

PARA-SELLES / KOP-COLOR II FUMOUCZE®



COLORATION ET CONCENTRATION DES ÉLÉMENTS PARASITAIRES DANS LES SELLES

BUT DU TEST :

PARA-SELLES / KOP-COLOR II FUMOUCZE® permet d'effectuer :

l'examen direct des éléments parasitaires dans les selles grâce au KOP-COLOR II.

la méthode de concentration des éléments parasitaires selon Bailenger avec coloration par le KOP-COLOR II.

la méthode de concentration des éléments parasitaires selon la technique IODÉSINE concentration.

La technique IODÉSINE concentration remplace celle du M.I.F. concentration. Le KOP-COLOR II remplace le KOP-COLOR. Les colorants entrant dans la composition de ces solutions restent inchangés. La Base pour IODÉSINE et le KOP-COLOR II ne contiennent ni formaldéhyde, ni dérivé mercuriel de manière à améliorer la sécurité au niveau du poste de travail.

COMPOSITION DU COFFRET :

- Solution tampon acéto-acétique pH 5
- Base pour IODÉSINE
- KOP-COLOR II
- Lugol
- Tubes coniques de 30 mL
- Tubes coniques de 10 mL
- Spatules
- Notice d'utilisation

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI :

- Micropipette 10-50 µL, micropipette 100-1000 µL
- Tubes à hémolyse
- Pipettes Pasteur
- Lames + lamelles pour microscopie
- Microscope
- Vortex
- Centrifugeuse
- Eau physiologique
- Ether ou acétate d'éthyle
- Conteneur pour déchets contaminés

STOCKAGE DES RÉACTIFS :

Les réactifs sont prêts à l'emploi.

Ils doivent être stockés à +18°...+25°C, à l'abri de la lumière, jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

Ne pas congeler.

CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS :

Compte tenu de la fragilité de certains stades parasitaires tels que les formes végétatives de protozoaires, il est recommandé de traiter les selles le plus rapidement possible après leur recueil.

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION :

- Pour usage in vitro.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Respecter les instructions de la notice d'utilisation.
- En cas de versement accidentel de réactif, nettoyer le plan de travail à l'aide de papier absorbant et rincer avec de l'eau. En cas de versement d'échantillon, nettoyer à l'aide d'eau de Javel et de papier absorbant.
- Éviter tout contact de réactif avec la peau, les yeux et les muqueuses. Ne pas ingérer.
- Les échantillons, les réactifs ainsi que le matériel et les produits contaminés doivent être éliminés dans un conteneur pour déchets contaminés, selon les recommandations et la réglementation en vigueur.
- **Base pour IODÉSINE** : R 10 : Inflammable.

A) EXAMEN DIRECT APRES COLORATION PAR LE KOP-COLOR II

PRINCIPE :

KOP-COLOR II est un procédé de coloration différentielle des éléments parasitaires utilisant un mélange d'agents colorants dont le Lugol. Son utilisation facilite la détection des éléments parasitaires qui apparaissent colorés en jaune, jaune-orange ou jaune-brun sur fond bleu plus ou moins foncé.

MODE OPÉRATOIRE :

- Homogénéiser les selles.
- Prélever un volume de selles équivalent à un petit pois et le déposer dans un tube à hémolyse contenant 1 mL de diluant (eau physiologique, eau distillée ou tampon acéto-acétique pH5).
- Triturer et agiter pour obtenir une suspension homogène (agitateur de type Vortex).
- A l'aide d'une micropipette, déposer sur une lame 10 µL de KOP-COLOR II.
- A l'aide d'une pipette Pasteur, ajouter 1 goutte (ou 25 µL avec une micropipette) de la suspension de selles à examiner.
- Bien mélanger.
- Recouvrir d'une lamelle et observer au microscope avec une lumière blanche (filtre bleu).

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS :

Les éléments parasitaires apparaissent colorés en jaune, jaune-orange ou jaune-brun sur fond bleu plus ou moins foncé.

