un exemple de préparation et de mesure de la S.G. d'une solution de flottation, reportez-vous à : <https://youtu.be/Skx7JDUL6IE>

## POS 1 : Flottation fécale simple

La flottation fécale simple convient à la récupération et à l'identification de la plupart des œufs de nématodes, de certains œufs de ténia, du ver de la langue (*Linguatula serrata*) et des kystes et oocystes de protozoaires dans les excréments canins et félins. La méthode est rapide, peu coûteuse et ne nécessite pas l'utilisation d'une centrifugeuse. Cependant, il n'inclut pas d'étape de concentration et les solutions de flottation visqueuses avec une glycémie élevée ne peuvent pas être utilisées, ce qui diminue la sensibilité lorsqu'il y a peu d'œufs/kystes dans les fèces et pour certains parasites avec des œufs légèrement plus élevés (par exemple, *Trichuris*).

### Réactifs/Matériaux

- Solution de flottation (ex.: sel saturé ou nitrate de sodium)
- Glissière et lamelle
- Gobelet à large ouverture (ex.: gobelet de collecte d'urine réutilisable/lavable ou gobelet jetable en plastique/papier)
- Tube à essai jetable de 10 à 15 ml ou pot en verre réutilisable à col étroit de 10 à 15 ml
- Passoire à thé, gaze ou étamine
- Bâtonnet à mélanger (ex.: abaisse-langue)

### Préparation des solutions de flottation de S.G. 1.20

- Nitrate de sodium:  
Dissoudre de 315 à 400 g de nitrate de sodium dans environ 700 mL d'eau distillée réchauffée (dH<sub>2</sub>O). Ajouter plus de dH<sub>2</sub>O jusqu'à ce que la solution entière pèse 1200 g (cela équivaut à un S.G. de 1,20). Mélanger la solution, puis vérifier la S.G. avec un densimètre.
- Sel saturé  
Dissoudre le sel de table (NaCl, ~300 à 400 g) dans 1000 mL de dH<sub>2</sub>O réchauffé en remuant continuellement. Ajouter le sel jusqu'à ce qu'il n'y en ait plus (c'est-à-dire que le sel reste précipité hors de la solution une fois refroidi). Vérifier S.G. avec l'hydromètre.

### Procédure

1. À l'aide du bâtonnet, placez ~2 g de matières fécales dans un gobelet à large ouverture (gobelet jetable en plastique/gobelet réutilisable lavable (par exemple, gobelet à urine)/pot d'urine stérile)
2. Ajouter ~4 ml de solution de flottation dans la tasse et bien mélanger avec les matières fécales à l'aide du bâtonnet
3. Ajouter une solution de flottation supplémentaire de ~4 ml dans la tasse et mélanger à nouveau
4. Versez/filtrez cette suspension fécale à travers une passoire à thé/gaze/étamine dans une nouvelle tasse
5. Videz le contenu de la tasse dans une éprouvette de 10 à 15 ml supportée dans un support ou un support ou dans un bocal en verre de 10 à 15 ml à col étroit
6. Continuez à ajouter du contenu ou complétez avec une solution de flottation jusqu'à ce qu'un ménisque positif se forme sur le rebord du tube à essai/bocal. Le dernier mL

de solution de flottation peut être versé à l'aide d'un compte-gouttes pour s'assurer que le ménisque est soigneusement formé

7. Placez délicatement une lamelle (environ 22 x 22 mm) sur le tube à essai
8. Laisser reposer 10 à 15 min
9. Soulevez délicatement la lamelle du tube, avec la goutte de liquide collée au fond de celle-ci, et placez-la sur une lame de microscope
10. Examiner au microscope optique à faible puissance (objectif 10X ; grossissement 100X) pour les étages helminthes et à haute puissance (objectif 40X ; grossissement 400X) pour les stades protozoaires.

Pour obtenir un autre guide étape par étape avec des images utiles de cette procédure, reportez-vous à :  
[http://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/Flotation/Simple\\_flotation/Purpose.htm](http://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/Flotation/Simple_flotation/Purpose.htm)

### Précautions de sécurité

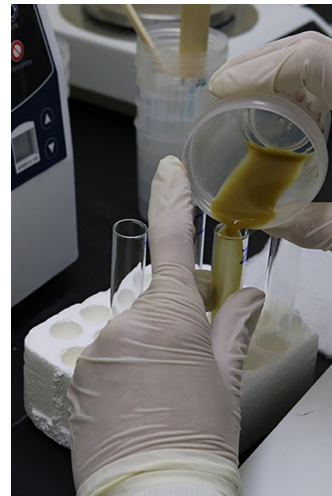
Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables  
 Lavez-vous soigneusement les mains lorsque vous avez terminé.

### Procédures de nettoyage

Versez le nitrate de sodium dans le récipient à déchets chimiques approprié.  
 Jetez toutes les lames, les lamelles de recouvrement et les tubes à essai jetables dans un récipient pour objets tranchants et tranchants.  
 Nettoyez soigneusement tout l'équipement (passoire à thé, gobelets réutilisables) avec une solution d'eau de Javel à 10 %  
 Essayez la zone de travail avec de l'éthanol à 70 %



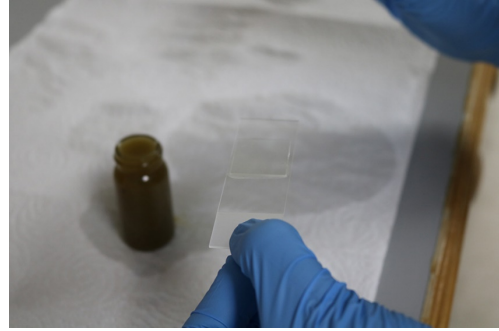
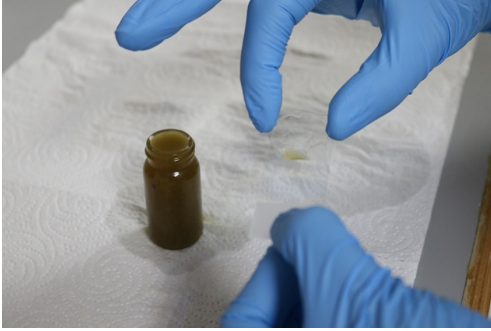
Placez environ 2 g de matières fécales dans un gobelet à large ouverture. Ajouter environ 4 mL de solution de flottation. Mélanger. Ajouter environ 4 mL de solution de flottation et mélanger.



Filtrez la solution à travers une gaze, une étamine ou une passoire à thé dans une tasse propre.



Versez la solution filtrée dans un tube à essai ou un bocal en verre à col étroit de 10 à 15 ml. Ajouter une solution de flottation supplémentaire jusqu'à ce qu'un ménisque positif se soit formé. Placer la lamelle sur le bocal.



Au bout de 10 à 15 minutes, retirez la lamelle et placez-la sur une lame.

## POS 2 : Flottation fécale par centrifugation

La procédure de flottation centrifuge au sulfate de zinc [S.G. 1.18] convient à l'isolement et à l'identification des kystes et oocystes de protozoaires dans les fèces, en particulier les kystes de *Giardia duodenalis*. La flottation centrifuge du sucre de Heather [S.G. 1.27] est plus sensible pour l'isolement d'œufs de nématodes plus lourds tels que ceux de *Trichuris vulpis* et de *Spirocerca lupi* et du trématode *Platynosomum*. La flottation centrifuge est peu coûteuse ; Cependant, il nécessite l'utilisation d'une centrifugeuse.

### Réactifs/Matériaux

- Solution de flottation (ex.; solution de sulfate de zinc ou solution de sucre de Sheather)
- L'iode de Lugol
- Glissière et lamelle
- Gobelet ou bocal à large ouverture (ex.; gobelet de collecte d'urine réutilisable/lavable ou gobelet jetable en plastique/papier)
- Tube à essai jetable ou réutilisable de 10 à 15 ml
- Passoire à thé, gaze ou étamine
- Bâtonnet à mélanger (ex.; abaisse-langue)
- Centrifugeuse pour tubes de 10 à 15 ml; Un godet à rotation complète préféré

### Préparation des solutions de flottation

- Solution de sulfate de zinc (S.G. 1.18)  
Dissoudre 331 g de sulfate de zinc dans 900 mL d'eau distillée réchauffée (dH<sub>2</sub>O). Ajouter plus de dH<sub>2</sub>O jusqu'à ce que la solution entière pèse 1180 g (cela équivaut à un S.G. de 1,18). Mélanger la solution, puis vérifier la S.G. avec un densimètre. Remarque: si du sulfate de zinc heptahydraté est utilisé, des quantités supplémentaires seront nécessaires (par exemple, environ 750 g)
- Sucre de bruyère (S.G. 1.27)  
À 355 ml d'eau chaude, ajouter (en remuant) 454 g de sucre. Ajouter 6 mL de formol à 10 % (10 mL de formaldéhyde à 40 % dans 90 mL d'eau distillée) par 454 g de sucre pour éviter toute contamination fongique. Ajustez pour vous assurer que le S.G. est de 1,27 à l'aide d'un densimètre

