

A.L.L. COLLECTION KIT - A.L.L. SOLUTION DIGESTION REAGENT - PHOSPHATE BUFFER 0,067 M pH 6,8

IMPIEGO PREVISTO

Sistema completo per la raccolta, il trasporto ed il trattamento di materiali (escreti, bronco aspirati, liquidi cavitari, urine, ed altri di origine biologica ad eccezione del sangue) da sottoporre alla ricerca del bacillo di KOCH e di micobatteri in genere.

INTRODUZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il sistema segue le indicazioni del "Centers for Disease Control and Prevention" (Atlanta, U.S.A.) per i Laboratori di III Livello che raccomandano:

"Aggiungere a 10 ml di campione un uguale volume di soluzione fluidificante-decontaminante (unico passaggio), costituita da NaOH 3%, sodio citrato 1,45%, NaCl 0,5%. Vortexare ed agitare per 15 minuti, indi neutralizzare portando a 50 ml con tampone fosfato sterile 0.067 M (pH 6.8) e centrifugare a 3.300 x g per 15 minuti. Scartare il sovrinatante e risospendere il sedimento in 2 ml di tampone fosfato."

Il sistema può essere impiegato sia per tecniche colturali tradizionali dei micobatteri che per tecniche di amplificazione genica.

Nel caso si volesse fluidificare un materiale fortemente mucoso prima di sottoporlo alla ricerca di germi comuni, occorre separare la fase di fluidificazione da quella della decontaminazione.

Se il materiale viene utilizzato per la sola ricerca di micobatteri si può unificare la fase di fluidificazione con quella di decontaminazione miscelando 2,5 ml di "ALL SOLUTION con 10 ml di "DIGESTION REAGENT ed unendo il tutto al materiale da trattare.

ATTENZIONE : Tale miscela non può essere conservata per più di 24 h.

PERFORMANCES

Il sistema ALL è stato valutato nella routine clinica e trovato idoneo per la preparazione dei campioni da sottoporre ad amplificazione per la determinazione di *M.tuberculosis* (1).

ALL COLLECTION KIT (Cat. N° 225001N)

Confezione da 25 tubi idonei alla raccolta, al trasporto ed al trattamento di liquidi cavitari, bronco aspirato, liquido cefalorachidiano, aspirato gastrico, pus ed altri materiali di origine biologica impedendo nel contempo la formazione di coaguli di fibrina e garantendo la lisi delle eventuali emazie. Conservare a 2-8°C.

CONTENUTO DELLA PROVETTA:

1 ml di soluzione acquosa di N-acetil-L-cisteina, EDTA sale sodico, saponina, sodio idrossido, polipropilenglicol.

METODO D'IMPIEGO

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Raccogliere il materiale al momento del prelievo all'interno del "ALL COLLECTION KIT" ed agitare. Inviare al più presto al Laboratorio (max 3 ore). Se ciò non fosse possibile conservare a 2-8°C sino al momento dell'invio.

FLUIDIFICAZIONE + DECONTAMINAZIONE:

Aggiustare il volume del campione a 10 ml con acqua distillata sterile ed aggiungere 10 ml di "DIGESTION REAGENT", vortexare, incubare a 37°C per 5 minuti ed agitare su piano rotante per 10 minuti.

Per i liquidi cavitari (versamento pleurico – versamento peritoneale) occorre effettuare un arricchimento preventivo per centrifugazione ad un N° di giri sufficienti a raggiungere una forza di sedimentazione di 3.000 g. per 20 minuti dopo aver diluito il campione con acqua distillata sterile (portare a 50 ml). Ciò è necessario poiché il peso specifico dei liquidi cavitari, specie del versamento pleurico, è molto vicino al peso specifico dei micobatteri. Tale fatto renderebbe meno efficace la centrifugazione finale. Allontanare con pipetta Pasteur il sovrinatante e risospendere il sedimento con 10 ml di acqua distillata sterile. Aggiungere a questo sedimento 10 ml di "DIGESTION REAGENT", vortexare, incubare a 37°C per 5 minuti ed agitare su piano rotante per 10 minuti.

NEUTRALIZZAZIONE:

Neutralizzare portando a 40 ml con "PHOSPHATE BUFFER" a pH 6,8 e vortexare nuovamente.