B) MÉTHODE DE CONCENTRATION D'ÉLÉMENTS PARASITAIRES SELON BAILENGER ET COLORATION PAR LE KOP-COLOR II

PRINCIPE :

Méthode de concentration diphasique utilisant l'éther comme solvant organique et la solution tampon acéto-acétique pH 5 comme phase aqueuse. L'examen du culot est réalisé après coloration par le KOP-COLOR II, permettant une détection plus facile des éléments parasitaires qui apparaissent en jaune, jaune-orange ou jaune-brun sur fond bleu plus ou moins foncé.

MODE OPÉRATOIRE :

- Dans un tube conique de 30 mL, verser 20 mL de tampon acéto-acétique.
- Homogénéiser les selles.
- Prélever une noix de selles (3 - 4 g ou 3 - 4 mL si les selles sont liquides) et la déposer dans le tampon acéto-acétique.
- Triturer à l'aide d'une spatule et agiter vigoureusement jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène (agitateur de type Vortex).
- Laisser reposer 2 à 3 minutes pour la sédimentation des gros débris.
- Verser 5 mL du surnageant dans un tube conique de 10 mL.
- Ajouter 2,5 à 3 mL d'éther.
- Boucher le tube et agiter vigoureusement pour obtenir une émulsion (agitation manuelle ou avec agitateur type Vortex).
- Déboucher le tube et centrifuger à 150-200 g pendant 5 minutes pour "casser" l'émulsion.
- En cas de gélification de la phase supérieure (résidus lipophiles), la décoller de la paroi du tube à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Éliminer le surnageant par retournement du tube.
- Remettre le culot en suspension avec 1 ou 2 gouttes d'eau physiologique (ne pas laisser dessécher le culot).
- A l'aide d'une micropipette, déposer sur une lame 10 µL de KOP-COLOR II.
- A l'aide d'une pipette Pasteur, ajouter 1 goutte (ou 25 µL avec une micropipette) de la suspension à examiner.
- Bien mélanger.
- Recouvrir d'une lamelle et observer au microscope avec une lumière blanche (filtre bleu).

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS :

Les éléments parasitaires apparaissent colorés en jaune, jaune-orange ou jaune-brun sur fond bleu plus ou moins foncé.

C) MÉTHODE DE CONCENTRATION D'ÉLÉMENTS PARASITAIRES SELON LA TECHNIQUE IODÉSINE CONCENTRATION

PRINCIPE :

Méthode de concentration diphasique utilisant l'éther comme solvant organique et la solution IODÉSINE comme phase aqueuse. Les éléments parasitaires apparaissent ainsi colorés en rose ou brun plus ou moins foncé.

MODE OPÉRATOIRE :

- Préparation de la solution IODÉSINE :**
Dans un tube conique de 30 mL, déposer à l'aide d'une micropipette 200 µL de Lugol et 20 mL de Base pour IODÉSINE.
- Homogénéiser les selles.
- Prélever une noix de selles (3 - 4 g ou 3 - 4 mL si les selles sont liquides) et la déposer dans la solution IODÉSINE précédemment préparée.
- Triturer à l'aide d'une spatule et agiter vigoureusement jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène (agitateur de type Vortex).
- Laisser reposer 2 à 3 minutes pour la sédimentation des gros débris.
- Verser 5 mL du surnageant dans un tube conique de 10 mL.
- Ajouter 2,5 à 3 mL d'éther.
- Boucher le tube et agiter vigoureusement pour obtenir une émulsion (agitation manuelle ou avec agitateur type Vortex).
- Déboucher le tube et centrifuger à 150-200 g pendant 5 minutes pour "casser" l'émulsion.
- En cas de gélification de la phase supérieure (résidus lipophiles), la décoller de la paroi du tube à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Éliminer le surnageant par retournement du tube.
- Remettre le culot en suspension avec 1 ou 2 gouttes d'eau physiologique (ne pas laisser dessécher le culot).
- A l'aide d'une pipette Pasteur, déposer sur une lame 1 goutte (ou 25 µL avec une micropipette) de la suspension à examiner.
- Recouvrir d'une lamelle et observer au microscope avec une lumière blanche (filtre bleu). Lors d'une coloration trop importante des parasites, il est recommandé d'augmenter l'intensité de la lumière blanche pour une bonne observation microscopique de ces derniers.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS :

Les éléments parasitaires apparaissent colorés en rose ou brun plus ou moins foncé.

N.B. : POSSIBILITÉ D'UTILISATION DE L'ACÉTATE D'ÉTHYLE COMME SOLVANT ORGANIQUE A LA PLACE DE L'ÉTHÈRE

L'éther (éther diéthylique - C₂H₅-O-C₂H₅) est le solvant de référence pour les techniques de concentration Bailenger et IODÉSINE. Il peut être remplacé par l'acétate d'éthyle à volume égal.

Il faut cependant noter que la solubilisation de certains débris fécaux est plus difficile avec l'acétate d'éthyle qu'avec l'éther diéthylique. **Ainsi, avec certaines selles traitées avec l'acétate d'éthyle, la couche interphase peut être plus épaisse et le culot, plus volumineux, peut présenter de nombreux éléments non parasitaires pouvant gêner l'observation microscopique.** Il convient alors de reprendre le culot avec une plus grande quantité de diluant, par exemple avec 4 gouttes d'eau physiologique au lieu de 2, et d'effectuer plusieurs montages pour l'examen microscopique.

Fabriqué par / Manufactured by : SERFIB
2, rue de la Bourse
75002 PARIS / FRANCE
Distribué par / Distributed by : Fumouze Diagnostics
110-114, rue Victor Hugo
92686 LEVALLOIS-PERRET CEDEX / FRANCE
TEL : 33(0) 1-49-68-41-00
www.fumouze.fr
www.fumouze.com

Nom. : 2000000 - 09/08



PARA-SELLES / KOP-COLOR II FUMOUCZE®



STAINING AND CONCENTRATION OF PARASITIC ELEMENTS IN STOOLS

INTENDED USE:

PARA-SELLES / KOP-COLOR II FUMOUCZE® allows performing:

- the direct examination of parasitic elements in stools with the KOP-COLOR II.
- the concentration of parasitic elements based on Bailenger's method with KOP-COLOR II staining.
- the concentration of parasitic elements based on IODESINE concentration method.

The IODESINE concentration technique replaces the M.I.F. Concentration one. KOP-COLOR II replaces KOP-COLOR. The used staining agents are the same. Base for IODESINE and KOP-COLOR II contain neither formalin nor mercury derivative so as to improve work station safety.

KIT CONTENT:

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| - pH 5 aceto-acetate buffer solution | - Conical tubes of 30 mL |
| - Base for IODESINE | - Conical tubes of 10 mL |
| - KOP-COLOR II | - Spatulas |
| - Lugol | - Package insert |

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

- | | |
|--|--------------------------|
| - Micropipette 10-50 µL | - Microscope |
| - Micropipette 100-1000 µL | - Vortex |
| - Haemolysis tubes | - Centrifuge |
| - Pasteur pipettes | - Physiological saline |
| - Slides + coverglasses for microscopy | - Ether or ethyl acetate |
| - Container for contaminated wastes | |

STORAGE CONDITIONS:

Reagents are ready-to-use. Store at +18°...+25°C, **sheltered from sunlight**, until the expiry date indicated on the box. Do not freeze.

SAMPLES STORAGE:

Due to the fragility of some of parasitic stages as protozoa vegetative forms, it is recommended to treat stools as soon as possible after their collection.

