

Validation du kit Fluo-RAL (RAL) pour la recherche de mycobactéries par coloration à l'auramine.

P. Gérôme⁽¹⁾, M. Fabre⁽²⁾, C. Soler⁽²⁾.

⁽¹⁾ Laboratoire de biologie médicale, HIA Desgenettes, 108, bd Pinel, 69275 Lyon cedex 03

⁽²⁾ Laboratoire de biologie médicale, HIA Percy, 101 av Henri Barbusse, 92141 Clamart Cedex.

1. Introduction

Le diagnostic bactériologique des infections dues aux mycobactéries repose initialement toujours sur l'examen microscopique. Il se fait directement sur l'échantillon ou après fluidification-décontamination-concentration. Actuellement, en France, en dehors de l'urgence, la microscopie à fluorescence est la plus utilisée du fait de sa sensibilité. Plusieurs kits de réactifs prêt à l'emploi sont maintenant commercialisés.

Le but de ce travail a été de valider un de ces réactifs, le kit Fluo-RAL (RAL), pour son utilisation en routine dans un laboratoire de mycobactériologie spécialisé.

2. Matériel et méthode

2.1. Choix des étalements

Cent-trente-trois paires d'étalements fixés à la flamme ont été choisis pour leur représentativité parmi des frottis conservés au laboratoire à l'abri de la poussière. Il s'agissait d'étalements effectués directement à partir du produit pathologique ou après son traitement à la N-acétyl-L-cystéine soude.

Les taux de produits pathologiques pré-traités étaient les suivants: crachats 18/58, aspiration bronchiques 24/31, tubage gastrique 8/9, lavage bronchique 11/11, liquide pleural 5/6, liquide céphalo-rachidien 2/2, biopsie ganglionnaire 6/7, biopsie pleurale 1/1, biopsie colique 1/1, biopsie osseuse 2/2, pus 2/2, hémoculture 2/2.

2.2. Coloration

Les paires d'étalements ont été colorées par recouvrement selon deux techniques : la méthode de Degommier utilisée comme référence à l'aide de colorants préparés au laboratoire à partir de poudres [auramine (Merck), rouge thiazine (RAL)] (1) et le kit Fluo-RAL avec des temps de coloration différents de ceux recommandés par le fabricant. A l'issue de chaque étape de coloration les frottis étaient rincés à l'eau distillée.

Étapes de coloration	Fixation	Rinçage	Auramine	Rinçage	Alcool-acide	Rinçage	Contre-colorant	Rinçage	Alcool-acide	Rinçage	TOTAL (mn)
Méthode											
Degommier (mn)	2	1	15	1	5	1	1,5	1	3	1	31,5
Fluo RAL (fabricant) (mn)	10	1	20	1	3	1	5	1	-	-	42
Fluo RAL (adapté) (mn)	5	1	15	1	3	1	5	1	-	-	32

2.3. Lecture

Les frottis ont été examinés au grossissement x400 au microscope à fluorescence de manière indépendante par 2 techniciens. Les résultats ont été exprimés de manière semi-quantitative conformément aux recommandations (2), l'examen étant considéré comme négatif après l'examen de 300 champs. En cas de positivité le résultat était confirmé par coloration de Ziehl-Neelsen. En cas de discordance entre examinateurs les lames étaient relues avant conclusion définitive.

3. Résultats

Le tableau suivant compare les résultats de la lecture de 133 paires de frottis colorés respectivement avec le kit Fluo-RAL et la méthode du laboratoire. Aucune discordance significative n'a été mise en évidence entre les méthodes comparées et ce quel que soit le type de frottis.

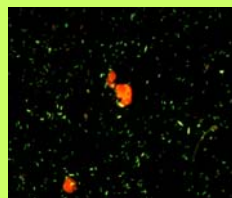
Méthode de coloration	Kit Fluo-RAL					Degommier
	Négatif	1+	2+	3+	4+	
Négatif	73	0	0	0	0	73
1+	0	9	1	0	0	10
2+	0	0	11	0	0	11
3+	0	0	0	32	0	32
4+	0	0	0	0	7	7



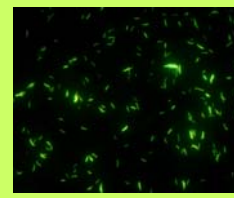
Coloration par recouvrement : 32 mn



Microscope à fluorescence



Prélèvement fluidifié (kit Fluo RAL)



4. Conclusion

Au décours de ce travail le kit Fluo-RAL (RAL) a été considéré comme validé pour son utilisation en routine où il a remplacé la méthode de Degommier utilisée jusqu'à présent dans le laboratoire.

Les bénéfices de cette technique sont un gain de sécurité lié à l'arrêt de la manipulation de réactifs en poudre (auramine en particulier) et une amélioration de la standardisation de la coloration pour un coût parmi les moins élevés du marché (3) et ce sans allongement de la durée de cette étape. En effet, avec les modifications apportées aux recommandations du fabricant (5 min de fixation contre 10 min recommandées ; 15 min de coloration à l'auramine contre 20 min) les temps de coloration des méthodes comparées sont identiques.

Dans l'avenir, la combinaison du réactif Fluo RAL à l'utilisation d'un microscope associant lumière blanche et technologie LED offrira une solution permettant la diffusion d'une méthode sensible et standardisée dans les pays de haute endémicité tuberculeuse pour un coût acceptable. Rappelons que l'examen direct est un élément essentiel de la stratégie DOTS (4).

Références

(1) <http://www.mycobacterie.fr> ; (2) David H., Levy-Frebault V., Thorel M.F. Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Institut Pasteur, Paris 1989, 87p.

(3) Maugein J. Comparaison de différents kits de coloration à l'auramine. X journées Mycobactéries Lyon 17-19 octobre 2007. (4) <http://www.who.int>