

**ISTRUZIONI PER L'USO**

A.L.L. DIGESTION NEUTRALISATION KIT

A.L.L SOLUTION

DIGESTION REAGENT

PHOSPHATE BUFFER

1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostici *in vitro*. Per il trattamento anticoagulante, lisante, fluidificante, decontaminante e neutralizzante dei campioni sui quali ricercare i micobatteri.

2 – COMPOSIZIONE – CONTENUTO DEL KIT E DEI SINGOLI REATTIVI**A.L.L. DIGESTION NEUTRALISATION KIT REF 225000**

Il kit per il trattamento di 20 campioni contiene:

1 - **A.L.L. SOLUTION**: 1 flacone con 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.

Contenuto del flacone: soluzione acquosa di N-acetil L-cisteina, EDTA sale sodico, saponina, sodio idrossido, polipropilenglicol.

2 - **DIGESTION REAGENT**: 1 flacone con 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 4 g, sodio citrato tribasico 5,9 g, acqua purificata 200 mL

3- **PHOSPHATE BUFFER**: 2 flaconi con 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" e decontaminante con "DIGESTION REAGENT".

Contenuto del flacone: potassio fosfato monobasico 2,2 g, potassio fosfato bibasico 2,7 g, acqua purificata 500 mL. pH 6,8.

REATTIVI SINGOLI

A.L.L. Solution REF 225020: 1 flacone con 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.

Contenuto del flacone: soluzione acquosa di N-acetil L-cisteina, EDTA sale sodico, saponina, sodio idrossido, polipropilenglicol.

Digestion Reagent REF 2403454: 1 flacone con 500 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 10 g, sodio citrato tribasico 14,75 g, acqua purificata 500 mL

Phosphate Buffer REF 225040: 1 flacone con 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" e decontaminante con "DIGESTION REAGENT".

Contenuto del flacone: potassio fosfato monobasico 2,2 g, potassio fosfato bibasico 2,7 g, acqua purificata 500 mL. pH 6,8.

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I reagenti sono stati ideati e sviluppati per il trattamento anticoagulante, lisante, fluidificante, decontaminante e neutralizzante dei campioni sui quali ricercare i micobatteri con tecniche colturali o di amplificazione genica (DNA, rRNA).

La N-acetil L-cisteina (NALC) del reattivo A.L.L. Solution svolge una funzione fluidificante dell'espettorato, la saponina lisa i globuli rossi eventualmente presenti nel campione, l'EDTA ha una funzione chelante e quindi anticoagulante del sangue eventualmente presente nel campione, il polipropilenglicol blocca la tendenza alla formazione di schiuma della saponina. Il sodio idrossido ha attività decontaminante e fluidificante sul campione; il sodio citrato è incluso nel reagente per legare gli ioni dei metalli pesanti che possono essere presenti nel campione e che possono inattivare la N-acetil L-cisteina. Il tampone fosfato è impiegato nella procedura di neutralizzazione prima dell'esame del campione trattato.

Il sistema segue le indicazioni del CDC¹ 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 sovrannutante e risospendere il sedimento in 2 mL di tampone fosfato.

4 – METODO DI PREPARAZIONE

I reattivi sono pronti per l'uso.

5 - CARATTERISTICHE

A.L.L. Solution

soluzione di colore giallo chiaro da limpida a leggermente opalescente

Digestion Reagent

soluzione limpida, incolore

Phosphate Buffer

soluzione limpida, incolore, pH 6,8 ± 0,05





6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
A.L.L Digestion Neutralisation Kit	kit	225000	1 kit per 20 test
A.L.L. Solution	Reattivo singolo	225020	1 flacone da 50 mL
Digestion Reagent	Reattivo singolo	2203454	1 flacone da 500 mL
Phosphate Buffer 0,067 M pH 6,8	Reattivo singolo	225040	1 flacone da 500 mL

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Centrifuga, provette sterili da centrifuga, pipette sterili, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura e reagenti per la coltura, l'identificazione dei micobatteri e/ o per la loro determinazione con tecniche di biologia molecolare.

8 - CAMPIONI

Escreato, bronco-aspirato, urine, feci, liquido seminale, liquidi cavitari. Raccogliere il materiale all'interno di un tubo da centrifuga da 50 mL. Per le urine utilizzare 2 tubi (100 mL). Operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.^{2,3}

9- PROCEDURA DELL'ANALISI

FLUIDIFICAZIONE + DECONTAMINAZIONE: ESCREATO, BRONCOASPIRATO

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

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 sovranatante, riunire i due sedimenti in un unico tubo lavando bene le pareti con acqua purificata 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 culturale).
- Procedere ad una seconda centrifugazione con le modalità precedenti, allontanare con pipetta Pasteur il sovranatante.
- Risospendere il sedimento con 7/8 mL di acqua purificata 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 purificata 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 sovranatante.

