



**Kit per striscio F.A.S.T.™ AFB
(400 campioni)**

Manuale d'istruzioni

Form 423 Rev. B
Ultima revisione: 18.1.2012

Kit per striscio F.A.S.T.™ AFB

Uso previsto

Preparazione e colorazione di strisci di campioni di pazienti o colture per il rilevamento o la caratterizzazione di bacilli acido-resistenti, quali il *Mycobacterium tuberculosis*.

Introduzione e principi

L'incidenza della tubercolosi 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 tubercolosi (TB) è essenziale per un efficace controllo e trattamento di questa patologia. Il metodo di rilevamento più utilizzato per il *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.

I bacilli acido-resistenti, fra cui il *Mycobacterium tuberculosis*, possono essere colorati con anilina e sono resistenti alla decolorazione con acido e alcol. Questo trattamento, seguito da una colorazione di contrasto, consente di distinguere i bacilli acido-resistenti da altri organismi e particelle che reagiscono esclusivamente alla colorazione di contrasto. Tuttavia, i metodi di colorazione generalmente utilizzati per l'analisi microscopica di bacilli acido-resistenti generano uno striscio la cui lettura può risultare complessa e richiedere molto tempo. La colorazione con auramina O e auramina-rodamina si è dimostrata efficace nell'analisi microscopica a fluorescenza dei micobatteri. Le relazioni riguardanti il meccanismo di colorazione riportano risultati contrastanti; secondo alcune di queste, l'auramina O si lega alla parete cellulare dei micobatteri² e la colorazione si lega "alla maggior parte o alla totalità" dell'acido nucleico presente nei micobatteri³. Ciononostante, è stato dimostrato che i metodi di colorazione con auramina O presentano una maggiore sensibilità rispetto ai metodi di microscopia a luce trasmessa nel rilevamento di batteri acido-resistenti (AFB)⁴. Questa maggiore sensibilità è principalmente dovuta al notevole contrasto che la colorazione fluorescente conferisce ai batteri acido-resistenti, che assumono una colorazione verde su sfondo scuro. La maggior distinzione consente l'uso di obiettivi con campi visivi di maggiori dimensioni, riducendo quindi i tempi complessivi di analisi.

Il kit per striscio QBC F.A.S.T. AFB comprende i reagenti e i materiali consumabili per l'analisi microscopica a fluorescenza degli strisci di AFB. I componenti del kit sono progettati specificatamente per offrire un sistema completo e comprendono il kit di colorazione con auramina O F.A.S.T. e i vetrini per microscopio SureFocus (in corso di brevetto). Il kit per colorazione con auramina O F.A.S.T. si avvale di un processo rapido in quattro fasi che richiede soltanto 2 minuti, rispetto ai metodi tradizionali di colorazione con auramina, che richiedono circa 15-20 minuti. I vetrini per microscopio SureFocus semplificano le procedure di microscopia a fluorescenza, grazie alla presenza di punti di riferimento fluorescenti nell'area dello striscio per la messa a fuoco. Questo consente di ridurre lo stress e la fatica dell'operatore, garantendo la qualità dei risultati.

Componenti del kit

I contenuti del kit sono sufficienti per il trattamento di circa 400 campioni di striscio e comprendono i seguenti prodotti:

- 400 contenitori per il prelievo dell'espettorato
- 400 bastoncini applicatori
- 432 vetrini per microscopio SureFocus
- Colorazione auramina O QBC F.A.S.T. (120 ml)
- Decolorante/colorante spegnitore QBC F.A.S.T. (120 ml)
- 5 vetrini di controllo F.A.S.T. QC
- 1 inserto prodotto

Modalità di conservazione

Conservare a una temperatura compresa fra 15 °C e 25 °C. Evitare l'esposizione a temperature elevate. Non utilizzare oltre la data di scadenza.

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.

Le sostanze chimiche in questo kit sono pericolose e possono essere nocive o letali. Utilizzare in un'area ben ventilata, indossando dispositivi di protezione individuale adeguati. Tenere il prodotto lontano da fiamme libere. Consultare la scheda di sicurezza (MSDS) per ulteriori informazioni sulle procedure di sicurezza e smaltimento.