### Procédure

1. À l'aide du bâtonnet, placez ~2 g de matières fécales dans une tasse/un bocal à large ouverture
2. Ajouter ~4 ml de solution de flottation dans la tasse/le bocal et bien mélanger avec les matières fécales à l'aide du bâtonnet.
3. Ajouter 4 mL de solution de flottation supplémentaire dans la tasse/le bocal et mélanger à nouveau
4. Versez/filtrez cette suspension fécale à travers une passoire à thé, une gaze ou une étamine dans une nouvelle tasse/bocal
5. Videz le contenu de la tasse ou du bocal dans un tube à essai de 10 à 15 ml supporté par une grille ou un support
6. Centrifuger à 500 g pendant 5 min

7. Ajouter délicatement plus de solution de flottation jusqu'à ce qu'un ménisque positif se forme au sommet du tube à essai et placer une lamelle (environ 22 x 22 mm) sur le dessus
8. Laisser reposer encore 5 à 10 min.
9. Soulevez délicatement la lamelle du tube avec la goutte de liquide collée au fond de celui-ci et placez-la sur une lame de microscope. L'ajout d'une goutte d'iode de Lugol à la lame avant d'y placer la lamelle peut rendre les *kystes de Giardia* plus faciles à voir
10. Examiner au microscope optique à faible puissance (objectif 10X; grossissement 100X) pour les étages helminthes et à haute puissance (objectif 40X; grossissement 400X) pour les stades protozoaires

### Procédure avec centrifugeuse à rotation complète

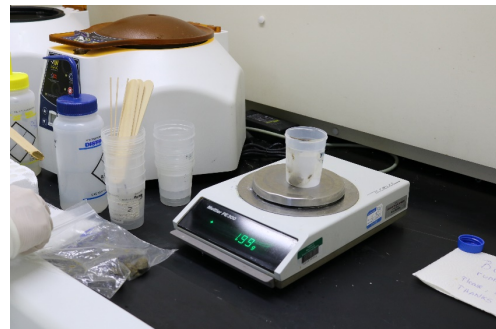
1. Suivez les étapes 1 à 5 ci-dessus
2. Ajouter délicatement plus de solution de flottation jusqu'à ce qu'un ménisque positif se forme au sommet du tube à essai et placer une lamelle (environ 22 x 22 mm) sur le dessus
3. Centrifugeuse à 500 g pendant 10 min
4. Suivez les étapes 9 et 10 ci-dessus

### Précautions de sécurité

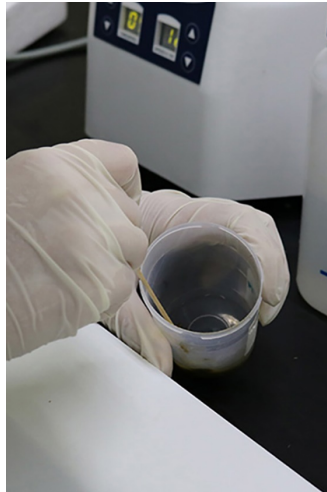
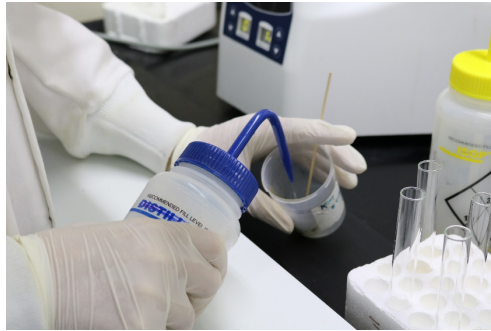
Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables  
Lavez-vous soigneusement les mains lorsque vous avez terminé.

### Procédures de nettoyage

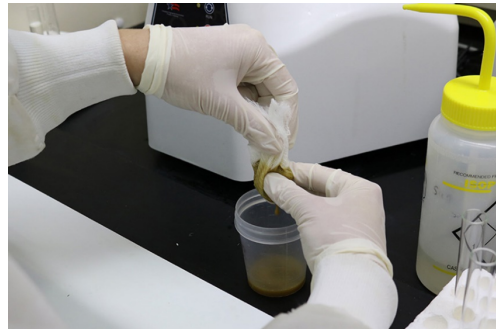
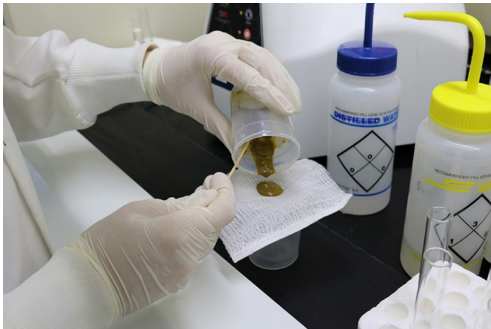
Verser le sulfate de zinc dans le conteneur à déchets chimiques approprié  
Jetez toutes les lames et les lamelles de recouvrement dans un contenant pour objets tranchants  
Nettoyez soigneusement tout l'équipement (passoire à thé, tubes à essai en verre) avec une solution d'eau de Javel à 10 %  
Essuyez la zone de travail avec de l'éthanol à 70 %.



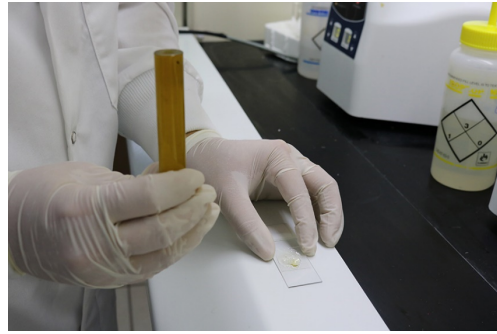
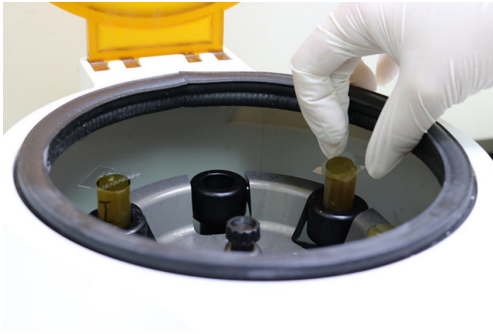




Pesez environ 2 g de matières fécales dans un gobelet propre. Mélanger les fèces avec la solution de flottation.



Verser la solution à travers une étamine/gaze/passoire à thé ; presser doucement pour recueillir la solution. Verser la solution dans le tube à essai.



Placez le tube dans la centrifugeuse et faites-le tourner pendant 5 min à 500 g.

Avec une centrifugeuse à godet pivotant, les tubes peuvent être tournés avec la lamelle. Pour toutes les autres centrifugeuses, après centrifugation, remplir de solution de flottation jusqu'à ce qu'il y ait un ménisque positif, puis placer sur la lamelle ; Laisser reposer pendant 5 à 10 minutes.

Retirez la lamelle et placez-la sur une lame. Examinez à un grossissement de 100X.

## POS 3 : Technique de Baermann

La technique Baermann est adaptée à l'isolement et à l'identification des larves de nématodes (par exemple *Strongyloides stercoralis* et les vers pulmonaires) dans les fèces fraîches.

### Réactifs/Matériaux

- Eau distillée (d'H<sub>2</sub>O)
- Entonnoir en plastique ou en verre, tube en caoutchouc et pince OU tube à centrifuger de 50 mL
- Passoire à thé et gaze ou étamine
- Cure-dent, élastique ou ficelle

### Mise en place de l'équipement

Fixez un entonnoir à un support ; Connectez un tube en caoutchouc avec une pince à la tige de l'entonnoir.

### Procédure

1. Placez 3 à 5 g de matières fécales au centre d'un grand carré d'étamine ou de gaze et attachez-les avec un élastique, une ficelle ou un cure-dent pour former une pochette
2. Placez le sachet dans une passoire à thé et suspendez-le dans l'entonnoir. Si vous utilisez un tube à centrifuger de 50 ml, suspendez le sachet directement dans le tube sans passoire à thé
3. Ajouter du d'H<sub>2</sub>O chaud dans l'entonnoir jusqu'à ce que l'eau recouvre le haut de la poche fécale ou ajouter de l'eau dans le tube de 50 ml jusqu'à ce que les selles soient recouvertes.
4. Laisser reposer 12 à 24 h ou toute la nuit pour les larves de ver pulmonaire ou 6 heures pour *Strongyloides stercoralis*
5. Si vous utilisez un entonnoir, ouvrez le bouchon sur le tube en caoutchouc et collectez 2 ml de sédiments filtrés dans un tube à essai. Si vous utilisez un tube à centrifuger de 50 ml, passez à l'étape 7
6. Laisser reposer l'éprouvette pendant 30 min ou centrifuger à 500 à 1000 g pendant 2 min
7. Retirer délicatement le surnageant à l'aide d'une pipette, en laissant ~0,5 mL de sédiment intact
8. Prélevez 1 à 2 gouttes du sédiment et placez-les sur une lame de microscope munie d'une lamelle. Répétez l'opération au besoin
9. Examiner au microscope optique à faible puissance (objectif 10X ; grossissement 100X) pour détecter les larves et à haute puissance (objectif 40X ; grossissement 400X) pour confirmer la présence d'un primordium génital et d'un œsophage et d'une forme de queue

### Précautions de sécurité

Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables  
Lavez-vous soigneusement les mains lorsque vous avez terminé.

