

Coloration MCDh



Fixation et coloration différentielle de structures cellulaires

IFU005A-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 dispositif.....	2
Stockage.....	2
Composants actifs.....	2
Classification des dangers et informations relatives à la sécurité.....	3
Qualification du personnel.....	3
Équipement et réactifs spéciaux requis, mais non fournis.....	3
Procédure opératoire.....	4
Résultats escomptés.....	6
Performances.....	6
Contrôle qualité utilisateur.....	6
Autres produits.....	7
Recommandations, remarques et dépannage.....	7
Tableau des symboles et abréviations.....	8
Bibliographie.....	8
Suivi des modifications.....	8

Utilisation prévue

La coloration MCDh est destinée à être utilisée pour la fixation et la coloration différentielle de structures cellulaires 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 panoptique MCDh permet de réaliser une numération formule sanguine par l'application successive de quatre réactifs : MCDh 1, MCDh 2, MCDh 3 et MCDh 4.

Variante de la coloration de May-Grünwald Giemsa, la coloration MCDh permet également d'effectuer une étude cytologique des fluides (urines, cérebrospinal, articulaire, pleural, etc.) et des échantillons solides (biopsies, tissus, écouvillonnages, etc.). L'interprétation des frottis permet de réaliser une évaluation qualitative et quantitative de la présence de bactéries, de leucocytes et de cellules épithéliales.

Le MCDh 1, formulé avec de l'alcool éthylique, est un mélange de colorants neutres. Il permet la fixation du frottis sanguin et prépare la coloration, notamment celle des éléments hydrosolubles tels que les granulations basophiles. Ces colorants sont inactifs en milieu alcoolique et réagissent uniquement de manière sélective une fois libérés dans une solution aqueuse de MCDh 2. Cette action génère la précipitation des colorants neutres, ce qui induit la coloration des érythrocytes, du cytoplasme, de certains leucocytes tels que les granulocytes neutrophiles, du cytoplasme bactérien ainsi que des granulations éosinophiles. Le MCDh 3 est une solution aqueuse qui colore le cytoplasme des monocytes et des lymphocytes. MCDh 3 facilite également le processus métachromatique par la coloration en rouge des granulations azurophiles.

Enfin, le MCDh 4 élimine l'excès de colorant et participe à la différenciation des éléments cellulaires grâce à l'action d'agents de rinçage spécialement sélectionnés.

L'action successive des réactifs MCDh 1, MCDh 2, MCDh 3 et MCDh 4 donne une teinte violette (typique des résultats de coloration Romanowsky-Giemsa), en particulier visible dans la chromatine, les plaquettes et les granulations neutrophiles.

Description du dispositif

MCDh 1

Solution bleu foncé limpide

RÉF. 313590-1000

1 x 1,0 L

RÉF. 313590-2500

1 x 2,5 L

MCDh 2

Solution incolore limpide

RÉF. 313570-1000

1 x 1,0 L

RÉF. 313570-2500

1 x 2,5 L

MCDh 3

Solution bleu foncé limpide

RÉF. 313560-1000

1 x 1,0 L

RÉF. 313560-2500

1 x 2,5 L

MCDh 4

Solution incolore limpide

RÉF. 313600-1000

1 x 1,0 L

RÉF. 313600-2500

1 x 2,5 L

Stockage

Température de conservation : 15-25 °C à l'abri de la lumière.

Durée de conservation du flacon avant et après ouverture : se référer à la date de péremption figurant sur l'étiquette.



Composants actifs

MCDh 1

May-Grünwald : env. 0,1%

Bleu azur de méthylène I – CAS 531-55-5 : env. 0,05%

MCDh 2

Monophosphate potassique – CAS 7778-77-0 : env. 0,05%

Phosphate disodique anhydre – CAS 7558-79-4 : env. 0,04%

MCDh 3

Bleu de méthylène – CAS 61-73-4 : < 0,25 %

MCDh 4

Monophosphate potassique – CAS 7778-77-0 : env. 0,03%

Phosphate disodique anhydre – CAS 7558-79-4 : env. 0,03%

Pour un lot spécifique, se reporter au certificat d'analyse correspondant disponible sur my.ral-diagnostics.fr.

Classification des dangers et informations relatives à la sécurité

MCDh 1

Danger : H225- Liquide et vapeurs très 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.



MCDh 2

Attention : H317 - Peut provoquer une allergie cutanée. H412 - Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P261 - Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.

P280 - Porter des gants de protection, des vêtements de protection, un équipement de protection des yeux. P333+P313 - En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin. P362+P364 - Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation



CONT	5-chloro-2-méthyl-2H-isothiazol-3-one / 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one
-------------	--

MCDh 3

Non applicable

MCDh 4

Attention : H226 - Liquide et vapeurs inflammables. H317 - Peut provoquer une allergie cutanée. 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. P261 - Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.

P280 - Porter des gants de protection, des vêtements de protection, un équipement de protection des yeux. P333+P313 - En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin. P362+P364 - Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation



CONT	5-chloro-2-méthyl-2H-isothiazol-3-one / 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one
-------------	--

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.raldiagnosics.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 de microscope et éthanol absolu.

