

Contribution au dépistage des kystes des protozoaires intestinaux: Etude comparative entre la coloration directe au LUGOL et la concentration de THEBAUT dans l'identification des protozoaires intestinaux (Amibes)

[Contribution to the screening of intestinal protozoa cysts: Comparative study between direct staining with LUGOL and the concentration of THEBAUT in the identification of intestinal protozoa (Amoebas)]

Paluku Kanyere Dieudonné

Institut Supérieur d'Etudes Agronomiques, Vétérinaires et Forestières (ISEAVF-Butembo), Butembo, RD Congo

Copyright © 2023 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the *Creative Commons Attribution License*, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Butembo city is undergoing serious disease problems as that of dirty hands. Among these diseases we have that caused by *Entamoeba histolytica* which is spreading a great deal among pupils although the increasing health structures. Two methods of checking the *Entamoeba* are held:

- The direct lugol coloration and.
- The Thebaut test.

Our concern is to detect which one of two mentioned above will offer us a good result. As a sample we examined 50 primary school pupils stool specimen. After a deep study, we got a clear conclusion that the Thebaut test is better than the direct Lugol coloration.

KEYWORDS: screening, cysts, intestinal protozoa, LUGOL, THEBAUT, Amoebas.

RESUME: La ville de Butembo connaît de sérieux problèmes des maladies dites de main sale. Parmi celles-ci nous avons l'amibiase dont la prévalence se manifeste avec des proportions inquiétantes au sein de la population notamment scolaire malgré la multiplicité des structures sanitaires. Deux méthodes de dépistage des kystes d'amibe sont utilisées: la coloration directe au lugol et le test de Thebaut. L'objectif du travail vise à identifier la méthode la plus performante. C'est à ce titre que nous avons prélevé des échantillons des selles frais auprès de 50 écoliers de la ville de Butembo. Après analyse des résultats, le test de Thebaut est de loin plus performant que la simple coloration au lugol. (39 cas positifs sur les 50 échantillons soit 78% contre 11 cas sur 50 soit 22% pour la coloration directe au Lugol).

MOTS-CLEFS: dépistage, kystes, protozoaires intestinaux, LUGOL, THEBAUT, Amibes.

1 INTRODUCTION

Le manque d'eau potable dans la ville de Butembo et ses environs est à la base des maladies hydriques dans les ménages. Parmi ces maladies, nous retenons principalement les parasitoses intestinales, les diarrhées, les dysenteries bacillaires, etc. (Raven, 2009).

Par ailleurs, faute des moyens péculinaires et techniques, le personnel soignant dans les structures sanitaires se limite à prescrire un traitement sans pour autant exiger les examens au laboratoire. Même quand ces derniers sont effectués, ils ne

sont pas du tout différenciés à cause du coût que cette opération exige. Cette situation se fait remarquer surtout en cas d'amibiase (Croux M, 1984).

L'amibe appartient à la classe des Protozoaires, sous-classe des *Rhizopoda*; genre *Entamoeba*, espèce *Entamoeba histolytica* et *Entamoeba coli* qui sont fréquents chez l'homme. Dans leur cycle évolutif, les amibes présentent deux formes; la forme kystique et la forme végétative (Golvan Y, 1983).

La forme végétative est allongée d'une taille diamétrale de 12-35 μ m, elle se déforme pendant les mouvements. Elle est arrondie quand elle est immobile, son cytoplasme est transparent et bien différent de l'endoplasme finement granuleux. (Golvan Y, Op.cit). La forme kystique est ronde, de taille diamétrale de 12-15 μ m, elle a un à quatre noyaux avec une membrane fine, régulière et circulaire. Son cytoplasme est de couleur jaune grisâtre et granuleux. Toute fois le kyste d'*Entamoeba coli* a huit noyaux avec une coque épaisse. Sa taille diamétrale est de 15-20 μ m ou même 30 μ m. (Vasombolwa K, 2002) et (Croux M, Op.cit).

