



BLEU TRYPAN 0.4%

Solution de coloration à usage in vitro



EAUCOL00-C8
EAUCOL00-UN



Version 5.01 de Juin 2022



Notice d'utilisation

Disponible sur www.eurobio-scientific.com

Table des matières

1.	Introduction.....	3
2.	Conditionnement.....	3
3.	Composition.....	3
4.	Type d'échantillon requis.....	3
5.	Protocole.....	3
6.	Conservation et stockage.....	4
7.	Indications / Contre-indications.....	4
8.	Contrôle Qualité.....	5
9.	Elimination des déchets.....	5
10.	Déclaration d'incidents.....	5
11.	Symboles et pictogrammes.....	5
12.	Références bibliographiques.....	6
13.	Assistance Technique.....	6

1. Introduction

Le bleu trypan fait partie des différents colorants d'exclusion utilisés pour la numération des cellules viables selon la propriété des cellules vivantes à ne pas internaliser certains colorants par l'action de leur barrière cytoplasmique active contrairement aux cellules mortes.

Ce principe appliqué à ce colorant permet la différenciation des cellules viables (incolores) et non viables (colorées en bleu) lors de la numération cellulaire.

Note: Le bleu trypan a une plus grande affinité pour les protéines sériques que pour les protéines cellulaires : si la coloration du milieu est trop importante, les cellules devront être culottées et mises en suspension dans un milieu sans protéine (type solution saline) avant leur comptage.

2. Conditionnement

Le bleu trypan en solution à 0,4% dans du sérum physiologique et préparé aseptiquement vous est proposé :

- en flacon compte-gouttes de 2 ml à usage unique pour une manipulation ponctuelle assurant le maintien de la stérilité.
- en flacon unidose de 250µL, permettant ainsi un usage unique. Les dosettes sont présentées par cinq, sécables entre elles puis emballées par 30.

Il ne s'agit pas d'un dispositif automatisé.

Références commerciales :

Description	Référence	Format
Bleu trypan en solution 0.4% (coffret de 30 flacons unidoses)	EAUCOL00-UN	30 x 250 µL
Bleu trypan en solution 0.4% (coffret de 10 flacons compte-gouttes)	EAUCOL00-C8	10 x 2 mL

3. Composition

Bleu trypan en solution à 0.4% dans du sérum physiologique tamponné au phosphate de potassium en eau doublement osmosée.

pH : 7 ± 0.5 .

Osmolarité : 270 - 340 mOsm/kg H₂O.

4. Type d'échantillon requis

Le bleu trypan est une solution à utiliser dans le cadre de culture cellulaire ou avec des échantillons cellulaires dans le cadre d'un diagnostic *in vitro*.

Les échantillons doivent être collectés, manipulés et préparés selon les bonnes pratiques de laboratoire et en appliquant les précautions nécessaires afin d'éviter leur contamination.

5. Protocole

Le dispositif est uniquement destiné à un usage par des professionnels.

Le dispositif est à usage unique.

Matériel requis :

1. En option, pour les flacons unidoses : ciseaux stériles (non fournis)
2. Bleu trypan à 0.4% en solution saline.
3. Microscope (non fournis).

4. Compteur manuel pour comptage cellulaire (non fournis).
5. Matériel à usage général de laboratoire et équipement de protection personnelle.

Procédure :

- Pour ouvrir les **flacons compte-gouttes** (EAUCOL00-C8) : ouvrir le flacon en dévissant le capuchon et l'ôter.
 - Pour ouvrir les **flacons unidoses** (EAUCOL00-UN) de bleu trypan : ouvrir le flacon à l'aide de ciseaux stériles ou bien casser le capuchon et l'ôter.
1. Une fois le flacon ouvert :
 - a) Retourner le flacon
 - b) Si le bleu trypan ne descend pas, tapoter doucement sur le dessus du flacon pour faire tomber le liquide
 - c) Presser le corps du flacon pour faire sortir les gouttes de bleu trypan
 - Pour ouvrir les **flacons unidoses** (EAUCOL00-UN) de bleu trypan, procéder comme décrit ci-dessous :
 - a) Ouvrir le flacon à l'aide de ciseaux stériles ou bien casser le capuchon et ôter-le.
 - b) Retourner le flacon
 - c) Si le bleu trypan ne descend pas, tapoter doucement sur le dessus du flacon pour faire tomber le liquide
 - d) Presser le corps du flacon pour faire sortir les gouttes de bleu trypan
 2. Déposer une ou deux gouttes sur les cellules à analyser, laisser agir 30 à 60 secondes puis compter les cellules mortes au microscope.