Procedere ad una seconda centrifugazione con le modalità precedenti, allontanare con pipetta Pasteur il sovranatante

Risospendere il sedimento con 10 mL di acqua purificata 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 purificata 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 sovranatante.

Risospendere il sedimento con 10 mL di acqua purificata 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 sovranatante
- Rilavare il fondello con 10/15 mL di "PHOSPHATE BUFFER".
- Dopo una nuova centrifugazione allontanare con pipetta Pasteur il sovranatante
- 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 SEPARATAMENTE)

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

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

Aggiungere 20 mL di acqua purificata 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 sovrannutante, risospingere il sedimento in 20 mL di acqua purificata 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 sovrannutante 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 sovrannutante 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 sovrannutante, e risospingere il sedimento con circa 2 mL di "PHOSPHATE BUFFER".

Tale sedimento può essere impiegato per tutte le tecniche indicate.

10 - CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio.

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Il sistema A.L.L. è stato valutato nella routine clinica e trovato idoneo per la preparazione dei campioni da sottoporre ad amplificazione per la determinazione di *M.tuberculosis*.⁴

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di A.L.L. Solution sono verificati per l'assenza di attività inibitoria della crescita dei seguenti microrganismi: *M.tuberculosis* ATCC 25177, *M. kansasii* ATCC 12478, *S.aureus* ATCC 25923, *N.gonorrhoeae* ATCC 19424, *S.pyogenes* ATCC 19615. Campioni rappresentativi di Digestion Reagent sono verificati per la capacità di decontaminazione con i seguenti ceppi: *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923, *E.faecalis* ATCC 29212, *P.aeruginosa* ATCC 10145.

12 - LIMITI DEL METODO

- 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.
- È responsabilità dell'utilizzatore validare le metodiche colturali o di biologia molecolare impiegate dopo il trattamento dei campioni con i reattivi del kit.
- I reattivi qui descritti sono da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- I reattivi qui descritti sono diagnostici *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale e devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- Prima dell'uso consultare le schede di sicurezza dei reattivi.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti i reattivi o gli agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i reattivi non utilizzati ed i materiali con i campioni o con ceppi microbici sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiali per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza dei prodotti sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso dei diagnostici *in vitro* qui descritti.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare il kit ed i reattivi singoli a +10°C /+25°C al riparo della luce. In queste condizioni i prodotti sono validi fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Aprire i flaconi con le precauzioni dell'asepsi.

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. Eliminare i prodotti nel caso i contenitori e/o i tappi fossero danneggiati o nel caso i flaconi non fossero ben chiusi





15 - BIBLIOGRAFIA

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 Carroll 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.

SINTESI DEL METODO D'IMPIEGO

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 sovranatante

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



**225020 e 225000 A.L.L SOLUTION**

SDS rev. 2

Regolamento (UE) 2020/878

Contiene: idrossido di sodio**Classificazione**

Sostanza o miscela corrosiva per i metalli, categoria 1
 Corrosione cutanea, categoria 1B
 Lesioni oculari gravi, categoria 1

H290
 H314
 H318

Può essere corrosivo per i metalli.
 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
 Provoca gravi lesioni oculari.

Etichettatura

Pittogramma



Avvertenza Pericolo

Indicazioni di pericolo:

H290 Può essere corrosivo per i metalli.
 H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

Consigli di prudenza:

P260 Non respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.
 P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
 P303+P361+P353 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle [o fare una doccia].
 P280 Indossare guanti / indumenti protettivi e proteggere gli occhi / il viso.
 P310 Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI / un medico / . . .
 P264 Lavare accuratamente . . . dopo l'uso.

2203454 e 225000 DIGESTION REAGENT

SDS rev. 2

Regolamento (UE) 2020/878

Contiene: idrossido di sodio**Classificazione**

Irritazione oculare, categoria 2
 Irritazione cutanea, categoria 2

H319 Provoca grave irritazione oculare.
 H315 Provoca irritazione cutanea.

Etichettatura
Pittogramma

Avvertenza Pericolo

Indicazioni di pericolo:

H319 Provoca grave irritazione oculare.
 H315 Provoca irritazione cutanea.

Consigli di prudenza:

P280 Indossare guanti protettivi e proteggere gli occhi / il viso.
 P337+P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
 P264 Lavare accuratamente . . . dopo l'uso.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o REF Numero di catalogo	LOT	Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Utilizzare entro
		Contenuto sufficiente per <n> saggi		Consultare le Istruzioni per l'Uso	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	05/2022
Revisione 4	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

