

Kit Fluo-RAL

RÉF. 359000-0000

Coloration fluorescente différentielle des bacilles acido-résistants



IFU065A-RAL

Bibliographie 9

Suivi des modifications 9

Produit destiné à un usage strictement professionnel.
Veuillez lire attentivement l'ensemble de ces informations avant toute utilisation de ce dispositif.

Table des matières

Utilisation prévue.....	1
Principe.....	1
Description du kit.....	2
Stockage	2
Composants actifs	2
Classification des dangers et informations relatives à la sécurité	3
Qualification du personnel	4
Équipement et réactifs spéciaux requis, mais non fournis	4
Procédure opératoire	4
Résultats escomptés.....	6
Performances	7
Contrôle qualité utilisateur.....	7
Autres produits	7
Recommandations, remarques et dépannage	7
Tableau des symboles et abréviations.....	9

Utilisation prévue

Le Kit Fluo-RAL est destiné à être utilisé pour la coloration différentielle par fluorescence des bacilles acido-résistants avant un examen au microscope.

RAL Diagnostics recommande le cas échéant d'utiliser les produits RAL Diagnostics associés et ne saurait garantir les résultats escomptés en association avec d'autres marques de produits.

Principe

Le Kit Fluo-RAL permet d'effectuer une détection rapide par fluorescence des mycobactéries ou des bacilles acido-résistants (AFB, Acid Fast Bacilli). Les caractéristiques propres à la structure de la paroi des mycobactéries entrave la pénétration des agents de décoloration. Cette propriété permet à l'AFB de conserver la coloration de l'auramine après avoir subi une décoloration à l'acide et à l'alcool. Autres éléments bactériens (non-AFB) et cellulaires sont contre-colorés par le Thiazine Red.

Description du kit

Fixative Fluo-RAL

Solution incolore limpide

RÉF. 362115-0250 1 X 250 mL

Auramine Fluo-RAL

Solution jaune d'aspect trouble

RÉF. 362325-0125 1 X 125 mL

Carbolic Solution for Auramine Fluo-RAL

Solution incolore limpide

RÉF. 362530-0125 1 X 125 mL

Degommier Discolouring Solution Fluo-RAL

Solution incolore limpide

RÉF. 362210-0250 1 X 250 mL

Thiazine Red Fluo-RAL

Solution rouge limpide

RÉF. 362780-0125 1 X 125 mL

Carbolic Solution for Thiazine Red Fluo-RAL

Solution incolore limpide

RÉF. 362610-0125 1 X 125 mL

Pour un lot spécifique, se reporter au certificat d'analyse correspondant disponible sur my.ral-diagnostics.fr.

Stockage

Température de conservation : 15-25 °C à l'abri de la lumière.

Durée de conservation du flacon avant et après ouverture : se référer à la date de péremption figurant sur l'étiquette.



Composants actifs

Fixative Fluo-RAL

Acide trichloroacétique - CAS - 76-03-9 : ≤ 1 %

Auramine Fluo-RAL

Éthanol - CAS - 64-17-5 : < 10 %

Auramine O - CAS - 2465-27-2 : < 1 %

Phénol - CAS - 108-95-2 : < 3 %

Carbolic Solution for Auramine Fluo-RAL

Phénol - CAS - 108-95-2 : < 10 %

Degommier Discolouring Solution Fluo-RAL

Éthanol - CAS - 64-17-5 : ≤ 95 %

Acide chlorhydrique, 37 % - CAS - 7647-01-0 < 1 %

Thiazine Red Fluo-RAL

Rouge thiazine - CAS - 2150-33-6 : < 1 %

Carbonate de sodium - CAS - 497-19-8 : < 1 %

Carbolic Solution for Thiazine Red Fluo-RAL

Phénol - CAS - 108-95-2 : < 1 %

Classification des dangers et informations relatives à la sécurité**Fixative Fluo-RAL**

Danger:

H314 - Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.

H412 - Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P280 - Porter des vêtements de protection, des gants de protection, un équipement de protection des yeux.

P301+P330+P331+P310 - EN CAS D'INGESTION: rincer la bouche. NE PAS faire vomir. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P303+P361+P353+P310 - EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/Se doucher. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P305+P351+P338+P310 - EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

Auramine Fluo-RAL

Attention:

H226 - Liquide et vapeurs inflammables.

P210 - Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d'inflammation. Ne pas fumer.

**Carbolic Solution for Auramine Fluo-RAL**

Danger:

H302 - Nocif en cas d'ingestion.

H314 - Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.

H341 - Susceptible d'induire des anomalies génétiques.

P264 - Se laver les mains soigneusement après manipulation.

P280 - Porter des gants de protection, des vêtements de protection, un équipement de protection des yeux et du visage.

