

TABLE OF CONTENTS

English...	1	German...	9
French...	3	Product Codes...	11
Spanish...	5	Glossary of Symbols...	11
Italian...	7		

INTENDED USE

NPC-67[®] Neutralizing Buffer is used to neutralize the base pH reagents used in the N-acetyl-L-cysteine (NALC) digestion and decontamination procedure for the increased recovery of *Mycobacterium* spp. from sputum and other clinical specimens.

SUMMARY

The decontamination and digestion procedure, utilizing the compound N-acetyl-L-cysteine (NALC) combined with sodium hydroxide and sodium citrate (trisodium citrate), results in increased yields of tubercle bacilli. The NALC procedure utilizes N-acetyl-L-cysteine as a mucolytic compound by disrupting chemical bonds in mucus. The sodium hydroxide acts as a bacterial decontaminate and the sodium citrate (trisodium citrate) stabilizes the NALC by chelating (binding) any heavy metal ions present in the specimen. Since the sodium hydroxide has a pH of approximately 13.00, it will kill bacteria (including mycobacteria after 15–20 minutes of exposure). As such, timing of the decontamination is critical to limit the amount of *Mycobacterium* spp. killed by the basic pH. A pH indicator is incorporated into the decontamination reagent to monitor the pH throughout the decontamination and buffering procedure, allowing the laboratory technologist to visually see when neutralization has been achieved. Bringing the pH to a neutral range can stop the decontamination process. The NPC-67 is used to neutralize the NaOH following the appropriate digestion and decontamination time, resulting in a pH of below 8.10. Adding conventional M/15 Phosphate Buffer or phosphate buffered saline will result in a pH range of 9.40 to 12.20, requiring a titration to a neutral pH with 1N HCL, or continued decontamination of *Mycobacterium* spp. will occur. Studies have documented that pH values above 8.10 are toxic to *Mycobacterium* spp., including *Mycobacterium tuberculosis*. Following the decanting step, PRB[™] Pellet Resuspension Buffer is added to achieve a tight neutral pH value (6.80–7.10) in the specimen sediment, optimizing mycobacteria recovery.

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

PRECAUTIONS

All clinical specimens submitted for the diagnosis of tuberculosis and other *Mycobacterium* spp. must be treated with appropriate care so as not to contaminate other specimens or laboratory personnel. Use all approved and regulated equipment for processing and detection procedures.

STABILITY AND STORAGE

NPC-67 is stable to the stated expiration date when stored at the required temperature. Prior to opening, NPC-67 can be stored at room temperature (15–30°C). After opening, store between 2–8°C. Allow the product to come to room temperature prior to use.

USER QUALITY CONTROL

Any product showing cloudiness, turbidity, precipitation or discoloration should be discarded. Quality controlled microorganisms should be utilized to verify procedures, media and reagents as appropriate for your laboratory's applicable regulatory agency or local procedural guidelines.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Appropriate specimens for the detection of *Mycobacterium* spp. should be collected according to prescribed standards and delivered to the laboratory in a safe and timely manner. Refer to local procedural guidelines for this information.

PROCEDURE

Materials Provided: NPC-67 Neutralizing Buffer.

Materials Not Provided: Centrifuge, vortex mixer, sterile pipettes, microscope slides, TB media, centrifuge tubes, NAC-PAC[®] or NAC-PAC RED, PRB Pellet Resuspension Buffer, and CELL-BOND[®] Slides.

