

Lames de microscope SureFocus[™]

Manuel d'utilisation

Lames de microscope SureFocus™

Brevet en instance

Utilisation prévue

Faciliter la détection basée sur la microscopie de fluorescence des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR)

Résumé et principes

L'incidence mondiale de la tuberculose (TB) est en augmentation au moins depuis 1990, lorsque l'Organisation Mondiale de la Santé a commencé à suivre les données d'incidence¹. La détection précoce et précise de la tuberculose est essentielle pour le contrôle et le traitement efficaces de la maladie. La méthode la plus courante pour la détection des bactéries acido-alcoolo-résistantes (BAAR), telles que l'agent causal principal de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) est l'examen microscopique de frottis d'expectoration¹, qui permet à la fois un diagnostic provisoire initial ainsi que la quantification de la charge mycobactérienne.

Il a été démontré que la détection de la tuberculose dans des frottis d'expectoration basée sur la microscopie de fluorescence est plus sensible que les méthodes sur fond clair². Cependant, malgré ses avantages reconnus, la microscopie de fluorescence introduit des problèmes qui affectent son utilité et ses indications pour une large utilisation. Ces problèmes sont concentrés sur le fait que la microscopie de fluorescence est une technique à fond sombre et, en tant que telle, requiert que l'échantillon génère un signal lumineux. Dans le cas de frottis TB colorés par fluorescence, la fluorescence d'arrière-plan est désactivée, ce qui est important pour produire un contraste significatif pour la détection de BAAR. En raison de cette désactivation, le champ d'examen génère un signal faible, voire nul, sur lequel faire le point dans des échantillons dans lesquels la charge de bacilles est faible à inexistante. Par conséquent, il est difficile d'assurer la qualité des essais lorsqu'un résultat négatif est obtenu. De plus, le signal de BAAR colorés par fluorescence est relativement faible (par rapport à des méthodes sur fond clair) et peut être observé uniquement à faible distance du plan focal. Dans ce cas, des utilisateurs inexpérimentés peuvent facilement ignorer des échantillons positifs en manquant le faible intervalle dans lequel le signal peut être distingué.

Les lames SureFocus *F.A.S.T.* sont conçues pour résoudre le problème d'incertitude de focalisation dans l'examen de frottis grâce à la présence de repères fluorescents sur lesquels l'examineur peut faire le point initial et maintenir le point tout au long de l'examen. Les repères, qui ont une forme d'ellipse avec des cercles et des traits, sont également formatés de manière appropriée pour constituer des outils utiles pour la préparation, l'examen, la formation et le contrôle qualité de frottis. L'ellipse délimite une zone de 3 cm x 2 cm, qui est standard pour des frottis d'expectoration TB et est ponctuée par 6 cercles sur et autour du sommet de la plus grande dimension. Les cercles présentent une plus grande surface qui facilite le centrage aisé de l'objectif pour la mise au point initiale. Les cercles produisent en outre des coordonnées qui peuvent être utilisées pour la standardisation de procédures d'examen de laboratoire et peuvent être utilisées conjointement avec les traits fluorescents dans la zone de frottis pour évaluer les distances requises pour un examen complet. En plus de la fonction d'aide à la préparation et à l'examen de frottis, les repères fluorescents peuvent être utiles en tant que témoin positif de fluorescence en cas de doute sur les réactifs, la procédure de coloration, le fonctionnement d'un instrument ou l'exécution de l'opérateur.

Les lames SureFocus sont conçues avec des caractéristiques de fluorescence similaires à l'auramine O (c'est-à-dire, excitées par une lumière bleue et une fluorescence vert clair), par conséquent les lames peuvent être utilisées avec des microscopes à fluorescence configurés pour examiner des frottis colorés à l'auramine O.

Contenu

Le produit contient :

- 432 lames de microscope SureFocus
- 1 notice d'utilisation

Avvertissements et précautions

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

Des échantillons cliniques humains peuvent être porteurs de maladies infectieuses tels que les agents causals de la tuberculose, l'hépatite, le virus d'immunodéficience humaine (VIH), etc. Respecter les précautions générales et les directives et réglementations locales pour la manipulation d'échantillons cliniques. Toutes les activités qui peuvent générer des aérosols à partir d'échantillons cliniques doivent être conduites dans une enceinte de biosécurité. Les activités qui mettent en œuvre la culture d'espèces *Mycobacterium* doivent être conduites en utilisant des procédures et pratiques de biosécurité de niveau 3.

