

ANVÄNDNINGSSINSTRUKTIONER

A.L.L. DIGESTION NEUTRALISATION KIT

A.L.L. SOLUTION

DIGESTION REAGENT

PHOSPHATE BUFFER

1 – AVSEDD ANVÄNDNING

In vitro-diagnostik. För antikoagulerande, lyserande, fluidiserande, dekontaminerande och neutraliserande behandling av prover för detektion av mykobakterier

2 – SAMMANSÄTTNING – INNEHÅLL I KITET OCH ENSKILDA REAGENSER**A.L.L. DIGESTION NEUTRALISATION KIT REF 225000**

1 – **A.L.L. Solution:** 1 flaska med 50 ml fluidiseringslösning för sputum, bronkopulmonala sekret och andra organiska prover som tas emot på laboratoriet för detektion av Kochs bacillus.

Flaskans innehåll: vattenlösning av N-acetyl-L-cystein, EDTA-natriumsalt, saponin, natriumhydroxid, polypropylenglykol.

2 – **Digestionsreagens:** 1 flaska med 200 ml alkalisk/triacetatlösning som ska användas för dekontaminering av alla biologiska prover som ska testas för Kochs bacill.

Flaskans innehåll: Natriumhydroxid 4 g, tribasiskt natriumcitrat 5,9 g, renat vatten 200 ml

3 – **Fosfatbuffert:** 2 flaskor med 500 ml steril fosfatbuffert pH 6,8 som ska användas för neutralisering av alla biologiska prover som ska testas för Kochs bacill, behandlade med "ALL Solution"-fluidifieringsmedel och dekontaminerade med "Digestion Reagent".

Flaskans innehåll: monobasisk kaliumfosfat 2,2 g, dibasisk kaliumfosfat 2,7 g, renat vatten 500 ml pH 6,8.

ENKLA REAGENSER

A.L.L. Solution REF 225020: 1 flaska med 50 ml fluidiserande lösning för sputum, bronkopulmonella sekret och andra organiska prover som tas emot på laboratoriet för testning av Kochs bacill.

Flaskans innehåll: vattenlösning av N-acetyl-L-cystein, EDTA-natriumsalt, saponin, natriumhydroxid, polypropylenglykol.

Digestionsreagens REF 2403454: 1 flaska med 500 ml alkalisk/triacetatlösning som ska användas för dekontaminering av alla biologiska prover som ska testas för Kochs bacill.

Flaskans innehåll: Natriumhydroxid 10 g, tribasiskt natriumcitrat 14,75 g, renat vatten 500 ml

Fosfatbuffert REF 225040: 1 flaska med 500 ml steril fosfatbuffert, pH 6,8, som ska användas för neutralisering av alla biologiska prover som ska testas för Kochs bacill och som har behandlats med "ALL Solution"-vätska och dekontaminerats med "Digestion Reagent".

Flaskans innehåll: monobasisk kaliumfosfat 2,2 g, dibasisk kaliumfosfat 2,7 g, renat vatten 500 ml pH 6,8.

3 – METODENS PRINCIP OCH FÖRKLARING AV FÖRFARANDET

Reagenserna har utformats och utvecklats för antikoagulerande, lyserande, fluidiserande, dekontaminerande och neutraliserande behandling av prover på vilka mykobakterier ska sökas genom odling eller genamplifieringstekniker (DNA, rRNA).

N-acetyl-L-cystein (NALC) i A.L.L. Solution-reagentet har en fluidiserande funktion på slem, saponin lyserar röda blodkroppar, EDTA har en kelaterande och därmed antikoagulerande effekt på blod som kan förekomma i provet, och polypropylenglykol blockerar saponins tendens att bilda skum. Natriumhydroxid har dekontaminerande och fluidiserande egenskaper; natriumcitrat ingår i reagentet för att binda tungmetalljoner som kan förekomma i provet och som kan inaktivera N-acetyl-L-cystein. Fosfatbuffert används i neutraliseringsproceduren före undersökning av det behandlade provet.

Systemet följer CDC:s riktlinjer för nivå III-laboratorier som rekommenderar: tillsätt till 10 ml prov en lika stor volym fluidiserande-dekontaminerande lösning (ett steg), bestående av NaOH 3 %, natriumcitrat 1,45 %, NaCl 0,5 %. Vortexa och blanda i 15 minuter, neutralisera sedan genom att tillsätta steril 0,067 M fosfatbuffert (pH 6,8) till 50 ml. Centrifugera vid 3 300 x g i 15 minuter. Kassera supernatanten och resuspendera sedimentet i 2 ml fosfatbuffert.

4 – BEREDNINGSMETOD

Reagenserna är färdiga att användas.

