

Protocole n° 24

Coloration trichromique modifiée de Weber

Principe :

Cette technique a été proposée pour la détection de spores de microsporidies dans les selles, dans d'autres liquides biologiques ou dans des frottis par apposition de biopsies.

Produits nécessaires à la coloration :

Formol à 10% tamponné Réf. 320720-	2500 ou 5000 mL
Chromotrope 2R Réf. 362130-	0025 g
Vert lumière haute pureté Réf. 320770-	0025 g
HistoRAL, milieu de montage Réf. 361210-	500 mL

Matériel spécifique nécessaire non fourni :

Acide acétique – Alcool – Acide phosphotungstique – Méthanol

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.

Préparation des solutions :

Solution Trichromique : 6,0 g de Chromotrope 2R, 0,15 g de Vert lumière haute pureté, 0,7 g d'acide phosphotungstique. Dissoudre ces réactifs dans 3 mL d'acide acétique glacial pendant 30 minutes. Puis les diluer dans 100 mL d'eau distillée.

Solution d'Alcool-Acide : Diluer 4,5 mL d'acide acétique dans 995,5 mL d'alcool à 90°.

Mode opératoire :

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

- Mélanger 10 mL de la suspension fécale ou d'un autre liquide biologique avec 20 mL de Formol à 10% tamponné.
- Réaliser un frottis. D'autres frottis (exemple : frottis par apposition de biopsies du grêle) ne nécessitent pas d'être fixés au formol.
- Fixer le frottis dans du méthanol pendant 5 minutes.
- Colorer le frottis avec la Solution Trichromique pendant 90 minutes.
- Rincer le frottis dans la Solution d'Alcool-Acide pendant 10 secondes puis brièvement dans l'alcool à 95°.
- Déshydrater le frottis dans l'alcool à 95° pendant 5 minutes, puis dans l'alcool absolu pendant 10 minutes.
- Passer le frottis dans un bain de xylène ou de toluène pendant 10 minutes.
- Monter avec un milieu de montage adapté à base de toluène/xylène.
- Lecture au microscope, objectif x100 à immersion.

Résultats :

Spores de microsporidies : rose plus ou moins intense.
Bactéries : vert.

On observe souvent une zone de la spore plus claire. Ceci aide à distinguer les microsporidies des levures qui sont en général de plus grande taille et qui apparaissent parfois uniformément rougeâtres.

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.

Stockage : 15 – 25 °C.

Références Bibliographiques :

WEBER R., BRYAN R.T., OWEN R.L., WILCOX C.M., GORELKIN L., VISVESVARA G.S. and the Enteric Opportunistic Infections Working Group, *Improved light-microscopical detection of Microsporidia spores in stool and duodenal aspirates*, The New England Journal of Medicine, vol. 326, n°3, janv. 1992, p. 161-166.