

Vetrini per microscopio SureFocus[™]

Manuale d'istruzioni

Vetrini per microscopio SureFocus™

In corso di brevetto

Uso previsto

Supporto al rilevamento di bacilli acido-resistenti (AFB) mediante microscopia a fluorescenza

Introduzione e principi

L'incidenza della tubercolosi (TB) a livello mondiale è caratterizzata da una tendenza all'aumento almeno dal 1990, anno in cui l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha intrapreso il monitoraggio dei dati d'incidenza¹. Il rilevamento tempestivo e accurato della TB è essenziale per un efficace controllo e trattamento di questa patologia. Il metodo di rilevamento più utilizzato per i batteri acido-resistenti, fra cui il principale agente causale della tubercolosi (*Mycobacterium tuberculosis*) è l'analisi microscopica di uno striscio dell'espettorato¹, in grado di fornire sia una prima diagnosi presuntiva che una quantificazione della carica micobatterica.

Il rilevamento della tubercolosi mediante microscopia a fluorescenza su strisci di espettorato si è rivelato maggiormente efficace rispetto alle metodiche di microscopia a campo chiaro². Tuttavia, nonostante i vantaggi riconosciuti della microscopia a fluorescenza, questo metodo pone problemi che influiscono sulla sua efficacia e sulla diffusione del suo utilizzo. Questi problemi sono principalmente dovuti al fatto che la microscopia a fluorescenza è una tecnica a campo scuro e, in quanto tale, richiede l'emissione di un segnale luminoso da parte del campione. Nel caso degli strisci di TB trattati con colorazione fluorescente, la fluorescenza dello sfondo viene eliminata allo scopo di garantire un contrasto evidente che faciliti il rilevamento dei bacilli acido-resistenti. Di conseguenza, il campo d'analisi emette un segnale debole o addirittura assente nei campioni con carico di bacilli ridotto o inesistente. Questo rende difficile garantire la qualità dei test con esito negativo. Inoltre, il segnale emesso da AFB trattati con colorazione fluorescente è relativamente debole (rispetto alle metodiche a campo chiaro) e può essere individuato soltanto entro una breve distanza dal piano focale. Un utente inesperto può così facilmente tralasciare campioni positivi a causa del mancato rilevamento del segnale.

I vetrini SureFocus F.A.S.T. sono progettati per risolvere il problema della messa a fuoco durante l'analisi degli strisci, grazie alla presenza di punti di riferimento fluorescenti per la messa a fuoco iniziale e il mantenimento della stessa nel corso dell'analisi. I punti di riferimento, che descrivono un'ellisse con cerchi e linee, sono inoltre formattati in maniera strategica, per facilitare la preparazione e la lettura degli strisci, nonché la formazione degli operatori e il controllo qualità. L'ellisse demarca un'area di 3 cm x 2 cm (standard per gli strisci di espettorato TB) ed è punteggiata da 6 cerchi intorno e all'interno dell'apice di maggiori dimensioni. I cerchi aumentano la superficie disponibile, facilitando il centraggio dell'obiettivo per la messa a fuoco iniziale. Essi possono essere inoltre utilizzati come coordinate per la standardizzazione delle procedure di analisi di laboratorio e insieme alle linee fluorescenti dell'area di striscio per misurare le distanze richieste per un'analisi completa. Oltre che come supporto alla preparazione e all'analisi degli strisci, i punti di riferimento fluorescenti possono offrire un'utile funzione di controllo positivo della fluorescenza in termini di reagenti, procedura di colorazione, funzionamento degli strumenti o prestazioni dell'operatore.

I vetrini SureFocus sono progettati con caratteristiche di fluorescenza analoghe a quelle dell'auramina O (ovvero eccitazione con luce blu e fluorescenza con luce verde); i vetrini possono essere pertanto utilizzati su microscopi a fluorescenza configurati per la visualizzazione di strisci colorati con auramina O.

Contenuti

La confezione contiene:

- 432 vetrini per microscopio SureFocus

- 1 inserto prodotto

Avvertenze e precauzioni

Per l'uso diagnostico *in vitro*

I campioni clinici umani possono contenere agenti infettivi, fra cui gli agenti causali di tubercolosi, epatite, virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e di altre patologie. Si raccomanda di attenersi alle precauzioni generalmente accettate, nonché alle linee guida e alle normative locali per la manipolazione di campioni clinici. Tutte le attività che possono generare aerosol da campioni clinici devono essere svolte all'interno di una cappa di biosicurezza. Le attività che prevedono la coltura di *Mycobacterium tuberculosis* devono essere effettuate nel rispetto delle procedure e delle pratiche di Biosicurezza di Livello 3.