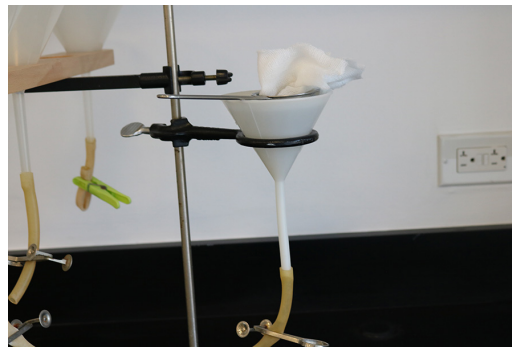
### Procédures de nettoyage

Jetez toutes les lames et les lamelles de recouvrement dans un contenant pour objets tranchants

Nettoyez soigneusement tout l'équipement (passoire à thé, entonnoir, tubes à essai en verre) avec une solution d'eau de Javel à 10 %

Essuyez la zone de travail avec de l'éthanol à 70 %

Méthode de l'appareil Baermann (entonnoir avec tube et pince)



Peser 3 à 5 g de matières fécales et les placer sur une étamine/gaze. Placez-les dans une passoire à thé, puis dans l'entonnoir. Remplissez d'eau. Après avoir passé la nuit, ouvrez la pince et collectez 2 ml de sédiments.

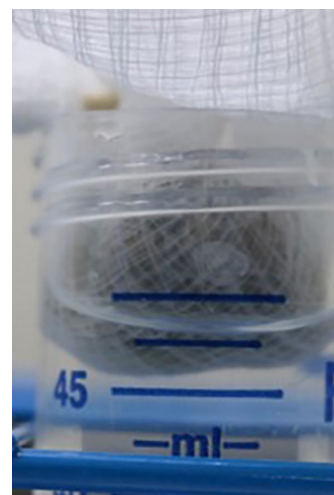
Méthode du tube à centrifuger (50 ml).



Étape 1.



Étape 2.



Étape 3.

Étape 1 : Placez les matières fécales au centre de la gaze ou de l'étamine.

Étape 2 : Suspendre dans un tube de 50 ml avec de l'eau tiède ; Ajouter de l'eau jusqu'à ce que les matières fécales soient recouvertes. Il faut plus d'eau.

Étape 3 : Après avoir laissé reposer pendant 6 à 24 h (selon le parasite), retirez les sédiments pour analyse.

## POS 4 : Technique de sédimentation simple

La technique de sédimentation fécale est adaptée à l'isolement et à l'identification d'œufs plus lourds, en particulier ceux des douves (par exemple *Alaria* spp., *Paragonimus* spp., etc.) et de certains ténias (par exemple *Spirometra* spp., *Diphyllobothrium latum*). La méthode est rapide, peu coûteuse et ne nécessite pas l'utilisation d'une centrifugeuse.

### Réactifs/Matériaux

- Eau distillée (d'H<sub>2</sub>O)
- Solution aqueuse de bleu de méthylène à 5 %
- Passoire à thé ou tamis (ouverture d'environ 0,1 mm)
- Gobelet/bocal en plastique
- Tube conique de 50 ml

### Procédure

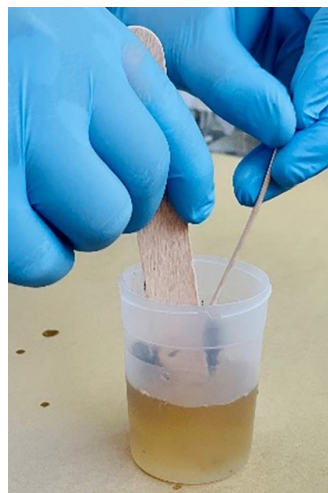
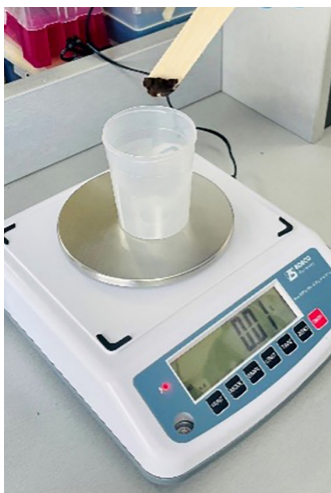
1. Faire tremper 5 g de fèces dans 50 mL d'H<sub>2</sub>O et bien mélanger
2. Passer à travers une passoire à thé / gaze / tamis dans un bocal en plastique pour filtrer. L'ouverture doit être d'au moins 150 µm.
3. Verser tout le contenu dans un tube à essai conique (50 ml)
4. Laisser sédimenter pendant 5 min ou bien centrifuger le tube à 650 g pendant 10 min
5. Vider le surnageant
6. Ajouter l'eau, mélanger et laisser sédimenter 5 min
7. Videz soigneusement le surnageant
8. Peut ajouter 1 à 2 gouttes de solution aqueuse de bleu de méthylène à 5 % dans un tube à essai pour faciliter l'identification (œufs de douve jaunes ou incolores sur fond bleu)
9. Transférez 1 à 2 gouttes du sédiment sur une lame de microscope, placez une lamelle de recouvrement et examinez-la à l'aide d'un microscope optique à faible puissance (objectif 4X (grossissement 40X) et objectif 10X (grossissement 100X))

### Précautions de sécurité

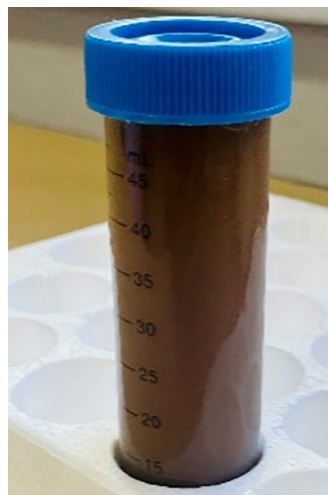
Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables  
Lavez-vous soigneusement les mains lorsque vous avez terminé.

### Procédures de nettoyage

Jetez toutes les lames et les lamelles de recouvrement dans un contenant pour objets tranchants  
Nettoyez soigneusement tout l'équipement (passoire à thé, tubes à essai en verre) avec une solution d'eau de Javel à 10 %  
Essuyez la zone de travail avec de l'éthanol à 70 %.

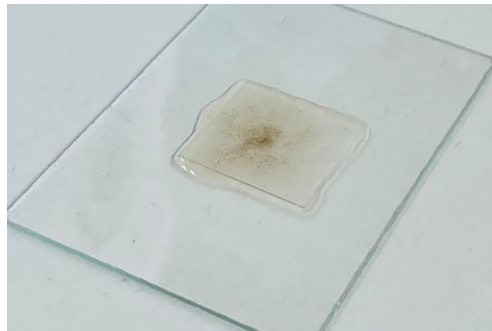
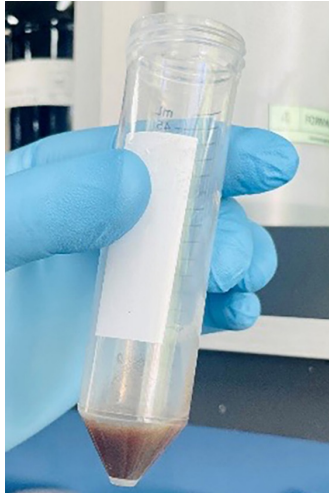


Faire tremper 5 g de fèces dans 50 ml de dH<sub>2</sub>O et bien mélanger.



Passez le mélange de matières fécales/eau à travers une passoire à thé/gaze/tamis dans un bocal en plastique pour filtrer. Verser tout le contenu dans un tube à essai conique (50 ml). Laisser sédimenter 5 min.

Absent de la photo : Ajouter de l'eau dans le tube, mélanger, laisser sédimenter pendant 5 min et verser le surnageant soigneusement.



Transférez 1 à 2 gouttes de sédiments sur une lame de microscope, placez une lamelle de recouvrement et examinez-la à l'aide d'un microscope optique à faible puissance.



## POS 5 : Coloration acido-résistante pour les oocystes de *Cryptosporidium*

Comme les oocystes de *Cryptosporidium* spp. sont très petits et difficiles à détecter par des examinateurs inexpérimentés, cette méthode permet une coloration spécifique et une détection plus facile.

