

Kit Gram-Hücker L, slow action

RÉF. 362860-0000

Coloration différentielle des bactéries



IFU043A-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
Classification des dangers et informations relatives à la sécurité	2
Qualification du personnel	3
Équipement et réactifs spéciaux requis, mais non fournis.....	3
Procédure opératoire.....	3
Résultats escomptés.....	5
Performances	5
Contrôle qualité utilisateur.....	5
Autres produits	5
Recommandations, remarques et dépannage	6
Tableau des symboles et abréviations.....	7
Bibliographie	7
Suivi des modifications	7

Utilisation prévue

Le Kit Gram-Hücker L, slow action est destiné à être utilisé pour la coloration différentielle des bactéries 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

La coloration de Gram-Hücker est une coloration différentielle basée sur la perméabilité de la paroi bactérienne. Dans cette technique, la paroi bactérienne n'est pas colorée mais sa structure permet de classer les bactéries en Gram-positives ou Gram-négatives.

La solution de Lugol permet la formation d'un complexe intracellulaire avec Crystal violet oxalate. Une perméabilité plus importante de la paroi des bactéries Gram-négatives permet à l'alcool d'éliminer ce complexe. Les bactéries Gram-négatives peuvent fixer le Safranin et apparaissent alors colorées en rose orangé. Les bactéries Gram-positives, caractérisées par une perméabilité de la paroi moins importante, ne sont pas décolorées par l'alcool, et restent colorées en violet.

La coloration de Gram-Hücker, dont le premier objectif est de différencier les bactéries Gram-négatives des bactéries Gram-positives, est très utile en mycologie et en parasitologie (médicale et vétérinaire). En effet, les champignons pathogènes sont Gram-positifs et cette propriété spécifique peut être mise à profit pour détecter ce type d'agents dans les échantillons. Les spores de Microsporidia sont également Gram-positives et peuvent alors être détectées sur des frottis, en utilisant notamment des biopsies duodénales.

Description du kit

Crystal violet oxalate

Solution violet foncé limpide
RÉF. 3614901A240 1 X 240 mL

Lugol, PVP-stabilized solution

Solution brune limpide
RÉF. 3674002A240 1 X 240 mL

Slow differentiator (alcohol-based)

Solution incolore limpide
RÉF. 363030-0240 1 X 240 mL

Safranin

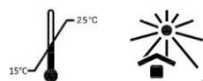
Solution rouge limpide
RÉF. 3615004A240 1 X 240 mL

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 avant et après ouverture : se reporter à la date de péremption figurant sur l'étiquette.



Classification des dangers et informations relatives à la sécurité

Crystal violet oxalate



Attention:

H226 - Liquide et vapeurs inflammables.

H319 - Provoque une sévère irritation des yeux.

H351 - Susceptible de provoquer le cancer.

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

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 et du visage.

P308+P313 - EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.

P337+P313 - Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

CONT Crystal violet

Lugol, PVP-stabilized solution

Étiquetage non applicable

Slow differentiator (alcohol-based)



Danger:

H225 - Liquide et vapeurs très inflammables.

H318 - Provoque 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.

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 CH₃(CH₂)₃OH

Safranin

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.



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 pour microscopes, source de chaleur douce (bec Bunsen ou plaque chauffante), le fixateur chimique (méthanol, éthanol, acide acétique ou formol...) et les dispositifs de 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.

Pour les étapes de coloration, placer la lame sur un support avec le frottis fixé dessus.

Protocole de coloration des frottis bactérien - Méthode de recouvrement manuel - Analyse manuelle au microscope

Durée de traitement : 02 min 50 s

Étapes	Réactif	Temps [mm: ss]	Indications
Colorer	Crystal violet oxalate	01:00	Non
Rincer	Eau	Non	Se débarrasser du réactif et éliminer l'excédant
Rincer	Lugol, PVP-stabilized solution	Non	Jet de Lugol pour éliminer l'eau de rinçage
Colorer	Lugol, PVP-stabilized solution	00:30	Peut être prolongé jusqu'à 1 min
Rincer	Eau	Non	Rincer minutieusement
Décolorer	Slow Differentiator	00:20	Peut être prolongé jusqu'à 40 secondes
Rincer	Eau	Non	Rapidement
Colorer	Safranin	01:00	Non
Rincer	Eau	Non	Rapidement
Sécher	Non	≥03:00	Non

Protocole de coloration des frottis en mycologie et parasitologie - Méthode de recouvrement manuel - Analyse manuelle au microscope

Durée de traitement : 01 min 40 s

Étapes	Réactif	Temps [mm: ss]	Indications
Colorer	Crystal violet oxalate	01:00	Non
Rincer	Eau	Non	Se débarrasser du réactif et éliminer l'excédant
Rincer	Lugol, PVP-stabilized solution	Non	Jet de Lugol pour éliminer l'eau de rinçage
Colorer	Lugol, PVP-stabilized solution	00:30	Peut être prolongé jusqu'à 1 min
Rincer	Eau	Non	Rincer minutieusement
Décolorer	Slow Differentiator	Non	Non
Rincer	Eau	Non	Rapidement
Colorer	Safranin	00:10	Peut être prolongé jusqu'à 1 min
Rincer	Eau	Non	Rapidement
Sécher	Non	≥03:00	Rapidement

Résultats escomptés

Frottis bactérien

Bactéries Gram-positives : violet

Bactéries Gram-négatives : orange - rose

Parasitologie et mycologie

Champignons pathogènes, spores de Microsporidia : violet.

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

L'exemple suivant concerne les échantillons bactériens.

RAL Diagnostics recommande d'utiliser un échantillon Gram positif et un échantillon Gram négatif pour le contrôle de qualité des réactifs lors du renouvellement des réactifs, pour chaque cycle de coloration ou au moins pour le premier cycle de coloration si une coloration est effectuée plusieurs fois par jour.

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

Ce contrôle pourrait être effectué à l'aide d'échantillons Gram-positif et Gram-négatif provenant d'échantillons de patients identifiés ou à l'aide de souches Gram positive es et Gram négatives connues (telles que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922). Les souches utilisées doivent être identifiées, éviter les espèces Gram-variable.

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

Ces contrôles qualité dépendent de l'autorisation du personnel qualifié.

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

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.

L'ajout de Polyvinylpyrrolidone (PVP) à Lugol, PVP-stabilized solution permet de supprimer la tension de vapeur de l'iode et assure une bonne conservation de la solution prête à l'emploi en flacon plastique.

L'utilisation d'un microscope à lumière verte (un filtre vert ou un filtre jaune superposé au filtre bleu) permet d'améliorer la netteté de l'observation. Le contraste dépend de la manière dont la différenciation est effectuée.

Le genre *Campylobacter* est peu coloré par R4 Safranin, tandis que le genre *Legionella* ne se colore pas.

Le liquide de rinçage pour la coloration peut être de l'eau distillée, déminéralisée ou du robinet.

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 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
	Comburant		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

CLARK G., *Staining procedures, Williams & Wilkins, 4th éd.*, 1981, p. 377-379.

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

VASTEL C.L., *Coloration Gram-Hücker, Le Tech. Biol.*, n°5, 1978, p. 243-245.

WEBER R., BRYAN R.T., OWEN R.L., WILCOX C.M., GORELKIN L., VISVESVARA G.S. and the Enteric Opportunistic Infections Working Group, *Improved light-microscopical detection of Microsporidia spores in stool and duodenal aspirates*, *The New England Journal of Medicine*, vol. 326, n°3, janv. 1992, p. 161-166.

Suivi des modifications

Date	Version	Modifications
05/2022	IFU043A-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