

INDICATIONS

Les réactifs de l'acide périodique – Schiff (PAS) sont destinés à « Usage diagnostique *in vitro* ».

La procédure de coloration PAS de Sigma-Aldrich offre des procédures standard et par micro-ondes pour la mise en évidence des lymphocytes et des mucopolysaccharides. Le schéma de coloration des lymphocytes est utile lors de la prise de décisions thérapeutiques dans des cas avérés de leucémie lymphoïde. La réaction du PAS dans les coupes de tissus est utile pour la mise en évidence des mucopolysaccharides. Le procédé de digestion enzymatique (α -amylase), suivie de la coloration PAS, peut aider à diagnostiquer une maladie d'Andersen.

La procédure de coloration PAS peut également être utilisée dans la mise en évidence des organismes fongiques dans les coupes de tissus.²

Lorsqu'ils sont traités avec de l'acide périodique, les glycoles sont oxydés en aldéhydes. Après la réaction avec le réactif de Schiff (un mélange de pararosaniline et de métabisulfite de sodium, un adduct de pararosaniline est libéré et colore les éléments cellulaires contenant du glycol.¹ Cette réaction peut être effectuée sur des préparations de frottis de sang, de moelle osseuse ou de tissus ou sur des coupes de tissus.^{2,3} Lorsqu'il est réalisé sur des frottis de sang ou de moelle osseuse, ce test peut être utile pour reconnaître certains cas d'érythroleucémie et de leucémie lymphoblastique aiguë.⁴

La digestion enzymatique (α -amylase) peut être utilisée pour aider à diagnostiquer une maladie d'Andersen. L'enzyme hydrolyse l'amidon, le glycogène et les produits de dégradation qui se forment dans les polysaccharides présents dans les tissus. Les produits inutiles résultant du procédé de digestion sont rincés avant la coloration PAS.²

Les procédures de Sigma-Aldrich incluent les techniques de PAS pour une coloration rapide au micro-ondes.^{6,8}

RÉACTIFS

SOLUTION D'ACIDE PÉRIODIQUE, référence N° 395-1

Acide périodique, 1 g/dl.

REACTIF DE SCHIFF, référence N° 395-2

Chlorhydrate de pararosaniline à 1 % et métabisulfite de sodium à 4 % dans de l'acide chlorhydrique, 0,25 mol/l.

SOLUTION D'HEMATOXYLINE, Gill N° 3, réf. catalogue GHS-3

Hématoxyline certifiée, 6 g/l, iodate de sodium, 0,6 g/l, sulfate d'aluminium, 52,8 g/l et stabilisant.

CONSERVATION ET STABILITÉ :

Conserver la solution d'acide périodique et le réactif de Schiff au réfrigérateur (2–8 °C). Conserver la solution d'hématoxyline, Gill N° 3 à température ambiante (18–26 °C). Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur les étiquettes.

ALTÉRATION :

Éliminer la solution d'hématoxyline, Gill N° 3 si la solution devient marron (trop oxydée par l'air) ou violette (perte d'acidité) ou lorsque la durée nécessaire à une coloration adaptée dépasse de plus de 5 minutes la durée recommandée dans la procédure.

PRÉPARATION :

La solution d'acide périodique, le réactif de Schiff et la solution d'hématoxyline, Gill N° 3 sont prêts à l'emploi.

Le FIXATEUR DE FORMOL-ETHANOL se prépare en mélangeant 5 ml de formaldéhyde avec 45 ml d'éthanol à 95 % (alcool réactif). Préparer une solution fraîche chaque jour et la conserver dans un récipient bien fermé.

PRÉCAUTIONS :

Suivre les précautions habituelles observées lors de la manipulation de réactifs de laboratoire. Éliminer les déchets selon les règlements locaux, départementaux, régionaux ou nationaux en vigueur. Pour les dernières informations sur les risques ou la sécurité, se reporter à la fiche technique du produit.

Les lames de contrôle PAS TISSUE-TROL sont des coupes de tissus humains inclus en paraffine contenant du PAS et doivent être considérées comme potentiellement infectieuses.

Informations sur les risques et la sécurité (Etats-Unis)

La solution d'acide périodique est CORROSIVE. Provoque des brûlures. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Retirer immédiatement tout vêtement contaminé. Porter des vêtements protecteurs et des gants, ainsi qu'une protection du visage et des yeux adaptés.