### Réactifs

- Méthanol absolu
- Fuchsine carbol de Kintoun
- Solution d'acide sulfurique à 10 % (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- 3% Vert malachite

### Procédure

1. Faites un mince frottis fécal et laissez sécher à l'air libre
2. Fixer avec du méthanol absolu pendant 10 min et laisser sécher le frottis
3. Coloration à froid au carbol fuchsine de Kinyoun (filtrée) pendant 5 min
4. Laver soigneusement à l'eau du robinet jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de tache (étape très importante qui peut prendre 3 à 5 min)
5. Décolorer à 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pour les frottis très fins, un trempage rapide dans le pot Coplin d'acide suivi d'un rinçage immédiat à l'eau du robinet suffit)
6. Contre-teinture avec 3 % de vert malachite pendant 2 à 5 min
7. Laver à l'eau du robinet et sécher par éponge
8. Examiner au microscope optique à haute puissance (objectif 40X ; grossissement 400X) à la recherche d'oocystes

### Résultats

Les oocystes se présentent sous la forme d'un corps ovale à rond (de 4 à 6 µm de diamètre), résistant à l'acide (rose vif), entouré d'un halo incolore. Les bactéries et les levures se colorent en vert.

### Précautions de sécurité

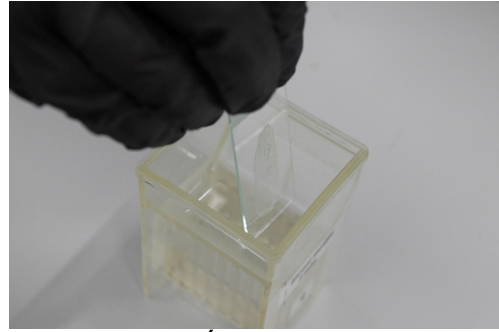
Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables  
Lavez-vous soigneusement les mains lorsque vous avez terminé.

### Procédures de nettoyage

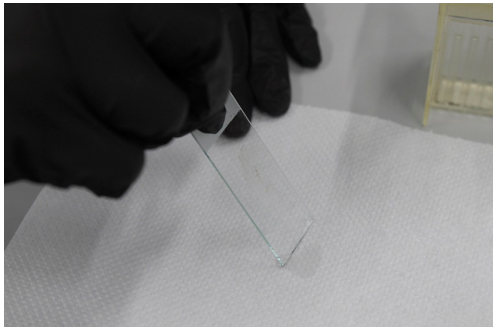
Jetez tout l'équipement jetable dans une poubelle à déchets médicaux ou un conteneur pour objets tranchants, le cas échéant.



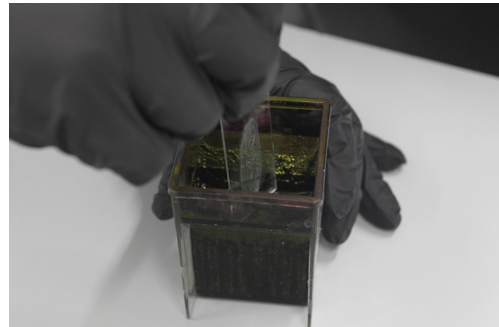
Étape 1.



Étape 2.



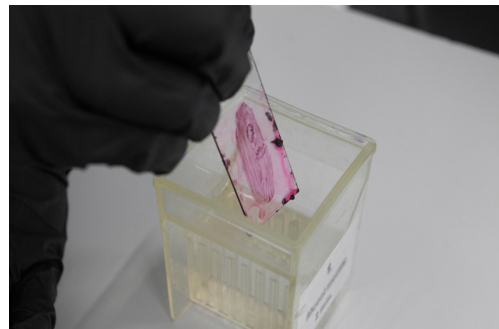
Étape 2.



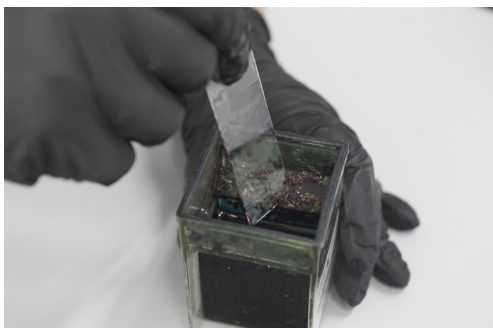
Étape 3.



Étape 4.



Étape 5.



Étape 6.



Étape 7.

## POS d'analyse sanguine

---

### POS 6 : Test de Knott modifié

Cette méthode est utilisée pour la détection des microfilaires dans le sang. La méthode est plus sensible qu'un frottis direct avec du sang frais car elle concentre les microfilaires à partir d'un grand volume de sang. En plus des tests sérologiques, cette méthode permet également de détecter et d'identifier les microfilaires d'espèces autres que *D. immitis* (c'est-à-dire *D. repens*, *Acanthocheilonema spp.*, *Brugia spp.*). Des échantillons de sang doivent être prélevés le soir pour une sensibilité accrue dans la détection des microfilaires de *Dirofilaria* spp.

#### Réactifs/Matériaux

- 2 % de formol (2 mL de formaldéhyde à 40 % dans 98 mL d'eau distillée)
- 1 % de bleu de méthylène
- Tube à centrifuger conique
- Glissière et lamelle
- Pipette

#### Procédure

1. Mélanger 1 mL de sang non coagulé (dans de l'héparine ou de l'EDTA) avec 9 mL de formol à 2 % dans un tube à centrifuger conique
2. Retournez doucement le tube 4 fois pour mélanger la solution
3. Centrifuger à 500 g pendant 5 min
4. Jeter le surnageant
5. Colorer les sédiments pendant 1 à 2 min avec 1 à 2 gouttes de bleu de méthylène à 1%
6. Ajoutez une goutte de l'échantillon sur une lame de verre et couvrez d'une lamelle. Répétez cette étape pour que 2 diapositives ou plus soient préparées ; Cela augmente la sensibilité
7. Remarque : Les étapes 1 à 6 peuvent être répétées pour augmenter la sensibilité
8. Examinez les lames au microscope optique à faible puissance (objectif 10X ; grossissement 100X) à la recherche de microfilaires. Des grossissements plus élevés peuvent être nécessaires pour l'identification morphologique spécifique des microfilaires

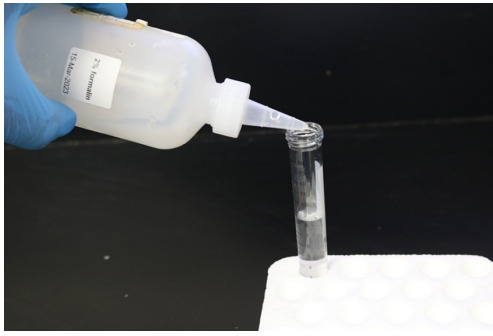
Nota : L'ajout de 9 mL de formol à 2 % et les étapes 2 à 4 peuvent être répétés si l'on désire un sédiment plus propre.

#### Précautions de sécurité

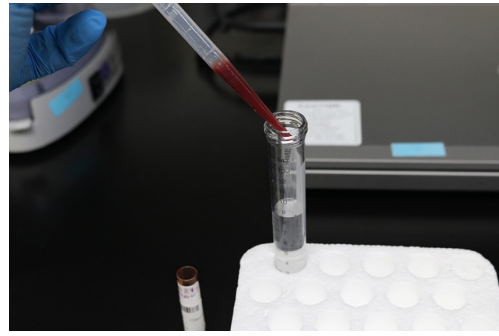
Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables

#### Procédures de nettoyage

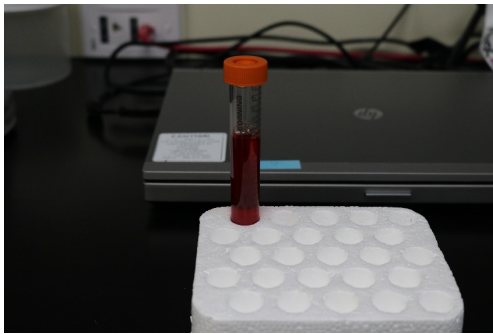
Jetez toutes les lames et les lamelles de recouvrement dans un contenant pour objets tranchants



Étape 1.



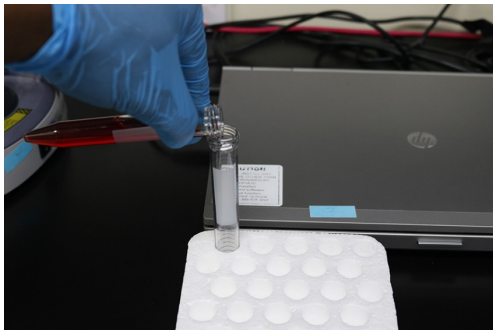
Étape 1.



Étape 2.