SEDIMENTAZIONE:

Centrifugare ad un N° di giri sufficienti a raggiungere una forza di sedimentazione di 3.000 g. per 20 minuti, decantare il sovrinatante e rilavare il fondello con 10/15 ml di "PHOSPHATE BUFFER", dopo una nuova centrifugazione allontanare con pipetta Pasteur il sovrinatante, risospendere il sedimento in 2 ml di "PHOSPHATE BUFFER".

Tale sedimento può essere impiegato per tutte le tecniche indicate.

ALL SOLUTION (Cat. N° 225020)

Confezione da 50 ml di soluzione idonea al trattamento di fluidificazione per escreato, bronco aspirato, urine ed altri campioni organici pervenuti in Laboratorio per la ricerca del bacillo di Koch. Conservare a 2-8 °C.

CONTENUTO DEL FLACONE:

Soluzione acquosa di N-acetil-L-cisteina, EDTA sale sodico, saponina, sodio idrossido, polipropilenglicol.

METODO D'IMPIEGO

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Raccogliere il materiale pervenuto al Laboratorio all'interno di un tubo da centrifuga da 50 ml. Per le urine utilizzare 2 tubi (100 ml).

FLUIDIFICAZIONE + DECONTAMINAZIONE:

Aggiungere al materiale pervenuto 2,5 ml di "ALL SOLUTION", aggiustare il volume a circa 10 ml ed agitare; aggiungere 10 ml di "DIGESTION REAGENT", vortexare incubare a 37 °C per 5 minuti ed agitare su piano rotante per 10 minuti.

Per il trattamento di liquidi cefalorachidiani procedere come per escreti e bronco aspirati. Con questo materiale il trattamento con "ALL SOLUTION" e la diluizione sino a 10 ml totali è utile per l'allontanamento di eventuali frazioni proteiche presenti, diminuendo il rischio di presenza di sostanze che potrebbero interferire nel caso si procedesse ad amplificazione.

Per le urine utilizzare i 2 tubi (100 ml), centrifugare ad un N° di giri sufficienti a raggiungere una forza di sedimentazione di 3.000 g. per 20 minuti, allontanare con pipetta Pasteur il sovrantante, riunire i due sedimenti in un unico tubo lavando bene le pareti con acqua distillata sterile e portare il volume a 40 ml, vortexare per allontanare dal sedimento eventuali sostanze inibitrici l'amplificazione (tale passaggio può essere omesso nel caso di solo esame colturale). Procedere ad una seconda centrifugazione con le modalità precedenti, allontanare con pipetta Pasteur il sovrantante e risospingere il sedimento con 7/8 ml di acqua distillata sterile. Aggiungere 2,5 ml di "ALL SOLUTION" ed agitare, aggiungere 10 ml di "DIGESTION REAGENT", vortexare incubare a 37 °C per 5 minuti ed agitare su piano rotante per 10 minuti.

Per liquidi seminali da sottoporre alla ricerca di *Mycobacterium tuberculosis* complex mediante tecniche di amplificazione è preferibile procedere ad un lavaggio preventivo del materiale allo scopo di allontanare eventuali sostanze inibitrici l'amplificazione, procedere come di seguito:

Aggiungere al materiale pervenuto 2,5 ml di "ALL SOLUTION" ed agitare, portare a 30/35 ml con acqua distillata sterile e vortexare a brevi intervalli avendo cura di disperdere in maniera omogenea il liquido seminale, centrifugare ad un N° di giri sufficienti a raggiungere una forza di sedimentazione di 3.000 g. per 20 minuti, allontanare con pipetta Pasteur il sovrantante. Procedere ad una seconda centrifugazione con le modalità precedenti, allontanare con pipetta Pasteur il sovrantante e risospingere il sedimento con 10 ml di acqua distillata sterile. Aggiungere 10 ml di "DIGESTION REAGENT", vortexare incubare a 37 °C per 5 minuti ed agitare su piano rotante per 10 minuti.