Le réactif de Schiff est TOXIQUE. Nocif en cas d'ingestion. Provoque des brûlures. Susceptible de provoquer un cancer. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs et des gants, ainsi qu'une protection du visage et des yeux adaptés. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette du produit si possible). Usage limité aux professionnels. Éviter toute exposition – obtenir des instructions spécifiques avant toute utilisation.

La solution d'hématoxyline Gill N° 3 est NOCIVE. Très toxique en cas d'inhalation. Irritation des yeux, de l'appareil respiratoire et de la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs appropriés. Organes cibles : foie et reins.

L'alcool réactif est INFLAMMABLE et IRRITANT. Irritation des yeux, de l'appareil respiratoire et de la peau. Conserver le récipient bien fermé. Tenir éloigné des sources d'ignition – défense de fumer. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs appropriés.

Le xylène est INFLAMMABLE et IRRITANT. Risques possibles de diminution de la fertilité. Peut être dangereux pour le fœtus. Nocif par inhalation et en cas de contact avec la peau. Irritation du système respiratoire et de la peau. Risques de lésions oculaires graves. Tenir éloigné des sources d'ignition – défense de fumer. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs et des gants, ainsi qu'une protection du visage et des yeux adaptés. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette du produit si possible).

Informations sur les risques et la sécurité (Europe)

La solution d'acide périodique est CORROSIVE. Provoque des brûlures. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Retirer immédiatement tout vêtement contaminé. Porter des vêtements protecteurs et des gants, ainsi qu'une protection du visage et des yeux adaptés.

Le réactif de Schiff est TOXIQUE. Provoque des brûlures. Susceptible de provoquer un cancer. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs et des gants, ainsi qu'une protection du visage et des yeux adaptés. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette du produit si possible). Usage limité aux professionnels. Éviter toute exposition – obtenir des instructions spécifiques avant toute utilisation.

La solution d'hématoxyline Gill N° 3 est NOCIVE. Très toxique en cas d'inhalation. Irritation des yeux, de l'appareil respiratoire et de la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs appropriés.

L'alcool réactif est HAUTEMENT INFLAMMABLE et IRRITANT. Hautement inflammable. Irritation des yeux, de l'appareil respiratoire et de la peau. Conserver le récipient bien fermé. Tenir éloigné des sources d'ignition – défense de fumer. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau, et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs appropriés.

Le xylène est NOCIF. Inflammable. Nocif par inhalation et en cas de contact avec la peau. Irritation de la peau. Éviter tout contact avec les yeux.

PROTOCOLE

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS :

Il est recommandé de prélever et de conserver les échantillons conformément aux directives du Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale M29-A2. Aucune méthode d'analyse actuelle ne garantit totalement que les échantillons de sang ou de tissus ne transmettent pas d'agents infectieux. Par conséquent, tous les échantillons de sang ou de tissus doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

On utilise des frottis de sang total, de sang traité sur EDTA ou héparine ou des frottis de moelle osseuse fraîchement préparés. Les fixer dès que possible.⁴

Pour les polysaccharides, les tissus fixés dans du formol neutre tamponné à 10 %, une solution de Zenker ou de Bouin peuvent être utilisés.² A noter que certains carbohydrates sont solubles dans l'eau.³ Pour la mise en évidence du glycogène, le liquide de Carnoy, le liquide de Gendre ou le formol alcoolique acide sont recommandés.² Le délai nécessaire à l'extraction de l'enzyme peut être prolongé lorsque le tissu est fixé dans un fixateur contenant de l'acide picrique.² Couper les coupes de tissus à 5 microns.

MATÉRIELS SPECIFIQUES NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS :

Solution de formaldéhyde à 37 %

Alcool réactif

Filtre papier Joseph N° 4

Des lames de contrôle PAS, telles que les PAS TISSUE-TROL de Sigma, référence N° P8814, doivent être incluses dans chaque test.

Procédures au micro-ondes uniquement :

Four micro-ondes ACCUMATE™ H2100, références N° A 9084 (110 v) ou A 9209 (220 v)

Jarre de Coplin avec couvercles à événements

Substitut concentré d'eau de Scott

α -amylase, Type VI-B, provenant de pancréas de porc (pour la procédure d'extraction de l'enzyme uniquement)

REMARQUES :

En cas d'utilisation du micro-ondes H2100 de Sigma-Aldrich, consulter le manuel d'utilisation du fabricant.

Des frottis de sang préparés à partir d'individus cliniquement sains peuvent être inclus à des fins de contrôle. Les leucocytes polymorphonucléaires présenteront une coloration cytoplasmique rouge prononcée. Les coupes de tissus, connues comme étant positives au PAS et/ou contenant du glycogène doivent être incluses à chaque fois qu'une coloration est effectuée. Sigma-Aldrich propose le PAS TISSUE-TROL™, référence N° P 8814 à cet effet.