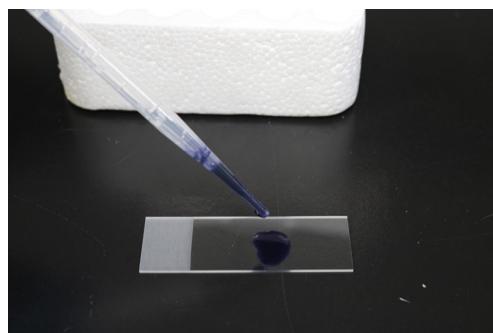
Étape 3.



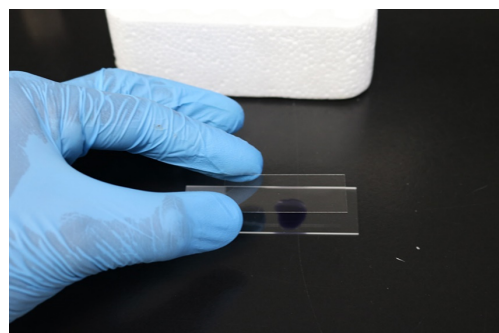
Étape 4.



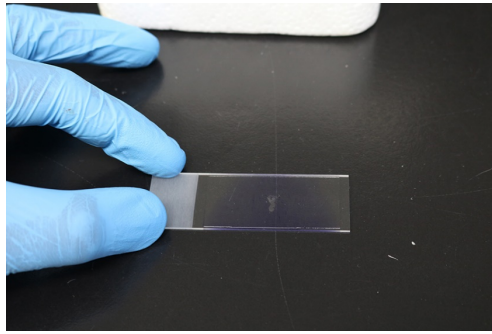
Étape 5.



Étape 6.



Étape 6.



Étape 6.

Photos reproduites avec l'aimable autorisation de Ian Branford et Shadrach Hobson-Tyson, École de médecine vétérinaire de l'Université Ross

## POS 7 : Méthode de microhématocrite pour la détection des microfilaires

Le microhématocrite est une méthode hématologique largement utilisée. Dans les échantillons de sang qui sont positifs pour les microfilaires de *Dirofilaria* spp. et d'*Acanthocheilonema* spp., ces larves ont tendance à se concentrer dans la fraction de la couche leucocrite du tube de microhématocrite. Ils peuvent être observés au microscope alors qu'ils sont encore vivants et mobiles.

### Réactifs/Matériaux

- Tubes de microhématocrite

### Procédure

1. Le sang total prélevé sur anticoagulant (EDTA, héparine, etc.) est utilisé pour remplir les tubes de microhématocrite (75 mm de long, 1 mm de diamètre)
2. Centrifuger dans une centrifugeuse à microhématocrite à 13 000-15 000 g pendant 4 à 5 minutes
3. Le tube de microhématocrite est délicatement retiré de la centrifugeuse et placé horizontalement sous un microscope, en se concentrant sur la fraction de couche leucocytaire, située entre le plasma et la couche de globules rouges
4. Examinez d'abord au microscope optique à l'aide d'un objectif 20X (grossissement 200X). et observer les microfilaires mobiles

### Résultats

Les microfilaires ne peuvent pas être différenciées au niveau de l'espèce en raison du mouvement et de l'absence de coloration pour la visualisation des caractéristiques de différenciation. Les microfilaires ont tendance à se déplacer de la zone de la couche leucocytaire vers le plasma lorsqu'elles sont chauffées par la lumière du microscope.

### Précautions de sécurité

Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables

### Procédures de nettoyage

Jetez toutes les lames et les lamelles de recouvrement dans un contenant pour objets tranchants et tranchants.

## POS 8 : Frottis sanguin (y compris frottis de sang capillaire de l'embout auriculaire)

Les frottis sanguins fins sont utilisés pour les parasites intra- et extracellulaires dans le sang périphérique tels que les hémoprotozoaires (*Babesia*, *Theileria*, *Rangelia*, *Cytauxzoon*, *Hepatozoon*, *Trypanosoma*). Les frottis épais sont plus concentrés et plus sensibles que les frottis minces, mais doivent être suivis d'un frottis mince pour l'identification morphologique du parasite. Des frottis minces et épais peuvent également être utilisés pour les microfilaires, mais ont une faible sensibilité par rapport au test modifié de Knott.

Dans la plupart des cas, deux frottis ou plus doivent être effectués pour augmenter la sensibilité de la méthode.

En plus de cette SOP, voir :

Frottis de sang capillaire frais. <https://youtu.be/EkYXXHSILYk> ; et <https://www.youtube.com/shorts/yfUN89hsZqs>

Frottis sanguin EDTA. <https://youtube.com/shorts/j-KNiVnIAi0?feature=share>

### Réactifs/Matériaux

- Coloration de Giemsa : solution 1 :20 (ex.; 2 mL de Giemsa bouillon et 40 mL d'eau distillée ou tamponnée). La solution 1 :20 ne doit pas dater de plus de 2 jours
- Pots de coloration
- Assurez-vous que les lames sont propres ; Essuyer avec de l'alcool avant utilisation en manipulant la glissière par le bord

### Procédure frottis sanguin mince

1. Placez une petite goutte de sang frais (avant que la coagulation ne se produise) ou de sang anticoagulé EDTA près d'une extrémité de la lame.
2. Utilisez une autre lame (l'épandeur) pour répandre le sang
3. Tenez l'épandeur à un angle d'environ 45 degrés
4. Touchez la face cachée du sang avec l'épandeur. Le côté le plus éloigné est le côté le plus éloigné du bord du toboggan
5. Le sang doit couler le long du bord de l'épandeur
6. Poussez doucement l'épandeur sur toute la longueur de la glissière
7. Notez qu'il s'agit de tirer le sang derrière l'épandeur. Il ne pousse pas le sang devant l'épandeur
8. Poussez l'épandeur jusqu'à l'extrémité de la glissière. Cela devrait se traduire par un « bord plumé », une zone où les cellules sanguines sont séparées
  - a. S'il n'y a pas assez de sang, le frottis est court
  - b. S'il y a trop de sang, il n'y a pas de bord en plumes
9. Sécher à l'air libre
10. Après avoir séché le film sanguin à l'air, fixez-le dans du méthanol absolu pendant 5 min et séchez-le à l'air libre

### Procédure frottis sanguin épais

1. Placez une petite goutte de sang au centre de la lame
2. Utilisez un bâton ou un coin d'une autre lame et étalez la goutte de sang en un motif circulaire
3. Le frottis obtenu doit avoir un diamètre d'environ 1,5 cm
4. Si la lame est placée sur du papier journal, il devrait être difficile de lire à travers le sang
5. Laissez sécher le frottis en position horizontale pendant au moins 30 minutes. Le frottis peut sécher pendant plusieurs heures
6. Ne fixez pas les frottis épais avec du méthanol ou de la chaleur
7. Teinture avec Giemsa
8. Si la coloration doit être retardée, trempez brièvement le frottis dans l'eau pour hémolyser les érythrocytes

### Procédure pour le frottis de sang capillaire de l'oreille

1. Tenez l'oreille et coupez la fourrure d'une petite zone sur un bord du pavillon de l'oreille
2. Essuyez avec une gaze sèche pour enlever les cheveux coupés, la poussière et les squames. N'utilisez PAS de liquide (par exemple un désinfectant) car cela empêcherait la formation de la boule de sang.
3. Piquez doucement l'oreille avec une aiguille fine (par exemple 25G ou 26G). (Cela doit être fait si doucement qu'aucun sang n'est produit.)
4. Pressez l'oreille autour du site de piqûre d'aiguille pour pousser le sang capillaire sur la surface de la peau. Il devrait y avoir une petite goutte de sang
5. Appliquez une lame de microscope sur la bulle et faites un frottis comme décrit précédemment pour un frottis sanguin mince

### Coloration et visualisation (tous types de frottis)

1. S'il n'est pas possible d'obtenir un kit de teinture commercial tel que Diff-Quik, la méthode suivante peut être utilisée.
2. Placez la lame dans la solution Giemsa 1 :20 pendant 20 à 30 min
3. Lavez délicatement à l'eau du robinet ou en plongeant dans un bocal d'eau du robinet. Ne pas trop laver ; Cela aura pour conséquence d'enlever la couleur.
4. Sécher à l'air libre en position verticale
5. Examinez d'abord la lame au microscope optique à l'aide d'un objectif 10X (grossissement 100X). Le grossissement peut être augmenté lors de la recherche de protozoaires intracellulaires et de l'identification de microfilaires.

### Résultats

Le cytoplasme du parasite se colore en bleu clair et les noyaux se colorent en magenta foncé.

Voir les lignes directrices sur les endoparasites pour les chiens et les chats pour obtenir des images des différents hémoprotazoaires.

Si des microfilaires sont observées dans un frottis sanguin, un test de Knott doit être effectué pour faciliter l'identification.

Méfiez-vous des artefacts liés au séchage ou à la coloration.

