

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

Microscopie

Solution de bleu de méthylène de Löffler

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro



La présente solution Solution de bleu de méthylène de Löffler est utilisée pour le diagnostic cellulaire dans la médecine humaine et sert à l'examen bactériologique et histologique d'échantillons d'origine humaine. C'est une solution de colorant prête à l'emploi, utilisée pour la mise en évidence de structures bactériennes cibles (telles que les mycobactéries acido-résistantes, par fixation, inclusion, coloration, contre-coloration, recouvrement) dans des épreuves bactériologiques et histologiques humaines, telles que les frottis de cultures bactériennes d'enrichissement ou les coupes histologiques de poumon, par exemple.

Principe

Les mycobactéries n'absorbent que très lentement des colorants en raison de la part élevée en cire et lipides dans la paroi de cellule. Afin d'accélérer l'absorption du colorant fuchsine et ainsi la formation du complexe mycolate-fuchsine dans la paroi de cellule, la solution de fuchsine phéniquée mise sur la préparation est normalement échauffée jusqu'à formation de vapeur. Si les mycobactéries ont absorbé le colorant, elles le retiennent malgré un traitement intensif avec une Acide chlorhydrique alcoolique comme par ex. acide chlorhydrique-alcool. Les mycobactéries sont donc caractérisées par une alcool-acido résistance à la coloration et apparaissent dans la préparation microscopique colorées en rouge tandis que tous les microorganismes non résistants à l'acide se colorent en fonction de la contre-coloration.

Application

Examen microscopique des mycobactéries.

Le kit de coloration Tb-color modifié se base sur la méthode classique de coloration Ziehl-Neelsen.

Réactifs

Art. Merck n° 109215 Solution fuchsine phéniquée Ziehl-Neelsen
100 ml, 500 ml, 2,5 l
Art. Merck n° 101287 Solution de bleu de méthylène de Löffler
100 ml, 500 ml, 2,5 l
Art. Merck n° 100327 Acide chlorhydrique alcoolique 1 l, 5 l

Matériel

Prélèvements de matériel bactériologique séchés à l'air et fixés par la chaleur comme crachats, ponctions-biopsies à l'aiguille fine, liquides de lavage, empreintes, liquides d'épanchement, pus, exudats, cultures liquides et solides, coupes histologiques.

Préparation des échantillons

Crachats

Afin de libérer les mycobactéries des expectorations, les crachats doivent être prétraités avec du Sputofluo[®]. Le principe actif du Sputofluo[®] est l'hypochlorite, qui dissout le matériel organique oxydativement en préservant efficacement les mycobactéries.

Mélanger 1 volume d'échantillon (min. 2 ml) dans un tube de centrifugeuse avec 3 volumes de Sputofluo[®] 15 % en solution diluée avec de l'eau distillée, laisser agir 10 min en secouant énergiquement.
Centrifuger 20 min à 3000 – 4800 tours/min, décanter le surnageant, étaler le sédiment et laisser sécher.

Ponctions, lavages, sédiments

Étaler les échantillons sur les lames porte-objets selon les étapes d'enrichissement appropriées et les faire sécher à l'air.

Coupes histologiques

Déparaffiner les coupes selon l'usage et les réhydrater dans un bain d'alcool de degré décroissant.

Fixation

La fixation s'effectue au dessus de la flamme d'un bec bunsen (2 à 3 fois en évitant une trop grande chaleur).

Le matériel peut aussi être fixé pendant 20 min à 100-110 °C dans une étuve ou sur une plaque chauffante.

Réalisation

Banc de coloration

1. Couvrir entièrement les préparations avec la solution fuchsine phéniquée Tb-color modifié, chauffer doucement jusqu'à la formation de vapeur et colorer 5 min. La solution de coloration ne doit pas bouillir.
2. Laver à l'eau du robinet jusqu'à ce qu'aucun nuage de couleur s'en aille
3. Couvrir entièrement les préparations avec la Acide chlorhydrique alcoolique Tb-color modifié et laisser agir en fonction de l'épaisseur du matériau pendant 15 – 30 sec.
4. Rincer immédiatement à l'eau du robinet
5. Contre-coloration pendant 30 sec avec la solution de bleu de méthylène Tb-color modifié ou 1 min avec la solution de bleu de méthylène Tb-color modifié delayée (dilution: 1+9 avec de l'eau distillée)
6. Rincer soigneusement à l'eau du robinet
7. Sécher

Effectuer le montage des lames séchées à l'aide de Entellan[®] neu ou de Néo-Mount[®] Les coupes histologiques doivent être traitées à des concentrations croissantes d'alcool et à l'aide de Entellan[®] neu ou de Neo-Mount[®].

