

# Kit Fluo-RAL

**REF: 359000**

## Fluorescenční diferenciální barvení acidorezistentních bakterií

Pro použití v laboratoři vyškoleným personálem. In Vitro diagnostické zařízení.

### 1 – Použití

Kit Fluo-RAL je určen pro diferenciální barvení acidorezistentních bakterií pro fluorescenční mikroskopii.

### 2 – Princip stanovení

Souprava Fluo-RAL umožňuje rychlou fluorescenční detekci mykobakterií a dalších acidorezistentních bakterií ve vzorku. Charakteristická struktura bakteriální stěny mykobakterií zabraňuje průniku odbarvovacího roztoku do buňky. To pak zajistí, že si bakterie ponechají Auramine barvivo, oproti bakteriím, které nejsou acidorezistentní, které se odbarví a poté nabarví Thiazine červenou.

### 3 – Reagencie

#### Fixative Fluo-RAL

Čirá, bezbarvá tekutina

362115-0250 1 x 250 ml

#### Auramine Fluo-RAL

Žlutá, kalná tekutina

362325-0125 1 x 125 ml

#### Carbolic Solution for Auramine Fluo-RAL

Čirá, bezbarvá tekutina

362530-0125 1 x 125 ml

#### Degommier discolouring solution Fluo-RAL

Čirá, bezbarvá tekutina

362210-0250 1 x 250 ml

#### Thiazine red Fluo-RAL

Čirá, červená tekutina

362780-0125 1 x 125 ml

#### Carbolic solution for Thiazine Red Fluo-RAL

Čirá, bezbarvá tekutina

362610-0125 1 x 125 ml

#### 4 – Skladování a manipulace

Výše uvedené reagensie skladujte při pokojové teplotě (15 – 25°C), mimo přímé sluneční světlo.

Datum expirace před a po otevření jsou uvedeny na obalu.



Veškerá manipulace se vzorky a reagensiemi musí být prováděna vyškoleným personálem dle relevantních norem. Při manipulaci používejte správná ochranná zařízení pro jednotlivce i pro pracoviště dle příslušných regulací.

Personál musí být obeznámen s klasifikací nebezpečí materiálu. Viz bezpečnostní list pro uvedené reagensie.

Měření musí být provedeno autorizovaným personálem dle platných laboratorních řádů.

#### 5 – Aktivní látky

- 362115: Trichlor-octová kyselina CAS 76-03-9, ≤ 1%
- 362325: Ethanol CAS 364-17-5, < 10%  
Auramine O CAS 2465-27-2, < 1%  
Fenol CAS 108-95-2, < 3%
- 362530: Fenol CAS 108-95-2, < 10%
- 362210: Ethanol CAS 64-17-5, ≤ 95%  
Kyselina chlorovodíková CAS 7647-01-0, < 1%
- 362780: Thiazine Red CAS 2150-33-6, < 1%  
Karbonát sodný, CAS 497-19-8, < 1 %
- 362610: Fenol CAS 108-95-2, < 1%

#### 6 – Příprava vzorku

Manipulujte se vzorky dle laboratorních norem.

##### Vzorky z tekutého média:

Vezměte mezi 300 až 400 µl tekutého média (spolu se shluky), nalijte do mikrozkušavku. Stočte v centrifuze 1 minutu při 10 000rpm, odstraňte supernatant. Přidejte 2 až 3 kapky fyziologického roztoku, zamíchejte vortexem nebo s očkem. Vytvořte nátěr.

##### Manuální bakteriální nátěr:

Vytvořte tenký nátěr bakterií, nechte uschnout při pokojové teplotě. Poté můžete nátěr zafixovat teplem nebo chemickým fixativem (methanol, ethanol, kyselina octová, formalin).

**Nikdy nefixujte teplem nátěr, který není úplně suchý. Mohl by popraskat a odpařit bakterie do vzduchu.**

Dle potřeby mohou být typy fixace kombinovány.

### Manuální bakteriální nátěr z tekuté nebo pevné kultury:

Dejte kapku SUREFIX na sklíčko a na tuto kapku dejte očkem kulturu z tekutiny (viz výše) nebo z kolonie. Zamíchejte kapku SUREFIX s vzorkem a vytvořte jednolitý nátěr. Nechte uschnout na vzduchu, pak jej nechte na teplé plotýnce 30 minut při 80°C.

### **7 – Příprava reagensů, nástrojů a produkty neobsažené v balení**

Balení neobsahuje: Mikroskopická sklíčka, Fluorescenční mikroskop s FITC sadou filtrů (Auramin Ex. 430 nm/Em. 510 nm, Thiazine Red Ex. 510 nm/ Em. 600 nm) a následující reagenty:

336000-0050 SUREFIX

Použité reagenty jsou závislé na užitém protokolu.

Fixative Fluo-RAL a Degommier Discolouring solution Fluo-RAL jsou připraveny k použití.

Připravte roztok Auraminu smícháním Auramine Fluo-RAL a Carbolic Solution for Auramine Fluo-RAL v poměru 1:1.