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

Frottis sanguin manuel : homogénéiser le tube en le retournant lentement et installer un dispositif d'étalement du sang. Retourner le tube et presser délicatement le dispositif sur une lame pour y déposer une petite goutte de sang (Fig. 1 - lame A à l'étape 1).

En utilisant une autre lame inclinée à 45° (Fig. 1 - lame B à l'étape 1), étaler le sang par capillarité sur le bord court (Fig. 1 - étapes 2 & 3) et tirer le frottis d'un geste franc (Fig. 1 - étape 4). Un frottis de bonne qualité ne va pas jusqu'à l'extrémité de la lame et présente une diminution progressive de l'épaisseur jusqu'à son extrémité effilée. Laisser le frottis sécher à l'air libre avant de le fixer ou de le colorer.

NB : en l'absence de dispositif d'étalement du sang, ouvrir le tube et utiliser une pipette pour déposer une goutte de sang.

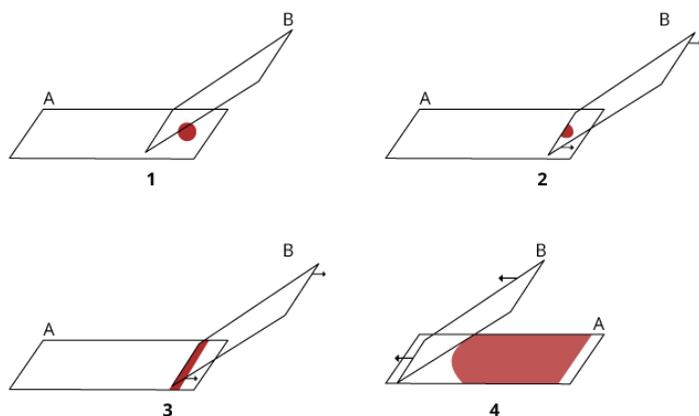


Figure 1. Représentation schématique de la réalisation d'un frottis sanguin

A & B : Lames, 1 – 4 : étapes 1 à 4

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...)

NB : 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.

Préparation des réactifs et instruments

Aucune préparation n'est requise. Les solutions sont prêtes à l'emploi. Transférer les solutions dans des bacs de coloration comme indiqué dans les protocoles ci-dessous.

Protocoles

Les étapes de coloration des protocoles indiqués ci-dessous consistent en des bains successifs des lames dans les différents bacs de coloration.

Protocole pour les échantillons hématologiques - Méthode de coloration manuelle par bain - analyse par systèmes automatisés CellaVision®

Durée de traitement : 11 min 30

Étapes	Réactif	Temps [mm: ss]	Indications
Fixer et pré-colorer	MCDh1	06: 00	Ne pas agiter
Colorer	MCDh2	01: 00	Agiter dans le bain entre 5 et 10 fois à la fin du compte à rebours
Colorer	MCDh2	02: 00	Agiter dans le bain entre 5 et 10 fois au début et à la fin du compte à rebours
Rincer	MCDh4	02: 00	à rebours
Sécher	Non	≥03: 00	Non

Protocole pour les échantillons hématologiques- Méthode de coloration manuelle par bain - Analyse manuelle au microscope

Durée de traitement : 09 min 50

Étapes	Réactif	Temps [mm: ss]	Indications
Fixer et pré-colorer	MCDh1	06: 00	Ne pas agiter
Colorer	MCDh2	01: 00	Agiter délicatement 3 fois dans le bain à la fin du compte à rebours
Colorer	MCDh2	02: 00	
Colorer	MCDh3	00: 40	
Rincer	MCDh4	00: 10	Agiter continuellement dans le bain pendant le compte à rebours
Sécher	Non	≥03: 00	Non

Remarque : en cas de phénomène de réfringence/d'artefact d'eau, préfixer les lames 2 min dans un bain d'éthanol absolu avant la coloration. Démarrer directement la coloration après l'étape de préfixation sans sécher les lames.

Protocole pour les échantillons hématologiques - Méthode de coloration automatisée par bain - analyse par systèmes automatisés CellaVision®

Durée de traitement : 11 min 30

Étapes	Réactif	Temps [mm: ss]	Indications
Fixer et pré-colorer	MCDh1	06: 00	Ne pas agiter
Colorer	MCDh2	01: 00	Agiter
Colorer	MCDh2	02: 00	
Colorer	MCDh3	00: 30	
Rincer	MCDh4	02: 00	
Sécher	Non	≥03: 00	Non

Protocole pour les échantillons hématologiques- Méthode de coloration automatisée par bain - Analyse manuelle au microscope

Durée de traitement : 09 min 50

Étapes	Réactif	Temps [mm: ss]	Indications
Fixer et pré-colorer	MCDh1	06: 00	Ne pas agiter
Colorer	MCDh2	01: 00	Agiter
Colorer	MCDh2	02: 00	
Colorer	MCDh3	00: 40	
Rincer	MCDh4	00: 10	
Sécher	Non	≥03: 00	Non

Pour les systèmes automatisés, la préfixation peut être effectuée dans le premier bain du système automatisé et avec un bain unique de MCDh2 plus long.

