

UTILISATION PRÉVUE

Le kit de réactifs IMMY MycoDDR contient tous les réactifs nécessaires à la digestion et à la décontamination des échantillons cliniques pour le diagnostic des infections aux mycobactéries.

RÉSUMÉ et EXPLICATION

Les échantillons suspectés de contenir une flore bactérienne normale, transitoire ou contaminante doivent être soumis à un processus de décontamination chimique permettant une récupération efficace des mycobactéries. (1) La procédure de digestion et de décontamination et les réactifs utilisés dans ce kit se fondent sur les descriptions fournies par Kubica et al. (2) Le composé mucolytique N-acétyl-L-cystéine (NALC) est combiné avec une solution d'hydroxyde de sodium : citrate de sodium pour digérer le mucus, tandis que le pH élevé de l'hydroxyde de sodium tue toute bactérie contaminante. Le pH élevé de cette solution peut également tuer les mycobactéries au bout de 15 à 20 minutes, ce qui rend critique le moment du processus de digestion-décontamination.

Après le processus de digestion/décontamination, il est également essentiel que la solution soit ramenée à un pH neutre le plus rapidement possible. Le réactif A de NaOH à 2,5 % comprend un réactif indicateur de pH qui passe du bleu à un pH basique à l'incolore à un pH proche de la neutralité. Cela permet au technologue de laboratoire de titrer visuellement la solution à l'aide du tampon de neutralisation B inclus. La solution résultante est soumise à une centrifugation et décantation. Le culot de sédimentation de l'échantillon résultant est remis en suspension dans le tampon de remise en suspension C.

AVERTISSEMENTS et PRÉCAUTIONS

- Pour usage diagnostique in vitro uniquement
- Prendre des précautions pour éviter la contamination croisée entre les échantillons. Dans une étude rétrospective, 16 % des 140 cas de tuberculose multirésistante étaient le résultat d'une contamination croisée en laboratoire (3)

PRÉCAUTIONS CONCERNANT LES RÉACTIFS

- Le réactif A de NaOH à 2,5 % contient de l'hydroxyde de sodium, un produit chimique caustique. Faire attention lorsqu'on travaille avec cette solution.
- Il convient d'appliquer les précautions standard contre les risques biologiques en traitant des échantillons cliniques susceptibles de contenir des cellules viables de la tuberculose afin d'éviter la contamination ou l'infection d'autres échantillons ou du personnel de laboratoire.

RÉACTIFS FOURNIS

Quantités selon le numéro REF					
REF	NALC (flacons de 300 mg)	Réactif A de NaOH à 2,5 % (bouteilles de 60 ml)	Neutre. Tampon B (bouteilles de 30 ml)	Resuspens. Tampon C (bouteilles de 3 ml)	Resuspens. Tampon C (bouteilles de 60 ml)
TBNN1010-2.5	10	10	Aucun	Aucun	Aucun
TBP300-5	5	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun
TBP67-60	Aucun	Aucun	60	Aucun	Aucun
TBP67-8	Aucun	Aucun	8 flacons de 500 ml	Aucun	Aucun
TBRB30-60	Aucun	Aucun	Aucun	60	Aucun

MATÉRIEL NON FOURNI

- Centrifugeur
- Mélangeur vortex
- Pipettes stériles
- Lames de microscope
- Tubes à centrifuger
- Milieu TB

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Remarque : Le réactif A de NaOH à 2,5 % restera actif pendant 72 heures après l'ajout du réactif NALC. Pour optimiser les résultats, prière de jeter tout réactif restant après cette période.

- Desserrer le bouchon du flacon de réactif A de NaOH à 2,5 %.
- Avec le manchon de sécurité en plastique toujours attaché, casser soigneusement le haut de l'ampoule en verre contenant la poudre de NALC.
- Ajouter la poudre de NALC au flacon de réactif A de NaOH à 2,5 %. S'il reste de la poudre de NALC dans l'ampoule, il n'est pas nécessaire de la réhydrater à ce stade.

STABILITÉ ET STOCKAGE DES RÉACTIFS

Les réactifs MycoDDR contenus dans cet emballage sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée lorsqu'ils sont conservés à 15 °C-30 °C.

Après avoir mélangé le réactif A de NaOH à 2,5 % et la poudre de NALC, conserver toute portion inutilisée à 2 °C-8 °C pendant 72 heures maximum. Ne pas congeler ou chauffer au-dessus de 30 °C. Laisser le produit revenir à température ambiante avant utilisation.

PRÉLÈVEMENT ET TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons cliniques doivent être prélevés et transportés au laboratoire conformément aux protocoles et normes établis. Prière de se référer aux directives institutionnelles locales pour les procédures de collecte et de transport requises.

Tous les échantillons doivent être manipulés conformément aux directives des CDC/NIH (Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health) ou aux directives des

institutions locales concernant le sérum, le sang ou tout autre liquide corporel humain potentiellement infectieux. Avant de les jeter, stériliser les conteneurs d'échantillons et autres matériaux contaminés à l'autoclave.