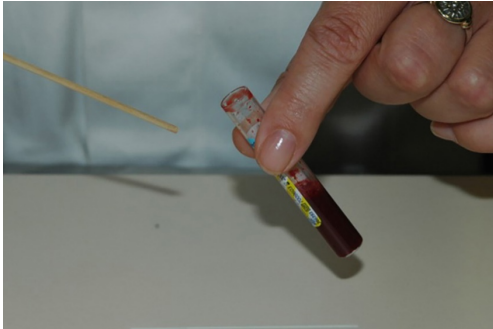


### Précautions de sécurité

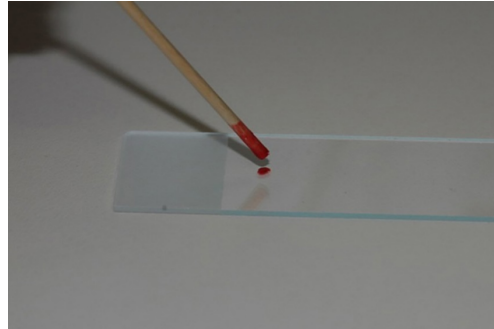
Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables

### Procédures de nettoyage

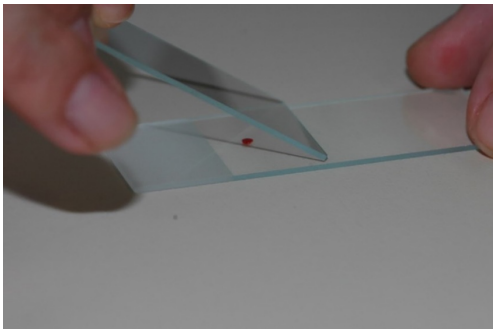
Jetez toutes les lames et les lamelles de recouvrement dans un contenant pour objets tranchants



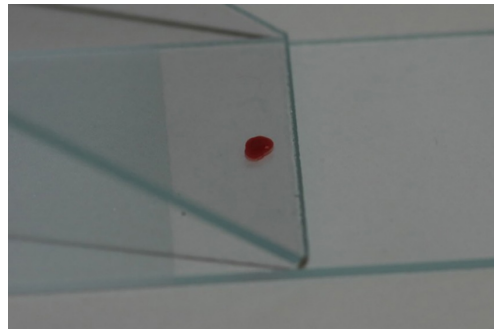
Étape 1.



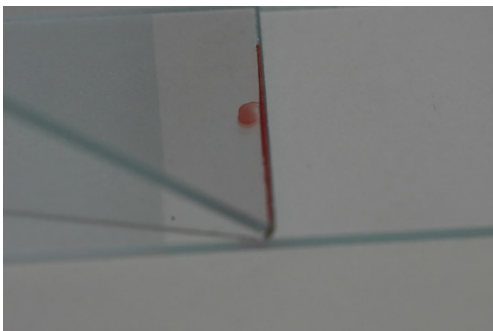
Étape 1.



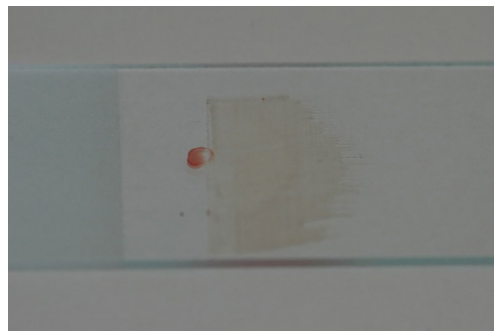
Étape 2.



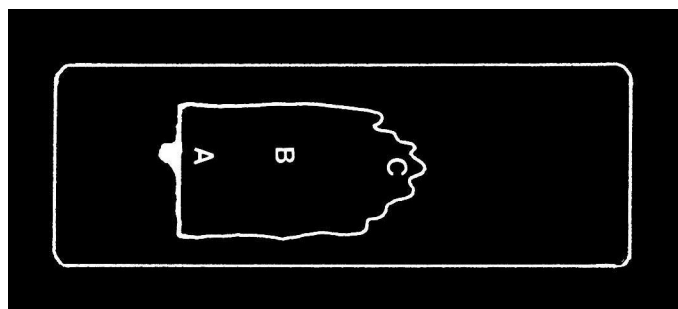
Étape 3.



Étapes 4 à 7.



Étape 8.



Étape 8. Le bord biseauté se trouve dans la zone C.

## POS 9 : Frottis de pelage Buffy

Le pelage leucocytaire est la fraction du sang qui contient la majorité des globules blancs et des plaquettes. Il contient 10 à 20 fois plus de leucocytes concentrés. Elle s'exprime suite à la centrifugation du sang prélevé sur des anticoagulants. La couche leucocytaire se présente sous la forme d'une fine couche de couleur chamois (d'où son nom), représentant environ 1 % du volume sanguin total, située dans le tube de centrifugation entre le plasma (ci-dessus) et les globules rouges (ci-dessous). En parasitologie, le frottis taché de couche leucocytaire représente un moyen plus sensible que le frottis de sang total standard de détecter au microscope certains parasites et autres agents pathogènes situés dans les globules blancs, tels que *Leishmania*, *Hepatozoon*, *Anaplasma* ou *Ehrlichia*. Le pelage chamois peut également inclure une concentration plus élevée de microfilaires et/ou de formes trypanomastigotes de *Trypanosoma* spp. que le sang total. La fraction de la couche leucocytaire peut également être utilisée pour l'extraction de l'ADN suivie de la PCR pour la détection moléculaire des mêmes parasites.

### Réactifs/Matériaux

- Tube sanguin EDTA
- Pipette
- Hématocrite ou tube capillaire en verre
- Teinture Giemsa
- Lames de verre

### Procédure

1. Le sang total prélevé sur anticoagulant (EDTA, héparine, etc.) est centrifugé à 200 g pendant 10 minutes à température ambiante
2. Le tube est délicatement retiré de la centrifugeuse et placé dans un porte-tube
3. À l'aide d'une pipette fine, une petite goutte de la couche de couche leucocytaire est aspirée et placée sur une lame
4. Utilisez une autre lame (l'épandeur) pour répandre le sang
5. Tenez l'épandeur à un angle d'environ 45 degrés
6. Touchez le côté opposé de la goutte avec l'épandeur. Le côté le plus éloigné est le côté le plus éloigné du bord du toboggan
7. La goutte de pelage leucocyte doit courir le long du bord de l'épandeur
8. Poussez l'épandeur sur toute la longueur de la glissière
9. Notez qu'il s'agit de tirer la goutte derrière l'épandeur. Il ne pousse pas la goutte devant l'épandeur
10. Poussez l'épandeur jusqu'à l'extrémité de la glissière. Cela devrait se traduire par un « bord plumé », une zone où les cellules sanguines sont séparées
  - a. Si la goutte est trop petite, le frottis est court
  - b. Si la goutte est trop grande, un bord biseauté n'est pas créé
11. Sécher à l'air libre
12. Après avoir séché le frottis à l'air, fixez-le dans du méthanol absolu pendant 5 min et séchez-le à l'air libre
13. Placez la lame dans la solution Giemsa 1 :20 pendant 20 à 30 min
14. Lavez délicatement à l'eau du robinet ou en plongeant dans un bocal d'eau du robinet. Ne pas trop laver ; Cela se traduira par la suppression de la couleur

15. Sécher à l'air libre en position verticale
16. Examinez d'abord la lame au microscope optique à l'aide d'un objectif 10X (grossissement 100X). Le grossissement peut être augmenté lors de la recherche de protozoaires intracellulaires et de l'identification de microfilaires

### **Résultats**

Voir les lignes directrices pour les chiens et les chats pour des images des différents parasites

### **Précautions de sécurité**

Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables

### **Procédures de nettoyage**

Jetez toutes les lames et les lamelles de recouvrement dans un contenant pour objets tranchants

## POS d'analyse de la peau

---

### POS 10 : Méthode du ruban adhésif et de la bande d'acétate

La méthode du ruban adhésif peut être utilisée autour de la région périnéale pour collecter les œufs de cestode et à divers sites de prédilection pour collecter les acariens de la fourrure.

#### Réactifs/Matériaux

- Glissière et lamelle
- Forceps
- Ruban adhésif transparent

#### Procédure

1. Utilisez du ruban adhésif transparent ou une bande d'acétate
2. Le ruban ou la bande doit mesurer environ 2,5 cm de long
3. Placer sur la surface des cheveux ou de la peau
4. Tirez dans le sens des cheveux
5. Placer (côté collant vers le bas) sur une lame de verre
6. Examinez à l'aide d'un objectif 4X ou 10X (grossissement 40X ou 100X) pour les acariens et les poux et d'objectifs 10X ou 40X (grossissement 100X ou 400X) pour les œufs de cestode

#### Résultats

Les œufs de poux et d'acariens peuvent être vus en plus d'une variété d'acariens et de poux.

#### Précautions de sécurité

Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables  
Lavez-vous soigneusement les mains lorsque vous avez terminé.

