

ou en partie (voir *Colorations spéciales*), on se sert des substances suivantes :

Eau	} lorsqu'on redoute les acides.
Alcool	
Glycérine	
Essence de girofle.	
Huile d'aniline.	
Acide acétique, 0,5 à 1 p. 100.	
— chlorhydrique, 10 gouttes par 500 cent. cubes d'eau.	
— nitrique, 25 p. 75 (EHRlich).	
— sulfurique, 25 p. 75 ou 100.	
Carbonate de potasse (Koch).	
Alcool-acétone (2/1) (NICOLLE).	

KÜHNE se sert d'eau de lithine pour neutraliser un liquide de lavage acide.

b. Les *doubles colorations* ne sont naturellement employées que dans les cas où les microbes sont noyés dans des produits pathologiques, et jamais lorsqu'on examine une culture (sauf pour les cultures sporulées. On lave et on recoloré avec une couleur qui tranche sur la première. Le rouge ressort bien sur le vert et le bleu, le violet sur la vésumine, l'éosine, la chrysoïdine (jaune). A côté de ces *colorations successives* se placent les *colorations substitutives*. Dans ce cas, le second bain est à la fois décolorant et recolorant pour certains éléments (voy. plus loin). Les *colorations électives* n'emploient qu'une seule matière colorante qui colore différemment les éléments. Le violet de méthyle colore en violet les noyaux et les microbes, et en rouge la substance amyloïde; le vert de méthyle colore en vert noyaux et microbes, et en violet la substance amyloïde. En colorant avec du bleu de méthyle un lambeau de mésentère d'une souris morte de péritonite suppurée à *Staphylocoques*, on voit les microbes en bleu, et certaines cellules conjonctives (*Mastzellen* d'EHRlich) présentant un noyau incolore et des granulations (basophiles) violettes. Le bleu de méthylène colore en violet les cellules adipeuses. BABÈS a vu certains microbes colorés en bleu avec des points rouges par le bleu de méthylène.

On peut, enfin, mais surtout avec les coupes, obtenir des triples et quadruples colorations.

Ce 5^e temps variera seul dans les méthodes de colorations spéciales.

F. LAVAGE. — On lave à l'eau, soit en agitant la lamelle dans un verre à pied rempli d'eau, soit en faisant couler sur la face colorée l'eau de la pissette (fig. 172). Si la coloration reste trop intense, on peut laver *rapidement* à l'alcool.

G. MONTAGE. — Pour monter la préparation, il faut d'abord reconnaître le côté de la lamelle qui est recouvert par la préparation; on gratte dans un angle avec une fine aiguille à dissociation. Si la préparation ne doit pas être conservée, on se contente de déposer une goutte d'eau sur une lame, et d'appliquer la lamelle encore humide, après avoir essuyé la face qui regardera l'objectif. Si on veut conserver la préparation, il faut encore une série de manipulations. On *éclaircit* avec une goutte de térébenthine, d'essence de bergamote ou d'huile de cèdre. Il ne faut pas employer les huiles éthérées, et spécialement l'essence de girofle, qui décolorent les microbes. On desséchera la lamelle, comme en *B*, avant de l'éclaircir. On monte ensuite au *baume du Canada* dissout dans le *xylol*; (les baumes au benzol ou au chloroforme font disparaître les couleurs d'aniline.) Il est commode de se servir du baume contenu dans des tubes métalliques compressibles; on débouche, on presse, une goutte tombe sur la lame. On aura soin de ne pas emprisonner de bulles d'air. Il est inutile de luter les préparations. Elles se conservent ainsi pendant six mois environ. A la longue, le xylol dissout les matières colorantes.

On ne montera jamais à la glycérine qui dissout rapidement les couleurs d'aniline, sauf le brun de Bismarck.

2^o Colorations spéciales. — Certains microbes jouissent d'affinités spéciales pour certaines solutions colorantes.

*A. MÉTHODE DE GRAM*¹. — 1^o *Méthode primitive.* — Cette méthode

¹ GRAM, *Fortsch. der Medicin*, 1884 p. 185.

imaginée par GRAM, en 1884, est basée sur la propriété qu'a l'iode de former avec le violet un nouveau composé qui a une affinité particulière pour certains microbes, et colore beaucoup moins les tissus que le violet aniliné. Elle sert de caractère très important pour la diagnose des espèces.

