

Protocole n° 17

Coloration « P.A.S. » des frottis, en mycologie et parasitologie

Principe :

En mycologie et parasitologie médicale, cette méthode met en évidence certains éléments parasitaires et fongiques soit sur frottis (squames cutanées, cellules de l'oropharynx, de l'œsophage, liquide de lavage broncho-alvéolaire, frottis par apposition d'organe), soit sur coupes histologiques.

Produits nécessaires à la coloration :

Réactif de Schiff Réf. 320680-	0250, 0500 ou 1000 mL
Hémalun de Mayer Réf. 320550-	1000 ou 2500 mL
Safran en solution alcoolique Réf. 369200-	0250, 0500 ou 1000 mL
HistoRAL, milieu de montage Réf. 361210-	500 mL

Matériel spécifique nécessaire non fourni :

Acide acétique – Alcool – Acétone – Ether – Acide périodique – Métabisulfite de sodium – Carbonate de lithium

Préparation des échantillons :

Les échantillons doivent être préparés conformément aux méthodes en vigueur dans le laboratoire, en l'application de l'Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale, J.O. n° 287 du 11 décembre 1999.

Mode opératoire :

Veuillez lire attentivement l'intégralité des informations qui suivent avant d'utiliser le produit.

Fixation des éléments cellulaires sur la lame

- Couvrir le frottis avec de l'acide acétique en solution aqueuse à 30% pour le fixer.
- Faire sécher le frottis en chauffant tout doucement jusqu'à évaporation totale de la solution.
- Couvrir ensuite le frottis avec un mélange alcool-acétone (1 part/1 part), attendre l'évaporation. Effectuer 3 fois cette opération.
- Couvrir enfin le frottis avec de l'éther, attendre l'évaporation. Effectuer 2 fois cette opération.

Coloration

- Refixer à l'alcool à 70° pendant 15 minutes puis couvrir le frottis avec de l'alcool à 95° pendant 15 minutes.
- Rincer à l'eau courante.
- Couvrir le frottis avec de l'acide périodique pendant 10 minutes.
- Rincer à l'eau courante.
- Couvrir le frottis avec le Réactif de Schiff pendant 16 minutes.
- Sans rincer, remplacer le Réactif de Schiff par du métabisulfite de sodium : laisser en contact pendant 6 minutes.
- Rincer à l'eau courante pendant 5 minutes.
- Couvrir le frottis avec l'Hémalun de Mayer pendant 2 minutes et 30 secondes.
- Rincer à l'eau courante (virage).
- Différencier au carbonate de lithium (solution aqueuse saturée et filtrée) pendant 15 minutes.
- Rincer à l'eau courante puis à l'alcool absolu.
- Couvrir le frottis avec le Safran alcoolique pendant 1 minute.
- Rincer à l'alcool absolu 2 à 3 fois pendant 10 minutes.
- Couvrir le frottis avec du toluène ou du xylène pendant 15 minutes
- Monter avec un milieu de montage adapté à base de toluène/xylène.

Résultats :

La réaction au P.A.S. colore en rouge plus ou moins intense :

- la paroi des éléments fongiques mycéliens et levuriformes.
- les formes prékystiques et kystiques de *Pneumocystis Carinii*.
- Certains protozoaires : les trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica* ainsi que la partie antérieure du filament dans la spore des microsporidies.
- En ce qui concerne les métazoaires, la réaction au P.A.S. facilite la mise en évidence et la reconnaissance de la membrane cuticulaire (ou lamellaire) des larves vésiculaires d'*Ecchinococcus granulosus*, agent de l'hydatidose et d'*Ecchinococcus multicularis*, responsable de l'échinococcose alvéolaire.

La réaction au P.A.S. est aussi utile pour la reconnaissance de la cuticule de nématodes tissulaires (par exemple des larves d'*Anisakis*) et des structures

tégumentaires d'arthropides (*Demodex*, *Sarcoptes*, acariens cutanés : agents de myases ; *Tunga penetrans* : agent de la sarcopsyllose ou d'organismes apparentés, pentastomes).

Recommandations et/ou notes d'utilisation :

Produit destiné à un usage exclusivement professionnel pour le Diagnostic in vitro. L'enlèvement et le traitement des déchets chimiques et biologiques doivent être effectués par une entreprise spécialisée et agréée.

Température de stockage : 15 - 25 °C.

Filtrer la solution d'Hémalun de Mayer avant chaque utilisation.

Références Bibliographiques :

SEGRETAIN G., DROUHET E., MARIAT F., *Diagnostic de laboratoire en mycologie médicale*, Maloine, 3^{ème} éd., 1974, p. 125-126.