#### Procédures de nettoyage

Jetez tout l'équipement jetable dans la poubelle à déchets médicaux ou les objets tranchants, le cas échéant

## POS 11 : Trichogramme / Méthode d'épilation des cheveux

Un trichogramme est l'examen des cheveux qui ont été épilés. Il est principalement utilisé pour les acariens de la fourrure, mais peut également être utilisé pour les poux. Dans les situations où le grattage de la peau est difficile (zone sensible), les épilations peuvent être utilisées pour la récupération des acariens de la peau, bien que la sensibilité soit plus faible que les éraflures cutanées. Les cheveux épilés peuvent être placés sur une lame et examinés à l'aide d'un microscope composé ou dans une boîte de Pétri et examinés sous un microscope à dissection (stéréo). Les poils obtenus lors du rasage des zones pour les éraflures cutanées peuvent également être visualisés à l'aide de la méthode d'épilation.

### Réactifs/Matériaux

- Glissière et lamelle
- Forceps
- Huile minérale/glycérine/huile de paraffine

### Procédure

1. Utilisez une pince pour épiler les poils. Épilation dans le sens de la pousse des poils
2. Si possible, pressez la peau avant et pendant l'épilation
3. Un minimum de 20 cheveux doivent être épilés avec 40 cheveux ou plus améliorant la sensibilité
4. Pour la visualisation à l'aide d'un microscope composé, placez les cheveux sur une lame avec une goutte d'huile minérale/glycérine/huile de paraffine et ajoutez une lamelle
5. Pour l'observation à l'aide d'un stéréomicroscope, placez les cheveux sur une boîte de Pétri avec une goutte d'huile minérale/glycérine/huile de paraffine
6. Examen à faible puissance Grossissement de 4X à 100X

### Précautions de sécurité

Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables  
Lavez-vous soigneusement les mains lorsque vous avez terminé.

### Procédures de nettoyage

Jetez tout l'équipement jetable dans la poubelle à déchets médicaux ou les objets tranchants, le cas échéant

## POS 12 : Égratignure de la peau pour les acariens et ruban adhésif

Les éraflures cutanées profondes peuvent être utilisées *pour la collecte de Demodex* spp. en grattant dans la région de l'alopecie ou pour les *Sarcoptes* et les *Notoedres* en grattant environ 1 à 2 cm des papules suspectées. Les éraflures superficielles de la peau peuvent être utilisées contre les acariens de la fourrure.

Les éraflures cutanées doivent être effectuées dans les zones de prédilection et/ou à proximité des lésions. En règle générale, plusieurs éraflures sont prélevées pour examen.

S'il n'y a pas de microscope dans la salle d'examen ou si un grattage de la peau est effectué lors d'une visite de consultation à domicile, du ruban adhésif peut être utilisé pour préserver le grattage de la peau. Les échantillons doivent être examinés pour détecter la présence d'acariens et d'œufs dans les 3 jours.

### Réactifs/Matériaux

- Glissière et lamelle
- Lame de scalpel émoussée
- Huile minérale/glycérine/huile de paraffine
- Ruban adhésif transparent

### Procédure

1. Si nécessaire, rasez délicatement la zone à gratter
2. Recueillir les poils à examiner (voir SOP 12 : Trichogramme)
3. Placez une goutte d'huile minérale/glycérine/huile de paraffine sur une lame de scalpel émoussée
4. Si vous recherchez *du Demodex*, pincez doucement la peau entre le pouce et l'index avant de gratter
5. Grattez doucement la peau longitudinalement et latéralement avec la lame émoussée du scalpel jusqu'à ce qu'un léger saignement capillaire
6. Placez le matériel collecté sur une diapositive pour une visualisation immédiate
7. S'il n'est pas possible de le voir dans un court laps de temps, placez le matériau recueilli sur la lame sur le côté collant d'un morceau de ruban adhésif. Placez le ruban adhésif, côté collant vers le bas, sur une lame.
8. Facultatif : appliquer fermement une bande de ruban adhésif (environ 2,5 cm de long) sur la lésion grattée et la retirer rapidement. Placez le ruban adhésif, côté collant vers le bas, sur une lame.
9. Examen à faible puissance (objectif 4X (grossissement 40X) et objectif 10X (grossissement 100X))

### Précautions de sécurité

Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables  
Lavez-vous soigneusement les mains lorsque vous avez terminé.

### Procédures de nettoyage

Jetez tout l'équipement jetable dans la poubelle à déchets médicaux ou les objets tranchants, le cas échéant

## POS 13 : Biopsie cutanée

La méthode est utilisée pour la détection et l'identification des microfilaires des nématodes onchocercidés des genres *Onchocerca* (c'est-à-dire *Onchocerca lupi*) et *Cercopithifilaria* (c'est-à-dire *Cercopithifilaria baina*, *Cercopithifilaria sp. II* et *Cercopithifilaria grassii*) dans la peau par l'observation des sédiments.

### Réactifs/Matériaux

- Poinçons de biopsie (4 mm de diamètre) OU scalpels jetables
- Solution saline (NaCl 0,9%)
- Joint en caoutchouc pour fixer la membrane
- Lames de verre
- Lamelle (10X10 mm)
- Microscopie optique
- Bleu de méthylène (1%)

### Procédure

1. Prélever des échantillons de peau à l'aide de scalpels jetables (environ 0,5 × 0,5 × 0,6 cm) OU de poinçons de biopsie (échantillon de 4 mm de diamètre)
2. Faire tremper l'échantillon dans une solution saline pendant 10 min à 37°C ou 3 heures à température ambiante (environ 20°C)
3. Prélever un échantillon de peau
4. Centrifuger les échantillons à 650 g pendant 10 min
5. Placez deux gouttes de sédiments sur une lame de verre
6. Ajouter une goutte de bleu de méthylène (1%)
7. Observer en microscopie optique à faible puissance (objectif 10X ; grossissement 100X) et à haute puissance (objectif 40X ; grossissement 400X) pour confirmer l'espèce
8. Identifier les microfilaires en fonction de leur morphologie

### Précautions de sécurité

Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables

### Procédures de nettoyage

Jetez toutes les lames et les lamelles de recouvrement dans un contenant pour objets tranchants

## Autres procédures

---

### POS 14 : Examen des acariens

Les acariens (*Otodectes*) peuvent être vus macroscopiquement et microscopiquement. Souvent, les acariens peuvent être vus avec un examen otoscopique, bien que cette méthode ne soit pas aussi sensible que l'examen des débris collectés avec un écouvillon. Les chiens et les chats infestés d'acariens peuvent avoir des infections bactériennes secondaires. Ceux-ci peuvent être douloureux et peuvent nécessiter de placer une muselière sur un chien avant l'examen ou l'administration d'un analgésique.

#### Réactifs/Matériaux

- Otoscope
- Prélèvement
- Huile minérale / huile de paraffine
- Glissière et lamelle

#### Procédure (Otoscope)

1. Soulevez le pavillon de l'oreille.
2. Placez délicatement le spéculum dans l'ouverture du conduit auditif
3. Tout en regardant à travers l'otoscope, déplacez lentement le spéculum le long du conduit auditif vertical
4. Observez le mouvement de la cire et des débris. *Les otodectes* peuvent apparaître sous forme de points blancs se déplaçant sur la cire foncée
5. Si l'oreille est particulièrement pleine de débris, l'utilisation d'un spéculum plus large peut être bénéfique
6. Des débris et de la cire peuvent remplir l'extrémité du spéculum. Ces débris et cette cire peuvent être examinés comme décrit ci-dessous pour un écouvillon

#### Procédure (écouvillonnage)

1. À l'aide d'un coton-tige légèrement enduit d'huile minérale ou d'huile de paraffine, retirez les débris cireux foncés des deux oreilles
2. Observez l'écouvillon pour voir s'il y a du mouvement. Le mouvement est probablement celui des acariens.
3. Placez 2 à 3 gouttes d'huile minérale/huile de paraffine sur une lame de verre
4. Mélangez les débris collectés dans l'oreille sur l'écouvillon avec l'huile
5. Enlevez les gros débris
6. Placez une lamelle sur la diapositive
7. Examiner à faible puissance (objectif 4X et 10X (grossissement 40X et 100X))

#### Résultats

Avec les deux procédures, les acariens peuvent être vus par leur mouvement, l'examen microscopique confirme l'identification et augmente la sensibilité de la méthode.



**Précautions de sécurité**

Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables.  
Lavez-vous soigneusement les mains lorsque vous avez terminé.

**Procédures de nettoyage**

Jetez tout l'équipement jetable dans la poubelle des déchets cliniques

## POS 15 : Démodécie pustuleuse

Le grattage de la peau est souvent négatif lorsqu'un chien a une démodécie pustuleuse. Cette méthode peut augmenter le rétablissement et la confirmation de l'infestation dans ces circonstances.

