

Protocole n° 12

Coloration de Ziehl-Neelsen, Contre-coloration au Bleu de Méthylène

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 de Ziehl après décoloration par l'acide et l'alcool. Les bactéries non acido-alcool-résistantes et les éléments cellulaires sont contre-colorés par le Bleu de Méthylène.

Produits nécessaires à la coloration :

Fuchsine de Ziehl Réf. 320490-	0125, 0500, 1000 ou 2500 mL
Bleu de méthylène phéniqué Réf. 310100-	0125, 1000 ou 2500 mL

Matériel spécifique nécessaire non fourni :

Platine chauffante – Acide sulfurique – Alcool à 90°

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 O1 : 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.

- 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 une solution d'acide sulfurique dilué au ¼ dans de l'eau déminéralisée pendant 3 minutes.
- Rincer à l'eau courante.
- Recouvrir la lame d'alcool à 90° pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau courante.
- Recouvrir la lame avec le Bleu de méthylène phéniqué pendant 30 secondes.
- Rincer 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 :

BEAURIN 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.