



Kit de frottis BAAR E-Z F.A.S.T.™ QBC

Manuel d'utilisation

Form 409, Rev. B
Révisé le 18.1.2012

Kit de frottis BAAR E-Z F.A.S.T.™ QBC

Utilisation prévue

Pour utilisation dans la préparation et la coloration de frottis d'échantillons ou cultures de patient pour la détection ou la caractérisation de bacilles acido-alcoolo-résistants tels que *Mycobacterium tuberculosis*.

Résumé et principes

L'incidence mondiale de la tuberculose 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 (TB) est essentielle pour le contrôle et le traitement efficaces de la maladie. La méthode la plus courante pour la détection de *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.

Des bacilles acido-alcoolo-résistants, tels que *Mycobacterium tuberculosis*, peuvent être colorés par des colorants d'aniline et sont résistants à la décoloration par un acide et un alcool. Lorsqu'il est suivi par une coloration de contraste, ce traitement conduit à la coloration des bacilles acido-alcoolo-résistants par contraste par rapport aux autres organismes et aux débris qui n'ont conservé que le colorant de contraste. Cependant, les méthodes de coloration conventionnellement utilisées pour l'examen microscopique des organismes conduisent à un frottis dont l'interprétation est longue et difficile. Les colorations à l'auramine O et l'auramine-rhodamine ont été utilisées avec succès pour la microscopie de fluorescence des mycobactéries. Les publications sur le mécanisme de coloration sont contradictoires; celles-ci mentionnent la liaison de l'auramine O à la paroi cellulaire des mycobactéries² et la liaison de la majeure partie, voire l'intégralité du colorant auramine O à l'acide nucléique dans les mycobactéries³. Cependant, il a été démontré que les méthodes de coloration à base d'auramine O sont plus sensibles que les méthodes de microscopie optique pour la détection des bactéries acido-alcoolo-résistantes (BAAR)⁴. Cette augmentation de sensibilité est due, en grande partie, au contraste significatif que les colorations fluorescentes confèrent aux bacilles acido-alcoolo-résistants, qui apparaissent en vert sur fond sombre. Cette augmentation de contraste permet d'utiliser des objectifs à champs plus larges, et donc de diminuer la durée totale de l'examen.

Le kit de frottis BAAR F.A.S.T. QBC est formaté pour être portable et comprend les réactifs et consommables nécessaires pour effectuer la microscopie de fluorescence de frottis BAAR. Les composants sont conditionnés dans 10 unités compactes, contenant chacune des réactifs et des consommables pour 5 essais et comprennent le système innovant et efficace de kit de coloration à l'auramine O F.A.S.T. et les lames de microscope SureFocus (brevet en instance). Le kit de coloration à l'auramine O utilise une procédure rapide en quatre étapes qui ne prend que deux minutes, alors que les méthodes à l'auramine conventionnelles durent environ 15 à 20 minutes. Les lames de microscope SureFocus simplifient la microscopie de fluorescence à l'aide de repères fluorescents répartis dans la zone de frottis pour effectuer et maintenir la mise au point et pour marquer les distances afin de déterminer le nombre de champs examinés. Cela permet de réduire le stress et la fatigue de l'opérateur et contribue à assurer la qualité des résultats.

Composants du kit

Ce kit contient 10 emballages suffisants pour traiter approximativement 50 échantillons. Chacun des 10 emballages comprend les éléments suivants :

- 5 récipients de collecte d'expectoration
- 5 écouvillons
- 5 lames de microscope SureFocus F.A.S.T.
- 3 ml colorant auramine O F.A.S.T. QBC
- 3 ml décolorant/désactivateur F.A.S.T. QBC

Conditions de conservation

Conserver à 15 – 25 °C. Éviter une chaleur excessive. Ne pas utiliser après la date d'expiration.

Avertissements et précautions

Pour utilisation diagnostique *in vitro*

Des échantillons cliniques humains peuvent être porteurs de maladies infectieuses tels que les agents causaux 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 de *Mycobacterium tuberculosis* doivent être conduites en utilisant des procédures et pratiques de biosécurité de niveau 3.