MICROBES QUI PRENNENT LE GRAM.	MICROBES QUI NE PRENNENT PAS LE GRAM (RESENT INCOLORES).
Staphylocoque pyogène.	Gonocoque.
Streptocoque pyogène.	Vibron cholérique.
Pneumocoque.	B. typhique.
Bacille de Löffler.	B. coli.
Bacillus anthracis.	B. pyocyanique.
Bacille de Nicolaïer.	B. de la morve.
Bacille tuberculeux, etc.	Bacille du chancre mou.
	Bacille de la pseudo-tuberculose.
	B. de la peste, etc.

On colore pendant cinq minutes avec la *solution d'Ehrlich* (violet aniliné, p. 266), puis on plonge dans la *solution de Lugol* :

Iodure de potassium	2 grammes.
Iode	1 —
Eau	300 —

jusqu'à coloration noire (une ou deux minutes). On lave ensuite à plusieurs reprises dans l'alcool absolu jusqu'à décoloration : ce troisième temps est quelquefois très long. Les tissus et les microbes qui ne « prennent pas le Gram » sont décolorés. On peut recolorer le fond. On éclaircit par le xylol, etc.

2° *Méthode de Gram modifiée par Nicolle* (1895). — Il vaut mieux employer la méthode de Gram avec les modifications suivantes. Le *violet phéniqué* inaltérable est substitué au *liquide d'Ehrlich* ; la *solution de Lugol* est plus forte ; l'*alcool-acétone* inaltérable, et décolorant très rapidement, est substitué à l'alcool. L'opération est plus rapide, plus sûre ; les préparations ne brunissent pas à la longue, et la triple coloration est possible (voy. coupes, p. 292).

Fixer la lamelle à l'*alcool-éther* (parties égales).

Plonger, quatre à six secondes, dans le bain :

Sol. saturée de violet de gentiane dans alcool à 95°	10 cent. cubes.
Eau phéniquée à 1 p. 100	100 —

Plonger, sans laver, quatre à six secondes, dans le *liquide de Lugol fort* :

Iodure de potassium	2 grammes.
Iode	1 —
Eau distillée	200 —

qu'on renouvelle une ou deux fois.

On décolore par l'alcool absolu additionné d'un tiers d'acétone (*alcool-acétone*).

Si on veut une double coloration (exsudats, frottis), on fait agir rapidement la solution :

Sol. saturée d'éosine dans alcool à 95°	50 cent. cubes.
Alcool à 95°	400 —

Laver, déshydrater, monter.

Si on a un mélange de deux organismes dont l'un prend le Gram, et l'autre non (*Gonocoques* et *Staphylocoques* par exemple), on recolorer avec :

Sol. saturée de fuchsine dans alcool à 95°	5 cent. cubes.
Eau distillée	100 —

à la place de l'éosine qui ne donnerait qu'un fonds diffus.

La figure 175 montre une préparation colorée par la *méthode Gram-Nicolle*. Les cellules, les *Gonocoques* (qui ne prennent pas le Gram) sont rouges, les *Staphylocoques* (qui prennent le Gram) sont restés violets.

3° *Méthode de Claudius*. — On doit la rapprocher de celle de Gram. Elle n'a sur elle aucun avantage. Les microbes qui prennent le Claudius sont les mêmes que ceux qui prennent le GRAM et inversement. Peut-être la méthode de Claudius sera

elle plus sûre pour le *V. septique* et le *B. du charbon symptomatique* qui prennent difficilement le Gram.

On colore, pendant une minute, avec le violet de gentiane

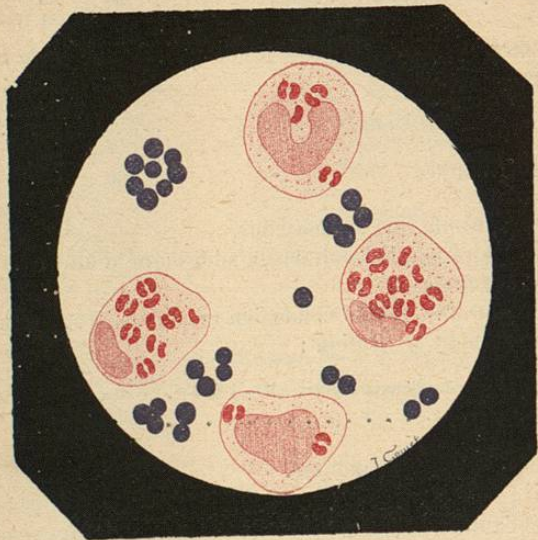


Fig. 175.

