



**Kit de frottis BAAR avec solution de digestion
F.A.S.T.™ (400 essais)**

Manuel d'utilisation

Form 408, Rev. B
Révisé le 18.1.2012

Kit de frottis BAAR avec solution de digestion *F.A.S.T.*™ QBC

Utilisation prévue

Pour utilisation dans la digestion/décontamination et la préparation d'échantillons respiratoires de patients ou de cultures pour la détection ou caractérisation consécutive d'organismes acido-alcoolo-résistants.

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 organismes 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 organismes acido-alcoolo-résistants par contraste 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 organismes 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.

La méthode de référence pour le diagnostic de la tuberculose (TB) est la culture et est souvent conduite conjointement avec la microscopie de frottis ou après détection d'un échantillon positif de frottis. La préparation d'un échantillon d'expectoration pour culture requiert à la fois la diminution de la viscosité par digestion ainsi que la décomposition de l'échantillon en diminuant les taux de flore commune viable. Pour la digestion et la décontamination, la méthode NALC-NaOH est souvent utilisée⁴. Dans ce cas, NALC (N-acétyl-L-cystéine) agit en tant qu'agent mucolytique par rupture des associations entre des molécules de mucine individuelles. NaOH (hydroxyde de sodium) inactive la flore commune et les organismes acido-alcoolo-résistants, mais avec une exposition contrôlée (temps et concentration), il tue la flore commune et laisse les organismes acido-alcoolo-résistants viables. Après digestion, décontamination et concentration consécutive, l'échantillon résultant peut être utilisé pour culture et microscopie de frottis.

Le kit de frottis BAAR avec solution de digestion *F.A.S.T.* QBC comprend les réactifs et les consommables nécessaires pour effectuer la microscopie de fluorescence de frottis TB, comprenant la digestion et la décontamination d'échantillon. Les composants sont spécifiquement conçus pour fonctionner comme un système complet 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 *F.A.S.T.* 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. Cela permet de réduire le stress et la fatigue de l'opérateur et contribue à assurer la qualité des résultats.

Composants du kit

Le contenu de ce kit est suffisant pour traiter environ 400 échantillons et contient les composants suivants :

400	tubes de préparation d'expectoration stériles
1200	pipettes de transfert stériles
432	lames de microscope SureFocus
120 ml	colorant auramine O F.A.S.T. QBC
120 ml	décolorant/désactivateur F.A.S.T. QBC
5	lames témoins QC F.A.S.T.
9	solutions de digestion d'expectoration (75 ml)
4	sachets de tampon de digestion
1	notice d'utilisation du kit

Avertissements 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 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 être dangereuses ou mortelles. Les réactifs contiennent un alcali fort et peuvent causer des brûlures. Éviter tout contact avec les yeux et la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement à grande eau. En cas d'ingestion de solution de digestion d'expectoration, donner du lait, du blanc d'œuf ou de grandes quantités d'eau. En cas de contact avec les yeux ou d'ingestion, consulter immédiatement un médecin. Consulter la fiche de sécurité pour plus d'informations concernant la sécurité et l'élimination des produits.

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.

Instructions d'utilisation

Pour utilisation avec des échantillons respiratoires de patient.

Les tubes de préparation d'expectoration, les pipettes de transfert stériles, et les lames SureFocus sont exclusivement pour usage unique.

Préparation de tampon phosphate

1. Verser le contenu du sachet de poudre de tampon phosphate dans une fiole jaugée de 500 ml ou un flacon autoclavable avec une graduation à 500 ml.
2. Ajouter de l'eau à 500 ml et mélanger soigneusement.
3. Si une fiole jaugée est utilisée, verser le contenu dans une fiole autoclavable.
4. Autoclaver le tampon.

Procédure de digestion

1. Avant utilisation, desserrer sans le retirer le bouchon à vis du flacon en plastique de solution de digestion d'expectoration.
2. Localiser l'ampoule dans le flacon et serrer le flacon dans la position verticale jusqu'à rupture de l'ampoule.
3. Fermer le couvercle et agiter le flacon doucement pour dissoudre NALC. Éviter le moussage de la solution.
4. Dans un tube de centrifugeuse de 50 ml stérile sans aérosol, ajouter des quantités égales d'échantillon clinique et de solution de NALC.