Les substances chimiques contenues dans ce kit sont dangereuses et peuvent causer des blessures ou être mortelles. Utiliser ce produit dans une zone correctement ventilée avec un équipement de protection personnelle approprié. Maintenir le produit à l'abri des flammes nues. Consulter la fiche de sécurité pour plus d'informations concernant la sécurité et l'élimination des produits.

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 pour la détection de BAAR doivent être conduites par du personnel formé aux techniques utilisées ainsi qu'aux pratiques et procédures générales de laboratoire appliquées.

Attention : ce produit contient des lames de verre. Manipuler avec précaution.

Instructions d'utilisation

Pour utilisation avec des échantillons directs ou concentrés d'expectoration ou de culture.

Les cuvettes de collecte d'expectoration, les écouvillons et les lames SureFocus™ sont à usage unique exclusivement.

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.

Procédure de coloration :

1. Fixer par la chaleur une lame contenant un échantillon de frottis.
2. Recouvrir le frottis avec le colorant auramine O F.A.S.T. et laisser au repos pendant 1 minute.
3. Rincer doucement le frottis avec de l'eau déminéralisée ou de l'eau de distribution et évacuer le rinçage.
4. Recouvrir le frottis avec le décolorant/désactivateur F.A.S.T. et laisser au repos pendant 1 minute.
5. Rincer doucement le frottis avec de l'eau déminéralisée ou de l'eau de distribution et évacuer le rinçage.
6. Sécher la lame.

Procédure d'examen :

Examiner la lame en utilisant le système ParaLens QBC ou un système de microscopie de fluorescence équivalent. 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 :

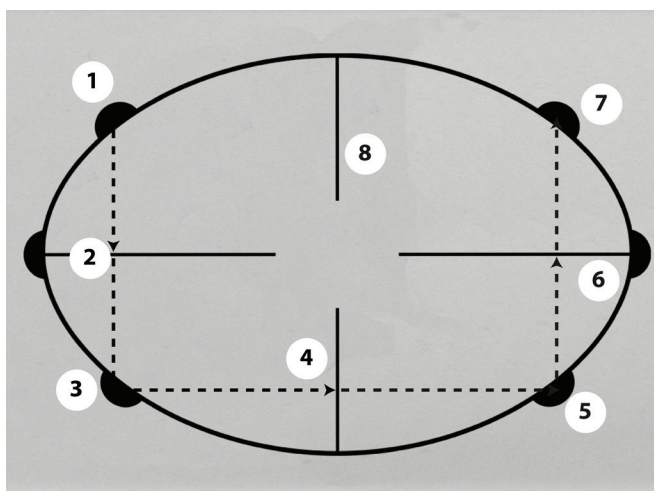
Placer la lame colorée sur la platine du microscope et centrer l'objectif sur un cercle de départ. En mode

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 :

Figure 1



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

Procédure de contrôle qualité :

Les lames doivent être colorées avec des réactifs utilisés pour le diagnostic d'échantillon de patient. Le technicien effectuant une coloration d'échantillon de patient doit effectuer la coloration de lame témoin selon les procédures de coloration d'échantillon. Les frottis positifs et négatifs doivent être examinés par des techniciens de laboratoire pratiquant le diagnostic d'échantillons de patient. Le contrôle qualité doit être effectué en routine et conformément aux réglementations en vigueur. Les résultats doivent être documentés.

1. Colorer la lame de contrôle qualité *F.A.S.T.* QBC avec la lame d'essai, en utilisant le kit de coloration à l'auramine O *F.A.S.T.* conformément à la procédure ci-dessus.
2. Maintenir les lames séparées pendant la procédure de coloration afin d'éviter une contamination croisée des réactifs de coloration d'une lame à une autre.
3. Examiner la lame colorée à l'aide d'un microscope approprié pour le type de coloration et enregistrer les résultats.

Une fluorescence inadéquate du témoin QC positif peut indiquer une dégradation du réactif de coloration. Ne pas utiliser pour des échantillons de patient jusqu'à ce que le problème soit corrigé.