Préparation d'un pus blennorrhagique coloré par la méthode de Gram-Nicolle.

Les *Gonocoques* sont rouges et intracellulaires; les *Staphylocoques pyogènes* sont violets et extracellulaires. Gr. = 1 400 D.

phéniqué. On lave, on égoutte. On fait agir, pendant une minute, la solution :

Solution saturée d'acide picrique	1 vol.
Eau distillée	4 —

On enlève l'excès avec du papier filtre. On décolore avec du chloroforme ou de l'essence de girofle jusqu'à ce que le réactif ne se teinte plus en bleu. On monte au baume.

4^e Coloration des microbes qui ne prennent pas le Gram. — NICOLLE (1892) recommande le procédé suivant : colorer au bleu de méthylène, plonger dans une solution aqueuse de tanin à 1/10, qui insolubilise instantanément la couleur au niveau des éléments; déshydrater; éclaircir; monter.

La solution de tanin s'altère vite, et, en plus, la coloration bleue est peu intense.

GARNIER (1901) préconise une autre méthode, qui n'a aucun de ces inconvénients. Fixer la lamelle. Laisser une minute dans la solution de Lugol forte (voy. p. 271). Laver rapidement; colorer au bleu de Kühne (voy. 266). Faire agir pendant une ou deux minutes (à froid ou en chauffant légèrement) la solution :

Molybdate d'ammoniaque cristallisé	1 gramme.
Eau distillée	10 —

Laver. Laisser refroidir. Déshydrater à l'alcool absolu. Eclaircir à l'essence de girofle. Passer au xylol. Monter au baume.

Ces solutions sont très stables. La coloration est en bleu foncé.

La méthode est applicable aux coupes. Il vaudra mieux employer une solution de Lugol plus faible. Bien laver la coupe dans l'eau distillée après le passage dans le molybdate.

B. COLORATION DES SPORES. — Dans les cultures examinées sans coloration, les spores se présentent comme de petites granulations réfringentes, sphériques ou ovoïdes. On les voit, par exemple, très bien dans les cultures de *B. du tétanos*.

En colorant une préparation avec les méthodes ordinaires, les spores restent incolores, formant des taches claires dans les bacilles colorés; elles sont très résistantes.

BUCHNER et HUEPPE ont simultanément découvert un moyen de les colorer. On sèche la lamelle, et on la chauffe longtemps (15 minutes à 1 heure à + 180°, ou dix fois sur la flamme); les spores se colorent vivement (violet phéniqué; 15 à 30 minutes), les bacilles restent presque incolores. La membrane de la spore a été modifiée par le chauffage. Mais on ne peut ainsi colorer que les spores seules.

Pour avoir une *double coloration*, on peut opérer ainsi. Faire passer dix fois la lamelle sur la flamme. Laisser pendant une heure dans la solution *chaude* de fuchsine anilinée d'*Ehrlich* (p. 266). Laver. Décolorer dans la solution :

Alcool.	75
A. chlorhydrique	25

Recolorer dans une solution aqueuse saturée de bleu de méthylène. Laver, sécher, etc. Les spores sont rouges et les bacilles bleus.

La *méthode de Fränkel* est une modification de la précédente. La décoloration et la recoloration se font par un séjour de une à deux minutes dans une solution unique, dite *solution de Fränkel* :

Acide nitrique pur.	20 cent. cubes.
Eau distillée.	30 —
Alcool à 90°.	50 —
Bleu de méthylène saturé	66 —

Méthode de Neisser. — Séjour de dix minutes à + 100° dans la solution fuchsinée de *ZIEHL* (p. 266). Lavage à l'eau. Lavage à l'alcool absolu jusqu'à ce que le liquide n'entraîne plus de fuchsine. Séjour de une minute dans une solution aqueuse de bleu de méthylène.