5 – FYSISKA EGENSKAPER

A.L.L. Solution

Digestionsreagens

Fosfatbuffert

ljusgul lösning, från klar till lätt opaliserande

klar lösning, färglös

klar lösning, färglös, pH 6,8 ± 0,05

6 – MEDFÖLJANDE MATERIAL – FÖRPACKNING

Produkt	Typ	REF	Förpackning
A.L.L. Digestion Neutralisation Kit	kit	225000	1 kit med 20 tester
A.L.L. Solution	Enkel reagens	225020	1 flaska à 50 ml
Digestion Reagent	Enkel reagens	2203454	1 flaska à 500 ml
Phosphate Buffer 0,067 M pH 6,8	Enkel reagens	225040	1 flaska à 500 ml

7 – MATERIAL SOM KRÄVS MEN INTE TILLHANDAHÅLLS

Centrifug, sterila centrifugrör, sterila pipetter, termostat och laboratorieutrustning, odlingsmedier och reagenser för odlingsidentifiering av mykobakterier och/eller bestämning av dessa med molekylära tekniker.





8 – PROVER

Sputum, bronkopulmonella sekret, urin, avföring, sädesvätska, kavitettsvätska. Samla materialet i ett 50 ml centrifugrör. För urin, använd 2 rör (100 ml). Arbeta i enlighet med god laboratoriesed för provtagning, förvaring och transport till laboratoriet.^{2,3}

9 – TESTFÖRFARANDE

FLYTANDE + DEKONTAMINERING: SLEM, BRONKOPULMONELLA SEKRET

- Tillsätt 2,5 ml "ALL SOLUTION" till det mottagna materialet.
- Tillsätt sterilt renat vatten upp till cirka 10 ml och blanda
- Tillsätt 10 ml "DIGESTION REAGENT", vortexa och inkubera vid 37 °C i 5 minuter, blanda i 10 minuter på en rotationsplatta.

FLYTANDE + DEKONTAMINERING: URIN

- Centrifugera de två rören i vilka urinen samlats (100 ml) med tillräcklig hastighet för att uppnå en sedimentationskraft på 3 000 g i 20 minuter.
- Avlägsna supernatanten med en Pasteurpipett, lägg de två sedimenten i ett rör genom att tvätta väggarna väl med sterilt renat vatten
- Fyll på volymen till 40 ml, vortexa för att avlägsna eventuella ämnen som hämmar amplifieringen från sedimentet (detta steg kan utelämnas vid enbart odlingsundersökning).
- Fortsätt med en andra centrifugering enligt ovan, ta bort supernatanten med en Pasteurpipett.
- Resuspendera sedimentet med 7/8 ml sterilt renat vatten.
- Tillsätt 2,5 ml "ALL SOLUTION" och blanda.
- Tillsätt 10 ml "DIGESTION REAGENT", vortexa, inkubera vid 37 °C i 5 minuter och blanda på rotationsplatta i 10 minuter.

FLYTANDE + DEKONTAMINERING: SÄDESVÄTSKA

För sädesvätskor som ska testas för *Mycobacterium tuberculosis*-komplex med hjälp av amplifieringstekniker är det bättre att förtvätta materialet för att avlägsna eventuella ämnen som hämmar amplifieringen.

Gör på följande sätt:

- Tillsätt 2,5 ml "ALL SOLUTION" till det mottagna materialet och blanda.
- Tillsätt sterilt renat vatten upp till 30/35 ml och vortexa upprepade gånger för att dispergera sädesvätskan homogent.
- Centrifugera med tillräcklig hastighet för att uppnå en sedimentationskraft på 3 000 g i 20 minuter, ta bort supernatanten med en Pasteurpipett.
- Fortsätt med en andra centrifugering enligt ovan, ta bort supernatanten med en Pasteurpipett.
- Resuspendera sedimentet med 10 ml sterilt renat vatten.
- Tillsätt 10 ml DIGESTION REAGENT, vortexa, inkubera vid 37 °C i 5 minuter och blanda på rotationsplatta i 10 minuter.

FLUIDIFIERING + DEKONTAMINERING: CAVITARY FLUID

För alla kavitära vätskor (pleural effusion-peritoneal spillage) krävs en förberikning.

- Späd provet med sterilt renat vatten till 50 ml.
- Centrifugera med tillräcklig hastighet för att uppnå en sedimentationskraft på 3 000 g i 20 minuter. Detta är nödvändigt eftersom den specifika vikten hos kavitära vätskor, särskilt pleural effusion, är mycket lik den hos mykobakterier. Denna likhet skulle göra den slutliga centrifugeringen mindre effektiv.
- Avlägsna supernatanten med en Pasteurpipett.
- Resuspendera sedimentet med 10 ml sterilt renat vatten.
- Tillsätt 10 ml DIGESTION REAGENT till detta sediment, vortexa, inkubera vid 37 °C i 5 minuter och blanda på en rotationsplatta i 10 minuter.

