

DOMAINE D'APPLICATION

Les colorants acido-résistants sont destinés à colorer des frottis préparés à partir d'échantillons suspects de contenir des mycobactéries.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Grâce aux caractéristiques acido-résistantes des mycobactéries, les techniques de coloration acido-résistantes sont précieuses pour le dépistage des bacilles de la tuberculose.

PRINCIPE

La teneur lipidique caractérisant la paroi cellulaire des bacilles acido-résistants entrave la coloration des organismes. Or, dans les colorants acido-résistants, le phénol permet la pénétration d'un colorant même après l'exposition aux décolorants. Pour qu'un organisme puisse être considéré comme acido-résistant, il doit résister à la décoloration à l'acide-alcool. Pour ce faire, on utilise un contre-colorant pour mettre en évidence l'organisme coloré.

REACTIFS

Colorants prêts à l'emploi.

PL.7018	Fuchsine phénatée ZN	500 ml
PL.7019	Fuchsine phénatée ZN	1 litre
PL.7020	Fuchsine phénatée ZN	2 litres
PL.7021	Fuchsine phénatée Kinyoun	500 ml
PL.7022	Fuchsine phénatée Kinyoun	1 litre
PL.7024	Différenciateur FP ZN et Kinyoun	500 ml
PL.7025	Différenciateur FP ZN et Kinyoun	1 litre
PL.7026	Différenciateur FP ZN et Kinyoun	2 litres
PL.7027	Bleu de méthylène	500 ml
PL.7028	Bleu de méthylène	1 litre
PL.7029	Bleu de méthylène	2 litres
PL.7030	Vert malachite	500 ml
PL.7031	Vert malachite	1 litre
PL.7032	Vert malachite	2 litres
PL.7033	Auramine-phénol	500 ml
PL.7034	Auramine-phénol	1 litre
PL.7035	Auramine-phénol	2 litres
PL.7036	Différenciateur auramine	500 ml
PL.7037	Différenciateur auramine	1 litre
PL.7038	Différenciateur auramine	2 litres
PL.7059	Rouge de thiazine	500 ml
PL.7060	Rouge de thiazine	1 litre

Colorants concentrés – Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée avant utilisation.

PL.8005	Fuchsine phénatée ZN	100 ml
PL.8006	Bleu de méthylène	100 ml
PL.8007	Vert malachite	100 ml
PL.8008	Auramine-phénol	100 ml
PL.8013	Permanganate de potassium	100 ml

Colorants concentrés - Diluer à 4 litres avec de l'eau distillée avant emploi.

PL.8005-4.0	Fuchsine phénatée ZN	400 ml
PL.8006-4.0	Bleu de méthylène	400 ml
PL.8007-4.0	Vert malachite	400 ml
PL.8008-4.0	Auramine-phénol	400 ml

PL.8013-4.0	Permanganate de potassium	400 ml
-------------	---------------------------	--------

Colorants concentrés – Compléter à 5 litres avec de l'eau distillée avant utilisation.

PL.8005-5.0	Fuchsine phénatée ZN	500 ml
PL.8006-5.0	Bleu de méthylène	500 ml
PL.8007-5.0	Vert malachite	500 ml
PL.8008-5.0	Auramine-phénol	500 ml
PL.8013-5.0	Permanganate de potassium	500 ml

Kits de colorants (Prêts à l'emploi)

PL.8060/25	Kit de colorants TB - Fuchsine phénatée ZN 250 ml, différenciateur ZN 2 x 250 ml, bleu de méthylène 250 ml.
PL.8061/25	Kit de colorants TB - Fuchsine phénatée ZN 250 ml, différenciateur ZN 2 x 250 ml, vert malachite 250 ml.

Huile à immersion (Risque réduit - sans DBP)

PL.396	Huile à immersion	50 ml
--------	-------------------	-------

MESURES DE SECURITE

1. Les colorants acido-résistants de Pro-Lab Diagnostic sont offerts uniquement en tant que matériel pour usage *in vitro* et ne doivent, en aucun cas, être utilisés à des fins curatives ou prophylactiques.
2. Pendant et après l'utilisation, traiter tous les matériaux selon les bonnes pratiques de laboratoire sans jamais oublier que la substance test doit être considérée comme potentiellement infectieuse si elle n'est pas convenablement manipulée.
3. Ce dispositif présente le même risque environnemental que les échantillons cliniques utilisés avec ce dernier. Tous les échantillons cliniques doivent être considérés comme potentiellement infectieux : les manipuler, les traiter et les éliminer selon les règles de sécurité en vigueur. L'impact environnemental existe et peut être minimisé par une élimination adéquate.

STABILITE ET CONSERVATION

Température ambiante. Tenir à l'abri de toute source d'inflammation et des rayons solaires directes. Conservés dans ces conditions, les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS ET MISE EN CULTURE

Consulter un texte de microbiologie standard.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

Lames en verre propres, boucle d'ensemencement stérile, ogive / air chaud, support pour coloration, huile d'immersion, microscope, papier buvard ou un substitut équivalent.