Méthode de Mæller (la meilleure pour beaucoup d'auteurs). — Séjour de deux minutes dans l'alcool absolu, puis de trois minutes dans l'acide chromique à 5 p. 100, puis de une minute dans le *Ziehl* à chaud. Laver. Séjour de dix secondes dans l'acide sulfurique à 5 p. 100, et de une minute dans la solution aqueuse de bleu.

On peut ensuite obtenir une triple coloration en colorant le fond de la préparation.

SALOMONSEN fait justement observer que les différentes spores ont de grandes différences d'aptitude à prendre les matières colorantes :

Nous conseillons, comme *la meilleure des méthodes, celle de*

Ziehl telle qu'elle sera décrite (p. 279) à propos du *Bacille tuberculeux*. La spore est d'un beau rouge se détachant sur le mycelium bleu (fig. 176).

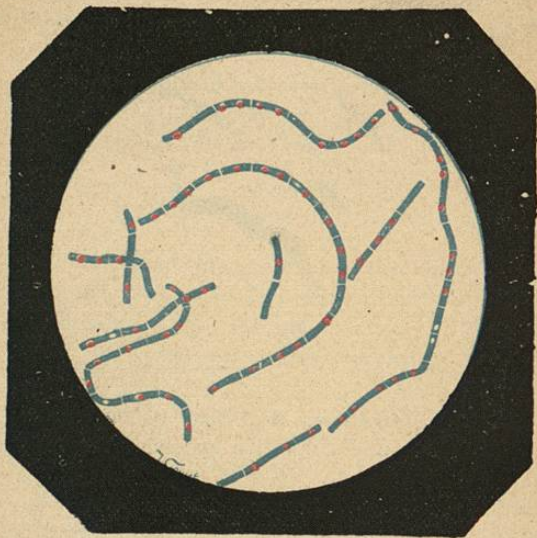


Fig. 176.

Bacillus anthracis. Culture en bouillon avec spores.
Coloration par la méthode de *Ziehl*. Les spores sont rouges. Gr. = 1 000 D.

C. COLORATION DES CILS. — Les espèces *mobiles* (voy. p. 261) possèdent des *cils* ou *flagella*¹ qui sont des prolongements

¹ Les cils ont une situation variable par rapport aux corps bacillaire. Ils sont toujours plus longs que le microbe. Ils sont ondulés, quelquefois enroulés les uns autour des autres (*SACKAROFF*). Certaines espèces n'ont qu'un ou deux cils vibratiles; la plupart sont multiciliées. Ce nombre est d'ailleurs variable pour une même espèce (fig. 177). Il n'est pas non plus toujours en rapport avec la mobilité; le *Micrococcus agilis* d'*ALI-COHEN* n'a qu'un seul cil. Il est facile (antiseptiques, températures dysgénésiques) de faire perdre aux microbes tout ou partie de leurs cils. C'est en somme à tort que *Di*

protoplasmiques hyalins, non granuleux et par conséquent très difficiles à voir et à colorer (voy. fig. 292, 298, 312 et 319).

Koch¹ les a découverts en 1877.

On peut voir sans coloration, avec un fort grossissement, les cils des grandes bactéries telles que les sulfo-bactéries

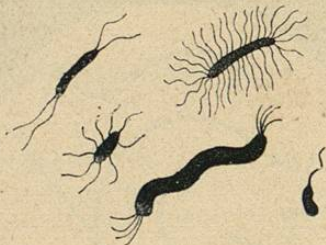


Fig. 177.

Principaux types de microbes ciliés.

(*Beggiatoa roseo-persinica*, *Bacterium photometricum*, etc.). En général il faut une coloration spéciale avec un mordant puissant.

Koch, le premier, a coloré les cils en se servant du liquide de MÜLLER et d'une solution aqueuse concentrée d'extrait de bois de campêche. KÜNSTLER s'est servi d'acide chromique et de noir de Collin. C'est LÖFFLER qui a perfectionné la technique et a pu voir les cils des petites espèces.