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

Attenzione: il kit contiene vetrini. Maneggiare con cura.

Istruzioni per l'uso

Preparazione e colorazione di campioni di espettorato direttamente prelevati, concentrati o sottoposti a coltura.

I contenitori per il prelievo dell'espettorato, i bastoncini applicatori e i vetrini SureFocus™ sono prodotti rigorosamente monouso.

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.

Procedura di colorazione:

1. Termofissare il vetrino contenente lo striscio di espettorato
2. Applicare la colorazione auramina O F.A.S.T. e lasciare in posa per 1 minuto
3. Sciacquare delicatamente lo striscio con acqua deionizzata o di rubinetto, quindi lasciarlo sgocciolare
4. Applicare il decolorante/colorante spegnitore F.A.S.T. sul vetrino e lasciare in posa per 1 minuto
5. Sciacquare delicatamente lo striscio con acqua deionizzata o di rubinetto, quindi lasciarlo sgocciolare
6. Far asciugare il vetrino

Procedura di analisi:

Esaminare il vetrino utilizzando il sistema QBC ParaLens o un sistema equivalente per la microscopia a fluorescenza. 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.

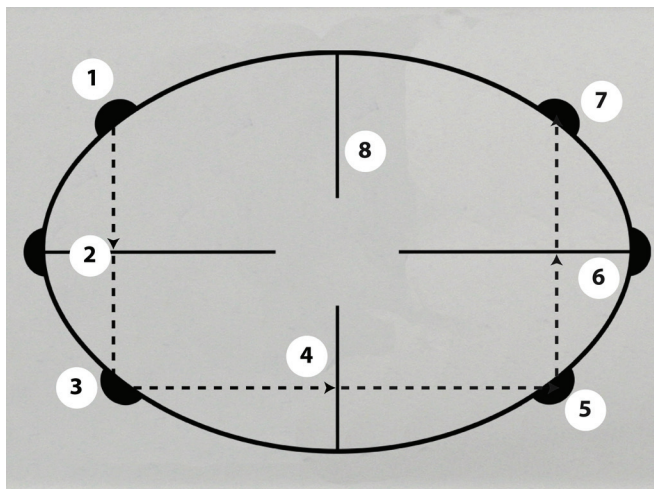
Analisi dello striscio:

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:

Figura 1



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

Procedura di controllo qualità:

Colorare i vetrini con i reagenti da utilizzare per l'analisi del campione del paziente. Il tecnico di laboratorio che effettua la colorazione dei campioni deve effettuare la colorazione del vetrino di controllo avvalendosi delle procedure previste per i campioni. Gli strisci positivi e negativi devono essere esaminati da tecnici di laboratorio mediante le tecniche diagnostiche previste per i campioni di pazienti. Effettuare regolarmente il controllo qualità, ai sensi delle normative governative e documentando i risultati ottenuti.

1. Colorare il vetrino di controllo qualità *F.A.S.T.* insieme al vetrino da analizzare, utilizzando il Kit di colorazione con auramina O *F.A.S.T.* secondo la procedura illustrata in precedenza.
2. Tenere separati i due vetrini durante la procedura di colorazione, onde evitare la contaminazione incrociata dei reagenti da un vetrino all'altro.
3. Analizzare il vetrino colorato utilizzando un microscopio adeguato al tipo di colorazione, quindi registrare i risultati.

La mancata fluorescenza del pozzetto del vetrino di controllo qualità positivo può indicare un deterioramento dell'agente colorante. Non utilizzare su campioni di pazienti prima di aver risolto il problema.

Risultati previsti

In caso di visualizzazione con microscopio a fluorescenza con filtro di eccitazione blu e filtro di emissione verde (es. filtro di eccitazione: 435-480 nm; filtro di emissione 510-600 nm), i marcatori del vetrino SureFocus risulteranno di colore verde fluorescente, offrendo un utile riferimento di messa a fuoco. I micobatteri, come quelli presenti sul vetrino di controllo positivo e come altri bacilli acido-resistenti, assumono una colorazione verde fluorescente su sfondo scuro. Tutti gli altri organismi, come quelli presenti sul vetrino di controllo negativo, assumono la colorazione di sfondo. La fluorescenza di un bacillo può indicare la sua appartenenza alla specie dei *Mycobacterium*.

