



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

Manuale d'istruzioni

Form 424 Rev. B
Ultima revisione: 18.1.2012

Kit per striscio con soluzione digerente F.A.S.T.™ AFB (400 campioni)

Uso previsto

Digestione/decontaminazione e preparazione di campioni respiratori o colture di pazienti per il successivo rilevamento o la caratterizzazione di organismi acido-resistenti.

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.

Gli organismi 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 gli organismi 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 agli organismi 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 metodo di riferimento per la diagnosi della TB è la coltura, spesso effettuata contestualmente all'analisi microscopica dello striscio o in seguito al rilevamento di un campione di striscio positivo. La preparazione dei campioni di espettorato per la coltura richiede sia la riduzione della viscosità del campione mediante digestione che la decontaminazione dello stesso, onde ridurre la presenza di normale flora batterica vitale. Un metodo piuttosto diffuso per la digestione/decontaminazione consiste nell'uso di NALC-NaOH⁴. In questo caso, la NALC (N-acetil-L-cisteina) agisce come agente mucolitico, rompendo i legami fra singole molecole di mucina. L'idrossido di sodio (NaOH) consente l'inattivazione della normale flora batterica e degli organismi acido-resistenti; con un'esposizione controllata (in termini di tempo e concentrazione), l'idrossido di sodio mantiene vitali gli organismi acido-resistenti, eliminando la normale flora batterica. In seguito alla digestione, alla decontaminazione e alla successiva concentrazione, il campione può essere sottoposto a coltura e analisi microscopica dello striscio.

Il Kit per striscio con soluzione digerente QBC F.A.S.T. AFB comprende i reagenti e i materiali consumabili per l'analisi microscopica a fluorescenza di strisci di TB, nonché per la digestione e la decontaminazione dei campioni. 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 e i 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	Provette sterili per la preparazione dei campioni di espettorato
1.200	Pipette sterili di trasferimento
432	Vetrini per microscopio SureFocus
120 ml	Colorazione auramina O QBC F.A.S.T.
120 ml	Decolorante/colorante spegnitore QBC F.A.S.T.
5	Vetrini di controllo qualità F.A.S.T. QC
9	Flaconi di soluzione digerente per espettorato (75 ml)
4	Bustine di soluzione tampone
1	Inserito kit

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. I reagenti contengono alcali forti e possono causare ustioni. Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua. In caso di ingestione della soluzione digerente per espettorato, somministrare latte, albume d'uovo o molta acqua. In caso di contatto con gli occhi rivolgersi immediatamente a un medico. Consultare la scheda di sicurezza (MSDS) del kit per ulteriori informazioni sulle procedure di sicurezza e smaltimento.

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.

Istruzioni per l'uso

Utilizzare su campioni respiratori di pazienti.

Le provette per la preparazione dell'espettorato, le pipette sterili di trasferimento e i vetrini SureFocus sono prodotti rigorosamente monouso.

Preparazione della soluzione tampone di fosfato

1. Versare il contenuto di una bustina di fosfato in polvere all'interno di un pallone volumetrico o un flacone da autoclave graduato a 500 ml.
2. Aggiungere 500 ml d'acqua, quindi miscelare con cura.
3. In caso di utilizzo di un pallone volumetrico, versare la soluzione in un flacone da autoclave.
4. Sterilizzare la soluzione tampone in autoclave.

Procedura di digestione

1. Prima dell'uso, svitare il tappo del flacone in plastica contenente la soluzione digerente per espettorato senza rimuoverlo.
2. Individuare l'ampolla all'interno del flacone, quindi romperla stringendo il flacone e mantenendolo in posizione verticale.
3. Chiudere il coperchio e agitare delicatamente il flacone fino a sciogliere la NALC; evitare la formazione di schiuma.