Per eventuali liquidi cavitari (versamento pleurico-versamento peritoneale) che non fossero stati raccolti negli appositi tubi (ALL COLLECTION KIT (Cat.N° 225001N) occorre effettuare un arricchimento preventivo per centrifugazione ad un N° di giri sufficienti a raggiungere una forza di sedimentazione di 3.000 g. per 20 minuti dopo aver diluito il campione con acqua distillata sterile (portare a 50 ml). Ciò è necessario poiché il peso specifico dei liquidi cavitari, specie del versamento pleurico, è molto vicino al peso specifico dei micobatteri. Tale fatto renderebbe meno efficace la centrifugazione finale. Allontanare con pipetta Pasteur il sovrantante e risospingere il sedimento con 10 ml di acqua distillata sterile. Aggiungere a questo sedimento 10 ml di "DIGESTION REAGENT", vortexare, incubare a 37 °C per 5 minuti ed agitare su piano rotante per 10 minuti.

NEUTRALIZZAZIONE:

Neutralizzare portando a 40 ml con "PHOSPHATE BUFFER" a pH 6,8 e vortexare nuovamente.

SEDIMENTAZIONE:

Centrifugare ad un N° di giri sufficienti a raggiungere una forza di sedimentazione di 3.000 g. per 20 minuti, allontanare con pipetta Pasteur il sovrantante e rilavare il fondello con 10/15 ml di "PHOSPHATE BUFFER", dopo una nuova centrifugazione allontanare con pipetta Pasteur il sovrantante, risospingere il sedimento in 2 ml di "PHOSPHATE BUFFER". Tale sedimento può essere impiegato per tutte le tecniche indicate.

Feci: Trattandosi di materiale fortemente contaminato, è indispensabile un trattamento decontaminante particolarmente energico. In un provettone da centrifuga da 50 ml una palettata di feci viene stemperata in 20 ml di "ALL SOLUTION" ed omogeneizzata al vortex, vengono aggiunti 20 ml di acqua distillata sterile e dopo agitazione si procede a centrifugazione ad un N° di giri sufficienti a raggiungere una forza di sedimentazione di 3.000 g. per 20 minuti. Allontanato con pipetta Pasteur il sovrantante, risospingere il sedimento in 20 ml di acqua distillata sterile, aggiungere 20 ml di "DIGESTION REAGENT", vortexare, incubare a 37 °C per 10 minuti ed agitare su piano rotante per 20/30 minuti.

Centrifugare ad un N° di giri sufficienti a raggiungere una forza di sedimentazione di 3.000 g. per 20 minuti, allontanare con pipetta Pasteur il sovrantante e risospingere il sedimento con 30 ml di "PHOSPHATE BUFFER" vortexando, centrifugare nuovamente ad un N° di giri sufficienti a raggiungere una forza di 3.000 g. per 20 minuti. Allontanare con pipetta Pasteur il sovrantante e rilavare 2 volte il fondello con 35 ml di "PHOSPHATE BUFFER", vortexando e centrifugando ogni volta ad

un N° di giri sufficienti a raggiungere una forza di sedimentazione di 3.000 g. per 20 minuti. Al termine allontanare con pipetta Pasteur il sovrantante, e risospendere il sedimento con circa 2 ml di "PHOSPHATE BUFFER". Tale sedimento può essere impiegato per tutte le tecniche indicate.

DIGESTION REAGENT (Cat. N° 2403454)

Confezione da 500 ml di soluzione alcalina/triacetata da impiegare per la decontaminazione di tutti i campioni biologici da sottoporre alla ricerca del bacillo di Koch. Utilizzare dopo la sola fluidificazione effettuata con "ALL COLLECTION KIT" o con "ALL SOLUTION" oppure direttamente assieme a questi con le tecniche viste sopra.

CONTENUTO DEL FLACONE

Sodio idrossido 15 g, sodio citrato tribasico 14, 7 g, acqua distillata 500 ml

METODO D'IMPIEGO

DECONTAMINAZIONE:

Aggiustare con acqua distillata sterile il volume del campione fluidificato a 10 ml, aggiungere 10 ml di "DIGESTION REAGENT", vortexare ed agitare su piano rotante per 15 minuti.

Per le urine risospendere il sedimento ottenuto dalla centrifugazione di 100 ml (lavato con 40 ml di acqua distillata sterile nel caso di impiego di tecniche di amplificazione) con 7/8 ml di acqua distillata sterile, Aggiungere 2,5 ml di "ALL SOLUTION" ed agitare, aggiungere 10 ml di "DIGESTION REAGENT", vortexare incubare a 37°C per 5 minuti ed agitare su piano rotante per 10 minuti.

