

Protocole n° 13

Coloration de Ziehl-Armand

Principe :

La coloration de Ziehl-Armand, variante de la technique de Ziehl-Neelsen, permet une détection des mycobactéries ou Bacilles Acido-Alcoolo-Résistants (B.A.A.R.) dont la structure très particulière de la paroi rend difficile la pénétration d'agents décolorants. Cette propriété permet aux B.A.A.R. de conserver la coloration par la Fuchsine de Ziehl. L'utilisation du Colorant d'Armand permet de réaliser simultanément la décoloration et contre-coloration de toutes les bactéries non acido-alcoolo-résistantes, des éléments cellulaires et du fond de la préparation. Dans cette technique de coloration, le temps de contact avec la Fuchsine de Ziehl peut être réduit grâce à l'utilisation des micro-ondes.

Produits nécessaires à la coloration :

Fuchsine de Ziehl Réf. 320490-	0125, 0500, 1000 ou 2500 mL
Colorant d'Armand Réf. 360100-	0125 ou 1000 mL

Matériel spécifique nécessaire non fourni :

Platine chauffante, Four à micro-ondes.

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.

Il est nécessaire de réaliser une fixation préalable. Se reporter à la note 01 : Fixation des frottis bactériens pour la détection des mycobactéries.

Mode opératoire :

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

Technique de Coloration sur platine chauffante

Temps de réalisation : 11 à 12 minutes

- Placer le frottis fixé sur une platine chauffante et recouvrir le frottis avec la Fuchsine de Ziehl.
- Laisser en contact 10 minutes, en ajoutant de temps en temps de la Fuchsine de Ziehl pour éviter la dessiccation.
- Rejeter le colorant et Rincer à l'eau courante.
- Recouvrir la lame avec le Colorant d'Armand pendant 1 à 2 minutes.
- Rincer brièvement à l'eau courante et laisser sécher le frottis.
- Lecture au microscope, objectif x100 à immersion.

Technique de Coloration rapide utilisant les micro-ondes

Temps de réalisation : 1 minute et 30 secondes à 2 minutes

- Placer un support de lame dans une boîte en plastique refermable hermétiquement.
- Placer le frottis fixé sur le support de lame et recouvrir le frottis avec la Fuchsine de Ziehl puis refermer la boîte.
- Placer la boîte et son contenu dans un four à micro-ondes, allure maximale pendant 1 minute.
- Rejeter le colorant et Rincer à l'eau courante.
- Recouvrir la lame avec le Colorant d'Armand pendant 30 secondes à 1 minute.
- Rincer brièvement à l'eau courante et laisser sécher le frottis.
- Lecture au microscope, objectif x100 à immersion.

Résultats :

B.A.A.R. : rose.

Fond de la préparation : 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.

Température de stockage : 15 – 25 °C.

En fonction de l'épaisseur du frottis, il peut être nécessaire d'augmenter le temps de la Fuchsine de Ziehl.

Afin de réaliser un screening des échantillons de prélèvements, Il est conseillé d'utiliser au préalable une technique de fluorescence à l'auramine.

La constatation d'un seul bacille sur toute la lame laisse planer un doute et doit toujours entraîner la répétition de l'examen microscopique sur un autre prélèvement.

Dans tous les cas, la réponse du bactériologiste devra toujours faire référence au nombre de champs observés et être, par conséquent, exprimée sous forme de

« absence de BAAR sur 200 (ou 100) champs microscopiques » et non sous forme de « bacilloscopie négative ».

La réponse « bacilloscopie positive » est également une mauvaise réponse car elle ne renseigne pas sur la richesse relative en bacilles du crachat. Un point essentiel est de donner un résultat quantitatif.

Références Bibliographiques :

GROSSET J., CATALAN F., LEVENTIS S., *Le problème actuel des mycobactéries*, Biologiste et Praticien, n° 39, 1979, p. 1-22.

PACAUD G., *Coloration en mycobactériologie*, Réactifs RAL, 1977, p. 5-6.

PACAUD G., *Les colorations dans la pratique quotidienne en mycobactériologie*, ATEB, Journée Technique Parisienne, mars 1977.