4. In una provetta da centrifuga sterile priva di aerosol da 50 ml, aggiungere parti uguali di campione e di soluzione di NALC.
5. Chiudere la provetta da centrifuga e miscelare fino a liquefazione. Attendere per 15 minuti che la reazione di digestione avvenga, in uno spazio a temperatura ambiente. Evitare di attendere per tempi più lunghi, in quanto l'esposizione prolungata alla soluzione digerente potrebbe rendere inattivi i micobatteri.
6. Aggiungere 50 ml di soluzione tampone di fosfato sterilizzata, quindi richiudere la provetta da centrifuga.
7. Centrifugare il campione per 15 minuti a 2.200-3.000 x g.
8. Lasciar decantare il surnatante all'interno di un contenitore per materiali a rischio biologico.
9. Sospendere nuovamente il sedimento in 1-2 ml di soluzione tampone di fosfato. Il pH del campione dovrebbe essere pari a 6,8.
10. Il campione può essere ora sottoposto a test diagnostici e 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. Le linee del vetrino SureFocus devono risultare visibili anche in seguito ad applicazione del campione. Termofissare il vetrino utilizzando un bruciatore o uno scaldavetrini.

1. Termofissare il vetrino contenente lo striscio di campione
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. Far asciugare il vetrino
6. Esaminare il vetrino utilizzando il sistema QBC ParaLens o un sistema equivalente per la microscopia a fluorescenza

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:

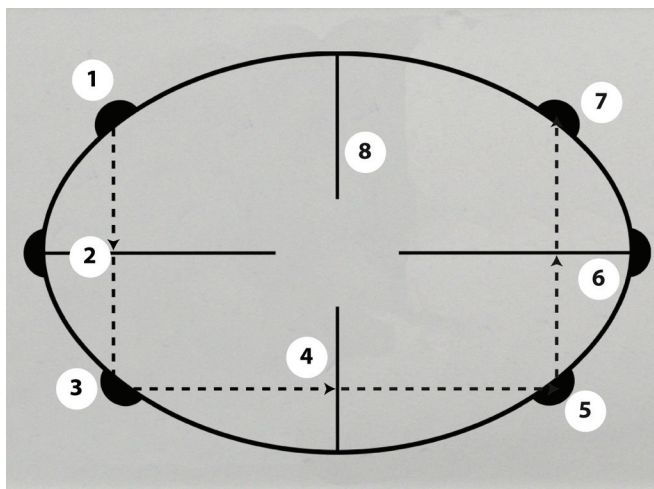
Porre il vetrino colorato sul tavolino del microscopio, quindi centrare l'obiettivo su un cerchio iniziale. Utilizzando la modalità di illuminazione a campo chiaro, mettere a fuoco il cerchio iniziale con un obiettivo di potenza inferiore, quindi passare all'obiettivo desiderato per l'analisi dello striscio. 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 la diagnosi 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.

Risultati previsti

La soluzione digerente per espettorato QBC *F.A.S.T.* è utilizzata per la digestione e la decontaminazione di campioni clinici respiratori (espettorato o lavaggio bronchiale) in caso di sospetta presenza di micobatteri.

Se le procedure sono state seguite correttamente, i campioni viscosi saranno liquefatti e la contaminazione da normale flora batterica risulterà ridotta o eliminata.

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. Una volta messi 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

Le provette per la preparazione dei campioni di espettorato e le pipette sterili di trasferimento sono fornite sterili. Non utilizzare il prodotto se la confezione risulta danneggiata o aperta.

Il metodo di digestione o decontaminazione appropriato varia a seconda della tipologia di campioni clinici e delle circostanze. Selezionare la procedura meno aggressiva, in grado di ridurre il livello di contaminazione.

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.

Materiali necessari ma non inclusi

Il Kit per striscio con soluzione digerente 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:

- Scaldavetrini o bruciatore a fiamma
- Centrifuga in grado di centrifugare le provette di preparazione dei campioni di espettorato a 2.200-3.000 x g
- Cappa di biosicurezza per la manipolazione dei campioni
- Dispositivi di protezione individuale

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 fluorescencnt 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 Infect Dis* 6:570-81.
5. Essential Procedures for Clinical Microbiology. (1998) American Society of Microbiology. Washington, D.C.

Modalità d'ordine

Kit per striscio con soluzione digerente QBC F.A.S.T. TB
 Centrifuga QBC F.A.S.T. (115 V, 60 Hz)
 Centrifuga QBC F.A.S.T. (220 V, 50 Hz)

Codice Cat.

427408
 427412
 427413



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