

A.L.L. DIGESTION NEUTRALISATION KIT

IMPIEGO PREVISTO

Kit completo per il trattamento anticoagulante, lisante, fluidificante (N-acetil L-cisteina), decontaminante e neutralizzante dei campioni sui quali ricercare i micobatteri con tecniche di amplificazione genica (DNA, rRNA) o colturali.

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%, NALC 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 sovrantante 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.

PERFORMANCE

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).

CONTENUTO DEL KIT

1 - **ALL SOLUTION**: confezione da 50 ml di soluzione idonea al trattamento di fluidificazione per escreato, bronco aspirato, 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.

2- **DIGESTION REAGENT** : 200 ml di soluzione alcalina/triacetata da impiegare per la decontaminazione di tutti i campioni biologici da sottoporre alla ricerca del bacillo di Koch..

CONTENUTO DEL FLACONE

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

3 - **PHOSPHATE BUFFER**: 1000 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" e decontaminane con "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.

I materiali forniti con il kit sono sufficienti a trattare 20 campioni (escreato, broncoaspirato, liquor, urine, liquido seminale, liquidi cavitari). Per le feci si consiglia di utilizzare i reattivi separati citati nel paragrafo "confezioni, poiché sono richiesti grandi volumi per ottimizzare il lavoro.

METODO D'IMPIEGO

RACCOLTA DEI CAMPIONI

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

FLUIDIFICAZIONE + DECONTAMINAZIONE - ESCREATO, BRONCOASPIRATO, LIQUOR

- Aggiungere al materiale pervenuto 2,5 ml di "ALL SOLUTION",
- Aggiustare il volume a circa 10 ml con acqua distillata sterile 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.

FLUIDIFICAZIONE + DECONTAMINAZIONE - URINE

- Centrifugare i 2 tubi in cui si è raccolta l'urina (100 ml) 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
- 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
- Risospendere 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.

FLUIDIFICAZIONE + DECONTAMINAZIONE - LIQUIDO SEMINALE

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

Risospendere 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.

FLUIDIFICAZIONE + DECONTAMINAZIONE - LIQUIDI CAVITARI

Per eventuali liquidi cavitari (versamento pleurico-versamento peritoneale) occorre effettuare un arricchimento preventivo del campione.

Diluire il campione con acqua distillata sterile portando a volume 50 ml.

Centrifugare ad un N° di giri sufficienti a raggiungere una forza di sedimentazione di 3.000 g. per 20 minuti. 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 R

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" e vortexare.

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

- Rilavare il fondello 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".

Tale sedimento può essere impiegato per tutte le tecniche indicate.

FLUIDIFICAZIONE + DECONTAMINAZIONE + NEUTRALIZZAZIONE - FECI (E' RACCOMANDATO L'USO DEI REATTIVI FORNIBILI SEPRATAMENTE)

Trattandosi di materiale fortemente contaminato, è indispensabile un trattamento decontaminante particolarmente energico.

Stemperare una paletta di con 20 ml di "ALL SOLUTION" in un provettone da centrifuga da 50 ml ed omogeneizzata al vortex,

Aggiungere 20 ml di acqua distillata sterile ed agitare

Procedere a centrifugazione 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, risospendere 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 risospendere 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.

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 R., 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.

CONFEZIONE

225000 **A.L.L. DIGESTION NEUTRALISATION KIT** **20 test**

PRODUTTORE

Biolife Italiana Srl

REATTIVI FORNIBILI SEPARATAMENTE

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