P301+P330+P331+P310 - EN CAS D'INGESTION: rincer la bouche. NE PAS faire vomir. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P303+P361+P353+P310 - EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/Se doucher. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P305+P351+P338+P310 - EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

CONT	C6H5OH
------	--------

**Degommier Discolouring Solution Fluo-RAL**

Danger:

H225 - Liquide et vapeurs très inflammables.

H314 - Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.

P210 - Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d'inflammation. Ne pas fumer.

P280 - Porter des gants de protection, des vêtements de protection, un équipement de protection des yeux.

P301+P330+P331+P310 - EN CAS D'INGESTION: rincer la bouche. NE PAS faire vomir. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P303+P361+P353+P310 - EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/Se doucher. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.



P305+P351+P338+P310 - EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

Thiazine Red Fluo-RAL

Étiquetage non applicable

Carbolic Solution for Thiazine Red Fluo-RAL

Étiquetage non applicable

Qualification du personnel

Tous les échantillons et produits doivent être manipulés par du personnel qualifié et habilité, protégé par une protection individuelle ou collective, selon les directives nationales en vigueur dans les laboratoires. Le personnel doit également prendre connaissance de la classification des matières dangereuses indiquées sur l'étiquetage du produit et fiche de données de sécurité (disponibles sur my.ral diagnostics.fr).

Traiter les échantillons conformément aux procédures en vigueur dans le laboratoire et exigées par les autorités compétentes au niveau national.

La procédure de diagnostic est strictement réservée au personnel qualifié et habilité, conformément aux procédures en vigueur au sein du laboratoire.

Équipement et réactifs spéciaux requis, mais non fournis

Lames de microscope, microscope à fluorescence avec FITC filter Set (Auramine : Ex. 430 nm/Em. 510 nm, Rouge thiazine : Ex. 510 nm/Em. 600 nm), ainsi que les dispositifs RAL Diagnostics suivants :

SUREFIX RÉF : 336000-0050

Cet équipement peut être différent en fonction du protocole. Veuillez-vous référer au protocole envisagé (voir la section Procédure opératoire) afin de vous assurer que vous disposez du nécessaire pour réaliser les analyses.

Procédure opératoire

L'équipement utilisé pour le traitement des échantillons doit être conforme aux instructions d'utilisation du fournisseur.

Préparation des échantillons

Prétraitement de l'échantillon à partir de milieux de culture liquides : Prendre environ 300 à 400 µL de milieu de culture liquide (incluant quelques billes si possible) et verser ce volume dans un microtube. Centrifuger pendant 1 minute à 10 000 rpm et jeter le surnageant. Ajouter ensuite 2 à 3 gouttes de solution saline physiologique dans le microtube et agiter au vortex ou remuer avec un embout en boucle. L'échantillon est maintenant prêt à être étalé en couche.

Frottis bactérien manuel : former une pellicule fine de l'échantillon de bactéries et laisser la lame sécher à température ambiante. Ensuite, le frottis bactérien peut être fixé à l'aide d'une source de chaleur douce (bec Bunsen ou plaque chauffante) ou fixé chimiquement avec un fixateur chimique (méthanol, éthanol, acide acétique ou formol...)

N.B. Ne jamais passer à la flamme un frottis qui n'est pas complètement sec, cela pourrait provoquer des crépitements et la dissémination de bactéries (création d'aérosols).

Si nécessaire, les deux fixations peuvent être combinées.

Frottis bactérien manuel à partir d'une culture liquide ou solide : Appliquer une goutte de SUREFIX sur une lame et, à l'aide d'une boucle, placer sur la goutte de SUREFIX la préparation d'une culture liquide (comme décrit ci-dessus) ou une colonie d'une culture solide. Mélanger la goutte de SUREFIX et l'échantillon et étaler en une couche pour constituer un frottis uniforme. Laisser au besoin le frottis sécher à l'air libre avant de placer la lame sur une plaque chauffante pendant 30 min à une température de 80 °C.

Préparation des réactifs et instruments

Fixative Fluo-RAL et Degommier Discolouring Solution Fluo-RAL sont prêts à l'emploi.

Préparer la solution d'Auramine en mélangeant des quantités égales de Carbolic Solution for Auramine Fluo-RAL et d'Auramine Fluo-RAL.

Préparer la solution de Thiazine Red en mélangeant des quantités égales de Carbolic Solution for Thiazine Red Fluo-RAL et de Thiazine Red Fluo-RAL.

Protocoles

Les étapes de coloration des protocoles indiqués ci-dessous consistent à couvrir de manière successive les lames avec les différents réactifs de coloration. Placer la lame sur un support avec le frottis fixé sur le dessus.