La recherche précédente à celle-ci était orientée vers l'étude de la prévalence de l'amibiase en milieu rural et urbain en périphéries directes de la Ville de Butembo, nous a révélé que les populations villageoises présentent un taux d'infections plus élevé (33%) contre une plus faible proportion en milieu urbain (17%). Ces résultats nous ont poussé à chercher à comprendre cette différence et à rechercher une méthode rapide et précise qui permettrait au personnel soignant d'agir sans doute.

Cette étude a été menée pour diagnostiquer le genre *Entamoeba* et en particulier l'espèce *E. histolytica*. Cette espèce est spécifiquement humaine et elle est répandue dans le monde entier sur une proportion de 10% de la population mondiale. Mais l'amibiase est surtout endémique dans les zones tropicales où l'hygiène est insuffisante. Ici on constate que les patients présentent différents symptômes allant de la forme intestinale aigue chronique; et extra intestinale. Pour tous ces cas, le porteur souffre jusqu'à devenir moins actif dans sa vie et passer parfois dans un état de dépendance. D'où ce mal est à déceler le plus tôt possible et chercher à l'éradiquer, en appliquant la méthode la plus efficace possible. Cependant, l'examen direct d'un fragment des selles émis peu de temps avant l'observation microscopique permet la mise en évidence des formes végétatives mobiles et d'en préciser les caractères (Vasombolwa, Op.cit).

Si ce premier examen est négatif, il est conseillé de reprendre l'examen au besoin après réaction par un purgatif salin tel que le sulfate de magnésium puis le compléter par une technique de concentration comme celle de Thebaut. Cette technique est en effet indiquée pour la recherche des protozoaires enkystés (Vasombolwa, Op.cit).

Préoccupé par l'endémicité de l'amibiase dans nos agglomérations, nous souhaitons que l'analyse effectuée pendant la manifestation du malaise soit précise et qu'elle soit en mesure de relever un résultat fiable pour vite soulager le patient sans tâtonnement. Généralement les techniciens de laboratoire recourent à la méthode de coloration directe au lugol au détriment de la méthode de Thebaut. (Roland M, 1974).

En effet la recherche de l'amibe se fait par l'examen au microscope photonique à objectif 10 ou 40fois. Elle consiste à mettre en évidence les formes végétatives dans les selles fraîches ou conservées à 37° C. Pour confirmer les résultats, il faut reprendre l'examen sur trois échantillons frais entre 3 à 4 jours d'intervalle chez le même individu.

La réaction sérologique est indispensable dans le cas de l'amibiase extra intestinale primitive notamment hépatique. Le diagnostic différentiel avec la dysenterie bacillaire se fait par culture bactériologique qui isole l'espèce *Shigella dysenteriae*.

Au cours de la présente recherche, nous voulons présenter l'efficacité de la méthode de Thebaut pour un diagnostic rapide et précis de kyste des protozoaires (Amibes). En plus, nous aimerions encourager les techniciens de laboratoire d'appliquer les deux méthodes pour atteindre et présenter un résultat fiable enfin de réduire l'incidence de ce mal dans notre environnement direct.

2 MATÉRIELS, RÉACTIFS ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIELS

A part les consommables (papiers, feuille de caoutchouc, bâtonnet râpé) les matériels suivants ont été utilisés:

- Microscope binoculaire
- Balance de précision
- Lame porte objet
- Lame couvre objet

- Pipette de transfert
- Centrifugeuse
- Tube
- Gaz (chinois métallique)
- Verre à pieds
- Ballon à décanter

2.2 LES MÉTHODES

2.2.1 COLLECTION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons de recherche "ont été prélevés auprès des écoliers de l'école primaire Tsaka-Tsaka dont l'âge varie de 6 à 10 ans. Nous les avons choisi de manière aléatoire dans les classes de première à troisième année. Dans chaque classe nous avons choisi cinq élèves chez qui nous avons réalisé deux examens destinés à la recherche des cellules végétatives ou kystiques des *Entamoeba* et cela par deux méthodes différentes à savoir; la coloration directe au lugol et la méthode de concentration de Thebaut.

Tous les échantillons prélevés ont été examinés au laboratoire central de l'Université Catholique du Graben fonctionnant dans les bâtiments de l'Institut Technique Agricole et Vétérinaire de Butembo.