WARNINGS AND PRECAUTIONS:

- For in vitro diagnostic use.
- Only for professional use.
- Follow the instructions for use.
- In case of accidental spill of reagents, clean the surface with absorbent paper and water. In case of spill of sample, clean the surface with absorbent paper and bleach.
- Avoid contact of reagent with skin, eyes and mucous membranes. Do not ingest.
- The samples, reagents as well as contaminated materials and products must be eliminated in a container for contaminated wastes, according to the prevailing recommendations and regulations.
- **Base for IODESINE:** R 10: Flammable.

A) DIRECT EXAMINATION AFTER STAINING BY KOP-COLOR II

PRINCIPLE:

KOP-COLOR II is a differential staining process of parasitic elements using a mixture of staining agents one of which is Lugol. Its utilization facilitates the detection of parasitic elements which appear to be yellow, yellow-orange or brownish-yellow on a more or less dark blue background.

TEST PROCEDURE:

- Homogenize stools.
- Take out a volume of stools equivalent to the size of a pea and place it in a haemolysis tube containing 1 mL of thinner (physiological saline, distilled water or pH5 aceto-acetate buffer solution).
- Triturate and shake it to obtain a homogeneous suspension (Vortex shaker).
- Using the micropipette, place 10 µL of KOP-COLOR II on a slide.
- Using the Pasteur pipette, add 1 drop (or, using the micropipette, add 25 µL) of the stools suspension to examine.
- Mix well.
- Place a coverglass over the stools suspension and examine by using a microscope having a white light (blue filter).

INTERPRETATION OF THE RESULTS:

Parasitic elements appear to be yellow, yellow-orange or brownish-yellow on a more or less dark blue background.

B) CONCENTRATION OF PARASITIC ELEMENTS BASED ON BAILENGER'S METHOD WITH KOP-COLOR II STAINING

PRINCIPLE:

Two phase method of concentration using ether as an organic solvent and a pH5 aceto-acetate buffer solution as the aqueous phase. The

examination of sediment is performed after staining by KOP-COLOR II which facilitates the detection of parasitic elements which appear to be yellow, yellow-orange or brownish-yellow on a more or less dark blue background.

TEST PROCEDURE:

- Pour 20 mL of the aceto-acetate buffer in a 30 mL conical tube.
- Homogenize stools.
- Take out the equivalent of a knob of the stools (3 to 4 g or 3 to 4 mL if the stools are fluid) and place it in the aceto-acetate buffer.
- Triturate the stools by using a spatula and shake the mixture vigorously until a homogeneous suspension is obtained (Vortex shaker).
- Permit the mixture to settle for 2 or 3 minutes for the sedimentation of the coarser particles.
- Pour 5 mL of supernatant in a 10 mL conical tube.
- Add 2.5 to 3 mL of ether.
- Plug the tube and shake vigorously in order to obtain an emulsion (shake manually or with a Vortex shaker).
- Take the plug out of the tube and centrifuge the mixture (150-200 g) for 5 minutes to "break" the emulsion.
- In the case of gelling in the higher phase (due to lipophile residues), loosen the emulsion from the tube walls using the Pasteur pipette.
- Eliminate the supernatant by turning the tube upside down.
- Put the sediment in a suspension using 1 or 2 drops of physiological saline (do not allow the sediment to dry up).
- Using the micropipette, place 10 µL of KOP-COLOR II on a slide.
- Using the Pasteur pipette, add 1 drop (or, using the micropipette, add 25 µL) of the suspension to examine.
- Mix well.
- Place a coverglass over the sediment suspension and examine under a microscope using a white light (blue filter).

INTERPRETATION OF THE RESULTS:

Parasitic elements appear to be yellow, yellow-orange or brownish-yellow on a more or less dark blue background.

C) CONCENTRATION OF PARASITIC ELEMENTS BASED ON IODESINE CONCENTRATION METHOD

PRINCIPLE:

Two phase method of concentration using ether as an organic solvent and the IODESINE solution as the aqueous phase. Parasitic elements appear to be pink or more or less darkish brown.