NEUTRALIZZAZIONE:

Neutralizzare portando a 40 ml con "PHOSPHATE BUFFER" a pH 6,8 e vortexare nuovamente.

SEDIMENTAZIONE:

Centrifugare ad un N° di giri sufficienti a raggiungere una forza di sedimentazione di 3.000 g. per 20 minuti, decantare il sovrantante e rilavare il fondello con 10/15 ml di "PHOSPHATE BUFFER", dopo una nuova centrifugazione allontanare con pipetta Pasteur parte del sovrantante, conservandone circa 2 ml in cui risospendere il sedimento. Tale sedimento può essere impiegato per tutte le tecniche indicate.

PHOSPHATE BUFFER 0,067 M pH 6,8 (Cat. N° 225040).

Confezione da 500 ml di tampone fosfato sterile a pH 6,8 da impiegare per la neutralizzazione di tutti i campioni biologici da sottoporre alla ricerca del bacillo di KOCH trattati con fluidificante "ALL SOLUTION" o "ALL COLLECTION KIT" e decontaminare "DIGESTION REAGENT". Conservare a 4-8°C.

CONTENUTO DEL FLACONE

Potassio fosfato monobasico 2,2 g, potassio fosfato bibasico 2,7 g, acqua distillata 500 ml. pH 6,8.

METODO D'IMPIEGO

NEUTRALIZZAZIONE:

Portare a 40 ml con "PHOSPHATE BUFFER" a pH 6,8 il materiale decontaminato con "DIGESTION REAGENT" e vortexare.

SEDIMENTAZIONE:

Centrifugare ad un N° di giri sufficienti a raggiungere una forza di sedimentazione di 3.000 g. per 20 minuti, decantare il sovrantante e rilavare il fondello con 10/15 ml di "PHOSPHATE BUFFER", dopo una nuova centrifugazione allontanare con pipetta Pasteur il sovrantante, e risospendere il sedimento con circa 2 ml di "PHOSPHATE BUFFER". Tale sedimento può essere impiegato per tutte le tecniche indicate.

AVVERTENZE

A.L.L. Solution ha un aspetto da limpido a leggermente opalescente. Nel caso si osservasse una vistosa torbidità si raccomanda di non utilizzarla.

Digestion Reagent e Phosphate Buffer sono soluzioni limpide; nel caso si osservasse torbidità od opalescenza si raccomanda di non utilizzarle

BIBLIOGRAFIA

1- Riva G., Carcheri M., Ciacci P., Graziani A., Lacitignola G., Mentasti P., Pastorino I., Ventura A., Zanin C., Capuzzo R. Importanza della preparazione del campione per allontanare sostanze inibenti l'amplificazione utilizzando il Mycobacterium Tuberculosis Direct Test". XXXII Congresso AMCLI, Firenze 2003, M071.

CONFEZIONI

225001 N

A.L.L. Collection Kit,

25 test (25 x 1 ml)

225020

A.L.L. Solution,

50 ml

2403454

Digestion Reagent,

500 ml

225040

Phosphate Buffer 0,067 M pH 6,8

500 ml

**SCHEMA DI LAVORO*****Raccolta:***

Raccogliere il materiale pervenuto al Laboratorio in un tubo da centrifuga da 50 ml.

Fluidificazione + Decontaminazione:

Aggiungere 2.5 ml di "ALL SOLUTION",
aggiustare il volume a 10 ml ca,
aggiungere 10 ml di "DIGEST KIT",
vortexare, incubare a 37°C per 5', agitare
su piano rotante per 10'

Neutralizzazione:

Neutralizzare portando a 40 ml con
"PHOSPHATE BUFFER" a pH 6,8
vortexare nuovamente

Sedimentazione:

Centrifugare ad un n° di giri sufficienti a
raggiungere una forza di sedimentazione di
3.000 g. per 20 minuti, allontanare con
pipetta Pasteur il sovrantante

Lavare il sedimento con 10/15 ml di
"PHOSPHATE BUFFER", dopo una nuova
centrifugazione allontanare con pipetta Pasteur
il sovrantante, risospendere il sedimento in 2
ml di "PHOSPHATE BUFFER" o di acqua
distillata sterile .
Il sedimento è pronto per l'uso