Ce produit est destiné à faciliter la détection des bacilles acido-alcool-résistants. La microscopie de frottis d'expectoration et les procédures mises en œuvre dans la préparation et le traitement des échantillons doivent être conduites par du personnel formé aux techniques utilisées ainsi qu'aux pratiques et procédures générales de laboratoire appliquées.

Attention : ce produit est constitué de verre. Manipuler avec précaution.

Conditions de conservation

Éviter une chaleur excessive. Conserver à l'abri d'un éclairage direct.

Procédure

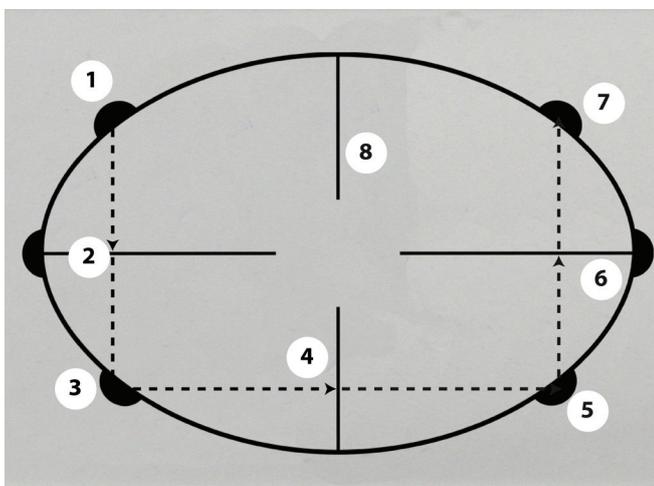
Les lames SureFocus peuvent être utilisées avec des échantillons de patient directs, des échantillons digérés ou des échantillons de culture.

Préparation de frottis et coloration :

Ajouter l'échantillon au centre de la lame SureFocus et frotter pour former un frottis uniforme qui s'étend de manière à occuper l'intégralité de la zone de l'ellipse. Le frottis doit être assez épais pour assurer qu'une quantité suffisante d'échantillon a été ajoutée. Pour les frottis directs, les traits de la lame SureFocus doivent encore être visibles à travers l'échantillon. Fixer la lame par la chaleur en utilisant un brûleur ou un chauffe-lame. Colorer la lame fixée par la chaleur en utilisant une procédure à l'auramine O telle que l'auramine O F.A.S.T. Remarque : il est recommandé d'inclure un échantillon de témoin positif et négatif avec chaque lot de lames colorées afin de contrôler l'intégrité du réactif et de l'instrument ainsi que l'exécution de l'opérateur.

Examen du frottis :

Figure 1



Placer la lame colorée sur la platine du microscope et centrer l'objectif sur un cercle de départ. En mode sur fond clair, faire le point sur le cercle de départ en utilisant un objectif de faible puissance et progresser jusqu'à l'objectif d'examen de frottis souhaité. Passer en mode fluorescence. En variante, le microscope peut être mis au point en mode fluorescence en utilisant la procédure suivante : centrer l'objectif sur le

cercle de départ et ajuster la hauteur de la platine juste au-dessus de la distance de travail de l'objectif, la source de lumière de fluorescence étant active, regarder dans l'oculaire et faire le point vers le bas avec le réglage fin jusqu'à ce que le champ soit net. (Conseil : lorsque la ligne fluorescente est mise au point, le champ microscopique devient vert vif. Si le champ reste sombre, le plan focal correct a été dépassé.) Déplacer le champ au bord de la ligne fluorescente et répéter la mise au point.

Commencer à examiner le frottis à partir du cercle de départ en se déplaçant au repère suivant. Les repères peuvent être utilisés afin de compter le nombre de champs examinés si les champs sont examinés de façon séquentielle sans se déplacer par saut dans le frottis (c'est-à-dire que le déplacement de la platine est continu). Lorsque le repère suivant est atteint, vérifier que le champ est net. Continuer l'examen en se déplaçant d'un repère à un autre jusqu'à ce que le nombre approprié de champs (la distance parcourue si le déplacement est continu) spécifié par vos procédures opératoires standardisées soit atteint. Rapporter les résultats.