PROCEDURE

Méthode classique de Ziehl-Neelsen

1. Préparer un frottis fin et uniforme et laisser sécher à l'air libre.
2. Fixer à chaud et laisser refroidir.
3. Inonder la lame avec de la fuchsine phéniquée ZN et chauffer lentement (ne pas faire bouillir). Laisser reposer pendant 10 minutes en chauffant à nouveau au bout de 5 minutes.

4. Rincer à l'eau.
5. Inonder la lame avec du différenciateur pendant 10 minutes, en appliquant un changement de différenciateur au bout de 5 minutes.
6. Rincer à l'eau.
7. Inonder la lame de contre-colorant (bleu de méthylène ou vert malachite), et laisser reposer pendant 1 minute.
8. Bien rincer à l'eau et buvarder légèrement ou sécher modérément à chaud.
9. Observer au microscope à immersion d'huile.

Méthode de fuchsine phéniquée de Kinyoun.

1. Préparer un frottis fin et uniforme et laisser sécher à l'air libre.
2. Fixer à chaud et laisser refroidir.
3. Inonder la lame avec de la fuchsine phéniquée de Kinyoun et laisser reposer pendant 10 minutes.
4. Rincer à l'eau.
5. Inonder la lame avec du différenciateur pendant 10 minutes, en appliquant un changement de différenciateur au bout de 5 minutes.
6. Rincer à l'eau.
7. Inonder la lame de contre-colorant (bleu de méthylène ou vert malachite), et laisser reposer pendant 1 minute.
8. Bien rincer à l'eau et buvarder légèrement ou sécher modérément à chaud.
9. Observer au microscope à immersion d'huile.

Méthode de coloration à l'auramine-phénol

1. Préparer un frottis mince et uniforme et sécher à l'air.
2. Fixer à la chaleur et laisser refroidir.
3. Noyer la lame dans l'auramine-phénol et laisser reposer pendant 10 minutes.
4. Rincer à l'eau.
5. Noyer la lame avec le différenciateur pendant 10 minutes, et changer de différenciateur au bout de 5 minutes.
6. Rincer à l'eau.
7. Inonder la lame avec du permanganate de potassium ou du rouge de thiazine et laisser reposer pendant 30 secondes.
8. Bien rincer à l'eau, sécher au buvard ou en l'exposant à une chaleur douce.
9. Observer à l'aide d'un microscope à fluorescence à bain d'huile.

CONTROLE DE QUALITE

L'âge des cultures et le pH du milieu où prolifèrent les bactéries peuvent influencer de façon marquée leur réaction à la coloration. Utiliser des cultures fraîches de la veille (24 heures au maximum).

Cultures CQ recommandées ;

- *Mycobacterium tuberculosis* HR37 Rv NCTC 7416
- *Streptomyces griseus* NCTC 7807

INTERPRETATION DES RESULTATS

Méthode de Ziehl et de Neelson:

Les bacilles acido-résistants sont colorés en rouge tandis que les autres organismes sont colorés en bleu ou vert en fonction du contre-colorant utilisé.

Méthode à la fuchsine phénatée de Kinyoun:

Les bacilles acido-résistants sont colorés en rouge tandis que d'autres organ-



ismes sont colorés en bleu ou vert en fonction du contre-colorant utilisé.

Méthode à l'auramine-phéno:





Les bacilles acido-résistantes apparaissent sous forme de bâtonnets lumineux brillants sur un fond sombre.

LIMITES

1. Des faux résultats de coloration peuvent apparaître en raison des débris cellulaires colorés par la technique.
2. Des réactions de coloration positives témoignent à présomption de la présence de *M. tuberculosis* dans l'échantillon uniquement. Des résultats de coloration négatifs ne signifient pas pour autant que l'échantillon sera négatif lorsque cultivé. Des méthodes de culture peuvent également être utilisées pour l'identification positive de *M. tuberculosis*.
3. Les organismes autres que les mycobactéries peuvent afficher différents degrés d'acido-résistance comme c'est le cas des espèces *Rhodococcus* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Isopora* spp.
4. Il est difficile de trop décolorer les organismes acido-résistants. Assurer une décoloration uniforme.
5. La durée joue un rôle important lors de la contre-coloration en utilisant le permanganate de potassium pour éviter de provoquer une extinction de fluorescence des bacilles.
6. Lire immédiatement le résultats sur les lames préparées ou les conserver à l'abri de la lumière entre 2° et 8°C pour éviter que la fluorescence ne s'atténue.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ziehl, F. 1882. Zur Färbung des Tuberkelbacillus. Dtsch. Med. Wochenschr. 8:451
2. Neelson, F. 1883. Ein Casuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose. Centralbl. Med. Wiss. 21:497-501.
3. Kinyoun, J.J. 1915. A note on Uhlenhuth's method for sputum examination for tubercle bacilli. Am. J. Clin. Pathol. 46:472-4.
4. Manual of Clinical Microbiology. Lennette.
5. The Practice of Medical Microbiology. 12 Edition. V2. R. Cruickshank, J.P. Duguid, B.P. Marmion, R.H.A. Swain.

	= Fabricant
	= Dispositif medical de diagnostic in vitro
	= Limite de temperature
	= Consulter la notice d' utilisation

Ce mode d'emploi est une traduction professionnelle de la version anglaise d'origine. En cas d'ambiguïté ou de divergence flagrante, veuillez consulter le Service de soutien de Pro-Lab.