PROCÉDURE DE TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

- Placer les échantillons cliniques (dans des tubes à centrifuger de 50 ml) dans une hotte de sécurité biologique appropriée avant le traitement.
- Desserrer les bouchons de chacun des tubes d'échantillons individuels sans les retirer. Il est important de n'avoir qu'un seul échantillon ouvert à la fois et d'éviter tout échange de bouchons
- En travaillant avec un échantillon à la fois, pipeter de manière aseptique un volume (jusqu'à 10 ml) de réactif A de NaOH à 2,5 %/réactif NALC (**voir la section Préparation des réactifs**) égal au volume de l'échantillon. Les échantillons d'un volume supérieur à 10 ml devront être divisés en deux tubes et traités séparément. Les culots de sédimentation doivent ensuite être combinés après les étapes de sédimentation/remise en suspension.
- Serrer les bouchons sur le tube à centrifuger et les vortexer pendant environ 30 secondes chacun.
- Laisser chaque échantillon incuber à température ambiante pendant 15 à 20 minutes, en vortexant brièvement toutes les 5 minutes.
- Après l'étape d'incubation, retirer le bouchon d'un seul tube d'échantillon et commencer lentement à verser le contenu d'un flacon de tampon de neutralisation B dans le tube. Observer la couleur du liquide dans le tube et arrêter de verser une fois que la couleur de la solution est devenue claire ou incolore.
- Jeter tout tampon de neutralisation B restant après utilisation.
- Répéter les étapes 6 et 7 pour chaque échantillon individuel, en utilisant un flacon séparé de tampon de neutralisation B sur chacun. Ne pas réutiliser le flacon sur plusieurs échantillons, sous peine de causer une contamination croisée et des résultats erronés.
- Serrer le bouchon sur chaque tube.
- Centrifuger chaque tube pendant 15 minutes à 3000 x g.
- Retirer les tubes d'échantillons dans la hotte de sécurité biologique.
- Verser lentement tout le surnageant dans un récipient anti-éclaboussures partiellement rempli d'un désinfectant approprié ou dans un tube jetable séparé pour éviter toute contamination croisée.
- À l'aide d'une pipette de transfert stérile, ajouter environ 0,5 ml à 1,0 ml d'un flacon individuel de tampon de remise en suspension C au culot de sédimentation et mélanger pour remettre le mélange en suspension.
- Préparer les frottis appropriés pour la coloration acido-résistante et/ou ensemencer les milieux de culture conformément aux protocoles de laboratoire.
- Ajouter 1 ml à 2 ml supplémentaires de tampon de remise en suspension C (selon les exigences de volume du laboratoire) au culot de sédimentation à l'aide d'une pipette de transfert stérile.
- Suivre les recommandations du fabricant pour toute procédure de diagnostic supplémentaire sur les culots de sédimentation remis en suspension.

CONTRÔLE QUALITÉ

Inspecter visuellement les tampons pour s'assurer qu'ils sont clairs et incolores, à l'exception de la solution de réactif A de NaOH à 2,5 % qui doit avoir une couleur bleue. Jeter tous les réactifs qui présentent une précipitation, une turbidité ou de la nébulosité.

REMARQUES SUR LA PROCÉDURE

Les échantillons qui sont régulièrement contaminés par des espèces de Pseudomonas peuvent nécessiter un traitement supplémentaire à l'acide oxalique, comme indiqué dans Kent & Kubica (2).

LIMITES

Il est nécessaire de suivre avec précision la procédure décrite ci-dessus. Une synchronisation, un tamponnage, une décantation, etc. inexacts peuvent entraîner la perte de certaines mycobactéries viables et des résultats de culture erronés.

RÉSULTATS ATTENDUS

La récupération de mycobactéries viables peuvent être attendus si elles sont présentes dans l'échantillon clinique et traités conformément à cette notice.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Les échantillons soumis aux tests de mycobactéries de routine ont été traités simultanément à l'aide du système IMMY Myco-DDR et du système de la Société A. À ce jour, 99 échantillons au total ont été testés, 38 échantillons pulmonaires (expectorations, LBA, liquide pleural) et 61 échantillons divers (tissus et plaies). Sur les 99 échantillons, 10 ont été testés positifs aux mycobactéries. La concordance globale entre IMMY et la société A est excellente (kappa = 0,878, IC à 95 % : 0,712-1,00).

IMMY Co. A	Mycobactérie Positif	Mycobactérie Négatif
Mycobactérie Positif	8	0
Mycobactérie Négatif	2	89

RÉFÉRENCES

- Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, et R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coord. éd., AS Weisfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Kent, P., Kubica, G.P., Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Centres de contrôle et de prévention des maladies (CDC). 1985.
- Small, P.M., N.B. McClenney et al., Molecular Strain Typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *J.Clin. Microbiol.* 31(7):1677-1682.

IMMY, Inc.
2701, promenade Corporate Center.
Norman, OK 73069, États-Unis
(405)360-4669/(800) 654-3639
Fax : (405) 364-1058
e-Mail : info@immy.com
Site Web : www.immy.com

CE
EC REP
MDSS
Schiffgraben 41
30175 Hanovre, Allemagne

30 °C	Stockage 15 °C-30 °C	LOT	Numéro de lot
15 °C	Fabricant	REF	Numéro de référence
Date de péremption	Conforme à la norme européenne Exigences syndicale	IVD	Diagnostics in vitro
CE	Suffisant pour « n » tests	Σ	

NaOH à 2,5 %