NEUTRALISERING

Neutralisera genom att tillsätta PHOSPHATE BUFFER upp till 40 ml och vortexa.

SEDIMENTERING

- Centrifugera vid tillräcklig hastighet för att uppnå en sedimentationskraft på 3 000 g i 20 minuter
- Avlägsna supernatanten med en Pasteurpipett
- Skölj med 10/15 ml "FOSFATBUFFERT".
- Efter ytterligare centrifugering, ta bort supernatanten med en Pasteurpipett
- Resuspendera sedimentet i 2 ml "FOSFATBUFFERT".

Detta sediment kan användas för alla angivna tekniker.

FLYTANDE + DEKONTAMINERING + NEUTRALISERING: AVFÖRING

(ANVÄNDNING AV SEPARAT TILLGÄNGLIGA REAGENSER REKOMMENDERAS)

- När materialet är kraftigt kontaminerat är en särskilt kraftfull dekontamineringsbehandling nödvändig.
- Blanda en liten mängd avföring med 20 ml "ALL SOLUTION" i ett 50 ml centrifugrör och vortexa.
- Tillsätt 20 ml sterilt renat vatten och blanda.
- Centrifugera med tillräcklig hastighet för att uppnå en sedimentationskraft på 3 000 g i 20 minuter.
- Avlägsna supernatanten med en Pasteurpipett och resuspendera sedimentet i 20 ml sterilt renat vatten.
- Tillsätt 20 ml DIGESTION REAGENT, vortexa, inkubera vid 37 °C i 10 minuter och blanda på en roterande platta i 20 till 30 minuter.
- Centrifugera med tillräcklig hastighet för att uppnå en sedimentationskraft på 3 000 g i 20 minuter.
- Avlägsna supernatanten med en Pasteurpipett och resuspendera sedimentet med 30 ml "FOSFATBUFFERT" genom vortexning.
- Centrifugera igen med tillräcklig hastighet för att uppnå en kraft på 3 000 g i 20 minuter.
- Avlägsna supernatanten med en Pasteurpipett och skölj pelleten två gånger med 35 ml "FOSFATBUFFERT", vortexa och centrifugera varje gång med tillräcklig hastighet för att uppnå en sedimentationskraft på 3 000 g i 20 minuter.
- Avlägsna slutligen supernatanten med en Pasteurpipett och resuspendera sedimentet med cirka 2 ml "FOSFATBUFFERT".

Detta sediment kan användas för alla angivna tekniker.





10 – ANVÄNDARENS KVALITETSKONTROLL

Varje batch av den produkt som beskrivs här släpps ut för försäljning efter att den har genomgått kvalitetskontroll för att verifiera att den uppfyller specifikationerna. Det är dock upp till användaren att utföra sin egen kvalitetskontroll i enlighet med relevanta föreskrifter, ackrediteringsregler och sin egen laboratorieerfarenhet.

11 – PRESTANDAEGENSKAPER

A.L.L.-systemet har utvärderats i klinisk rutin och befunnits lämpligt för provberedning för amplifiering av *M.tuberculosis*.⁴

Innan produkten släpps för försäljning kontrolleras representativa prover från alla partier av A.L.L-lösningen för att säkerställa att de inte hämmar tillväxten av följande mikroorganismer: *M.tuberculosis* ATCC 25177, *M.kansasii* ATCC 12478, *S.aureus* ATCC 25923, *N.gonorrhoeae* ATCC 19424, *S.pyogenes* ATCC 19615. Representativa prover av Digestion Reagent testas för dekontamineringskapacitet med följande stammar: *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 29212, *P.aeruginosa* ATCC 10145.

12 – METODENS BEGRÄNSNINGAR

- Om ett material är mycket slemmigt ska det fluidiseras innan det utsätts för vanlig bakteriedetektering. Fluidiseringssteget måste separeras från dekontamineringssteget.
- Om materialet endast ska användas för detektion av mykobakterier kan fluidiserings- och dekontamineringsstegen kombineras genom att blanda 2,5 ml "ALL SOLUTION" med 10 ml "DIGESTION REAGENT" och tillsätta detta till det material som ska bearbetas.
VARNING: Denna blandning kan inte förvaras i mer än 24 timmar.
- Det är användarens ansvar att validera de odlings- eller molekylärbiologiska metoder som används efter behandling av proverna med kitets reagenser.
- De reagenser som beskrivs här är avsedda som ett hjälpmedel vid diagnos av mikrobiella infektioner. Tolkningen av resultaten bör göras med hänsyn till patientens kliniska historia, provets ursprung och resultaten av andra diagnostiska tester.