Připravte roztok Thiazine Red smícháním Thiazine Red Fluo-RAL a Carbolic solution for Thiazine Red Fluo-RAL v poměru 1:1.

### **8 – Protokoly**

Níže uvedené protokoly sestávají z postupných pokrývání sklíček reagenty. Uvedené časy se vztahují pouze na kontakt reagenty se vzorkem.

Při metodě pokrývání barvami položte sklíčka na stojánek s zafixovaným vzorkem nahoru.

### **Standardní bakteriální nátěr – manuální barvení pokrytím – manuální mikroskopická analýza**

Délka barvení: 32 minut

Kroky	Reagenty	Čas [min:s]	Instrukce
Fixace	Fixative Fluo-RAL	05:00	-
Opláchnutí	Destilovaná voda	01:00	-
Barvení	Auramine roztok	15:00	-
Opláchnutí	Destilovaná voda	01:00	-
Odbarvení	Degommier discolouring solution Fluo-RAL	03:00	-
Opláchnutí	Destilovaná voda	01:00	-
Barvení	Thiazine Red roztok	05:00	-
Opláchnutí	Destilovaná voda	01:00	-
Schnutí	-	≥03:00	Mimo světlo

### Krátký bakteriální nátěr – manuální barvení pokrytím – manuální mikroskopická analýza

Délka barvení: 18 minut 30 sekund

Kroky	Reagencie	Čas [min:s]	Instrukce
Fixace	Fixative Fluo-RAL	03:00	-
Opláchnutí	Destilovaná voda	01:00	-
Barvení	Auramine roztok	10:00	-
Opláchnutí	Destilovaná voda	01:00	-
Odbarvení	Degommier discolouring solution Fluo-RAL	00:30	-
Opláchnutí	Destilovaná voda	01:00	-
Barvení	Thiazine Red roztok	01:00	-
Opláchnutí	Destilovaná voda	01:00	-
Schnutí	-	≥03:00	Mimo světlo

### Rychlý bakteriální nátěr – manuální barvení pokrytím – manuální mikroskopická analýza

Délka barvení: 4 minuty 30 sekund

Kroky	Reagencie	Čas [min:s]	Instrukce
Fixace	Fixative Fluo-RAL	01:00	-
Opláchnutí	Destilovaná voda	-	-
Barvení	Auramine roztok	01:00	-
Opláchnutí	Destilovaná voda	-	-
Odbarvení	Degommier discolouring solution Fluo-RAL	00:30	-
Opláchnutí	Destilovaná voda	-	-
Barvení	Thiazine Red roztok	01:00	-
Opláchnutí	Destilovaná voda	-	-
Schnutí	-	≥03:00	Mimo světlo

## 9 – Předpokládané výsledky

### Bakteriální nátěr

**AFB:** Fluorescenční zeleno-žlutá

**Pozadí preparátu:** Červená

Pokud se výsledky liší od předpokladu, kontaktujte prosím výrobce nebo jeho zástupce.

## 10 - Charakteristika

Analytická validita reagensů je zaručena CE certifikací. Pro optimální výsledky používejte čisté a suché laboratorní příslušenství. Laboratoř je zodpovědná za kontaktování výrobce nebo jeho zástupce při jakékoliv závažné příhodě.

### Další informace:

Je nutné předem zafixovat bakteriální nátěr.

Auramine Fluo-RAL je normálně kalný. Doporučuje se obnovit barvicí roztoky alespoň jednou týdně.

Auramine a Thiazine Red roztoky jsou stabilní týden po rozpuštění.

Vzorky nechávejte schnout mimo světlo.

Mikroskopická analýza je prováděna s 20x a 40x zvětšením pro suchý objektiv bez krycího sklíčka. Pro každý pozitivní výsledek pod fluorescencí je zapotřebí výsledek potvrdit novým nabarvením vzorku metodou Ziehl za tepla nebo studě (Kit RAL ZN nebo Kit Cold ZN).

## 11 – Kontrola kvality

Uživatelé jsou zodpovědní za provedení kontroly kvality, její procedury a návaznosti s příslušnými laboratorními řády.

RAL Diagnostics doporučuje použít pozitivní a negativní kontrolu při každé obnově reagensů a pro první cyklus barvení dne. Sklíčka nabarvená pro kontrolu kvality by měly být správně nabarveny a bez precipitátů.

Sklíčka mohou být připravena předem a řádně tepelně zafixována pro skladování.


Pozitivní kontrolu připravujte ze vzorku pozitivního pacienta nebo z roztoku AFB kultury (např.: Mykobakterium abscessus CIP 108541).




Výsledky barvení pro každý typ buněk musí souhlasit s uvedenými předpokládanými výsledky. Kontrolu kvality musí provádět pouze vyškolený personál.

## 12 – Bezpečnostní údaje

Se všemi vzorky biologického původu by se mělo manipulovat jako s potencionálně infekčními. Likvidaci provádějte dle místních platných regulací.

Chemický a biologický odpad musí být shromážděn a likvidován registrovanými společnostmi. Bezpečnostní údaje jednotlivých reagensů naleznete v jejich příslušných bezpečnostních listech.