SPECIMEN PROCESSING

- Line up specimens (in centrifuge tubes) in a biosafety hood.
- Loosen specimen container caps. Work in sets equivalent to a centrifuge load.
- Open bottle labeled "NAC-PAC RED". Add the NALC powder to the NAC-PAC RED bottle. Shake well to dissolve the NALC powder. **NOTE:** Some residual NALC powder may remain in the vial. It is **not** necessary to liquefy the portion remaining in the vial. **THIS SOLUTION WILL BE GOOD FOR 72 HOURS AFTER MIXING.** Discard the mixed solution after 72 hours.
- To the sterile 50 ml centrifuge tube containing the specimen to be digested, add the NAC-PAC RED/NALC solution as follows:
 - For specimens **1–5 ml**, add a volume of NAC-PAC RED/NALC equal to that of the specimen volume.
 - For specimens **6–7 ml**, add 5 ml of NAC-PAC RED/NALC.
 - For specimens **8–10 ml**, add an equal volume of NAC-PAC RED/NALC and then split the specimen after step 6 equally into two centrifuge tubes, proceed with steps 7–9 and then combine the sediments from both tubes into one centrifuge tube and proceed with step 10.

Following this protocol will help achieve effective decontamination while also allowing for proper neutralization. If you routinely encounter specimens greater than 10 ml in volume, please contact Alpha-Tec Technical Services for special instructions.

- Tighten the caps on the centrifuge tubes. Mix each specimen on a vortex until liquefied (30 seconds per specimen).
- Allow each specimen to stand for 15–20 minutes. Vortex every 5 minutes during this step.
- Fill each tube with NPC-67 until effective neutralization is indicated by a color change from red/pink to colorless. Once a colorless point has been reached, do not continue to add NPC-67 to the sample. Tighten cap and swirl by hand to mix. **NOTE:** NPC-67 will achieve a colorless solution [basic pH neutralization] when added to a decontamination reagent [NAC-PAC RED] with a NaOH concentration of 3% or lower.
- Centrifuge the specimen tubes at 3000 xg for 15 minutes. It is recommended but not required to use a refrigerated centrifuge. Each laboratory must check the centrifuge head radius and use an appropriate nomogram for proper speed selection [rpm] to achieve the desired relative centrifugal field of 3000 xg.
- Working in a biosafety hood, pour off all supernatant into a splash-proof container holding an appropriate disinfectant. Use an appropriate disinfectant to disinfect any contamination on the lip of the specimen tube. Do not allow the disinfectant to run down inside the specimen tube.
- Resuspend the pellet with 0.5 ml–1.0 ml of PRB. Do not resuspend the pellet with NPC-67, water or saline. **NOTE:** To maximize time to detection for rapid growth automated detection systems, resuspend the pellet with 1.0 ml of PRB. Depending on the needs of your laboratory, the pellet may be resuspended with 0.5 ml of PRB to create a more concentrated sample for increased acid-fast smear staining sensitivity. Once the smears have been made, add an additional 1.0 ml of PRB to inoculate rapid broth detection systems and other media.
- Mix the sediment and buffer well, and inoculate the liquid broth for your automated detection equipment per the manufacturer's instructions.
- Place two drops of the sediment onto the surface of each of the TB media used. **NOTE:** A contamination control plate (BAP or TSA) can be inoculated at this point and incubated at 35–37°C for 48 hours.
- Make smears for acid-fast staining. Use adhesive CELL-BOND Slides or sterile albumin adhesive solutions to attach the specimen to the slide. Dry the smears and proceed with acid-fast staining per the manufacturer's directions. **NOTE:** An acid-fast stain control slide

should be stained in conjunction with the patient smears to verify the staining technique and components. Contact Alpha-Tec Technical Services for a complete list of acid-fast stains and control slides.

14. To the unused portion of the specimen, add the balance of the PRB and refrigerate at 2–8°C to save for future diagnostic procedures or reprocessing if necessary.