Questo prodotto è progettato per facilitare il rilevamento dei bacilli acido-resistenti. L'analisi microscopica degli strisci di espettorato e le procedure di preparazione e trattamento dei campioni devono essere effettuate soltanto da personale adeguatamente formato in merito alle relative tecniche, nonché alle pratiche e alle procedure generiche di laboratorio.

Attenzione: prodotto in vetro. Maneggiare con cura.

Modalità di conservazione

Evitare l'esposizione a temperature elevate. Evitare l'esposizione diretta alla luce.

Procedura

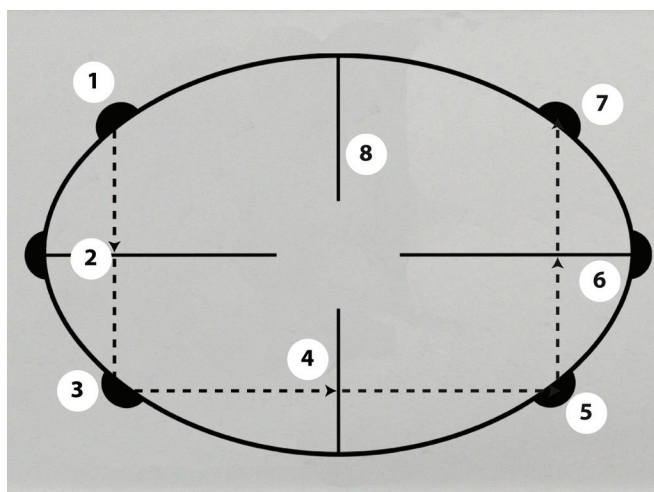
I vetrini SureFocus possono essere utilizzati con campioni direttamente prelevati, digeriti o sottoposti a coltura.

Preparazione e colorazione dello striscio:

Applicare il campione al centro del vetrino SureFocus, creando uno striscio uniforme che copra l'intera superficie dell'ellisse. Lo striscio dev'essere di spessore adeguato per garantire la presenza della corretta quantità di campione. Per gli strisci diretti, le linee del vetrino SureFocus devono risultare visibili anche in seguito ad applicazione del campione. Termofissare il vetrino utilizzando un bruciatore o uno scaldavetrini. Procedere alla colorazione del vetrino termofissato mediante una procedura di colorazione con auramina O come la procedura di colorazione con auramina O *F.A.S.T.*. Nota: si consiglia di includere un campione di controllo positivo e un campione di controllo negativo ad ogni lotto di vetrini colorati per garantire l'integrità dei reagenti e degli strumenti, nonché le prestazioni dei tecnici.

Analisi dello striscio:

Figura 1



Porre il vetrino colorato sul tavolino del microscopio, quindi centrare l'obiettivo su un cerchio iniziale. Utilizzando la modalità di illuminazione a campo chiaro, mettere a fuoco il cerchio iniziale con un obiettivo di potenza inferiore, quindi passare all'obiettivo desiderato per l'analisi dello striscio. Passare alla modalità fluorescenza. In alternativa, è possibile effettuare la messa a fuoco del microscopio in modalità fluorescenza con la seguente procedura: centrare l'obiettivo su un cerchio iniziale, quindi regolare l'altezza del tavolino

al di sopra dell'altezza operativa dell'obiettivo; dopo aver attivato la sorgente di luce fluorescente, guardare attraverso l'oculare e regolare la messa a fuoco con la vite micrometrica, fino a quando il campo non risulta messo a fuoco. (Suggerimento: il campo visivo dovrebbe assumere gradualmente una colorazione verde brillante durante la messa a fuoco della linea fluorescente. Se il campo visivo continua ad essere di colore scuro, il piano focale non è corretto.) Spostarsi verso i bordi della linea fluorescente ripetendo la procedura di messa a fuoco.

Iniziare ad analizzare lo striscio partendo dal cerchio iniziale e procedendo verso il punto di riferimento successivo. I punti di riferimento possono essere utilizzati per contrassegnare i campi visivi analizzati in caso di analisi sequenziale all'interno dello striscio (ovvero in assenza di movimento continuo). Al raggiungimento del punto di riferimento successivo, verificare che il campo visivo sia a fuoco. Procedere con l'analisi passando da un punto di riferimento all'altro, fino al raggiungimento del numero di campi richiesto (o della distanza percorsa, in caso di movimento continuo) a seconda della procedura operativa standard adottata. Registrare i risultati.