Fixative Fluo-RAL	
H314	Způsobuje vážné popáleniny a poškození očí.
H412	Škodlivý pro vodní organismy s dlouhodobými následky.
P280	Používejte ochranné prostředky – oblečení, rukavice, brýle a ochranu obličeje.
P301+P330+P331+P310	PŘI POŽITÍ: Vypláchněte ústa, nevyvolávejte zvracení. Ihned volejte toxikologické středisko nebo lékařskou pomoc.

P303+P361+P353+P310	PŘI POTŘÍSNĚNÍ: Ihned odstraňte kontaminované oblečení. Opláchněte vodou nebo osprchujte. Ihned volejte toxikologické středisko nebo lékařskou pomoc.
P305+P351+P338+P310	PŘI KONTAKTU S OČIMA: Opatrně vyplachujte několik minut vodou. Pokud lze, vyjměte kontaktní čočky, pokračujte v promývání. Ihned volejte toxikologické středisko nebo lékařskou pomoc.
<b>Auramine Fluo-RAL</b>	
H226	Hořlavá kapalina a páry.
P210	Držte dál od zdrojů tepla, jiskření, teplých povrchů, otevřených plamenů a dalších zdrojů ohně. Nekuřte.
<b>Carbolic solution for Auramine Fluo-RAL</b>	
H302	Škodlivý při požití.
H314	Způsobuje vážné popáleniny a poškození očí.
H341	Podezření na působení genetických defektů.
P201	Před použitím si prostudujte pokyny k použití.
P264	Po manipulaci s produktem si důkladně umyjte ruce.
P280	Používejte ochranné prostředky – oblečení, rukavice, brýle a ochranu obličeje.
P301+P330+P331+P310	PŘI POŽITÍ: Vypláchněte ústa, nevyvolávejte zvracení. Ihned volejte toxikologické středisko nebo lékařskou pomoc.
P303+P361+P353+P310	PŘI POTŘÍSNĚNÍ: Ihned odstraňte kontaminované oblečení. Opláchněte vodou nebo osprchujte. Ihned volejte toxikologické středisko nebo lékařskou pomoc.
P305+P351+P338+P310	PŘI KONTAKTU S OČIMA: Opatrně vyplachujte několik minut vodou. Pokud lze, vyjměte kontaktní čočky, pokračujte v promývání. Ihned volejte toxikologické středisko nebo lékařskou pomoc.
Obsahuje	C6H5OH
<b>Degommier discolouring solution Fluo-RAL</b>	
H225	Vysoce hořlavá kapalina a páry.
H314	Způsobuje vážné popáleniny a poškození očí.

P210	Držte dál od zdrojů tepla, jiskření, teplých povrchů, otevřených plamenů a dalších zdrojů ohně. Nekuřte.
P280	Používejte ochranné prostředky – oblečení, rukavice, brýle a ochranu obličeje.
P301+P330+P331+P310	PŘI POŽITÍ: Vypláchněte ústa, nevyvolávejte zvracení. Ihned volejte toxikologické středisko nebo lékařskou pomoc.
P303+P361+P353+P310	PŘI POTŘÍSNĚNÍ: Ihned odstraňte kontaminované oblečení. Opláchněte vodou nebo osprchujte. Ihned volejte toxikologické středisko nebo lékařskou pomoc.
P305+P351+P338+P310	PŘI KONTAKTU S OČIMA: Opatrně vyplachujte několik minut vodou. Pokud lze, vyjměte kontaktní čočky, pokračujte v promývání. Ihned volejte toxikologické středisko nebo lékařskou pomoc.

#### Thiazine Red Fluo-RAL

Bez značení.

#### Carbolic solution for Thiazine Red Fluo-RAL

Bez značení.

#### 13 – Reference

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

**GEROME P., FABRE M., SOLER C.**, *Validation of the kit Fluo-RAL (Réactifs RAL) for screening of mycobacteria using auramine staining.*, (1) Laboratoire de biologie médicale, HIA Desgenettes 69275 Lyon, (2) Laboratoire de biologie médicale, HIA Percy 92141 Clamart, FRANCE, Poster Réactifs RAL 2008.

**GROSSET J., CATALAN F., LEVENTIS S.**, *Le problème actuel des mycobactéries*, Biologiste et Praticien, n°39, 1979, p. 1-22.

**MAUGEIN J., VACHER S., DEGRANGE S.**, *Comparison between different auramine staining kits*, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Haut Lévêque 33604 PESSAC, FRANCE, Poster Réactifs RAL 2007.

**PACAUD G.**, *Coloration en mycobactériologie*, Réactifs RAL, 1977, p. 7-10.

**PACAUD G.**, *Les colorations dans la pratique quotidienne en mycobactériologie*, ATEB, Journée Technique Parisienne, mars 1977.

Procedure modified by Medical Biology Laboratory, HIA Percy in Clamart -France (C.Soler, M.Favre).

Revize: 05\_2022

Verze: IFU065A-RAL