Protocole standard de coloration des frottis bactériens – Méthode manuelle par bain – Analyse manuelle au microscope

Durée de traitement : 32 min

Étapes	Réactif	Durée [mm:ss]	Indications
Fixer	Fixative Fluo-RAL	05:00	Non
Rincer	Eau distillée	01: 00	Non
Colorer	Auramine solution	15: 00	Non
Rincer	Eau distillée	01: 00	Non
Décolorer	Degommier Discolouring Solution Fluo-RAL	03: 00	Non
Rincer	Eau distillée	01: 00	Non
Colorer	Thiazine Red solution	05: 00	Non
Rincer	Eau distillée	01: 00	Non
Sécher	Non	≥03:00	Conserver à l'abri de la lumière

Protocole court de coloration des frottis bactériens – Méthode manuelle par bain – Analyse manuelle au microscope

Durée de traitement : 18 min 30 s

Étapes	Réactif	Durée [mm:ss]	Indications
Fixer	Fixative Fluo-RAL	03:00	Non
Rincer	Eau distillée	01: 00	Non
Colorer	Auramine solution	10: 00	Non
Rincer	Eau distillée	01: 00	Non
Décolorer	Degommier Discolouring Solution Fluo-RAL	00: 30	Non
Rincer	Eau distillée	01: 00	Non
Colorer	Thiazine Red solution	01: 00	Non
Rincer	Eau distillée	01: 00	Non
Sécher	Non	≥03:00	Conserver à l'abri de la lumière

Protocole rapide de coloration des frottis bactériens – Méthode manuelle par bain – Analyse manuelle au microscope

Durée de traitement : 04 min 30 s

Étapes	Réactif	Durée [mm:ss]	Indications
Fixer	Fixative Fluo-RAL	01: 00	Non
Rincer	Eau distillée	Non	Non
Colorer	Auramine solution	01: 00	Non
Rincer	Eau distillée	Non	Non
Décolorer	Degommier Discolouring Solution Fluo-RAL	00: 30	Non
Rincer	Eau distillée	Non	Non
Colorer	Thiazine Red solution	01: 00	Non
Rincer	Eau distillée	Non	Non
Sécher	Non	≥03:00	Conserver à l'abri de la lumière

Résultats escomptés

Frottis bactérien

AFB : vert jaune fluorescent

Fond de la préparation : rouge

Si les résultats observés diffèrent de ceux escomptés, contacter le service technique de RAL Diagnostics par l'intermédiaire de votre fournisseur habituel pour recevoir une assistance.

Performances

Ce dispositif médical est conforme à l'état de l'art. Ses performances analytiques, sa validité scientifique et sa pertinence médicale sont évaluées lors de l'examen du marquage CE.

Afin de garantir les performances du produit, utiliser un équipement de laboratoire propre et sec.

Il incombe au laboratoire de notifier au fabricant et à l'autorité compétente au niveau régional/national tout incident grave lié à l'utilisation de ce dispositif médical.

Contrôle qualité utilisateur

Il incombe néanmoins aux utilisateurs de déterminer les modes opératoires appropriés de contrôle qualité pour leur laboratoire et de se conformer aux réglementations de laboratoire applicables.

RAL Diagnostics recommande d'utiliser un frottis positif et un frottis négatif provenant de d'échantillons de patients différents lors du renouvellement des réactifs et pour le premier cycle de coloration de chaque jour. Les lames colorées à des fins de contrôle de la qualité doivent être vérifiées pour s'assurer qu'elles présentent des résultats satisfaisants pour le test prévu (correctement colorées et exemptes de précipité).

Les lames peuvent être préparées à l'avance et fixées à la chaleur de manière appropriée pour le stockage.

Il est possible d'effectuer ce contrôle à l'aide d'un échantillon de patient positif ou d'une suspension diluée d'AFB dont le statut positif est établi (tel que *Mycobacterium abscessus* CIP 108541).

Les résultats pour chaque type de cellules de la coloration doivent également être conformes aux résultats prévus, indiqués dans ce manuel.

Ces procédures de contrôle de la qualité ne doivent être effectuées que par du personnel qualifié.

Autres produits

Pour toute information, veuillez contacter votre fournisseur habituel.

Recommandations, remarques et dépannage

Aspect du produit

Si l'aspect du produit diffère de celui indiqué ci-dessus dans ce manuel, ne pas l'utiliser et contacter le service technique de RAL Diagnostics par l'intermédiaire de votre fournisseur habituel pour obtenir de l'aide.

Remarques sur les procédures

Afin de prévenir la dégradation du produit, veuillez respecter les recommandations de stockage et de manipulation indiquées dans cette notice.

Il est impératif d'effectuer une fixation préliminaire du frottis bactérien.

