

Protocole n° 104

RAL ZN Staining Kit

(Réf. : 365500-0000)

(Réf. : 365400-0000)

Coloration de Ziehl-Neelsen pour la détection des mycobactéries

Principe :

La coloration de Ziehl-Neelsen permet une détection des mycobactéries ou Bacilles Acido-Alcool-Résistants (B.A.A.R.) dont la structure de la paroi rend difficile la pénétration d'agents décolorants. Cette propriété permet aux B.A.A.R. de conserver la coloration rose de la Fuchsine phéniquée ZN après décoloration par l'Acide-Alcool 3% ZN. Les bactéries non acido-alcool-résistantes et les éléments cellulaires sont contre-colorés par le Bleu de Méthylène 0.3% ZN.

Description du kit :

Fuchsine phéniquée ZN	1 x 500 ou 1 x 1000 mL
Acide-Alcool 3% ZN	2 x 500 ou 1 x 1000 mL
Bleu de Méthylène 0.3% ZN	1 x 500 ou 1 x 1000 mL

Le coffret permet de réaliser environ 200 à 300 lames ou 400 à 600 lames selon le kit utilisé.

Temps de réalisation : 9 minutes.

Matériel spécifique nécessaire non fourni :

Platine chauffante ou bec Bunsen ou tampon de ouate imbibé d'alcool

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.

- Placer le frottis fixé sur une platine chauffante et le recouvrir avec la Fuchsine phéniquée ZN (flacon ❶).
- Laisser en contact 5 minutes, en ajoutant de temps en temps de la Fuchsine phéniquée ZN pour éviter la dessiccation. Ne jamais aller jusqu'à l'ébullition de la solution de colorant
- Rincer les lames délicatement à l'eau pour écarter l'excès de colorant. Evacuer l'excès d'eau de rinçage. A cette étape, les frottis ont une couleur rouge.
- Recouvrir la lame pendant 3 minutes au moyen de l'Acide-Alcool 3% ZN (flacon ❷). La coloration rouge devrait avoir presque disparue, si ce n'est pas le cas, répéter cette séquence durant 2 minutes supplémentaires.
- Laver délicatement à l'eau pour éliminer l'excès d'Acide-Alcool 3% ZN. Evacuer l'excès d'eau de rinçage.
- Recouvrir le frottis avec le Bleu de Méthylène 0.3% ZN (flacon ❸) pendant 1 minute.
- Rincer les lames à l'eau et les laisser sécher à l'air.
- 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 phéniquée ZN.

Pour chauffer les lames, il est possible d'utiliser un bec Bunsen, une lampe à alcool ou encore un tampon enflammé de ouate imbibé d'alcool.

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 :

BEURIN M.C., *Diagnostic des mycobactéries au laboratoire*, Porphyre Afrique, vol. 1, n° 1, nov. 1983, p. 22-24.

PACAUD G., *Coloration en mycobactériologie*, Réactifs RAL, 1977, p. 2-4.

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

ENARSON D.A., RIEDER H.L., ARNADOTTIR T., TREBUCQ A., *Prise en charge de la tuberculose*, UICTMR, 5th Edition 2000.