PROCEDURE NOTES

1. NPC-67 has been validated for use with multiple molecular diagnostic methods and systems. For more information regarding compatibility with specific methods or systems, contact Alpha-Tec Technical Services.
2. Small volume specimens with correspondingly low post-neutralization volumes can make centrifuge balancing difficult. If your laboratory frequently encounters small volume specimens, it is acceptable to add sterile saline to the sample to reach a combined volume of 5 ml prior to the addition of NAC-PAC RED/NALC solution. In this case, the sample should be decontaminated with 5 ml of NAC-PAC RED/NALC solution. This will increase the final post-neutralization specimen volume making centrifuge balancing easier.
3. Specimens contaminated with *Pseudomonas* spp. will need additional treatment with the OxA® Oxalic Acid Reagent Kit (#0004805). Refer to the Oxalic Acid Directions For Use for complete instructions, or call Alpha-Tec Technical Services for information on the pH effects of the oxalic acid procedure and the appropriate buffering requirements.
4. Following the decontamination of the specimen with NAC-PAC RED, bloody specimens may remain pink after the addition of the NPC-67 due to the residual hemoglobin in the specimen. If the color change cannot be visualized due to hemoglobin, add the NPC-67 up to the 50 ml mark to ensure complete neutralization. For additional information, contact Alpha-Tec Technical Services.

EXPECTED RESULTS

If *Mycobacterium* spp. are present in the clinical specimen and processed according to the procedures listed within this document, the recovery of cultivable, viable and clinically significant *Mycobacterium* spp. can be expected.

LIMITATIONS OF PROCEDURES

Timing of the decontamination step, proper buffering, speed and timing of the centrifugation step, proper decanting and addition of the PRB to the pellet are vital to the recovery of *Mycobacterium* spp. Failure to follow the listed procedures may result in decreased numbers or total loss of *Mycobacterium* spp. resulting in an inaccurate culture report.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

NPC-67 was tested on clinical samples and recovered all culture appropriate *Mycobacterium* spp. when the designated procedures were followed.

BIBLIOGRAPHY

1. Babakhani, F., Warren N., Henderson D., and Dalton H. Effect of Transportation and Acid Neutralization on Recovery of Mycobacteria from Processed Specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995. 104(1):65–68.
2. Chapman J.S., Bernard, J.S. The Tolerance of Unclassified Mycobacteria. Limits of pH Tolerance. *Am. Rev Respir Dis.* 1962. 86:582–583.
3. Kent, P., Kubica, G.P., Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Centers for the Disease Control and Prevention, Atlanta. 1985.
4. Kubica, G.P., et al. Sputum Digestion and Decontamination with N-acetyl-L-cysteine-Sodium Hydroxide for Culture of Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 1963. 87:775–779.
5. Kubica, G.P., et al. Comments on the Use of the New Mucolytic Agent, N-acetyl-L-cysteine, as a Sputum Digestant for the Isolation of Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 1964. 89:284–286.

6. Lennette, E.H., et al., Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology Third Edition. 1980.
7. Vestal, A.L., Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria. C.D.C., Atlanta, GA. 1975.
8. Yegian, D., Budd V. Toxic Effect of Sodium Hydroxide on Tubercle Bacilli. *Am. J. Clinical Pathology.* 1952. 22:456–460.

CONTACT

For Technical Assistance email Technical@AlphaTecSystems.com for Customer Service, email Sales@AlphaTecSystems.com or call [+1] 800.221.6058 or [+1] 360.260.2779 between 8 am and 4 pm Monday through Friday, Pacific Time.

WARRANTY

CalibreScientific US, Inc. warrants this product to perform as described in the labeling and literature supplied. CalibreScientific US, Inc. disclaims any implied warranty or merchantability or fitness for any other purpose, and in no event shall CalibreScientific US, Inc. be liable for any consequential damages arising out of aforesaid express warranty.

Mode d'emploi :

NPC-67® Tampon de Neutralisation**DOMAINE D'UTILISATION**

Le Tampon de Neutralisation NPC-67 est utilisé pour neutraliser l'alcalinité du milieu lors de la fluidification par la N-acétyl-L-cystéine (NALC) et la décontamination des échantillons cliniques visant à optimiser le recouvrement des mycobactéries à partir d'expectorations et autres échantillons cliniques.