Les données obtenues avec cette procédure permettent uniquement de faciliter le diagnostic et doivent être révisées conjointement avec d'autres tests ou informations sur les diagnostics cliniques.

PROTOCOLE :

I. PRÉPARATIONS DE FROTTIS DE SANG, DE MOELLE OSSEUSE OU DE TISSUS

Procédure standard :

- Après les avoir laissés sécher à l'air, fixer les frottis de sang pendant **1 minute** à **température ambiante** dans un fixateur de formol-éthanol.
- Rincer les lames pendant **1 minute** sous un filet d'eau du robinet.

3. Immerger les lames dans la solution d'acide périodique, référence N° 395-1, pendant **5 minutes à température ambiante**.
4. Rincer les lames dans de l'eau distillée, changée plusieurs fois.
5. Immerger les lames dans le réactif de Schiff, référence N° 395-2, pendant **15 minutes à température ambiante**.
REMARQUE : Après utilisation, reboucher immédiatement le réactif de Schiff et le remettre au réfrigérateur (2-8 °C).
6. Laver les lames sous l'eau du robinet pendant **5 minutes**.
7. Contre-colorer les lames dans la solution d'hématoxyline, Gill N° 3, référence N° GHS-3, pendant **90 secondes**.
8. Rincer les lames sous l'eau du robinet pendant **15 à 30 secondes**, les laisser sécher à l'air et les examiner au microscope avec un objectif à immersion dans l'huile (900X). Les lames peuvent être montées sur un milieu de montage à base de toluène ou de xylène.

Procédures par micro-ondes :

1. Après les avoir laissés sécher à l'air, fixer les frottis pendant **1 minute à température ambiante** dans le fixateur de formol-éthanol.
2. Rincer les lames pendant **1 minute** sous un filet d'eau du robinet.
3. Placer les lames dans **40 ml** de solution d'acide périodique contenue dans une jarre de Coplin en plastique.
4. Passer au four micro-ondes **800 watts** pendant **10 secondes**.
5. Bien rincer dans de l'eau déminéralisée changée plusieurs fois.
6. Placer les lames dans **40 ml** de réactif de Schiff contenu dans une jarre de Coplin en plastique.
7. Passer au four micro-ondes **800 watts** pendant **15 secondes**. Mélanger la solution avec une pipette Beral ou une tige d'applicateur et laisser incuber pendant **1 minute**.
8. Rincer sous un filet d'eau chaude du robinet pendant **5 minutes**.
9. Placer les lames dans **40 ml** de solution d'hématoxyline, Gill N° 3, contenue dans une jarre de Coplin en plastique.
10. Passer au four micro-ondes **800 watts** pendant **10 secondes**.
11. Rincer sous l'eau du robinet pendant **1 à 2 minutes**, puis bleuir dans un Substitut concentré d'eau de Scott, à **température ambiante**.
12. Rincer sous l'eau du robinet. Laisser sécher à l'air.
13. Les lames peuvent être montées sur un milieu de montage à base de toluène ou de xylène.

II. COUPES DE TISSUS

Procédure standard :

1. Déparaffiner et hydrater les coupes avec de l'eau déminéralisée.
2. Immerger les lames dans la solution d'acide périodique, référence N° 395-1, pendant **5 minutes à température ambiante** (18-26 °C).
3. Rincer les lames dans de l'eau distillée changée plusieurs fois.
4. Immerger les lames dans le réactif de Schiff, référence N° 395-2, pendant **15 minutes à température ambiante** (18-26 °C).
5. Laver les lames sous l'eau du robinet pendant **5 minutes**.
6. Contre-colorer les lames dans la solution d'hématoxyline, Gill N° 3, référence N° GHS-3, pendant **90 secondes**.
7. Rincer les lames sous l'eau du robinet.
8. Déshydrater, nettoyer et monter les coupes sur un milieu de montage à base de toluène ou de xylène.