Pour assurer un prélèvement conforme des échantillons, nous donnions à l'écolier un morceau de caoutchouc propre, un papier propre et un bâtonnet propre en bois (tigette de balais râpée). Ensuite nous demandions à l'écolier de déféquer sur papier et de prélever rapidement une portion importante des selles, le placer sur caoutchouc et nous l'amener. Nous avons alors nous même pris l'échantillon, l'étiqueter et l'amener au laboratoire.

2.2.2 COLORATION AU LUGOL

- **Matériels**
 - Microscope binoculaire
 - Lame porte objet
 - Lame couvre objet
- **Réactifs**
 - Lugol dilué 5 fois
 - Mode opératoire

Une portion de selles est mélangée avec la goutée de Lugol sur la lame P. objet la préparation est couverte moyennant la lamelle. La lecture est réalisée au microscope avec l'objectif 10 et 40 X.

2.2.3 MÉTHODE DE CONCENTRATION DE THEBAUT

- **Matériels**
 - Microscope binoculaire
 - La balance de précision
 - Lame porte objet
 - Lame couvre objet
 - Pipette de transfert
 - Centrifugeuse
 - Tube
 - Gaz (chinois métallique)
- **Réactifs**
 - Solution d'acide trichloroacétique formolée, ethersulfirique), Lugol
 - Verre à pied
 - Ballon à décanter

• **Mode opératoire**

Technique: délayer les selles dans la solution d'acide trichloracétique formolée à raison d'un volume de selles pour 10 volumes de liquide de dilution sur un chinois métallique (Gaz) et recueillir le filtrat dans un verre à pied. Laisser déposer au moins 2 minutes pour que les résidus lourds se rassemblent au fond du verre. Verser alors le surnageant dans le ballon à décanter et ajouter un volume égal d'Ether sulfurique. Emulsionner par agitation vigoureuse.

Laisser déposer au moins pendant 2 minutes. Soutir le liquide clair dans un tube à centrifuger. S'il y a encore un dépôt abondant au fond du ballon à décanter, laisser de côté le 1^{er} millilitre de façon à ne garder que le liquide clair, centrifuger (1800 tours/minutes). Recueillir et examiner le culot.

3 PRÉSENTATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

3.1 PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des examens des selles au Laboratoire sont repris à l'annexe 1. Pendant nos manipulations, nous exprimons les résultats par lame, c'est-à-dire le résultat global de toute la préparation en déterminant le nombre de tous les éléments rencontrés dans la préparation entière. Pour une lame positive (+), il était question de révéler les éléments qui font de la lame positive. Pour un résultat négatif, nous confirmions cette dernière après avoir lu deux à trois préparations.

C'est ainsi que sur 50 échantillons, 13 cas ont été positifs par la méthode de coloration directe au Lugol et 37 négatifs par la même méthode. Par contre 39 cas ont été positifs après concentration de THEBAUT et 11 cas négatifs par la même méthode. Aussi à partir du tableau en annexe n°1, nous constatons que sur 50 échantillons,

Les résultats obtenus au laboratoire sont repris dans le tableau 1 suivant:

Tableau 1. Cas positifs et Négatifs des kystes selon les classes

Taille de l'échantillon	Classe	Fréquence	Examen après coloration directe au lugol				Examen après concentration de Thebaut			
			+	%	-	%	+	%	-	%
50	1ère année	15	7	14	8	16	14	28	1	2
	II ^{ème} année	13	4	8	9,	18	10	20	3	6
	III ^{ème} année	22	2	4	20	40	15	30	7	14
Total		50	13	26	36	74	39	78	11	22

Selon ce tableau, les cas positifs des selles correspondant aux classes de I^{ère} année, II^{ème} année, III^{ème} année étant respectivement de 14%, 8%, 4 % par l'examen direct au lugol augmente respectivement à 28 %, 20 %, 30 % dans l'examen après concentration de THEBAUT. Aussi les cas négatifs des selles correspondant aux classes de I^{ère} année, II^{ème} année, III^{ème} année étant respectivement de 16 %, 18%, 40 % par l'examen direct au Lugol diminue respectivement à 2 %, 6 %, 14% par la méthode après concentration de Thebaut.