Résultats attendus

En observant avec un microscope à fluorescence ayant une configuration de filtre d'excitation bleu et d'émission vert (par exemple, filtre d'excitation : 435 – 480 nm; filtre d'émission : 510 – 600 nm), les marquages sur la lame SureFocus doivent émettre une fluorescence verte et constituent un moyen utile pour la mise au point. Une fois la mise au point effectuée, des mycobactéries, telles que celles contenues dans le témoin positif, et les autres organismes acido-alcool-résistants émettent une fluorescence verte sur fond sombre. Tous les autres organismes, tels que ceux contenus dans le témoin négatif, doivent présenter les caractéristiques de coloration d'arrière-plan. Un bacille fluorescent constitue une identification provisoire d'espèce *Mycobacterium*.

Les mycobactéries dans le puits positif de la lame de contrôle qualité, doivent émettre une fluorescence vert vif. Le témoin négatif doit présenter les caractéristiques de coloration d'arrière-plan.

Si les résultats attendus ne sont pas obtenus, rechercher la cause du problème, qui peut comprendre un défaut des réactifs, de l'instrument, et des opérateurs. Si un défaut de témoin est suspecté, utiliser un autre moyen pour tester le système tel qu'un échantillon de patient (positif ou négatif connu). Ne pas produire de résultats de patient tant que le défaut du système n'a pas été corrigé.

Limitations

Certaines mycobactéries à croissance rapide peuvent ne pas émettre de fluorescence avec cette coloration. Les méthodes Ziehl-Neelsen, Kinyoun, ou d'autres doivent être utilisées sur ces échantillons. La fluorescence de frottis s'atténue progressivement avec le temps et peut se dégrader en cas de chauffage et illumination excessifs, par conséquent des échantillons colorés doivent être examinés dès que possible.

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.

Bien qu'un résultat positif indique la présence de mycobactéries, un résultat négatif ne permet pas d'exclure une infection. D'autres méthodes de diagnostic telles que la culture ou la PCR doivent être utilisées pour identification positive.

Si les lames SureFocus n'émettent pas de fluorescence ou que les lames de contrôle qualité présentent une

fluorescence faible ou nulle, le système de microscopie de fluorescence doit également être contrôlé afin de vérifier qu'il fonctionne correctement. Rechercher la cause du défaut, qui peut comprendre un défaut de réactifs, d'instrument et d'opérateurs. Si un défaut de témoin est suspecté, utiliser un autre moyen pour tester le système tel qu'un échantillon de patient (positif ou négatif connu). Ne pas produire de résultats de patient tant que le défaut du système n'a pas été corrigé.

Les réactifs de coloration *F.A.S.T.* peuvent se dégrader lorsqu'ils sont exposés à une chaleur excessive. Toujours effectuer un contrôle qualité pour déterminer l'intégrité du colorant avant de rapporter les résultats de patient. Ne pas utiliser le colorant si le contrôle qualité échoue.

Matériaux nécessaires non fournis

Le kit de frottis BAAR E-Z *F.A.S.T.* QBC est conçu pour être utilisé avec un système de microscopie de fluorescence capable d'exciter des échantillons de 425 à 480 nm et d'émettre une fluorescence d'au moins 510 à 600 nm. L'équipement additionnel comprend un chauffe-lame ou un brûleur (par exemple, une lampe à essence ou un bec Bunsen).

Références

1. Organisation mondiale de la santé. (2009) Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO Report 2009. WHO Press, Genève, Suisse.
2. Baron, E.J. et S.M. Finegold. (1990) Baily & Scott's Diagnostic Microbiology, 8^{ème} édition. The CV Mosby Company, Baltimore, Maryland.
3. Steingart K. R., et al. (2007) Fluorescence versus conventional for sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infectious Disease* 6:570-81.
4. Hanscheid, T. (2008) The future looks bright: low-cost fluorescencet microscopes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Coccidia*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.

Pour plus d'informations sur la commande de kits BAAR et accessoires *F.A.S.T.*, consulter notre site Web à l'adresse www.qbcdiagnostics.com. Les agents commerciaux QBC sont également disponibles au +1 (814) 692-7661 (États-Unis) et par e-mail à qbcsales@qbcdiag.com.

Références de produit

Kit de frottis BAAR <i>F.A.S.T.</i> QBC	427410
-----------------------------------------	--------



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



Caustique



Inflammable



Usage unique exclusivement