RÉSUMÉ

La procédure de fluidification et de décontamination à base de N-acétyl-L-cystéine (NALC) en association avec l'hydroxyde de sodium et le citrate trisodique, permet d'optimiser le recouvrement des bacilles tuberculeux. La méthode NALC utilise la N-acétyl-L-cystéine comme agent mucolytique pour briser les liaisons chimiques du mucus. L'hydroxyde de sodium a une action décontaminante antibactérienne, et le citrate trisodique stabilise la NALC par chélation des ions de métaux lourds présents dans l'échantillon. L'hydroxyde de sodium ayant un pH d'environ 13,00 détruit les bactéries (y compris les mycobactéries après une exposition de 15 à 20 minutes). La durée de l'étape de décontamination est donc déterminante afin de limiter la quantité de mycobactéries tuées par le pH alcalin. Un indicateur de pH est incorporé au réactif de décontamination, ce qui permet de surveiller le pH tout au long des étapes de décontamination et de neutralisation, en donnant au technicien de laboratoire une indication visuelle de la fin de la neutralisation. La décontamination peut être interrompue en ramenant le pH à des valeurs proches de la neutralité. NPC-67 est utilisé pour neutraliser le NaOH après un temps de fluidification et de décontamination approprié, et permet d'obtenir un pH inférieur à 8,10. En ajoutant un tampon phosphate M/15 conventionnel ou un tampon phosphate salin, on obtient un pH compris entre 9,40 et 12,20, nécessitant une titration à un pH neutre avec une solution d' HCl 1N afin d'empêcher la destruction des mycobactéries de se poursuivre. Des études ont montré que des valeurs de pH supérieures à 8,10 sont toxiques pour les mycobactéries, y compris *Mycobacterium tuberculosis*. Après l'étape de décontamination, un tampon de reprise du culot PRB™ est ajouté pour obtenir une valeur de pH très proche de la neutralité (entre 6,80 et 7,10) dans le culot de l'échantillon, ce qui optimise le rendement en mycobactéries.

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO UNIQUEMENT**PRÉCAUTIONS**

Tous les échantillons cliniques soumis au diagnostic de la tuberculose et autres infections à mycobactéries doivent être traités avec les précautions d'usage afin d'éviter toute contamination des autres échantillons ou du personnel de laboratoire. Utiliser uniquement des équipements approuvés et conformes aux réglementations pour toutes les étapes de traitement et de détection.

STABILITÉ ET CONSERVATION

Stocké à la température requise, NPC-67 est stable jusqu'à la date de péremption indiquée. Avant ouverture, stocker NPC-67 à température ambiante (entre 15 et 30°C). Après ouverture, conserver entre 2 et 8°C. Laisser le produit s'équilibrer à température ambiante avant utilisation.

CONTRÔLE QUALITÉ PAR L'UTILISATEUR

Tout produit présentant une opacité, une turbidité, une précipitation ou une altération de la coloration doit être éliminé. Des microorganismes de référence doivent être utilisés pour la vérification des modes opératoires, des milieux et des réactifs, conformément aux recommandations de l'autorité de tutelle du laboratoire ou aux directives locales.

COLLECTE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons appropriés pour la détection des mycobactéries doivent être collectés conformément aux normes prescrites, et délivrés au laboratoire en respectant les règles de sécurité et les délais. Se reporter aux directives locales pour obtenir ces informations.

PROCÉDURE

Matériel Fourni : Le Tampon de Neutralisation NPC-67.

Matériel Non Fourni : Centrifugeuse, vortex, micropipettes stériles, lames de microscope, milieux de culture pour mycobactéries, tubes à centrifuger, NAC-PAC® ou NAC-PAC RED, tampon de reprise du culot PRB, et lames CELL-BOND®.

TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

1. Aligner les échantillons (dans des tubes à centrifuger) dans une enceinte de biosécurité.
2. Dévisser le bouchon des tubes contenant les échantillons. Travailler par séries équivalentes à la charge de la centrifugeuse.
3. Ouvrir un flacon étiqueté "NAC-PAC RED". Ajouter la poudre NALC au flacon NAC-PAC RED. Agiter pour dissoudre la poudre NALC. **N.B.** : De la poudre NALC résiduelle peut subsister dans l'ampoule. Il n'est pas nécessaire de dissoudre ce résidu. **CETTE SOLUTION EST UTILISABLE PENDANT SEULEMENT 72 HEURES APRÈS RECONSTITUTION.** Jeter la solution reconstituée au bout de 72 heures.
4. Dans le tube à centrifuger stérile de 50 ml contenant l'échantillon à fluidifier, ajouter la solution NAC-PAC RED/NALC dans les proportions suivantes:
 - a. Échantillons de **1 à 5 ml**: **ajouter un volume de NAC-PAC RED/NALC égal à celui de l'échantillon.**
 - b. Échantillons de **6 à 7 ml** : **ajouter 5 ml de solution NAC-PAC RED/NALC.**
 - c. Échantillons de **8 à 10 ml** : **ajouter un volume équivalent de NAC-PAC RED/NALC et répartir l'échantillon après l'étape 6** de manière égale dans deux tubes à centrifuger ; réaliser les étapes 7 à 9, puis réunir les culots des deux tubes dans un tube à centrifuger et passer à l'étape 10.

Le respect de ce protocole permet une décontamination efficace et une neutralisation correcte. Si des échantillons de plus de 10 ml sont régulièrement traités, veuillez contacter les Services Techniques d'Alpha-Tec pour obtenir des indications spécifiques.

5. Reboucher les tubes à centrifuger. Mélanger au vortex chaque échantillon jusqu'à liquéfaction (30 secondes par échantillon).
6. Laisser reposer chaque échantillon pendant 15–20 minutes. Pendant cette étape, mélanger au vortex toutes les 5 minutes.
7. Ajouter dans chaque tube le NPC-67 jusqu'à ce que la solution vire du rouge/rose à l'incolore, indiquant la neutralisation complète du pH alcalin. Une fois la solution incolore, ne plus ajouter de NPC-67 à l'échantillon. Refermer le tube et mélanger à la main en effectuant des mouvements rotatoires. **N.B.** : NPC-67 donne une solution incolore [neutralisation du pH alcalin] lorsqu'il est ajouté à un réactif de décontamination [NAC-PAC RED] avec une concentration en NaOH de 3 % ou moins.
8. Centrifuger les tubes contenant les échantillons à 3000 xg pendant 15 minutes. Il est recommandé, mais non impératif, d'utiliser une centrifugeuse réfrigérée. Chaque laboratoire doit vérifier le rayon de rotation de la centrifugeuse et utiliser un abaque approprié pour une sélection correcte de la vitesse de rotation [rpm] afin d'obtenir la force centrifuge désirée de 3000 xg.
9. En travaillant dans une enceinte de biosécurité, verser la totalité du surnageant dans un récipient anti-projections contenant un désinfectant approprié. À l'aide d'un désinfectant approprié, éliminer toute contamination sur le rebord du tube. Ne pas laisser le désinfectant couler à l'intérieur du tube.
10. Reprendre le culot avec 0,5 ml–1,0 ml de PRB. Ne pas reprendre le culot avec le NPC-67, ni avec de l'eau ou une solution saline. **N.B.** : Afin d'optimiser le temps de détection pour les systèmes automatisés de détection rapide, reprendre le culot dans 1,0 ml de PRB. Un échantillon plus concentré peut être obtenu en reprenant le culot dans 0,5 ml de tampon en vue d'une plus grande sensibilité

lors de l'examen microscopique. Une fois les frottis réalisés, ajouter 1,0 ml supplémentaire de PRB afin d'inoculer les systèmes de détection rapide en milieu liquide et autres milieux.