D'une façon générale : prendre une petite quantité de culture récente (quelques heures) sur gélose, et la délayer dans un verre de montre rempli d'eau ordinaire (non distillée), de

MESSEA a tenté de classer les microbes d'après leurs cils. On avait pensé à un moment distinguer ainsi le *Colibacille* du *Bacille d'Eberth*.

Les cils sont une émanation du protoplasma (BUTCHLI, FERRIER, REMLINGER). Les espèces mobiles seraient constituées par une partie centrale, facile à colorer, analogue au noyau, et d'une zone périphérique, non granuleuse, difficile à colorer, d'où émaneraient les cils.

¹ KOCH, *Untersuchungen über Bacterien*, Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1877.

façon à obtenir un trouble léger et homogène. Déposer sur une lamelle *scrupuleusement propre*. Laisser sécher à la température ordinaire, à l'abri des poussières.

1° *Procédé de Löffler*. — On laisse la lamelle quatre à cinq minutes dans l'encre de fuchsine de Löffler chauffée à dégagement de vapeurs.

Encre de Löffler	}	Sol. aqueuse d'ac.	
		gallique $\frac{20}{80}$. . .	10 cent. cubes.
		Sol. de sulfate de fer saturée à froid. .	5 —
		Sol. alcoolique de fuchsine	1 —

Elle doit être filtrée chaque fois. On lave ensuite à l'eau et à l'alcool à 95°, puis on plonge, pendant une minute, dans la solution colorante :

Sol. alcoolique de fuchsine	41 cent. cubes.
Alcool absolu	10 —
Eau d'aniline	100 —

Laver à l'eau et à l'alcool absolu.

Le violet peut remplacer la fuchsine. Il faut modifier l'acidité du mordant suivant l'espèce du bacille. On tâtonne avec deux solutions

- α. Solution de soude à 1 p. 100.
- β. Solution d'acide sulfurique à 1 p. 100.

qu'on ajoute à l'encre de fuchsine.

LÖFFLER conseille de s'exercer sur le *Bacille du lait bleu* dont les cils sont colorables dans une échelle assez étendue d'acidité (20 centimètres cubes de β à 15 centimètres cubes de α pour 16 centimètres cubes d'encre). Voici des exemples :

<i>Spirillum concentricum</i>	Encre seule.
Choléra asiatique	1/2 goutte de α dans 16 cc. d'encre.
Bacille typhique	1 cc. de β dans 16 cc. d'encre.
B. subtilis	20 à 30 gouttes dans 16 cc. d'encre.
Vibron septique	37 gouttes dans 16 cc. d'encre.

Cette méthode occasionne d'abondants grumeaux très adhérents.

Elle a été modifiée par NICOLLE et MORAX qui jugent inutile l'addition d'alcali, ou d'acide et remplacent le colorant de LÖFFLER par la fuchsine de Ziehl, par LUTSCHKE qui substitue l'acétate au sulfate de fer (moins de grumeaux), par RAMON Y CAJAL qui substitue dans le mordant la fuchsine anilinée à la fuchsine alcoolique, par BUNGE, etc.

2° Procédé de Sclavo. — Laisser une minute dans :

Tanin	1 gramme.
Alcool à 50°	100 —

Laver. Laisser une minute dans une solution aqueuse à 5 p. 100 d'acide phospho-tungstique. Laver rapidement dans l'eau distillée. Laisser trois ou quatre minutes dans la solution d'Ehrlich légèrement chauffée. Laver, sécher, etc.

3° Procédé de Van Ermenghen (1893) (le meilleur). — Laisser, trente minutes à froid ou cinq minutes à + 60°, dans le bain fixateur :

A. osmique 2 p. 100	1 cent. cube.
Tanin 10 à 25 p. 100	2 —
A. acétique	4 à 5 gouttes.

Laver soigneusement à l'eau. Passer cinq à dix secondes dans du nitrate d'argent à 0,5 p. 100. Mettre, sans laver, dans le bain réducteur :

A. gallique	5 grammes.
Tanin	5 —
Acétate de soude fondu	10 —
Eau	350 —

Repasser dans le nitrate d'argent et de nouveau dans le bain réducteur. Laver, sécher, etc.

Le principe est la réduction d'un sel d'argent à la surface des cils préalablement fixés.