Procédures par micro-ondes pour la digestion enzymatique (α -amylase) :

1. Utiliser des lames de test en double. En étiqueter une pour la digestion enzymatique et l'autre pour la coloration PAS uniquement.
REMARQUE : Les lames enduites d'un adhésif tissulaire sont recommandées. Ne pas inclure les coupes dans la celloïdine lors de la digestion enzymatique.²
2. Déparaffiner et hydrater les lames avec de l'eau déminéralisée.
3. Préparer la solution de travail de l'enzyme en diluant **0,2 g d' α -amylase**, référence N° 3176 dans **40 ml** d'eau déminéralisée. Bien mélanger et placer dans une jarre de Coplin en plastique. Préparer juste avant l'utilisation.
4. Passer au four micro-ondes **600 watts** pendant **25 secondes**.
5. Retirer les lames de la jarre de Coplin et rincer la lame digérée sous l'eau du robinet pendant **5 minutes**.
6. En utilisant des lames digérées et non digérées, poursuivre la procédure par micro-ondes pour les tissus, étape 2.

Procédures par micro-ondes :

1. Déparaffiner et hydrater avec de l'eau déminéralisée.
2. Placer les lames dans **43 ml** de solution d'acide périodique contenue dans une jarre de Coplin en plastique. Couvrir la jarre avec un couvercle non serré, ou utiliser des couvercles dans lesquels des trous ont été percés.
3. Passer au four micro-ondes **800 watts** pendant **10 secondes**.
4. Bien rincer dans de l'eau déminéralisée changée plusieurs fois.
5. Placer les lames dans **40 ml** de réactif de Schiff contenu dans une jarre de Coplin en plastique.
6. Passer au four micro-ondes **800 watts** pendant **15 secondes**. Mélanger la solution avec une pipette Beral ou une tige d'applicateur et laisser incuber pendant **1 minute**.
7. Rincer sous un filet d'eau du robinet pendant **5 minutes**.
8. Placer les lames dans la solution d'hématoxyline, Gill N° 3 ou la solution de couleur vert clair contenue dans une jarre de Coplin en plastique.
9. Passer au four micro-ondes **800 watts** pendant **10 secondes**.
10. a. En cas d'utilisation de l'hématoxyline de Gill, rincer sous l'eau du robinet pendant **1 à 2 minutes**, puis bleuir dans un Substitut concentré d'eau de Scott, à **température ambiante**. Rincer sous l'eau du robinet. Déshydrater, nettoyer et monter.
b. En cas d'utilisation d'une solution de couleur vert clair, rincer rapidement dans de l'eau déminéralisée, déshydrater rapidement, nettoyer et monter.

PERFORMANCE

Les substances positives au PAS se colorent entre le rose et le rouge et les noyaux sont bleus. Une lame d'extraction d'enzyme (α -amylase) n'aura aucune coloration PAS visible de glycogène lorsqu'elle sera comparée à la lame de contrôle positive au glycogène non digéré.



Si les résultats observés sont différents des résultats escomptés, contacter le Service Technique d'Assistance Sigma-Aldrich.

RÉFÉRENCES

1. Hotchkiss RD: A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Arch Biochem 16:131, 1948
2. Sheehan DC, Hrapchak BB: Theory and Practice Histotechnology, 2nd ed. CV Mosby, St. Louis, (MO), pp 52, 164-167, 1980
3. Culling CFA, Allison RT, Barr WT: Cellular Pathology Technique, 4th ed. Butterworths, pp 216-220, 1985
4. Davey FR, Nelson DA: Periodic Acid Schiff (PAS) Stain. IN Hematology, 2nd ed. WJ Williams, E Buetler, AJ Erslev, RW Rundles, McGraw-Hill, New York, pp 1630-1632, 1977
5. Thompson SW: Selected Histochemical and Histopathological Methods, CC Thomas, Springfield, (IL), pp 520-539, 1966
6. Leong AS-Y, Milios J: Rapid immunoperoxidase staining of lymphocyte antigens using microwave irradiation. J Pathol 148:183, 1986
7. Brinn NT: Rapid metallic histologic staining using the microwave oven. J Histotechnol 6:125, 1983
8. Valle S: Special stains in the microwave oven. J. Histotechnol 9:237, 1986

Sigma-Aldrich, Inc. garantit la conformité de ses produits aux informations contenues dans cette notice et dans les autres notices Sigma-Aldrich. L'utilisateur doit s'assurer que le(s) produit(s) est/sont adapté(s) à l'utilisation qu'il souhaite en faire. D'autres conditions générales peuvent s'appliquer. Voir au verso de la facture ou du bordereau de commande les conditions de vente et autres informations.

Protocole N° 395
Révision précédente : 2003-02
Révision : 2003-09

  AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Royaume-Uni

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 Etats-Unis +1 314 771 5765
Assistance technique : appeler en PCV au +1 314 771 3122
ou adresser un email à clintech@sial.com
Pour commander : appeler en PCV au +1 314 771 5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Allemagne 49-7329-970