Tableau 2. Cas positifs et cas négatifs des kystes pour chacune de deux méthodes

Type d'examen / Résultat	Après coloration directe au lugol		Après concentration de Thebaut	
	Effectif	%	Effectif	%
Positif	13	26	39	78
Négatif	37	74	11	22
Total	50	100	50	100

De l'observation de ce tableau ci-après, il ressort d'un d'échantillon de 50 ans, on a 13 cas positifs présentant les kystes à l'examen après coloration directe au Lugol soit 26% contre 39 cas positifs après concentration de Thebaut soit 78%.

Tableau 3. Fréquence de consistance des selles, les résultats positifs et les résultats négatifs, aux kystes selon la méthode utilisée

Consistance	Fréquence	%	Examen après coloration directe au lugol				Examen après concentration de THEBAUT			
			+	%	-	%	+	%	-	%
Selles Molles	15	30	1	2	14	28	10	20	5	10
Selles très molles	4	8	3	6	1	2	3	6	1	2
Moulées	31	62	9	18	22	44	26	52	5	10
Total	50	100	13	26	37	74	39	78	11	22

Selon ce tableau 3, les résultats positifs des selles molles par la méthode de coloration directe au lugol est de 2 % alors qu'après concentration, elle augmente à 20 %. En même temps les résultats négatifs des selles molles par la méthode de coloration directe au lugol sont de 28% alors qu'après concentration ils diminuent à 10 %. Les résultats positifs des selles très molles par la méthode de coloration directe au Lugol est la même que par la méthode après concentration de Thebaut, soit 6 % pour les 2 méthodes dans le cas des selles très molles et 2 % des résultats négatifs par les deux méthodes.

Enfin, les résultats positifs des selles moulées par la méthode de coloration directe au Lugol sont de 18 % alors qu'après concentration, ils augmentent à 52 % et les résultats négatifs des selles moulées par la méthode de coloration directe au Lugol sont de 44 % alors qu'après concentration, ils diminuent à 10 %.

En somme, avec une taille de 50 échantillons seulement 13 cas ont été positifs, soit 26 % après examen direct, contre 39 cas positifs soit 78 % après concentration de Thebaut.

Tableau 4. Cas négatifs aux kystes pour la méthode de coloration directe au Lugol comparés à leurs résultats après concentration de Thebaut

L'échantillon	Lugol		Thebaut	
	Effectif cas négatifs	%	Effectif cas négatifs	%
37	37	74	11	22

Des 37 cas déclarés négatifs après coloration directe au Lugol, 26 soit 72,22 % se sont révélés positifs après concentration de Thebaut.

3.2 INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

En utilisant le test de chi-deux (chi-carré), nous aurons ce qui suit conformément aux résultats présentés dans le tableau n°2: Si la méthode utilisée n'avait aucun rapport avec les résultats de l'analyse, au Laboratoire, et si cette variable " méthode appliquée" était parfaitement indifférente, on s'attendrait à ce que le pourcentage des résultats positifs et négatifs soient le même dans l'une ou l'autre méthode.

Cependant, la situation effectivement constatée s'écarte de cette hypothèse nulle. D'où il y a lieu d'appliquer un test statistique, en l'occurrence le test chi-deux pour éprouver l'hypothèse nulle qui stipule que le résultat par la méthode à la coloration au lugol serait le même que celui de la méthode à la concentration de Thebaut.

$$X^2 = \sum \frac{(fo - ft)^2}{ft} = \text{avec } \sum = \text{somme,}$$

Fo = Fréquence Observée et ft = Fréquence Théorique

Le tableau de contingence s'exprime de la manière suivante :

fo	ft	$\frac{(fo - ft)^2}{ft}$
13	26	6.5
39	26	6.5
37	24	7.04
11	24	7.04
Total		27.08 = x^2_{obs}

$$\alpha = 0.5 \text{ et } ddl = 1 \Rightarrow X^2_{th} = 3.84$$

$$x^2_{obs} = 27.08 \text{ supérieur à } x^2_{crit} = 3,84$$

L'hypothèse nulle est rejetée selon laquelle la méthode au Lugol donnerait les mêmes résultats que la méthode de Thebaut.

