Kit Cold ZN

CE IVD

RÉF. 362390-0000

Coloration différentielle des bacilles acido-résistants

IFU078A-RAL

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 2
Qualification du personnel 3
Équipement et réactifs spéciaux requis, mais non fournis 4
Procédure opératoire 4
Résultats escomptés 5
Performances 6
Contrôle qualité utilisateur 6
Autres produits 6
Recommandations, remarques et dépannage 6
Tableau des symboles et abréviations 8
Bibliographie 8
Suivi des modifications 8

Utilisation prévue

Le Kit Cold ZN est destiné à être utilisé pour la coloration différentielle par 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 Cold ZN permet d'effectuer la détection 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 la fuchsine après avoir subi une décoloration à l'acide et à l'alcool. D'autres éléments bactériens (non-AFB) et cellulaires sont contre-colorés par le bleu de méthylène.

Description du kit

Fixative
Solution incolore limpide
RÉF. 362120-0240 1 X 240 mL

Fuchsin
Solution rouge foncé limpide
RÉF. 365250-0240 1 X 240 mL

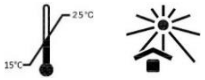
Discolouring Solution
Solution incolore limpide
RÉF. 362215-0240 1 X 240 mL

Methylene Blue
Solution bleu limpide
RÉF. 365340-0240 1 X 240 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.
Après ouverture, la durée d'utilisation prévaut sur la date de péremption.



Composants actifs

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

Fuchsin
Éthanol - CAS - 64-17-5 : < 20 %
Fuchsine basique, diamant - CAS - 632-99-5 : ≤ 3 %
Phénol - CAS - 108-95-2 : < 7 %

Discolouring Solution
Éthanol - CAS - 64-17-5 : ≤ 95 %
Acide chlorhydrique, 37 % - CAS - 7647-01-0 : < 1 %

Methylene Blue
Bleu de méthylène - CAS - 61-73-4 : < 0,5 %

Classification des dangers et informations relatives à la sécurité

Fixative
Danger:
H314 - Provoque des 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 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.

Fuchsin

Danger:
H226 - Liquide et vapeurs inflammables.
H302 - Nocif en cas d'ingestion.
Danger:
H314 - Provoque des brûlures de la peau et de graves lésions des yeux.
H341 - Susceptible d'induire des anomalies génétiques.
H351 - Susceptible de provoquer le cancer.
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.
P264 - Se laver les mains soigneusement après manipulation.
P280 - Porter des gants de protection, des vêtements de protection, un équipement de protection des yeux/du visage.
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	Basic fuchsin, diamant, C6H5OH 80%

Discolouring Solution

Danger:
H225 - Liquide et vapeurs très inflammables.
H314 - Provoque des 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.

Methylene Blue

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.raldiagnostics.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, et 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

Aucune préparation n'est requise. Les solutions sont prêtes à l'emploi.

Protocoles

Les étapes de coloration des protocoles indiqués ci-dessous consistent à couvrir de manière successive les lames avec les différents réactifs de coloration ou à tremper les lames dans les différents bains de coloration. L'information se trouve dans le titre des protocoles.

L'étape de la méthode de recouvrement consiste à placer la lame sur un support avec le frottis fixé, situé vers le dessus.

Protocole 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	01: 00	Non
Rincer	Eau	00: 30	Égoutter l'excédent de réactif sur du papier absorbant, puis rincer
Colorer	Fuchsin	10: 00	Non
Rincer	Eau	01: 00	Égoutter l'excédent de réactif sur du papier absorbant, puis rincer
Décolorer	Discolouring Solution	03: 00	Non
Rincer	Eau	01: 00	Égoutter l'excédent de réactif sur du papier absorbant, puis rincer
Colorer	Methylene Blue	01: 00	Non
Rincer	Eau	01: 00	Égoutter l'excédent de réactif sur du papier absorbant, puis rincer
Séchage	Non	≥03:00	Non

Protocole de coloration des frottis bactériens – Méthode de recouvrement manuel – Analyse manuelle au microscope

Durée de traitement : 18 min 30 s

Étapes	Réactif	Durée [mm:ss]	Indications
Fixer	Fixative	01: 00	Non
Rincer	Eau	00: 30	Éliminer le réactif, puis rincer
Colorer	Fuchsin	10: 00	Non
Rincer	Eau	01: 00	Éliminer le réactif, puis rincer
Décolorer	Discolouring Solution	03: 00	Non
Rincer	Eau	01: 00	Éliminer le réactif, puis rincer
Colorer	Methylene Blue	01: 00	Non
Rincer	Eau	01: 00	Éliminer le réactif, puis rincer
Sécher	Non	≥03:00	Non

Résultats escomptés

Frottis bactérien
AFB : rose
Fond de la préparation : bleu

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 règlementations 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'examen au microscope est réalisé avec un objectif X100 à immersion.
Selon l'épaisseur du frottis, il peut s'avérer nécessaire d'augmenter la durée de la coloration à la fuchsine.
Pour réaliser un dépistage des échantillons, il est recommandé d'utiliser au préalable une technique de fluorescence à l'auramine.
L'observation d'un bacille unique sur une lame donnée est un résultat incertain qui doit toujours conduire à une nouvelle investigation sur un autre échantillon.
En toute situation, le rapport du bactériologiste doit toujours faire référence au nombre de champs observés et être signalé comme « absence de détection d'AFB sur 200 (ou 100) champs microscopiques » et non comme « bacilloscopie négative ».

De même, le signalement « bacilloscopie positive » ne représente pas une bonne réponse car elle ne donne aucune indication sur la richesse relative en bacilles de l'expectoration. Le rapport doit toujours présenter des informations quantitatives.
Il est recommandé d'utiliser deux kits de coloration différents, un pour l'examen direct des frottis et un autre pour les frottis provenant de cultures.

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.
La coloration réalisée conformément à ces recommandations restera stable pendant plusieurs jours.

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 règlementations 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
	Explosif
	Inflammable
	Comburant
	Gaz sous pression
	Corrosif
	Toxique
	Nocif ou irritant
	Danger pour la santé
	Danger pour l'environnement
	Etiquetage non applicable

Symboles	Interprétation
LOT	Code du lot
SN	Numéro de série
REF	Référence du catalogue
	Date de fabrication
	Utiliser jusqu'à
UDI	Identification unique du dispositif
	Fabriquant
	Importateur
	Entité distribuant le dispositif médical dans la région concernée
CE	Dispositif marqué CE
IVD	Dispositif médical de diagnostic in vitro
EC REP	Représentant agrée de la communauté européenne
CH REP	Représentant agrée en Suisse
UK CA	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
STERILE R	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
CONT	Matière dangereuse contenue
	Consulter les instructions d'utilisation
USE	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 cancérigènes, mutagènes ou reprotoxiques (CMR), ou des substances classées comme perturbateurs endocriniens

Bibliographie

BEAURIN M.C., Diagnostic des mycobactéries au laboratoire, Porphyre Afrique, vol. 1, n°1, nov. 1983, p. 22-24.

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

PACAUD G., *Coloration en mycobactériologie*, Réactifs RAL, 1977, p. 2-4.

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

Suivi des modifications

Date	Version	Modifications
05/2022	IFU078A-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