13 – FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER OCH VARNINGAR

- De reagenser som beskrivs här är kvalitativa *in vitro*-diagnostiska produkter för professionellt bruk och måste användas i laboratorium av adekvat utbildad personal, med godkända aseptiska och patogensäkra metoder.
- Läs säkerhetsdatabladet för reagensen före användning.
- Behandla proverna som potentiellt smittsamma.
- Laboratoriemiljön måste kontrolleras för att undvika kontaminering av reagenser eller mikrobiella agens.
- Sterilisera allt biologiskt farligt avfall före bortskaffande. Kassera oanvända reagenser och material med steriliserade prover eller mikrobiella stammar i enlighet med gällande lagstiftning.
- Använd inte de produkter som beskrivs här som aktiva ingredienser i farmaceutiska preparat eller som material för produktion av livsmedel eller foder.
- Analyscertifikat och säkerhetsdatablad för produkterna finns tillgängliga på www.biolifeitaliana.it.
- Rapportera till Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) och till behöriga myndigheter alla allvariga incidenter som inträffar i samband med användningen av de *in vitro*-diagnostiska produkter som beskrivs här.
- Informationen i detta dokument har sammanställts efter bästa kunskap och förmåga och utgör en riktlinje för korrekt användning av produkten, men utan åtagande eller ansvar. Slut användaren måste i alla fall följa lokala lagar, förordningar och standardförfaranden för undersökning av prover som samlats in från olika mänskliga och djuriska organiska distrikt, miljöprover och produkter avsedda för konsumtion av människor eller djur. Vår information befriar inte slut användaren från ansvaret att kontrollera att våra produkter är lämpliga för det avsedda ändamålet.

14 – FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN OCH HÅLLBARHET

Förvara kitet och de enskilda reagensen vid +10 °C / +25 °C skyddade från ljus. Under dessa förhållanden är produkterna giltiga till det utgångsdatum som anges på etiketten. Använd inte efter detta datum. Öppna flaskorna med aseptiska försiktighetsåtgärder.

A.L.L. Solution har ett klart till lätt opaliserande utseende. Om tydlig grumlighet observeras rekommenderas att den inte används. Digestionsreagens och fosfatbuffert är klara lösningar; om grumlighet eller opaliserande utseende observeras rekommenderas att de inte används. Kassera produkterna om behållarna och/eller locken är skadade eller om flaskorna inte är tätt tillslutna.

15 – REFERENSER

1. Kent, P. T., and G. P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology. A guide to the level III laboratory. Centers for Disease Control, Atlanta, Ga.
2. UK Standards for Microbiology Investigations. Issued by the Standards Unit, Public Health England. Investigation of specimens for Mycobacterium species. Bacteriology, B 40, Issue no: 7.3, Issue date: 5.10.2020
3. Isabella Martin et al. Mycobacterium: General Characterisation, Laboratory Detection, and Staining Procedures . In Carrol KC, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 12th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2019.
4. 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.





SUMMARY OF THE METHOD OF USE

COLLECTION: collect the material received by the laboratory in a 50 mL centrifuge tube	FLUIDIFICATION + DECONTAMINATION: Add 2.5 mL of "ALL SOLUTION", adjust volume to approximately 10 mL, add 10 mL of "DIGESTION REAGENT", vortex, incubate at 37°C for 5', mix on rotary plate for 10'
	NEUTRALIZATION: <u>neutralise</u> adding PHOSPHATE BUFFER up to <u>40 mL</u> at pH 6.8 and vortex again
	SEDIMENTATION: Centrifuge at a sufficient speed to achieve a sedimentation force of 3.000g/20 minutes, remove supernatant with Pasteur pipette
	Wash the sediment with 10/15 mL of "PHOSPHATE BUFFER", after a new centrifugation remove the supernatant with a Pasteur pipette, resuspend the sediment in 2 mL of PHOSPHATE BUFFER" or sterile distilled water. The sediment is ready to use

A.L.L. SOLUTION

SDS rev. 2

Förordning (EU) 2020/878

Innehåller: natriumhydroxid

Klassificering

Ämnen eller blandningar som är korrosiva för metaller, kategori 1
Frätande på huden, kategori 1B
Allvarlig ögonskada, kategori 1

H290
H314
H318

Kan vara korrosivt för metaller.

Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon.
Orsakar allvarliga ögonskador.

Märkelement

Faropiktogram



