

Protocole n° 108

Kit Fluo-RAL

(Réf. : 359000-0000)

Coloration optimisé à l'Auramine pour la détection des mycobactéries

Principe :

Le kit Fluo-RAL permet une détection rapide par fluorescence des mycobactéries ou Bacilles Acido-Alcool-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 à l'auramine malgré une décoloration par l'acide et l'alcool. Les bactéries non acido-alcool-résistantes et les éléments cellulaires sont décolorés puis contre-colorés par le rouge thiazine.

Description du kit :

Fixateur Fluo-RAL	1 x 250 mL
Auramine Fluo-RAL	1 x 125 mL
Solution phéniquée pour Auramine Fluo-RAL	1 x 125 mL
Décolorant de Degommier Fluo-RAL	1 x 250 mL
Rouge thiazine Fluo-RAL	1 x 125 mL
Solution phéniquée pour Rouge thiazine Fluo-RAL	1 x 125 mL

Le coffret permet de réaliser environ 200 lames.

Temps de réalisation : 32 minutes (Protocole Standard recommandé)
18 minutes et 30 secondes (Protocole court)
3 minutes et 30 secondes (Protocole rapide)

Recharges disponibles :

Fixateur Fluo-RAL Réf. 362115-	1000 mL
Auramine Fluo-RAL Réf. 362325-	0500 mL
Solution phéniquée pour Auramine Fluo-RAL Réf. 362530-	0500 mL

Décolorant de Degommier Fluo-RAL Réf. 362210-	1000 mL
Rouge thiazine Fluo-RAL Réf. 362780-	0500 mL
Solution phéniquée pour Rouge thiazine Fluo-RAL Réf. 362610-	0500 mL

Matériel spécifique nécessaire non fourni :

Microscope à fluorescence avec un jeu de filtres FITC

Auramine : Ex. 430 nm ; Em. 510 nm
Rouge Thiazine : Ex. 510 nm ; Em. 600 nm

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 :

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

Préparer les solutions de travail 1 et 2 comme suit :

Solution 1 (Auramine) : mélanger extemporanément en quantités égales et selon vos besoins* l'Auramine Fluo-RAL (flacon ②) et la Solution phéniquée pour Auramine Fluo-RAL (flacon ③).

Solution 2 (Rouge thiazine) : mélanger extemporanément en quantités égales et selon vos besoins* le Rouge thiazine Fluo-RAL (flacon ⑤) et la Solution phéniquée pour Rouge thiazine Fluo-RAL (flacon ⑥).

Protocole Standard (recommandé)

- Fixer le frottis avec le Fixateur Fluo-RAL (flacon ①) 5 minutes
- Rincer à l'eau distillée 1 minute
- Colorer avec la solution 1 15 minutes
- Rincer à l'eau distillée 1 minute
- Décolorer avec le Décolorant de Degommier Fluo-RAL (flacon ④) 3 minutes
- Rincer à l'eau distillée 1 minute
- Contre-colorer avec la solution 2 5 minutes



- Rincer à l'eau distillée 1 minute
- Laisser sécher à l'abri de la lumière

Protocole court

- Fixer le frottis avec le Fixateur Fluo-RAL (flacon ❶) 3 minutes
- Rincer à l'eau 1 minute
- Colorer avec la solution 1 10 minutes
- Rincer à l'eau 1 minute
- Décolorer avec le Décolorant de Degommier Fluo-RAL (flacon ❷) 30 secondes
- Rincer à l'eau 1 minute
- Contre-colorer avec la solution 2 1 minute
- Rincer à l'eau 1 minute
- Laisser sécher à l'abri de la lumière

Protocole rapide

- Fixer le frottis avec le Fixateur Fluo-RAL (flacon ❶) 1 minute
- Rincer à l'eau
- Colorer avec la solution 1 1 minute
- Rincer à l'eau
- Décolorer avec le Décolorant de Degommier Fluo-RAL (flacon ❷) 30 secondes
- Rincer à l'eau
- Contre-colorer avec la solution 2 1 minute
- Rincer à l'eau
- Laisser sécher à l'abri de la lumière

Résultats :

B.A.A.R. : jaune-vert fluorescent

Fond de la préparation : rouge

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.

L'Auramine Fluo-RAL a un aspect normalement trouble.

L'examen microscopique s'effectue avec des objectifs, généralement x20 et x40, sans huile à immersion et sans lamelle couvre-objet.

Chaque fois que des organismes fluorescents sont décelés, il est recommandé de confirmer la présence de Bacilles Acido-Alcool-Résistants par une coloration de Ziehl à chaud (RAL ZN Staining kit,) ou à froid (Kit Cold ZN).

* Les solutions 1 et 2 se conservent 1 semaine après reconstitution.

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. 7-10.

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

Protocole modifié par le laboratoire de biologie médicale, HIA Percy à Clamart (C. Soler, M. Fabre)

P. GEROME (1), M. FABRE (2), C. SOLER (2), *Validation du kit Fluo-RAL (Réactifs RAL) pour la recherche de mycobactéries par coloration à l'auramine*, (1) Laboratoire de biologie médicale, HIA Desgenettes 69275 Lyon, (2) Laboratoire de biologie médicale, HIA Percy 92141 Clamart, Poster Réactifs RAL 2008.

J. MAUGEIN, S. VACHER, S. DEGRANGE, *Comparaison de différents kits de coloration à l'auramine*, Laboratoire de Bactériologie, hôpital Haut Lévêque 33604 PESSAC, Poster Réactifs RAL 2007.