

Auramine

1. NATURE DU RÉACTIF :

Colorant basique, dérivé du diphenylméthane, de nuance jaune ; appelé aussi chlorhydrate d'auramine, ou jaune de pyoktamin. Autres noms :

- 4,4'-(IMIDOCARBONYL) BIS(N,N-DIMETHYL ANILINE)
- 4,4'-(IMIDOCARBONYL)BIS(N,N'-DIMETHYLAMINE), MONOHYDROCHLORIDE
- 4,4'-BIS(DIMETHYLAMINO)-BENZHYDRYLIDEIMINE HYDROCHLORIDE

Formule brute : $C_{17}H_{22}CLN_3$

N° index couleur: C.I. 41000 ; nom index couleur : Basic Yellow 2 (BY2)

Elle est utilisée dans la synthèse du colorant Solvent Yellow 34 (SY34).

2. PRÉPARATION :

MÉTHODE DE SMITHWICK (utilisée pour colorer les *Mycobacterium*)

Auramine :	1 g
Ethanol à 95° :	100 cc

Phénol :	3 g
Eau bidistillée :	100 cc

Mélanger ces deux solutions.

Solution de décoloration :

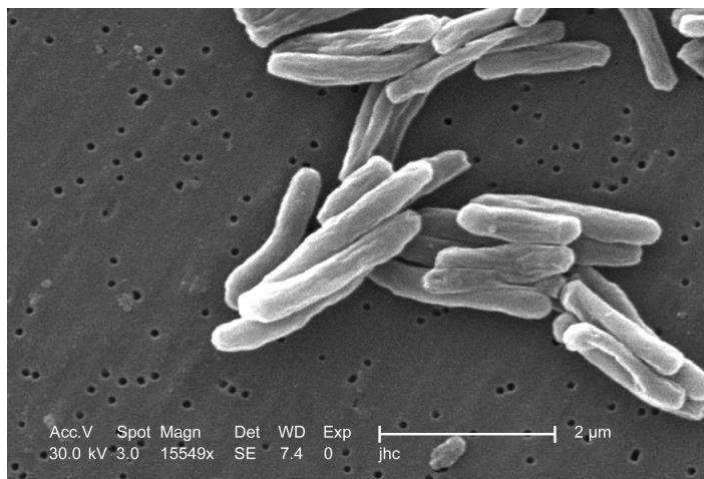
Acide chlorhydrique :	0,5 cc
Ethanol à 70° :	100 cc

Solution de contre-coloration :

Rouge de thiazine :	0,1 g
Phosphate disodique :	0,1 g
Eau bidistillée :	100 cc

Voir utilisation ci-dessous !

3. UTILISATION :



→ photo au microscope électronique, avec sujet grossi 15.550x (image en accès libre sur Internet)

L'auramine est essentiellement utilisée en microscopie à fluorescence.

Elle permet par exemple de colorer et mettre en évidence le bacille de Koch, ou bacille de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) ainsi que celui de la lèpre : mise en évidence des mycobactéries aussi appelées B.A.A.R. (Bacilles Acido-Alcool-Résistants) par une technique de coloration par fluorescence selon Degom-

mier. L'auramine phéniquée colore en jaune-vert fluorescent les mycobactéries.

MÉTHODE DE SMITHWICK :

- ++ Fixer le frottis à chaud (éthanol + chaleur)
- ++ Exposer à l'auramine phéniquée durant 15 minutes
- ++ Rincer à l'eau distillée stérile
- ++ Décolorer pendant 2 à 5 minutes avec une solution acido-alcoolique (acide sulfurique à 25 % dans éthanol à 95°)
- ++ Rincer à l'eau distillée stérile
- ++ Contre-colorer au rouge de thiazine durant 2 minutes
- ++ Rincer à l'eau distillée stérile
- ++ Laisser sécher à l'air

LA MÉTHODE DE KUBICA est très semblable, mais elle fait appel à une solution décontaminante à base de citrate de sodium.

Le mécanisme de la coloration fluorescente est comparable à la coloration classique Ziehl-Neelsen. La résistance à l'acide des mycobactéries repose sur le fait qu'une enveloppe cireuse de la membrane chez ces germes empêche par traitement acide la restitution de colorants une fois absorbés.

L'auramine était autrefois employée comme agent antiseptique notamment sous le nom de Glauramine, classée comme « agent pouvant être cancérigène pour l'homme » ; son chlorhydrate a été très utilisé pour la teinture du papier, du cuir et des textiles.

Compte tenu de la réglementation, ces colorants ne sont plus employés en France pour teindre des textiles. La norme NF Environnement proscrit l'utilisation de produits (encres, papier...) contenant de l'auramine. Par contre, les colorants à base d'auramine (SY34 ou BY2) sont toujours fabriqués à l'étranger, notamment en Inde et en Chine. Le colorant SY34 est employé pour la fabrication du papier carbone et la coloration des encres de stylo à bille, des huiles, des graisses et des laques à l'alcool. Le colorant BY2 est utilisé pour la teinture des textiles : laine, coton, soie, nylon...