Résultat

Mycobactéries	rouge
Fond	bleu clair

Interprétation

Le résultat est "bacilles acido-résistants mis ou non en évidence". Il n'est pas possible de distinguer s'il s'agit de mycobactéries tuberculeuses ou d'autres mycobactéries, et l'on ne peut pas non plus constater si les bactéries sont activées ou inactivées.

Si des mycobactéries sont trouvés, effectuer d'autres analyses dans des laboratoires spéciaux.

Remarque

Le microscope utilisé doit respecter les exigences d'un laboratoire de diagnostics médicaux.

Préparation des échantillons

Tous les échantillons doivent être traités conformément aux règles de l'art.

Tous les échantillons doivent être clairement identifiés.

Utiliser des instruments appropriés pour la prise d'échantillons et la préparation, respecter les instructions du fabricant pour l'emploi/utilisation.

Diagnostic

Les diagnostics doivent être exclusivement effectués par des personnes autorisées et formées. Les nomenclatures en vigueur doivent être utilisées.

Chaque étape doit être effectuée sous contrôle, afin d'exclure toute possibilité de résultat erroné. Des tests plus poussés seront choisis et réalisés selon des méthodes reconnues.

Stockage

Stocker le kit et les solutions de coloration entre +15°C et +25°C.

Dès la première ouverture des flacons, conservées entre +15°C et +25°C les solutions sont utilisable jusqu'à la date de péremption.

Conservation

Utiliser les solutions jusqu'à la date de péremption indiqué. Tenir les flacons toujours bien fermés.

Capacité

Avec ce coffret on peut effectuer jusqu'à 200 préparations, le nombre de préparation pour les solutions individuelles dépend de la taille de l'emballage (jusqu'à 200 préparations/>1000 préparations).

Remarques sur l'utilisation

Pour éviter les erreurs, la coloration doit être effectuée par un personnel qualifié. Réserve à une utilisation professionnelle.

Respecter les directives nationales relatives à la sécurité au travail et à l'assurance qualité.

Utiliser des microscopes équipés selon le standard.

En cas de besoin, utiliser une centrifugeuse conforme à la norme de laboratoire et aux critères.

Protection contre les infections

Veiller impérativement à une protection efficace conformément aux directives des laboratoires.

Consignes d'élimination

Éliminer l'emballage conformément à la réglementation en vigueur.

Les solutions usagées et les solutions dont la date de péremption est dépassée doivent être traitées comme des déchets dangereux, en respectant les directives locales relatives à l'élimination des déchets. Pour commander les instructions sur l'élimination des déchets, cliquer sur le Quick Link « Hints for Disposal of Microscopy Products » sur www.microscopy-products.com. Au sein de l'UE s'applique le règlement (CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) N° 1907/2006.

Réactifs auxiliaires

Art. No. 108000	Sputofluol®	1 l
Art. No. 104699	Huile à immersion	100 ml, 500 ml
Art. No. 115577	Huile à immersion selon ISO 8036 modifiée	100 ml
Art. No. 106965	Essence de cèdre pour la microscopie	100 ml, 500 ml
Art. No. 107961	Entellan® neu	100 ml, 500 ml
Art. No. 109016	Neo-Mount®	500 ml
Art. No. 109843	Neo-Clear®	5 l
Art. No. 100974	Ethanol dénaturé avec 1 % d'éthylméthylcétone pour analyse EMSURE®	1l, 2,5l
Art. No. 100983	Ethanol absolu p.a. pour analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur	1l, 2,5 l
Art. No. 108681	Xylène p.a. pour analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur	1l, 2,5 l

Classement des matières dangereuses

Art. No. 101287

Tenir compte de la classification des matières dangereuses indiquées sur l'étiquette et les indications de la fiche de données de sécurité

La fiche technique de sécurité de Merck est disponible sur Internet et sur demande.

Composants principaux du kit

Art. No. 101287	
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 – 8,6
1l =	0,97 kg

Status: Juin 2014

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.microscopy-products.com

EMD Millipore Corporation, 290 Concord Road, Billerica,
MA 01821, USA, Tel. +1-978-715-4321