Protocole pour les échantillons cyto-bactériens - Méthode de coloration manuelle par bain - Analyse manuelle au microscope

Durée de traitement : 09 min 32

Étapes	Réactif	Temps [mm: ss]	Indications
Fixer et pré-colorer	MCDh1	07: 00	Ne pas agiter
Colorer	MCDh2	01: 00	Agiter délicatement dans le bain à la fin du compte à rebours
Colorer	MCDh2	01: 00	
Colorer	MCDh3	00: 30	
Rincer	MCDh4	00: 02	Agiter continuellement dans le bain pendant le compte à rebours
Sécher	Non	≥03: 00	Non

Résultats escomptés

Échantillons hématologiques :

Noyaux/chromatine : pourpre +/- dense

Cytoplasme des granulocytes : rose violacé pâle

Granulations de granulocytes éosinophiles : orangé

Granulations de granulocytes basophiles : bleu foncé

Granulations de granulocytes neutrophiles : +/- violet foncé

Cytoplasme des lymphocytes avec ARN : bleu franc

Cytoplasme de lymphocytes sans ARN : bleu clair

Granulations de lymphocytes azurophiles : rouge

Cytoplasme des monocytes : bleu trouble

Érythrocytes : beige rosé

Chromomère de plaquettes : rouge violacé

Hyalomère de plaquettes : bleuté

Noyau de parasites sanguin : rouge

Cytoplasme de parasites sanguin : bleu

Échantillons cyto-bactériens

Noyaux/chromatine : pourpre +/- dense

Cytoplasme : bleu clair à bleu violacé clair

Érythrocytes : beige rosé

Bactéries : bleu à rose violacé

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

Les utilisateurs ont la responsabilité de déterminer les modes opératoires appropriés de contrôle qualité leur laboratoire et de se conformer aux réglementations de laboratoire applicables.

Échantillon hématologique : RAL Diagnostics recommande d'effectuer la coloration de frottis sanguins fraîchement réalisés présentant une numération leucocytaire normale et sans pathologie connue lors du renouvellement du réactif et pour le premier cycle de coloration chaque jour. Les lames colorées à des fins de contrôle de la qualité doivent être vérifiées pour s'assurer qu'elles présentent des résultats satisfaisants pour le test prévu (correctement colorées et exemptes de précipité).

Échantillon bactérien : RAL Diagnostics recommande d'utiliser un échantillon de bactéries connues pour effectuer 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.

Le résultat est vérifié au microscope, en comparaison avec les résultats obtenus par la technique habituelle validée par le laboratoire.

Les résultats de la coloration doivent également être conformes aux résultats prévus, indiqués dans ce manuel.

Ces procédures de contrôle de la qualité ne doivent être effectuées que par du personnel qualifié.

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.

En cas de phénomène de réfringence/d'artefact d'eau, préfixer les lames 2 min dans un bain d'éthanol absolu avant la coloration.

Pour les systèmes automatisés, la préfixation peut être effectuée dans le premier bain du système automatisé et avec un bain unique de MCDh2 plus long.

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. S'il est nécessaire de conserver les préparations de frottis colorés pendant plusieurs mois ou années, RAL Diagnostics recommande de les monter avec une lamelle, avec un milieu de montage approprié, et de les conserver dans une boîte à l'abri de la lumière et de la poussière.

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, effluent 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
			Conservation à l'abri de la lumière
			Limite de température : 15-25°C
			Limite de température : 15-30°C
			Conservation 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

BENATTAR L., FLANDRIN G., *Morphometry and Quality Control for a May-Grünwald Giemsa stained preparation. A 40 centers cooperative study. Leuk. & Lymphoma* 1999, 33, 587-591.

BENATTAR L., FLANDRIN G., *Étapes de l'automatisation de l'étude microscopique du sang. Rencontre Médecins biologistes, 2002. ATEB, Journée Technique Parisienne, mars 1977.*

DUHAMEL G., DUHAMEL E., *Cytologie hématologique, Les cellules pathologiques I et II, Coloration au May-Grünwald Giemsa RAL, Biologiste et Praticien et Réactifs RAL, 1984 et 1989.*

École Nationale de Chimie, *Coloration de Pappenheim, Présentation théorique des mécanismes cytochimiques des colorants neutres avec applications techniques détaillées, Journée du technicien biologiste, mars 1980, p. 1-9.*

GENTILHOMME O., TREILLE-RITOUET D., BRYON P-A., *Cytologie hématologique, Les cellules normales, Coloration au May-Grünwald Giemsa RAL, Réactifs R.A.L, 1989.*

THEML H., *ATLAS de poche d'Hématologie, Médecine-Sciences Flammarion, p. 19-25, 2000*

Suivi des modifications

Date	Version	Modifications
05/2022	IFU005A-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