COLORATION DE MYCOBACTÉRIES SELON HAGEMANN-HERMANN

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, exsudats, cultures liquides et solides, coupes histologiques.

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.

Préparation

Solution d'acide phénique (faire fondre 10 volumes d'acide phénique à une chaleur modérée sur un bain d'eau et mélanger avec un volume d'eau) et d'auramine (dissoudre 1 g d'auramine dans 1000 cc d'eau distillée ; ajouter 50 g d'acide phénique liquéfié.

Solution de permanganate de potassium à 0,1 % (dissoudre 1 g de permanganate de potassium dans de l'eau distillée et remplir pour arriver à 1000 cc)

Réalisation

1. Recouvrir les préparations avec une solution d'acide phénique et d'auramine ; faire bouillir les préparations et laisser agir pendant 5 min ; secouer la solution et répéter la coloration
2. Rincer soigneusement à l'eau
3. Différencier dans l'acide chlorhydrique-alcool jusqu'à la décoloration pendant env. 15-20 sec
4. Rincer à l'eau et éventuellement contre-coloration

Créateur du projet : Didier BAAR (★) Auteur de la fiche technique : Marcel LECOMTE

Responsable : Marcel LECOMTE (Cercle Mycologique de Namur & Cercle des M.L.B.)

Cercle des Mycologues du Luxembourg belge asbl (M.L.B.), Président : Paul PIROT, rue des Peupliers, 10, B-6840 NEUFCHATEAU

Pour vos commandes : voir la feuille du Catalogue

5. Plonger 5 sec dans la solution de permanganate de potassium
6. Rincer à l'eau
7. Plonger 1 sec dans la solution de bleu de méthylène de Löffler
8. Rincer à l'eau

Résultat

Bactéries : jaune ou fluorescent

Cellules et mucus violet foncé

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 trouvées, effectuer d'autres analyses dans des laboratoires spécialisés. Un résultat positif à la coloration par l'auramine doit être confirmé par une coloration de Ziehl-Neelsen (qui peut être réalisé sur la même lame).

COLORATION DE DEGOMMIER : auteur Philippe BINAUD, 26/03/2008 :

« La solution d'auramine que nous utilisons est une solution aqueuse phéniquée. L'auramine est soluble dans l'alcool ou les acides comme la fuchsine. C'est cette propriété que nous utilisons en biologie médicale : on colore tout à l'auramine, puis on décolore tout par de l'acide et alcool puis on fait une contre coloration par le rouge thiazine : Les mycobactéries, étant acido-alcolorésistantes, restent fluorescentes alors que le fond est rouge.

C'est le pendant de la coloration dite de "Ziehl" où on utilise la fuchsine puis une décoloration acide-alcool puis une contre coloration au bleu de méthylène → mycobactéries roses sur fond bleu.

L'avantage de la coloration de Degommier est que l'œil humain est beaucoup plus sensible à la fluorescence ; cela nous permet de rechercher les mycobactéries à un faible grossissement et de balayer de nombreux champs (elles sont souvent rares dans les prélèvements), puis de confirmer au grossissement 100 par la coloration de Ziehl.

A adapter aux incrustations de Russules ??????

MÉTHODE DE HEUSCHELE ET COLL. (1986) POUR LA RECHERCHE DES CRYPTOSPORIDIES DANS LES DÉFÉCATIONS.

C'est une méthode qui a été décrite par Mansfield en 1970 pour l'identification des mycobactéries et qui a été adaptée.

Le diagnostic repose sur la mise en évidence du parasite dans les selles. Vu la taille et la transparence des oocystes, il est indispensable de colorer les frottis car un simple examen direct expose à de nombreuses erreurs (difficulté de différencier le *Cryptosporidium* des levures).

Coloration des oocystes par l'auramine

C'est une technique de fluorescence d'orientation très sensible, qui permet de déceler une faible concentration en oocystes. Elle est utile pour éliminer les examens négatifs et présente l'avantage de pouvoir recolorer les frottis par la technique de Ziehl Neelsen, modifiée par Henriksen et Pohlentz, après avoir repéré les zones suspectes en fluorescence. Cependant, il peut exister quelques difficultés avec des risques de fluorescence aspécifique.

Produits

Auramine

Solution S1 : 0,1g d'auramine + 10 cc d'éthanol à 95%.

Solution S2 : 3 cc de phénol + 87 cc d'eau distillée.

Mélanger S1 et S2. Conserver dans un flacon opaque.

Alcool chlorhydrique :

99,5 cc d'éthanol à 70% + 0,5 cc d'HCl

Permanganate de potassium :

0,5 g KMnO₄ + 100 cc d'eau distillée.

Technique

- Préparer un frottis mince de fèces
- Laisser sécher pendant 24 heures à la température ambiante
- Colorer la lame pendant 15 minutes par l'auramine
- Rincer à l'eau distillée
- Décolorer pendant 2 minutes par l'alcool chlorhydrique
- Rincer à l'eau distillée
- Contre-colorer pendant 3 minutes par la solution de permanganate de potassium
- Rincer à l'eau distillée
- Laisser sécher
- Lecture en ultra-violet au grossissement (x1000).