5. Boucher le tube de centrifugeuse et mélanger l'échantillon jusqu'à ce qu'il soit liquéfié. Laisser la réaction de digestion se produire pendant 15 minutes à température ambiante. Éviter des temps de digestion plus longs étant donné que les mycobactéries sont inactivées après une exposition prolongée à la solution de digestion.
6. Ajouter du tampon phosphate stérile à un volume final de 50 ml et reboucher le tube de centrifugeuse.
7. Centrifuger l'échantillon pendant 15 minutes à 2 200 à 3 000 x g.
8. Décanner le surnageant dans un récipient pour danger biologique.
9. Remettre en suspension le culot dans 1 à 2 ml de tampon phosphate. L'échantillon doit maintenant être à pH 6,8.
10. L'échantillon est maintenant prêt pour test diagnostique et 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. Cependant, 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.

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

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.

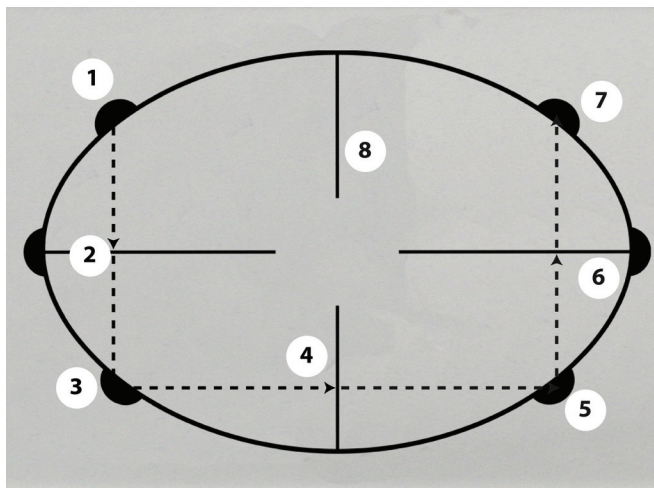
Examen du frottis :

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.

Résultats attendus

La solution de digestion d'expectoration *F.A.S.T.* QBC est utilisée pour la digestion et la décontamination d'échantillons respiratoires cliniques (expectoration ou lavage bronchique) suspectés de contenir des mycobactéries.

Si les procédures sont correctement appliquées, les échantillons visqueux sont liquéfiés et toute contamination par la flore normale est réduite ou éliminée.

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 de *Mycobacterium* spp.

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 du témoin est suspecté, utiliser un autre moyen pour tester le système tel qu'un échantillon de patient (positif ou négatif connu). Ne pas produire des résultats de patient tant que le défaut du système n'a pas été corrigé.

Limitations

Les tubes de préparation d'expectoration et les pipettes de transfert fournis sont stériles. Si l'emballage primaire est endommagé ou ouvert, ne pas utiliser le produit.

Aucun procédé de digestion-décontamination n'est adapté pour tous les échantillons cliniques dans toutes les situations. Lorsque vous sélectionnez une procédure, choisissez la procédure la plus douce pour réduire la contamination.

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.

Matériaux nécessaires non fournis

Le kit de frottis BAAR avec solution de digestion *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 de transmettre une fluorescence d'au moins 510 à 600 nm. L'équipement additionnel nécessaire comprend les éléments suivants :

- Chauffe-lame ou flamme
- Centrifugeuse capable de centrifuger les tubes de préparation d'expectoration à 2200-3000 x g
- Enceinte de biosécurité pour la manipulation des échantillons
- Équipement de protection personnelle

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. 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*.
4. Steingart K. R., *et al.* (2007) Fluorescence versus conventional for sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 6:570-81.
5. Essential Procedures for Clinical Microbiology. (1998) American Society of Microbiology. Washington, D.C.

Références de commande

Kit de frottis TB avec solution de digestion F.A.S.T. QBC	427408
Centrifugeuse F.A.S.T. QBC (115 V, 60 Hz)	427412
Centrifugeuse F.A.S.T. QBC (220 V, 50 Hz)	427413



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