

Protocole n° 42

Coloration de Mann-Dominici par l'Erythrosine - Bleu de toluidine

Principe :

Cette coloration bichromique fait agir successivement un colorant cytoplasmique acide, l'Erythrosine, ou un mélange de colorants acides, Erythrosine B - Orangé G, et un colorant nucléaire basique, le Bleu de toluidine. Cette méthode permet la mise en évidence fine des cellules, en particulier dans les tissus conjonctifs, les organes hématopoïétiques et les tissus inflammatoires. Elle met bien en évidence la basophilie et l'acidophilie des cytoplasmes ainsi que les granulations des cellules sanguines.

Produits nécessaires à la coloration :

| | |
|---|-----------------------|
| Erythrosine B Réf. 350150- | 0025 ou 0100 g |
| Orangé G Réf. 315370- | 0025 ou 0100 g |
| Bleu de toluidine pur Réf. 361590- | 0025 ou 0100 g |
| Liquide de lugol Réf. 367300- | 0240, 1000 ou 2500 mL |
| HistoRAL, milieu de montage Ref. 361210- | 500 mL |

Matériel spécifique nécessaire non fourni :

Hyposulfite de sodium – Acide acétique – Eau distillée

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 d'Erythrosine B - Orange G : Dissoudre à part 0,2g d'Erythrosine B dans 50mL d'eau distillée puis 1g d'Orangé G dans 50mL d'eau distillée. Mélanger les deux solutions.

Solution de Bleu de toluidine : Dissoudre 1g de Bleu de toluidine pur dans 100mL d'eau distillée et filtrer immédiatement avant emploi.

Solution d'acide acétique : Préparer une solution aqueuse à 0,5% d'acide acétique.

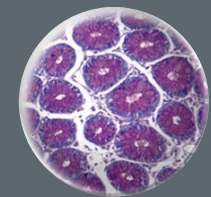
Solution d'hyposulfite de sodium : Préparer une solution aqueuse à 3% et 5% d'hyposulfite de sodium.

Mode opératoire :

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

Il est obligatoire de fixer les pièces dans un fixateur chromique (Zenker, Helly).

- Déparaffiner puis hydrater la coupe.
- Au cours du Déparaffinage, éliminer éventuellement les précipités mercuriels qui gêneraient la lecture des préparations de la façon suivante :
 - Après le bain d'alcool à 95° du déparaffinage, plonger la lame 3 minutes dans une solution d'éthanol iodé (0,5 g d'iode dans 100 mL d'éthanol à 80°).
 - Rincer brièvement à l'eau.
 - Transférer dans une solution aqueuse à 3% d'hyposulfite de sodium pendant 3 minutes.
 - Bien rincer à l'eau courante puis rincer à l'eau distillée. La coupe est alors prête pour la coloration.
- Passer dans le Liquide de lugol pendant 5 minutes.
- Transférer dans une solution aqueuse à 5% d'hyposulfite de sodium pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau.
- Passer dans une solution aqueuse à 0,5% d'acide acétique pendant 1 minute.
- Colorer dans la solution d'Erythrosine B - Orangé G pendant 15 minutes environ (la teinte doit être rose franc. Ne pas surcolorer car le Bleu de toluidine ne prendrait plus sur les cytoplasmes basophiles).
- Rincer dans la solution d'acide acétique pendant 5 minutes.
- Colorer sur lame par la solution de Bleu de toluidine, fraîchement filtrée, pendant 2 à 3 minutes.
- Rincer rapidement dans l'eau distillée puis dans une solution aqueuse à 0,5% d'acide acétique.
- Egoutter. Essuyer très soigneusement les 2 faces de la lame et essorer au papier Joseph, très rapidement, sans laisser sécher la coupe. Plonger aussitôt, et brusquement, dans l'éthanol absolu. Agiter pendant 2 à 3 secondes.



- Porter dans un mélange éthanol absolu-toluène (2 parts/1 part). Quand le rose de l'Erythrosine commence à apparaître, plonger dans du toluène pur. Examiner alors au microscope : si la différenciation est insuffisante, recommencer au point précédent.
- Monter avec un milieu de montage adapté à base de toluène/xylène.

Résultats :

Noyaux

chromatine : bleu foncé.

nucléoles : rouge

Cytoplasmes

basophiles : bleu plus accentué.

acidophiles : rose à rouge

Granulations des leucocytes

neutrophiles : violacé

éosinophiles : rouge orangé vif.

basophiles : bleu foncé

Hématies : jaune orangé

Collagène : rose pâle

Fibres élastiques : rose vif

Bactéries (surtout celles à Gram +) : intensément bleu

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 à l'abri de la lumière.

Les temps de coloration peuvent varier en fonction de la nature du tissu et de l'épaisseur de la coupe.

Références Bibliographiques :

GANTER P., JOLLES G., *Histochimie normale et pathologique*, éd. GAUTHIER-VILLARS, vol. 2, 1970, p. 1436-1437.