4° Procédé de Neuhaus (pour le Bacille typhique). — Mettre sur la lamelle quelques gouttes de la solution :

Tanin à 50 p. 100 (filtrer)	100 cent. cubes.
Solution saturée de sulfate ferreux	50 —
Sol. alcoolique saturée de fuchsine	10 —

et chauffer, à quatre reprises différentes sur la flamme jusqu'à dégagement de vapeurs. Laver à l'eau, Colorer au Ziehl. Laver, etc. Suivant que le microbe a une sécrétion alcaline ou acide, on neutralise avec quelques gouttes d'une solution à 10 p. 100 de soude ou d'acide sulfurique.

Procédé de Rossi (1900). — Se servir d'une culture fraîche, sur agar, ne contenant pas de chlorure de sodium en excès. On verse sur la lamelle : 4 à 5 gouttes d'une solution de Ziehl et une goutte de :

Solution aqueuse à 1 p. 1000 de potasse caustique	100 grammes.
Acide tannique	25 —

(Dissoudre à chaud.)

On laisse en présence 15 à 25 minutes. On lave et on monte.

Tous ces procédés¹ sont très délicats. Il ne faut pas employer une culture en bouillon, mais une dilution de culture solide. Les microbes doivent être peu abondants et espacés. La lamelle sera bien propre, flambée (contre les matières grasses), et deséchée à l'abri de la poussière. On fixera sur la flamme de la lampe à alcool ; le bec Bunsen altère les cils.

STRAUS dit avoir vu les cils de bacilles cholériques vivants, en examinant une goutte de culture mélangée avec une goutte de liquide de Ziehl très dilué. Ce procédé échoue, en tous cas, avec le *B. d'Eberth* et le *Colibacille*.

D. COLORATION DES MICROBES DITS ACIDOPHILES (B. TUBERCULEUX, B. DE LA LÈPRE, AUTRES BACILLES ACIDOPHILES). — KOCH² (1882) a

¹ Voir la *Revue générale de REMLINGER : Gazette médicale des hôpitaux militaires*, 1896, n° 3.

² KOCH, *Die Aetiologie der Tuberculose*, Mit. a. d. k. Gesundheitsamte II, 1884.

coloré, le premier, les bacilles tuberculeux par le bleu de méthylène alcalinisé par la potasse; le fond était recoloré en brun avec la vésuvine. Le procédé n'a qu'un intérêt historique.

EHRlich, quelques semaines après la découverte de KOCH, substitue l'aniline à la potasse, ayant remarqué que le violet de gentiane, qui est très impur et contient de l'aniline, colorait mieux que le violet de méthyle. WEIGERT, KOCH perfectionnent le procédé d'EHRlich.

ZIEHL substitue à l'aniline un autre corps de la série aromatique : l'acide phénique, et montre que l'alcalinité n'est pas indispensable. PRIOR emploie l'essence de térébenthine à la place de l'huile d'aniline; le thymol (BRIEGER), le borax (SAHLI), l'ammoniaque (WEIGERT) sont successivement essayés. KOCH, EHRlich croyaient que le *Bacille tuberculeux* avait une réaction tout à fait spéciale. LICHTHEIM, GIACOMI, PETRI, BAUMGARTEN montrent que le *Bacille tuberculeux* se colore bien sans rien ajouter aux solutions de couleurs d'aniline, mais il faut le laisser longtemps en contact et chauffer; le *Bacille de Koch* se colore donc plus difficilement et se décolore plus lentement par les acides minéraux que les autres microbes. Cependant, en faveur d'un protoplasma à réaction spéciale, on peut rappeler qu'EHRlich a montré, en 1886, la décoloration presque spécifique du bacille, coloré dans une solution simple, par un bain dans une solution concentrée de bisulfite de soude, et que STRAUS a retiré du corps des bacilles une matière amorphe possédant la réaction d'Ehrlich.

Dans son travail de 1897, KOCH prouve définitivement que la réaction colorante du *Bacille tuberculeux* n'est pas due à la résistance d'une cuticule quelconque, mais qu'elle tient décidément à une substance, qui, même isolée, à l'état amorphe, possède la propriété de rester colorée par la fuchsine phéniquée après traitement par l'acide azotique dilué et l'alcool. C'est un acide gras, non saturé, insoluble dans l'alcool à froid, soluble dans l'éther, très difficilement saponifiable. On peut l'extraire du corps des bacilles au moyen d'une solution chaude de soude caustique; les bacilles perdent alors leurs propriétés colorantes spéciales. Cet acide gras forme une

couche uniforme à la périphérie du bacille, une véritable enveloppe protectrice.

