

Protocole n° 12 bis

Coloration de Ziehl-Neelsen, Contre-coloration au Vert Malachite

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 RAL après décoloration par l'acide et l'alcool. Les bactéries non acido-alcool-résistantes et les éléments cellulaires sont contre-colorés par le Vert malachite. Dans cette technique de coloration à froid, le temps de contact avec la Fuchsine phéniquée RAL est réduit.

Produits nécessaires à la coloration :

Fuchsine phéniquée RAL Réf. 365240-	0125 ou 1000 mL
Acid-Alcool 3% ZN Réf. 365320-	0500 ou 1000 mL
Vert malachite en solution aqueuse Réf. 363170-	0500 mL

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 à la chaleur et/ou à l'alcool à chaud. (cf. 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.

- Placer le frottis fixé sur le support de coloration.
- Recouvrir la lame avec la Fuchsine phéniquée RAL pendant 5 minutes.
- Rejeter le colorant et rincer à l'eau courante pendant 2 minutes.
- Recouvrir la lame avec l'Acide-Alcool 3% ZN pendant 3 minutes.
- Rincer à l'eau courante pendant 2 minutes.
- Recouvrir la lame avec le Vert malachite en solution aqueuse pendant 8 minutes.
- 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 : vert.

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 RAL.

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.

Protocole selon le laboratoire de Bactériologie GROUPE HOSPITALIER SUD, Pessac 33 (Hôpital Haut-Levêque), **Docteur Jeannette TEXIER-MAUGEIN**.