4 CONCLUSION

Notre préoccupation majeure était de savoir la quelle de deux méthodes serait plus fiable. Au cours de cette recherche, les objectifs poursuivis pour l'intérêt de notre population exposée à une infection continue sont:

- Fixer l'opinion des techniciens de laboratoire sur la méthode désormais fiable pour le dépistage des kystes de protozoaires pour identifier les pathogènes;
- Eclaircir rapidement le diagnostic pour permettre une décision urgente au personnel soignant

Pour réaliser ce travail nous avons procédé à la récolte aléatoire de 50 échantillons des selles chez les enfants de 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} année d'études primaires à l'école TSAKA-TSAKA située en Ville de Butembo. Ces échantillons ont été examinés au Laboratoire Central de l'U.C.G. (Université Catholique du Graben) en mai 2018 par deux méthodes d'analyse à savoir:

- La coloration directe au Lugol;
- La méthode de Thebaut

Les résultats sont clairs, la deuxième méthode améliore la mise en évidence des kystes des protozoaires soit 39 cas sur 50 ou 78% de l'effectif global.

Aussi cette méthode démontre une hétérogénéité des parasites dans un même échantillon allant jusqu'à 30,76% soit 4 cas sur 13 ayant présenté une espèce autre que celles trouvées dans les examens à la coloration au Lugol.

La méthode de Thebaut décèle les parasites même s'ils sont moins nombreux dans l'échantillon. Elle révèle des kystes dans un examen direct au Lugol sorti négatif. Nous confirmons donc que la méthode de concentration de Thebaut est performante pour la mise en évidence des kystes d'amibes dans un échantillon des selles.

REFERENCES

- [1] Herve HARANT, 1963, *parasitologie médicale et pathologie exotique*, 5 (me édition, librairie maloin S.A, Paris.
- [2] VASOMBOLWA K, 2002, *séminaire de microbiologie générale*, UNIKIS; Programme DES en chimie industrielle.
- [3] CROUX M et al, 1984, guide diagnostic de laboratoire Mangnen.
- [4] Roland -MARIE S.A, 1974, in documentation scientifique, laboratoire épidémiologie clinique et diagnostic thérapeutique.
- [5] GOLVAN Y-J, 1983, éléments de parasitologie médicale, éditions médicales Flammarion, Paris VI pp 49-52 et 216-240.
- [6] RAVEN et al, 2009: Environnement, 6^e éd, Boeck university, 39 B-1000 Bruxelles 687p.
- [7] SEKERAVITI, M., 1999: Essai de potabilité de l'eau de boisson du mont LUBWE, TFE, inédit, ISCA-Butembo.