Si vous utilisez une cellule de Malassez pour le comptage, vous pouvez réaliser le protocole suivant :

3. Placer la lamelle sur l'hémocytomètre.
4. A l'aide d'un microscope avec un objectif à 10X et un oculaire 10X, compter les cellules viables (réfringentes).
5. Si plus de 5% des cellules sont sous forme d'agrégats, réaliser une nouvelle suspension et faire un nouveau comptage.
6. Effectuer le calcul de la numération comme suit :

Nombre total de cellules = C x d x 1000 x V

C: nombre de cellules comptées sur toute la cellule de Mallassez (1mm³).

d: dilution (correspondant à 2 tel que décrite dans l'étape 3).

V: Volume de la suspension cellulaire.

6. Conservation et stockage

Le bleu trypan doit être conservé à température ambiante (+15°C / +30°C) jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Ne pas conserver au réfrigérateur, un précipité pourrait se former, empêchant l'écoulement normal du bleu trypan à l'ouverture.

Après ouverture, les solutions de bleu trypan peuvent précipiter : un passage sur filtre stérile 0.2µm est recommandé pour éliminer les cristaux de précipités.

Le dispositif est destiné à un usage unique, et doit être utilisé après ouverture.

Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé.

7. Indications / Contre-indications

Le bleu trypan en solution est toxique : il est nocif en cas d'ingestion, d'inhalation ou de contact avec la peau et les yeux, provoquant des irritations.

Le bleu trypan en solution est cancérigène en cas d'exposition chronique et peut causer des malformations congénitales chez le fœtus.

Information légales : H350, 314, H335, P201, P280, P314/101.



Pour plus d'informations vous pouvez consulter la fiche de données de sécurité sur demande et sur le site internet.

Compte tenu de ces caractéristiques, nous vous conseillons l'utilisation du bleu trypan en solution uniquement et en un usage in-vitro pour la numération cellulaire en hémocytomètre.

Aucune substance interférant avec le fonctionnement du dispositif n'a été identifiée.

8. Contrôle Qualité

Conformément au système de management de la qualité d'Eurobio, certifié ISO EN 13485, chaque lot de Bleu trypan est testé selon les spécifications prédéfinies afin de garantir une qualité constante des produits.

Contrôle de l'aspect

Une inspection visuelle est réalisée sur le produit, afin de s'assurer de son aspect (liquide bleu).

Contrôles physico-chimiques

Le pH et l'osmolarité sont mesurés par un pH-mètre et un osmomètre étalonnés avec des solutions standards. Le produit est contrôlé selon des procédures standardisées.

Contrôle de propreté bactérienne et fongique

Un contrôle est effectué afin de vérifier l'absence de croissance bactérienne et fongique dans le produit, permettant de garantir son état de propreté microbiologique. Ces contrôles sont effectués selon les prescriptions de la Pharmacopée Européenne.

Tests biologiques d'activité

Des tests biologiques d'activité sont également réalisés sur cellules VERO en contrôlant la cinétique relative de croissance, afin de s'assurer de l'absence de toxicité et de l'efficacité du produit.

9. Elimination des déchets

Eliminer tous les déchets conformément à la législation sur les DASRI.