### Réactifs/Matériaux

- Glissière et lamelle

### Procédure

1. Presser une ou deux pustules
2. Récupérez le matériau en appuyant fermement une lame contre la peau
3. Placez une lamelle sur la diapositive
4. Examinez la préparation à faible puissance (objectif 10X, grossissement 100X) et à puissance plus élevée (objectif 40X, grossissements 400X)

### Précautions de sécurité

Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables  
Lavez-vous soigneusement les mains lorsque vous avez terminé.

### Procédures de nettoyage

Jetez tout l'équipement jetable dans une poubelle à déchets médicaux ou un conteneur pour objets tranchants, le cas échéant.

## POS 16 : Sédimentation de l'urine

La sédimentation urinaire peut être utilisée pour identifier les œufs de *Dioctophyme renale* et de *Pearsonema plica* (syn. *Capillaria plica*).

### Réactifs/Matériaux

- Glissière et lamelle
- Tube à centrifuger de 10 à 15 ml
- L'iode de Lugol
- Acide acétique

### Procédure

1. Prélever un échantillon d'urine dans un gobelet en plastique jetable
2. Remplir un tube de 10 ou 15 mL avec l'échantillon et centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 min. Vider le surnageant
3. Prenez 1 à 2 gouttes de sédiment dans une lame de verre et ajoutez une lamelle
4. L'échantillon peut être mélangé avec une goutte d'iode de Lugol pour ajouter du contraste
5. Si l'échantillon est recouvert de globules rouges, il peut être mélangé avec 2 à 3 gouttes d'acide acétique
6. Examinez la préparation à faible puissance (objectif 10X, grossissement 100X) et à puissance plus élevée (objectif 40X, grossissements 400X)

### Précautions de sécurité

Portez une blouse de laboratoire et des gants jetables  
Lavez-vous soigneusement les mains lorsque vous avez terminé.

### Procédures de nettoyage

Jetez tout l'équipement jetable dans une poubelle à déchets médicaux ou un conteneur pour objets tranchants, le cas échéant.

## Références d'identification

---

### Oeufs et oocystes dans les fèces

- [1] Zajac AM, Conboy GA, Little SE, Reichard MV. 2021. Veterinary Clinical Parasitology 9<sup>th</sup> edition. Wiley-Blackwell. Available electronically.
- [2] Eggs found in Faecal Floats  
<https://shire.science.uq.edu.au/parasites/helminths/nematodes/faecal-floats.php>
- [3] [www.parasite.org.au/para-site/contents/toc.html](http://www.parasite.org.au/para-site/contents/toc.html)

### Larves dans les fèces

- [1] Di Cesare A, Traversa D. 2014. Canine angiostrongylosis: recent advances in diagnosis, prevention, and treatment. Vet Med (Auckl). 5:181-192. doi:10.2147/VMRR.S53641
- [2] Greve JH. 1985. Identifying nematode larvae in feces of dogs and cats. Iowa State University Veterinarian. 47(2): 98-101.  
[http://lib.dr.iastate.edu/iowastate\\_veterinarian/vol47/iss2/4](http://lib.dr.iastate.edu/iowastate_veterinarian/vol47/iss2/4)
- [3] McGarry JW, Morgan ER. 2009. Identification of first-stage larvae of Metastrongyles from dogs. Vet Rec 165(9):258-261.
- [4] Traversa D, Di Cesare A, Conboy G. 2010. Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe: emerging and underestimated. Parasit Vectors. 3:62.  
doi:10.1186/1756-3305-3-62

### Microfilaires dans le sang

- [1] Companion Animal Parasite Council Guidelines. <https://capcvet.org/guidelines/heartworm/>
- [2] Magnis J, Lorentz S, Guardone L, et al. 2013. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. Parasit Vectors. 6:48. doi:10.1186/1756-3305-6-48
- [3] Parasitological Diagnosis in Cats, Dogs and Equines. ESCCAP Guideline 04 First Edition – November 2022.  
[www.esccap.org/uploads/docs/hgqo8xak\\_1335\\_ESCCAP\\_GL4\\_v2\\_1p.pdf](http://www.esccap.org/uploads/docs/hgqo8xak_1335_ESCCAP_GL4_v2_1p.pdf) page 35

### Microfilaires dans la peau

- [1] Mutafchiev Y, Dantas-Torres F, Giannelli A, Abramo., Papadopoulos E, Cardoso L, Cortes H, Otranto D. 2013. Redescription of *Onchocerca lupi* (Spirurida: Onchocercidae) with histopathological observations. Parasit Vectors 6:309.
- [2] Otranto D, Varcasia A, Solinas C, Scala A, Brianti E, Dantas-Torres F, Annoscia G, Martin C, Mutafchiev Y, Bain O. 2013. Redescription of *Cercopithifilaria binae* Almeida & Vicente,

1984 (Spirurida, Onchocercidae) from a dog in Sardinia, Italy. *Parasit Vectors*. 6:132. doi:10.1186/1756-3305-6-132.

- [3] Otranto D, Brianti E, Dantas-Torres F, Miró G, Latrofa MS, Mutafchiev Y, Bain O. 2013. Species diversity of dermal microfilariae of the genus *Cercopithifilaria* infesting dogs in the Mediterranean region. *Parasitology* 140(1):99-108. doi:10.1017/S0031182012001357.

### **Identification des tiques**

- [1] Barker SC, Walker AR. 2014. *Ticks of Australia: The Species That Infest Domestic Animals and Humans*. Magnolia Press, Auckland. <http://www.alanwalker.com/guidebooks/ticks/>
- [2] Bristol University Tick ID. Key to Genera. <http://www.bristoluniversitytickid.uk/page/Key+to+Genera/6/#.Y7NaNHbMI2w>
- [3] Madder M, Horak I, Stoltz H. Ticks of veterinary importance and Tick Identification. [https://www.afrivip.org/sites/default/files/Ticks\\_identification/ticks\\_importance/](https://www.afrivip.org/sites/default/files/Ticks_identification/ticks_importance/) and [https://www.afrivip.org/sites/default/files/Ticks\\_identification/index/](https://www.afrivip.org/sites/default/files/Ticks_identification/index/) (Africa). See also [www.afrivip.org/sites/default/files/07\\_identification\\_vetimportance.pdf](http://www.afrivip.org/sites/default/files/07_identification_vetimportance.pdf)
- [4] Szabó MP, Pinter A, Labruna MB. 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect Microbiol*. 3:27. doi:10.3389/fcimb.2013.00027
- [5] TickEncounter Identification Guide. <https://web.uri.edu/tickencounter/fieldguide/id-guide/>
- [6] Walker AR, Bouattour A, Camicas J-L, et al. 2003. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. University of Edinburgh. <http://www.alanwalker.com/guidebooks/ticks/>
- [7] Zajac AM, Conboy GA, Little SE, Reichard MV. 2021. *Veterinary Clinical Parasitology* 9<sup>th</sup> edition. Wiley-Blackwell. Available electronically.

### **Identification des acariens, des poux et des puces**

- [1] Common parasites of veterinary importance, Mite identification key. <https://shire.science.uq.edu.au/parasites/arachnids/mites/mites-identification.php>
- [2] Dantas-Torres F, Otranto D. 2014. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box [published correction appears in *Parasit Vectors*. 2016;9(1):298]. *Parasit Vectors*. 7:22. doi:10.1186/1756-3305-7-22
- [3] Flea Identification. [www.cdc.gov/nceh/ehs/docs/pictorial\\_keys/fleas.pdf](http://www.cdc.gov/nceh/ehs/docs/pictorial_keys/fleas.pdf)
- [4] Common parasites of veterinary importance. Key to Flea Species of Veterinary Importance in Australia. <https://shire.science.uq.edu.au/parasites/insects/fleas/fleas-key.php>

## Références et vidéos de méthodes

---

- [1] Parasitological Diagnosis in Cats, Dogs and Equines. ESCCAP Guideline 04 First Edition – November 2022. Free and available electronically.  
[www.esccap.org/uploads/docs/hgqo8xak\\_1335\\_ESCCAP\\_GL4\\_v2\\_1p.pdf](http://www.esccap.org/uploads/docs/hgqo8xak_1335_ESCCAP_GL4_v2_1p.pdf)
- [2] The RVC/FAO Guide to Veterinary Diagnostic Parasitology.  
<https://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/Faeces/Purpose.htm>
- [3] Zajac AM, Conboy GA, Little SE, Reichard MV. 2021. Veterinary Clinical Parasitology 9<sup>th</sup> edition. Wiley-Blackwell. Available electronically.
- [4] Preparing and measuring the S.G. of a flotation solution. <https://youtu.be/Skx7JDUL6IE>
- [5] Fresh capillary blood smear. <https://youtu.be/EkYXXHSILYk> and <https://www.youtube.com/shorts/yfUN89hsZqs>
- [6] EDTA blood smear. <https://youtube.com/shorts/j-KNiVnIAi0?feature=share>
- [7] Collecting blood from the ear tip. <https://www.youtube.com/shorts/8KCQ1gqX9Hk>