Ajoutons que le *Bacille de la lepre* présente les mêmes propriétés. Pour NEISSER, KÜHNE, BORDONI-UFFREDUZZI, il se colorerait plus facilement par le bleu de méthylène alcalin; pour LUSTGARTEN, il résisterait mieux (après coloration par l'Ehrlich) à l'action décolorante d'une solution à 1 p. 100 d'hypochlorite de soude; pour NEISSER, BAUMGARTEN, il pourrait se colorer à froid dans un bain simple.

Le *Bacille de la tuberculose aviaire* se colore plus rapidement que celui de la tuberculose des mammifères.

Les *Bacilles du smegma* (ALVAREZ et TAVEL) et du *cérumen* (GOTTSTEIN) ne présentent les réactions du *Bacille de Koch* que grâce à leur manteau graisseux provenant du milieu ambiant (BIENSTOCK).

On a découvert récemment toute une série de bacilles, ayant les mêmes réactions colorantes que le bacille de Koch, on les a appelés plus spécialement : *acidophiles* (voy. p. 513).

On emploie plus volontiers les rouges que les violets; ils tranchent mieux à la lumière artificielle, et se conservent plus longtemps. On préservera avec soin les lamelles des matières grasses qui empêchent les colorations.

Voici le détail des principales méthodes.

1^o *Procédé d'Ehrlich*. — Séjour d'une demi-heure, ou plus, à froid, de quelques minutes, à chaud (jusqu'à dégagement de vapeurs), dans la solution suivante à faire au moment de s'en servir :

Eau d'aniline	100 cent. cubes.
Sol. alcoolique saturée de fuchsine ou de violet de méthyle	11 —

On agite ensuite la lamelle pendant quelques secondes dans :

Acide nitrique (pur d'acide nitreux)	1
Eau	2 ou 3

On lave dans l'eau, et la lamelle reprend en partie sa colora-

tion (le sel triacide peu coloré formé par l'acide, se décompose, devient monoacide, plus coloré). On repasse dans la solution acide, et ainsi de suite jusqu'à décoloration de la lamelle qui reste jaune pâle (fuchsine) ou verdâtre (violet). La décoloration ne doit pas être absolument complète; elle ne s'obtient jamais pour les taches de matière colorante. Une décoloration trop complète décolorerait aussi les bacilles tuberculeux. On lave ensuite à l'alcool à 60° (Koch), à l'eau; on sèche et on monte. On peut auparavant recolorer le fond en bleu si le bacille est rouge, en rouge s'il est violet.

2° *Procédé de Ziehl-Neelsen*. — La technique est la même que pour le procédé d'Ehrlich avec les solutions suivantes :

Solution colorante	Fuchsine	1 gramme.
	A. phénique	5 —
	Eau distillée	100 —
	Alcool absolu	10 —

(Quelques minutes à chaud, dégagement de vapeurs.)

Elle se conserve indéfiniment.

Solution décolorante	Acide sulfurique	25
	Eau	100

(Quelques secondes.)

Laver et colorer dans une solution aqueuse de bleu de méthylène. C'est le procédé le plus courant. — La figure 178 donne un spécimen du résultat.

3° *Procédé de Hauser* (le meilleur). — Le temps délicat du procédé de Ziehl est la décoloration. Il faut décolorer suffisamment pour que seuls les bacilles tuberculeux restent colorés: il ne faut pas aller jusqu'à décolorer ceux-ci. Le procédé d'HAUSER (1898) remédie à cet inconvénient.

On opère comme pour le procédé de Ziehl; seule la solution décolorante est changée. Un acide *organique* (l'acide lactique) est substitué à l'acide minéral. Il décolore en dissolvant, au

¹ Avoir soin de verser l'acide sulfurique dans l'eau et non l'eau dans l'acide de crainte de briser le récipient.

lieu de décolorer en substituant un sel triacide incolore au sel monoacide très coloré. On a, ainsi, un temps beaucoup plus long entre la décoloration suffisante et la décoloration trop prononcée.