10. Déclaration d'incidents

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif fait l'objet d'une notification à Eurobio Scientific et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

11. Symboles et pictogrammes

	Marquage CE
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Limite de température
	Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé
	Référence
	Lot
	Date limite d'utilisation
	Fabricant
	Date de fabrication
	Consulter les <i>instructions d'utilisation</i>
	Attention

	Usage Unique
	Danger carcinogène
	Attention danger

12. Références bibliographiques

1. Berkson, J., T.B. Magath and M. Hurn (1939) – The error of estimate of the blood cell count as made with the Hemocytometer - Am.J.Physiol 128. 309.
2. Sanford, K.K., Wr. Earle, V.J. Evans, H.K. Waltz and J.E. Shannon (1951) – The measurement of proliferation in tissue culture by enumeration of cell nuclei – J. Nat. Cancer Inst. 11, 773.
3. Hugh J, Phillips. In Tissue culture Methods and Applications, Eds, Kruseé P.F. and Patterson, M.K, Jr., Academic Press, N.Y. (1973), P 406.

13. Assistance Technique

Pour obtenir une assistance sur nos produits, merci de contacter notre support technique.

Le service clients d'Eurobio Scientific est joignable par voie électronique (mail), à l'adresse adv@eurobio-scientific.com ou par téléphone au +33 (0)1.69.07.94.77.



7, avenue de Scandinavie
91940 Les Ulis Cedex
FRANCE



TRYPAN BLUE 0.4%

Staining solution for in vitro use



EAUCOL00-C8
EAUCOL00-UN



Version 5.01 of June 2022



Instructions For Use

Available on www.eurobio-scientific.com

Contents

1.	Introduction	9
2.	Commercial references	9
3.	Composition / Properties	9
4.	Type Of Sample Required.....	9
5.	Protocole.....	9
6.	Conservation and Stockage	10
7.	Indications / Contraindications.....	10
8.	Quality Control	10
9.	Waste Disposal.....	11
10.	Incident Report.....	11
11.	Symbols And Pictograms	11
12.	Bibliography	11
13.	Technical Assistance	12

1. Introduction

Trypan blue is one of the different exclusion dyes used for counting viable cells according to the property of living cells not to internalize certain dyes by the action of their active cytoplasmic barrier, unlike dead cells. This principle, applied to this dye, allows the differentiation of viable (colorless) and non-viable (colored in blue) cells during cell counting.

Note: Trypan blue has a greater affinity for serum proteins than for cellular proteins: if the staining of the medium is too strong, the cells must be pelleted and suspended in a protein-free medium (saline solution type) before counting them.

2. Commercial references

Trypan Blue in 4,0% solution in physiological serum and aseptically prepared is available in :

- 2ml dropper bottles allowing periodical manipulation while maintaining microbiological cleanliness
- 250µl single-dose vials, for single-use. The pods are presented by five, divisible between them then packed by 30.

This is not an automated device.

Commercial references :

Description	Reference	Format
Bleu trypan in 4.0% solution (box of 30 single-dose vials)	EAUCOL00-UN	30 x 250 µL
Bleu trypan in 0.4% solution (box of 10 dropper bottles)	EAUCOL00-C8	10 x 2 mL

3. Composition / Properties

Bleu trypan in 0.4% solution in physiological serum buffered with potassium phosphate in double osmosed water.

pH: 7 ± 0.5 .

Osmolarity: 270 - 340 mOsm/kg H₂O.

4. Type of Sample Required

Trypan blue is a solution to be used with cell cultures or cell samples, within *in vitro* diagnostic manipulations.

Samples must be collected, handled and prepared according to good laboratory practices, and following the necessary precautions to avoid sample contamination.

5. Protocole

The device is only intended for use by professionals.

The device is for single use.

Material required:

1. (Optional, to use with single-dose vials : Sterile scissors)
2. Trypan Blue at 0.4% in saline solution.
3. Microscope (not supplied).
4. Manual counter for cell counting (not supplied).
5. General laboratory equipment and Personal Protective Equipment.

Protocole:

- To open Trypan Blue **dropper bottles** (EAUCOL00-C8) : Open the bottle by unscrewing the cap and take it off.
- To open Trypan Blue **single-use vials** (EAUCOL00-UN) : Open the vial either with sterile scissors or by breaking the cap off and take it off.