ANNEXE 1. RÉSULTAT DES EXAMENS DES SELLES AU LABORATOIRE

N°	Classe	Examens macroscopique	Examens microscopiques	
			Après coloration directe au Lugol	Après concentration de THEBAUT
1	1 ^{ère} année	Molles	Négatif	Négatif
2	1 ^{ère} année	Très molles	3 kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame 1kyste d' <i>E. Coli</i> /lame	13 kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame 9 kystes d' <i>E. Coli</i> /lame
3	1 ^{ère} année	Moulées	2 kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame	13 kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame
4	II ^{ème} année	Molles	Négatif	9 kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame
5	II ^{ème} année	Moulées	2kystes d' <i>E. Coli</i> /lame	2kystes d' <i>E. coli</i> /lame; 1kyste d' <i>E. Histolytica</i> /lame
6	III ^{ème} année	Moulées	Négatif	Négatif
7	III ^{ème} année	Molles	2kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame	8 kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame
8	II ^{ème} année	Moulées	3kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame	12 kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame
9	II ^{ème} année	Moulées	3kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame	10 kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame
10	1 ^{ère} année	Moulées	10 kystes de Giardia/lame	30 kystes de giardia/lame
11	1 ^{ère} année	Moulées	1 kyste d' <i>E. Histolytica</i> /lame	14 kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame
12	1 ^{ère} année	Moulées	Négatif	5 kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame; 3 kystes d' <i>E. Coli</i> /lame
13	II ^{ème} année	Moulées	Négatif	Négatif
14	III ^{ème} année	Molles	Négatif	Négatif
15	III ^{ème} année	Très molles	Négatif	Négatif
16	III ^{ème} année	Moulées	Négatif	1 kyste d' <i>E. Coli</i> /lame
17	III ^{ème} année	Très molles	17 kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame	21 kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame, 6 kystes d' <i>E. Coli</i> /lame
18	I ^{ère} année	Très molles	1 kyste d' <i>E. Histolytica</i> /lame	3kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame
19	II ^{ème} année	Molles	Négatif	Négatif
20	II ^{ème} année	Moulées	Négatif	Négatif
21	II ^{ème} année	Moulées	Négatif	1 kyste d' <i>E. Histolytica</i> /lame
22	1 ^{ère} année	Moulées	Négatif	1 kyste d' <i>E. Coli</i> /lame
23	1 ^{ère} année	Moulées	Négatif	2kystes d' <i>E. Coli</i> /lame
24	1 ^{ère} année	Molles	Négatif	2kystes d' <i>E. Coli</i> /lame
25	1 ^{ère} année	Moulées	Négatif	4kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame, 2 kystes d' <i>E. Coli</i> /lame
26	1 ^{ère} année	Molles	Négatif	2kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame, 1 kyste de Giardia/lame
27	II ^{ème} année	Moulées	Négatif	Négatif
28	III ^{ème} année	Moulées	Négatif	4 kystes d' <i>E. Coli</i> /lame
29	III ^{ème} année	Moulées	Négatif aux kystes	Négatif
30	1 ^{ère} année	Moulées	Négatif	5kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame, 2 kystes d' <i>E. Coli</i> /lame
31	II ^{ème} année	Moulées	Négatif	4kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame, 1 kyste d' <i>E. Coli</i> /lame
32	II ^{ème} année	Moulées	Négatif	2kystes d' <i>E. Coli</i> /lame
33	II ^{ème} année	Moulées	Négatif	4kystes d' <i>E. Coli</i> /lame
34	II ^{ème} année	Molles	Négatif	3kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame
35	II ^{ème} année	Moulées	2kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame	10kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame, 4 kystes d' <i>E. Coli</i> /lame
36	III ^{ème} année	Moulées	Négatif	4kystes d' <i>E. Histolytica</i> /lame
37	III ^{ème} année	Molles	Négatif	1kyste d' <i>E. Histolytica</i> /lame

38	III ^{ème} année	Moulées	Négatif	1kyste d'E. Coli/ lame
39	III ^{ème} année	Molles	Négatif	Négatif
40	III ^{ème} année	Molles	Négatif	Négatif
41	1 ^{ère} année	Moulées	2kystes d'E. Coli/ lame	12kystes d'E.Coli/lame
42	1 ^{ère} année	Moulées	20 kystes d'E. <i>Histolytica</i> /lame	40kystes d'E. <i>Histolytica</i> / lame, 11 kystes d'E. Coli/lame
43	III ^{ème} année	Molles	Négatif	4kystes d'Endolinax nana/ lame, 2Kystes d'E.Coli/lame
44	III ^{ème} année	Moulées	Négatif	40kyste d'E. <i>Histolytica</i> / lame, 11 kystes d'E. Coli/lame
45	III ^{ème} année	Moulées	Négatif	1kyste d'Endolinax nana/ Lame
46	III ^{ème} année	Moulées	Négatif	4 kystes d'E <i>Histolytica</i> /lame
47	II ^{ème} année	Molles	Négatif	3 kystes d'E. <i>Histolytica</i> /lame
48	II ^{ème} année	Moulées	Négatif	3 kystes d'E. <i>Histolytica</i> /lame, 1 kyste d'E. coli/lame
49	III ^{ème} année	Moulées	Négatif	1 kyste d'E. <i>histolytica</i> / lame, 4 kystes d'E. coli/lame
50	III ^{ème} année	Moulées	Négatif	10 kystes d'E. <i>Histolytica</i> / lame 9 kystes d'E.coli/ lame