Esempio di analisi dello striscio:

La Figura 1 mostra un vetrino SureFocus con un percorso di analisi consigliato. Per seguire il percorso, provvedere alla messa a fuoco iniziale utilizzando un cerchio iniziale 1. Analizzare il vetrino in senso verticale, quindi procedere in maniera sistematica verso il cerchio iniziale 3. Spostandosi da un campo visivo all'altro, procedere all'osservazione con movimento continuo, avendo cura di non saltare da un campo all'altro. Una volta raggiunta la linea 2, verificare la messa a fuoco del microscopio. Procedere in senso verticale verso il cerchio iniziale 3, verificando la messa a fuoco del microscopio. Procedere in senso orizzontale verso la linea 4. Una volta raggiunta la linea 4, verificare la messa a fuoco del microscopio.

In caso di lettura dei campi visivi in movimento continuo, il numero di campi analizzati sarà il seguente:

Ingrandimento	Numero di campi analizzati
200x	26
400x	52
600x	78
1000x	130

La seguente tabella indica le distanze approssimative fra punti di riferimento e il numero di campi visivi ad ingrandimenti standard:

Percorso di analisi	Distanza (mm)	Campi visivi		
		200x	400x	600x
Da 1 a 2; da 2 a 3; da 5 a 6; da 6 a 7	6,5	7	14	21
Da 1 a 8; da 8 a 7; da 3 a 4; da 4 a 5	11	12	24	36

Controllo qualità

Le linee fluorescenti dei vetrini SureFocus appaiono fluorescenti se visualizzate con microscopio a fluorescenza. Utilizzare le linee per verificare che la sorgente di luce e i componenti ottici del microscopio funzionino correttamente. Qualora le linee non siano visibili o appaiano scarsamente visibili, indagare sulle possibili cause del problema, che potrebbero essere legate allo strumento, ai vetrini o all'operatore. Non effettuare la diagnosi microscopica di campioni di pazienti prima di aver risolto il problema.

Risultati previsti

I vetrini SureFocus emettono una fluorescenza verde se eccitati da una luce blu (435-480 nm) e osservati attraverso filtri di fluorescenza che consentono il passaggio della luce verde (510-600 nm).

Limitazioni

La fluorescenza dei materiali si attenua col tempo e può deteriorarsi in seguito a esposizione a temperature o a illuminazione eccessive. Se il segnale di fluorescenza non è visibile sulle linee dei vetrini SureFocus, non utilizzare i vetrini per procedure di microscopia a fluorescenza.

Se i vetrini SureFocus non emettono fluorescenza, verificare il corretto funzionamento del sistema di microscopia a fluorescenza.

Strumenti necessari ma non inclusi

- Applicatore per la creazione di strisci di campioni di pazienti
- Bruciatore o scaldavetrini
- Reagenti e materiali per la colorazione
- Microscopio a fluorescenza con le seguenti caratteristiche:
 - Capacità di eccitare i campioni da 435 a 480 nm
 - Capacità di trasmettere la luce emessa da 510 a 600 nm
- Olio di immersione (se necessario)

Bibliografia

I vetrini SureFocus QBC *F.A.S.T.* sono parte integrante di un sistema di assicurazione della qualità nell'analisi microscopica. Per ulteriori informazioni sui sistemi di assicurazione della qualità per i laboratori micobatterologici, sono disponibili le seguenti risorse:

1. Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO). (2009) Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO Report 2009. WHO Press, Ginevra, Svizzera.
2. Steingart, K.R., *et al.* (2007) Fluorescence Versus Conventional for Sputum Smear Microscopy for Tuberculosis: a Systematic Review. *Lancet Infect Dis* 6:570-81.
3. Essential Procedures for Clinical Microbiology. (1998) American Society of Microbiology. Washington, D.C.
4. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis by Sputum Microscopy. (2005) Institute of Medical and Veterinary Science. Adelaide, Australia.
5. Manual of Clinical Microbiology. (2007) Volumi 1 e 2. Nona edizione. American Society of Microbiology. Washington, D.C.

Modalità d'ordine

Vetrini SureFocus QBC *F.A.S.T.*

Codice Cat.

427411



QBC Diagnostics, Inc.
200 Shadylane Drive, Philipsburg PA, 16866
+1-814-692-7661, www.qbcdiagnostics.com



Emergo Europe
Molenstraat 15, 2513 BH L'Aia, Paesi Bassi
Tel: +31 (0) 70-345-8570, Fax: +31 (0) 70-346-7299



Produttore



Rappresentante autorizzato per la Comunità Europea



Utilizzare entro



Codice catalogo



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Limiti di temperatura



Codice del lotto (partita)



Consultare le istruzioni per l'uso



Monouso