1. Once the bottle or vial is open :
 - a) Turn the bottle upside down.
 - b) If the Trypan Blue solution does not flow down, gently tap on the top of the bottle to make the liquid drop.
 - c) Squeeze the body of the bottle to release Trypan Blue drops.
2. Place one or two drops on the cells to be analysed, and leave to act for 30 to 60 seconds then count the dead cells under the microscope.

If you use a Malassez cell for counting, you can perform the following protocol:

3. Place the slide on the hemocytometer.
4. Using a microscope with a 10X objective and a 10X eyepiece, count the viable cells (refractive).
5. If more than 5% of cells are under the form of aggregates, make a new suspension and make a new count. Effectuer le calcul de la numération comme suit :

Total number of cells = $C \times d \times 1000 \times V$

C: number of cells counted on the whole Malassez cell (1mm³).

d: dilution (corresponding to 2 as described in step 3).

V: cell suspension volume.

6. Conservation and Stockage

Trypan Blue must be stored at room temperature (+15°C / +30°C) until the expiry date indicated on the label. Do not store in the refrigerator, as a precipitate may form, preventing the normal flow of trypan blue when opened.

After opening, trypan blue solutions can precipitate: filter through a sterile 0.2µm filter is recommended to eliminate crystals of precipitates.

The device is designed to be single-used, and must be used after opening.

Do not use if the packaging has been damaged.

7. Indications / Contreindications

Trypan blue in solution is toxic: it is harmful if swallowed, inhaled or in contact with the skin and eyes, causing irritation.

Trypan blue solution is carcinogenic in chronic exposure and can cause birth defects for fetuses.



Legal information: H350, 314, H335, P201, P280, P314/101.

For more information, please read the MSDS, available on demand and on the website.

Given these characteristics, we recommend the use of trypan blue in solution only and for *in-vitro* use for cell counting in a hemocytometer.

No substance interfering with the functioning of the device has been identified.

8. Quality Control

In accordance with Eurobio's quality management system, certified ISO EN 13485, each batch of Trypan Blue is tested according to predefined specifications in order to guarantee consistent product quality.

Appearance control

The product undergoes a visual inspection, to make sure of its appearance (blue liquid).

Physicochemical control

pH and osmolarity are measured by a pH meter and an osmometer calibrated with standard solutions. The product is controlled according to standardized procedures.

Bacterial and fungal cleanliness control

A control is carried out in order to verify the absence of bacterial and fungal growth in the product, to guarantee its state of microbiological cleanliness. These controls are carried out according to the prescriptions of the European Pharmacopoeia.

biological activity tests

Biological activity tests are also carried out on VERO cells by controlling the relative growth kinetics, in order to ensure the absence of toxicity and the effectiveness of the product.

9. Waste Disposal

Dispose of all waste in accordance with local legislation.

10. Incident Report

Any serious incident occurring in relation with the device must be the subject of a notification to Eurobio Scientific and to the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established..

11. Symbols And Pictograms

	CE-marking
	In Vitro Diagnostic Medical Device
	Temperature limit
	Do not use if the packaging has been damaged
	Reference
	Lot/batch
	Expiration date
	Manufacturer
	Date of manufacturing
	Read <i>instructions for use</i>
	Warning
	Single Use
	Carcinogenic hazard
	Warning : danger

12. Bibliography

- Berkson, J., T.B. Magath and M. Hurn (1939) – The error of estimate of the blood cell count as made with the Hemocytometer - Am.J.Physiol 128. 309.
- Sanford, K.K., Wr. Earle, V.J. Evans, H.K. Waltz and J.E. Shannon (1951) – The measurement of proliferation in tissue culture by enumeration of cell nuclei – J. Nat. Cancer Inst. 11, 773.

6. Hugh J, Phillips. In Tissue culture Methods and Applications, Eds, Kruseé P.F. and Patterson, M.K, Jr., Academic Press, N.Y. (1973), P 406.

13. Technical Assistance

In order to get assistance with our products, please contact our technical support.

Eurobio Scientific customer service can be reached via email (adv@eurobio-scientific.com) or telephone (+33 (0)1.69.07.94.77).



7, avenue de Scandinavie
91940 Les Ulis Cedex
FRANCE