L'Auramine Fluo-RAL est d'aspect trouble en temps normal. Il est conseillé de renouveler les solutions dans le compartiment de coloration au moins une fois par semaine.

Les solutions d'Auramine et de Thiazine Red peuvent être conservées une semaine après reconstitution.

Sécher à l'air et à l'abri de la lumière.

L'examen microscopique est généralement réalisé avec des objectifs secs x20 et x40 et sans lamelle. Chaque fois que des organismes fluorescents sont observés, il faut confirmer la présence de bacilles acido-résistants (AFB) en colorant à nouveau la lame avec une technique de coloration de Ziehl à froid ou à chaud (Kit RAL ZN staining ou kit Cold ZN).

Stabilité du produit

Chaque produit RAL Diagnostics est utilisable jusqu'à la date de péremption figurant sur le produit, dans son emballage d'origine et hermétiquement scellé.

Stabilité de la coloration

La qualité et la reproductibilité de la coloration dépendent de l'utilisation correcte des produits.

Instructions pour le nettoyage et l'élimination des déchets

Traiter tous les échantillons biologiques, effluents et consommables usagés comme potentiellement dangereux.



Pour éviter tout risque, appliquer les instructions suivantes : éliminer les échantillons, effluents et consommables conformément aux normes du laboratoire ainsi qu'aux normes et réglementations nationales et locales en vigueur.

L'enlèvement et le traitement des déchets chimiques et biologiques doivent être effectués par des entreprises spécialisées et agréées.

Tableau des symboles et abréviations

Selon le produit, vous pouvez trouver les symboles suivants sur le dispositif ou le matériel d'emballage.

Pictogrammes GHS	Interprétation	Symboles	Interprétation
	Explosif		Code du lot
	Inflammable		Numéro de série
	Combustible		Référence du catalogue
	Gaz sous pression		Date de fabrication
	Corrosif		Utiliser jusqu'à
	Toxique		Identification unique du dispositif
	Nocif ou irritant		Fabriquant
	Danger pour la santé		Importateur
	Danger pour l'environnement		Entité distribuant le dispositif médical dans la région concernée
	Etiquetage non applicable		Dispositif marqué CE
			Dispositif médical de diagnostic in vitro
			Représentant agréé de la communauté européenne
			Représentant agréé en Suisse
			Conformes aux directives britanniques
			Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé
			Conserver à l'abri de la lumière
			Limite de température : 15-25°C
			Limite de température : 15-30°C
			Conserver à l'abri de l'humidité
			Boîte : manutention vers le haut
			Fragile
			Stérilisé par irradiation
			Système de barrière stérile unique avec emballage de protection externe
			Combinaison de protection stérile et stérilisée par radiation
			Ne pas réutiliser
			Ne pas stériliser de nouveau
			Contenu suffisant pour n tests
			Matière dangereuse contenue
			Consulter les instructions d'utilisation
			Utilisation
			Après ouverture utiliser dans les XX mois
			Ne pas utiliser le produit en conjonction avec une machine de coloration automatique
			Dispositif médical contenant des substances potentiellement cancérogènes, mutagènes ou reprotoxiques (CMR), ou des substances classées comme perturbateurs endocriniens

Bibliographie

GENEVA WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Manual of basic techniques for a health laboratory*, n°39, 1982, p. 231-234.

GEROME P., FABRE M., SOLER C., *Validation of the kit Fluo-RAL (Réactifs RAL) for screening of mycobacteria using auramine staining.*, (1) Laboratoire de biologie médicale, HIA Desgenettes 69275 Lyon, (2) Laboratoire de biologie médicale, HIA Percy 92141 Clamart, FRANCE, Poster Réactifs RAL 2008.

GROSSET J., CATALAN F., LEVENTIS S., *Le problème actuel des mycobactéries*, Biologiste et Praticien, n°39, 1979, p. 1-22.

MAUGEIN J., VACHER S., DEGRANGE S., *Comparison between different auramine staining kits*, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Haut Lévêque 33604 PESSAC, FRANCE, Poster Réactifs RAL 2007.

PACAUD G., *Coloration en mycobactériologie*, Réactifs RAL, 1977, p. 7-10.

PACAUD G., *Les colorations dans la pratique quotidienne en mycobactériologie*, ATEB, Journée Technique Parisienne, mars 1977.

Procedure modified by Medical Biology Laboratory, HIA Percy in Clamart - France (C.Soler, M.Favre).

Suivi des modifications

Date	Version	Modifications
05/2022	IFU065A-RAL	Conformité à l'IVDR (UE) 2017/746



RAL Diagnostics - Site Montesquieu - 33650 Martillac - France
T+33(0)5 57 96 04 04 - F +33 (0)5 57 96 04 55 - ral-diagnostics.fr / cellavision.com