TEST PROCEDURE:

- IODESINE solution preparation:**
 - Place 200 µL of Lugol in the bottom of a 30 mL conical tube, then add 20 mL of Base for IODESINE.
- Homogenize the stools.
- Take out the equivalent of a knob of the stools (3 to 4 g or 3 to 4 mL if the stools are fluid) and place it in the previously prepared Iodesine solution.
- Triturate the stools by using a spatula and shake the mixture vigorously until a homogeneous suspension is obtained (Vortex shaker).
- Permit the mixture to settle for 2 or 3 minutes for the sedimentation of the coarser particles.
- Pour 5 mL of supernatant in a 10 mL conical tube.
- Add 2.5 to 3 mL of ether.
- Plug the tube and shake vigorously to obtain an emulsion (shake manually or with a Vortex shaker).
- Take the plug out of the tube and centrifuge the mixture (150-200 g) for 5 minutes to "break" the emulsion.
- In the case of gelling in the higher phase (due to lipophile residues), loosen the emulsion from the tube walls using the Pasteur pipette.
- Eliminate the supernatant by turning the tube upside down.
- Put the sediment in a suspension using 1 or 2 drops of physiological saline (do not allow the sediment to dry up).
- Using the Pasteur pipette, place 1 drop (or, using the micropipette, add 25 µL) of the suspension to examine on a slide.
- Place a coverglass over the sediment suspension and examine under a microscope using a white light (blue filter). When parasites colouring is too important, it is recommended to increase the white light intensity for a good microscopic observation of these last ones.

INTERPRETATION OF THE RESULTS:

The parasitic elements appear to be pink or more or less darkish brown.

N.B.: POSSIBILITY OF USING ETHYL ACETATE AS ORGANIC SOLVENT INSTEAD OF ETHER

Ether (diethyl ether – C₂H₅ – O – C₂H₅) is the reference solvent for Bailenger and IODESINE concentration methods. It can be replaced by ethyl acetate in equal volume. It is however necessary to note that the solubilisation of certain faecal fragments is more difficult with ethyl acetate than with diethyl ether. **So, with certain stools treated with ethyl acetate, the interface layer may be thicker and the more voluminous sediment may present numerous non-parasitic elements which may hamper microscopic observation.** It is then advisable to take back the sediment with more diluent, for example with 4 drops of physiological water instead of 2, and to make several assemblies for the microscopic examination.

BIBLIOGRAPHIE / REFERENCES:

1. A. O'FEL - Parasitologie mycologie - *Format Utile*, Saint-Maur.
2. J. BAILENGER - Coprologie parasitaire et fonctionnelle - *Imprimerie Drouillard*, Bordeaux.
3. P. BOURÉE - Aide mémoire de parasitologie - *Flammarion*, Paris.
4. A.-M. DELUOL - Atlas de parasitologie - Guide pratique du diagnostic au microscope - (tomes I, II, III), *Edition Varia*, Paris.
5. J.-P. NOZAIS, A. DATRY, M. DANIS, C. BOUDON - Traité de parasitologie médicale - *Pradel*, Paris.
6. M. GENTILLINI, B. DUFLO - Médecine tropicale de voyage - *Flammarion Médecine Sciences*, Paris.
7. Y.-J. GOLVAN - Eléments de parasitologie médicale - *Flammarion*, Paris.
8. H. LEGER, M.-J. NOTTEGHEM - Guide de parasitologie pratique - *SEDES*, Paris.
9. C. JUNOD - Recherche spéciale des oeufs et larves d'Helminthes dans les selles par la méthode des concentrations combinées - *Feuillets de biologie*, 92: 55-62 (1976).
10. D. ENGELS, S. NAHIMANA, B. GRYSELS - Comparison of the direct faecal smear and two thick smear techniques for the diagnosis of intestinal parasitic infections - *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 523-525 (1996).