Oocyste de *Cryptosporidium* sp. révélé par coloration à l'auramine

Sous l'effet des rayons ultra-violet, les oocystes du *Cryptosporidium* apparaissent sous forme d'anneaux car la fluorescence est plus intense à la périphérie. Cependant, il peut exister quelques difficultés avec des risques de fluorescence aspécifique. En effet, nous avons pu remarquer que le genre *Eimeria* ainsi que les spores des levures peuvent également émettre une fluorescence.

Technique de Ziehl Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz.

Cette coloration permet de voir les oocystes en couleur rouge vif et s'ils renferment quatre sporozoïtes agencés autour d'un corps résiduel arrondi. Elle est indispensable pour mettre en évidence les oocystes de *Cryptosporidium*.

Réactifs

Carbolfuchisine

Solution A : Fuchisine basique (1 g) + Éthanol à 95% (10 cc) → Dissoudre en broyant dans un mortier

Solution B : Phénol cristallisé (5 g) + Eau distillée (100 cc) → mélanger les solutions A et B. Laisser reposer pendant 8 jours. Filtrer et conserver à température ambiante.

Bleu de méthylène (0,3 g) + Eau distillée (100 cc) → filtrer

Acide sulfurique à 5 %.

Technique

Fixer le frottis mince de fèces par le méthanol.

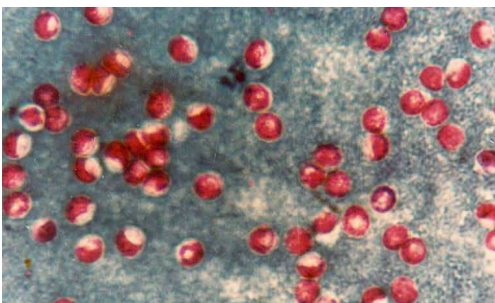
Colorer pendant une heure par la solution de carbolfuchisine.

Rincer rapidement à l'eau du robinet.

Différencier pendant 30 secondes par l'acide sulfurique.

Rincer et contre-colorer au bleu de méthylène pendant une minute, ou au vert malachite à 5 % pendant 5 minutes.

Rincer et examiner à l'immersion.



Oocystes de *Cryptosporidium* sp colorés par la technique de Ziehl Nielsen.

Photo: Thèse de Doctorat, 1992. Alae-eddine Gati.

Le diagnostic par immunofluorescence ou par ELISA est également possible.

Créateur du projet : Didier BAAR (★) Auteur de la fiche technique : Marcel LECOMTE

Responsable : Marcel LECOMTE (Cercle Mycologique de Namur & Cercle des M.L.B.)

Cercle des Mycologues du Luxembourg belge asbl (M.L.B.), Président : Paul PIROT, rue des Peupliers, 10, B-6840 NEUFCHATEAU

Pour vos commandes : voir la feuille du Catalogue

Concentration des oocystes

En général, les oocystes du *Cryptosporidium* sont suffisamment nombreux dans les selles diarrhéiques et les techniques de concentration ne semblent pas indispensables. Elles s'avèrent nécessaires lorsque le nombre des oocystes est faible.

Les techniques suivantes sont utilisées :

- Technique de Ritchie
- Technique de flottaison en solution saturée de saccharose
- Technique de flottaison dans une solution saturée en NaCl
- Technique de flottaison dans une solution de sulfate de zinc à 33%.

Cette dernière semble être la plus efficace car elle permet d'obtenir le maximum d'oocystes dans le surnageant alors que la plupart des débris fécaux restent concentrés dans le culot de centrifugation.

4. DANGERS :

Fortement soupçonné d'être cancérigène. Toxique per os dans toutes les solutions ; peut s'enflammer ou exploser si ses poudres ou poussières sont mélangées à l'air. Ce produit est instable dans les conditions suivantes : lorsque chauffé à plus de 200° C, le produit se décompose en émettant des chlorures et des oxydes d'azote. Est incompatible avec les bases, les agents oxydants forts.

Eviter tout contact avec la peau : est absorbé par les voies respiratoires, la peau et les voies digestives Irritation des yeux avec possibilité de dommages à la cornée ; l'absorption cutanée peut occasionner les effets suivants : dermatite, brûlures, nausées, vomissements.

Rincer abondamment les yeux avec de l'eau et consulter un médecin.

Retirer rapidement les vêtements contaminés. Laver la peau au savon et à l'eau.

En cas d'ingestion, faire vomir la personne si elle est consciente. Appeler un médecin.

En cas d'inhalation des vapeurs ou des poussières, amener la personne dans un endroit aéré. Consulter un médecin.

5. CONSERVATION :

Stocker le colorant entre +5° et + 30° C. Dès la première ouverture du flacon, conserver entre + 5° et + 30° C ; le colorant est utilisable jusqu'à la date de péremption. Tenir les flacons toujours bien fermés.