Exemple d'examen de frottis :

La figure 1 ci-dessus décrit une lame SureFocus avec un trajet d'examen suggéré. Pour ce trajet, localiser le point initial en utilisant le cercle de départ 1. Examiner la lame verticalement et de façon systématique, en se déplaçant vers le cercle de départ 3. Au cours du déplacement de champ à champ, balayer avec un mouvement continu en veillant à ne pas sauter des champs. Une fois que la ligne 2 est atteinte, veiller à ce que le microscope soit au point. Continuer verticalement jusqu'au cercle de départ 3 et veiller à ce que le microscope soit au point. Suivre une trajectoire horizontale vers la ligne 4. Une fois que la ligne 4 est atteinte, vérifier que le champ est au point.

À ce stade, le nombre de champs suivants a été balayé si les champs sont lus suivant un déplacement continu :

Grossissement	Nombre de champs examinés
200x	26
400x	52
600x	78
1000x	130

Le tableau suivant présente les distances approximatives et les champs de vision à des grossissements standard entre les repères :

Trajet d'examen	Distance (mm)	Champs de vision		
		200x	400x	600x
1 à 2 ; 2 à 3 ; 5 à 6 ; 6 à 7	6,5	7	14	21
1 à 8 ; 8 à 7 ; 3 à 4 ; 4 à 5	11	12	24	36

Contrôle qualité

Les traits fluorescents sur la lame SureFocus doivent émettre une fluorescence vive dans un microscope à fluorescence. Utiliser les traits pour vérifier le bon fonctionnement de la source lumineuse et de l'optique de votre microscope. Si les traits ne sont pas observés ou sont de faible intensité dans le microscope à fluorescence, contrôler l'instrument, les lames et l'exécution de l'utilisateur pour déterminer la cause du défaut. Ne pas effectuer de microscopie pour le diagnostic de patient tant que le problème n'est pas corrigé.

Résultats attendus

Les lames SureFocus doivent émettre une fluorescence lorsqu'elles sont excitées par une lumière bleue (dans la plage de 435 à 480 nm) et observées à travers des filtres de fluorescence qui laissent passer une

lumière verte (dans la plage de 510 à 600 nm) vers l'observateur.

Limitations

La fluorescence s'atténue progressivement avec le temps et les matériaux fluorescents peuvent se dégrader en cas de chauffage ou d'illumination excessif. Si aucun signal de fluorescence n'est observé en provenance des traits sur les lames SureFocus, ne pas utiliser les lames pour la microscopie de fluorescence.

Si les lames SureFocus n'émettent pas de fluorescence, le système de microscopie de fluorescence doit également être contrôlé afin de vérifier qu'il fonctionne correctement.

Matériaux nécessaires non fournis

- Écouvillon pour appliquer et étaler un échantillon de patient
- Brûleur ou chauffe-lame
- Réactifs et fournitures de coloration
- Microscope à fluorescence ayant les caractéristiques suivantes :
 - Capable d'exciter des échantillons de 435 à 480 nm
 - Capable de transmettre une lumière émise dans la plage de 510 à 600 nm
- Huile à immersion (si nécessaire)

Références

Les lames SureFocus F.A.S.T. QBC font partie intégrante de l'assurance qualité globale de microscopie de fluorescence. Pour plus d'informations sur l'assurance qualité pour le laboratoire de mycobactériologie, consulter les ressources suivantes :

1. Organisation mondiale de la santé. (2009) Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO Report 2009. WHO Press, Genève, Suisse.
2. Steingart, K.R., *et al.* (2007) Fluorescence Versus Conventional for Sputum Smear Microscopy for Tuberculosis: a Systematic Review. *Lancet Infect Dis* 6:570-81.
3. Essential Procedures for Clinical Microbiology. (1998) American Society of Microbiology. Washington, D.C.
4. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis by Sputum Microscopy. (2005) Institute of Medical and Veterinary Science. Adelaide, Australia.
5. Manual of Clinical Microbiology. (2007) Volumes 1 and 2. 9^{ème} édition. American Society of Microbiology. Washington, D.C.

Références de commande

Lames SureFocus F.A.S.T. QBC

427411



QBC Diagnostics, Inc.
200 Shadylane Drive, Philipsburg PA, 16866
+1-814-692-7661, www.qbcdiagnostics.com



Emergo Europe
Molenstraat 15, 2513 BH The Hague, Pays-Bas
Tél. : +31 (0) 70-345-8570, Fax : +31 (0) 70-346-7299



Fabricant



Représentant agréé dans la Communauté européenne



Utilisation par



Référence



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*



Limitation de température



Numéro de lot



Consulter les instructions d'utilisation



Usage unique exclusivement