I micobatteri all'interno del pozzetto del vetrino di controllo qualità positivo devono assumere una colorazione verde brillante. Il vetrino di controllo negativo deve assumere una colorazione di sfondo.

Se si ottengono risultati diversi da quelli previsti, indagare sulle possibili cause, fra cui l'uso inappropriato dei reagenti e dello strumento o un errore dell'operatore. Se si sospetta che il problema sia dovuto ai vetrini di controllo, utilizzare un altro sistema, ad esempio campioni di pazienti noti come positivi o negativi. Non registrare i risultati relativi ai pazienti prima di aver risolto eventuali problemi di sistema.

Limitazioni

È possibile che alcuni micobatteri a crescita rapida non assumano una colorazione fluorescente con questa colorazione. Per questi campioni, si raccomanda l'uso delle metodiche di Ziehl-Neelsen, di Kinyoun o di altre tecniche di colorazione. La fluorescenza degli strisci si attenua col tempo e può deteriorarsi in seguito a esposizione a temperature o a illuminazione eccessive. Si raccomanda di analizzare i campioni colorati nel minor tempo possibile.

Se il segnale di fluorescenza non è visibile sulle linee dei vetrini SureFocus, non utilizzare i vetrini per procedure di microscopia a fluorescenza.

Un risultato positivo evidenzia la presenza di micobatteri; allo stesso tempo, un risultato negativo non esclude la presenza di un'infezione. Si consiglia l'uso di altri metodi diagnostici, come la coltura o la PCR.

Se i vetrini SureFocus non assumono una colorazione fluorescente o se i vetrini di controllo presentano

una fluorescenza limitata o non presentano alcuna fluorescenza, si consiglia di verificare il corretto funzionamento del sistema di microscopia. Indagare sulle possibili cause, fra cui l'uso inappropriato dei reagenti e dello strumento o un errore dell'operatore. Se si sospetta che il problema sia dovuto ai vetrini di controllo, utilizzare un altro sistema, ad esempio campioni di pazienti noti come positivi o negativi. Non registrare i risultati relativi ai pazienti prima di aver risolto eventuali problemi di sistema.

I reagenti di colorazione *F.A.S.T.* possono deteriorarsi se esposti a temperature eccessive. Effettuare sempre il controllo qualità per determinare l'integrità della colorazione prima di registrare i risultati relativi ai pazienti. Non utilizzare la colorazione in caso di esito negativo del controllo qualità.

Materiali necessari ma non inclusi

Il Kit per striscio QBC *F.A.S.T.* AFB è progettato per l'uso con un sistema di microscopia a fluorescenza con eccitazione a 425-480 nm e trasmissione della fluorescenza a un minimo di 510-600 nm. Gli strumenti necessari ma non forniti comprendono un scaldavetrini o un bruciatore a fiamma (es. lampada a spirito o becco Bunsen).

Bibliografia

1. Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO). (2009) Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO Report 2009. WHO Press, Ginevra, Svizzera.
2. Baron, E.J. e S.M. Finegold. (1990) Baily & Scott's Diagnostic Microbiology, ottava edizione. The CV Mosby Company, Baltimore, Maryland.
3. Hanscheid, T. (2008) The future looks bright: low-cost fluorescencet microscopes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Coccidia*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.
4. Steingart K. R., et al. (2007) Fluorescence versus conventional for sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infectious Disease* 6:570-81.

Per ulteriori informazioni sulle modalità d'ordine dei kit e degli accessori *F.A.S.T.* AFB, è possibile consultare il nostro sito web all'indirizzo www.qbcdiagnostics.com. Il team vendite di QBC è inoltre disponibile al numero +1 (814) 692-7661 (Stati Uniti) e all'indirizzo di posta elettronica qbcsales@qbcdiag.com.

Modalità d'ordine

Kit per striscio QBC *F.A.S.T.* AFB

Codice Cat.

427409



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



Caustico



Infiammabile



Monouso