On colore donc avec le Ziehl. On décolore avec une *solution alcoolique à 2 p. 100 d'acide lactique*. La décoloration est suffi-



Fig. 178.

Préparation de crachats tuberculeux.

Coloration par le procédé de Ziehl. Les *Bacilles de Koch* sont rouges. Gr. = 1 200 D.

sante en quelques secondes et peut se prolonger sans inconvénients pendant une demi-heure. C'est donc un procédé essentiellement pratique, recommandé par LESIEUR qui l'a étudié soigneusement dans son laboratoire.

4° *Procédé de Kühne* (un des meilleurs). — BOREL a fait connaître, en 1893, l'excellent procédé suivant dû à KÜHNE, et resté inédit. L'agent de différenciation est l'*aniline chlorhydrique*, qui

décolore très bien sans nuire aux tissus, et dont l'action peut être prolongée longtemps sans décolorer les bacilles; l'action ultérieure de l'alcool décolore tout, sauf les bacilles, en quelques secondes.

Laisser dix à quinze minutes dans le *liquide de Ziehl*.

Faire passer quelques secondes dans une solution d'aniline chlorhydrique à 2 p. 1000.

Plonger rapidement dans alcool.

Monter.

5° *Procédé de B. Fränkel*. — Le premier temps est le même que celui du procédé d'EHRLICH. On décolore et on recolore avec une solution unique (méthode substitutive) :

Alcool à 90°	50 grammes.
Eau	30 —
Acide nitrique pur	20 —
Bleu de méthylène	en excès.

Agiter et filtrer. On passe sans lavage du premier bain (fuchsine) dans le second et on laisse une à deux minutes. Lavage à l'eau, déshydratation par l'alcool; xylol; baume. Si le premier bain était au violet, le second serait ainsi modifié :

Alcool	70 grammes.
Acide azotique	30 —
Vésuvine	en excès.

Ce procédé a le mérite de la rapidité.

6° *Procédé de Gabbett* (1887). — Séjour de deux à dix minutes dans un premier bain :

Fuchsine	1 gramme.
Acide phénique	5 —
Alcool absolu	10 —
Eau	100 —

Pas de lavage. Séjour de trente à soixante secondes dans un deuxième bain :

Acide sulfurique	25 grammes.
Eau	100 —
Bleu de méthylène	1 à 2 —

Ces deux solutions se conservent bien. Nous recommandons ce procédé pour la préparation rapide de crachats à l'hôpital, avant l'adoption du procédé de HAUSER:

7° *Procédé de Gibbs* (1883). — Type de coloration élective. Un seul temps. On broie ensemble :

Fuchsine	2 grammes.
Bleu de méthylène	1 —

et on dissout dans :

Aniline	3 cent. cubes.
Alcool absolu	15 —

et on ajoute :

Eau distillée	15 cent. cubes.
-------------------------	-----------------

On met cinq minutes dans ce liquide chauffé et on décolore à l'alcool. Les bacilles sont rouges, le reste bleu.

8° *Procédé de Weigert* (1887). — Le *B. tuberculeux* prend le Gram (p. 270). WEIGERT modifie le dernier temps du Gram; il décolore par l'*huile d'aniline*, qui déshydrate en même temps. On lave au xylol.

Les bacilles sont moins racornis, ils sont en violet très foncé. La fibrine se colore en bleu. Les produits caséux ne sont pas colorés.

9° *Procédé d'Hermann*. — On possède les deux solutions :

1° {	Krystall violet	1 gramme.
	Alcool à 95°	30 —
2° {	Carbonate d'ammoniaque	1 —
	Eau distillée	100 —

qu'on mélange, au moment de s'en servir, jusqu'à ce que la tache sur le papier soit très foncée. On laisse la lamelle une minute dans le mélange chauffé à ébullition commençante. On décolore par l'acide nitrique dilué entre un dixième à un tiers. On recolore par l'éosine.

Rappelons que le procédé de FRÄNKEL (p. 274), qui colore si bien les spores du *B. anthracis*, est un des procédés de colo-