11. Bien mélanger le culot et le tampon et inoculer les systèmes de détection rapide en milieu liquide, selon les recommandations du fabricant.
12. Déposer deux gouttes de culot sur la surface de chacun des milieux de culture pour mycobactéries. **N.B.** : À ce stade, vous pouvez inoculer un gélose témoin de contamination (BAP ou TSA) et l'incuber entre 35 et 37°C pendant 48 heures.
13. Réaliser des frottis en vue de l'examen microscopique. Utiliser des lames adhésives CELL-BOND ou une solution stérile d'albumine pour fixer l'échantillon sur la lame. Sécher les frottis et réaliser la coloration en suivant les indications du fabricant. **N.B.** : Une lame de contrôle de coloration doit être colorée en même temps que les frottis du patient, afin de vérifier la technique de coloration et les composants utilisés. Contacter les Services techniques d'Alpha-Tec pour obtenir la liste complète des colorants utilisés pour l'examen microscopique et des lames de contrôle.
14. Ajouter le reliquat de PRB à la portion inutilisée de l'échantillon et conserver à 2–8°C pour d'autres procédures de diagnostic ou pour un nouveau traitement si nécessaire.

NOTES SUR LE MODE OPÉRATOIRE

1. NPC-67 a été validé pour une utilisation avec de multiples méthodes et systèmes de diagnostic moléculaire. Pour plus de détails concernant sa compatibilité avec des méthodes et systèmes spécifiques, prière de contacter les Services techniques d'Alpha-Tec.
2. Les échantillons de faible volume, ayant également un faible volume après neutralisation, peuvent poser des problèmes de réglage de la centrifugeuse. Si votre laboratoire traite fréquemment des échantillons de faible volume, il est acceptable d'ajouter une solution saline stérile à l'échantillon pour atteindre un volume total de 5 ml avant ajout de la solution de NAC-PAC RED/NALC. Dans ce cas, l'échantillon doit être décontaminé avec 5 ml de solution NAC-PAC RED/NALC. Cela permet d'augmenter le volume après neutralisation et de faciliter le réglage de la centrifugeuse.
3. Les échantillons contaminés par *Pseudomonas* spp. nécessitent un traitement supplémentaire avec d'OxA® Oxalic Acid Reagent Kit (#0004805). Voir les instructions complètes sur la notice de l'acide oxalique, ou appeler les Services Techniques ou le Service des ventes d'Alpha-Tec pour obtenir des informations concernant les effets sur le pH de la technique à l'acide oxalique et les exigences applicables aux tampons.
4. Après décontamination de l'échantillon avec NAC-PAC RED, les échantillons sanguinolents peuvent rester roses après l'ajout du NPC-67, en raison de l'hémoglobine résiduelle dans l'échantillon. Si le changement de coloration ne peut être visualisé dû à l'hémoglobine, ajouter du NPC-67 jusqu'au repère de 50 ml pour s'assurer d'une complète neutralisation. Pour plus de détails, contacter les Services techniques d'Alpha-Tec.

RÉSULTATS ATTENDUS

Si des mycobactéries sont présentes dans l'échantillon clinique et sont traitées conformément aux procédures décrites dans ce document, on peut s'attendre à l'obtention de populations de mycobactéries cultivables, viables et significatives au plan clinique.

LIMITES DE LA MÉTHODE

La durée de la décontamination, une neutralisation adéquate, la vitesse et la durée de centrifugation, la réalisation correcte de la décantation et l'addition du PRB sont des étapes cruciales pour le recouvrement des mycobactéries. Le non-respect des procédures décrites peut donner lieu à une baisse, voire à une perte totale de la population de mycobactéries et donc à un résultat faussé.

CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DE PERFORMANCE

NPC-67 a été testé sur des échantillons cliniques et a permis dans tous les cas le recouvrement des mycobactéries lorsque les procédures ont été respectées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Babakhani, F., Warren N., Henderson D., and Dalton H. Effect of Transportation and Acid Neutralization on Recovery of Mycobacteria from Processed Specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995. 104(1):65–68.
2. Chapman J.S., Bernard, J.S. The Tolerance of Unclassified Mycobacteria. Limits of pH Tolerance. *Am. Rev Respir Dis.* 1962. 86:582–583.
3. Kent, P., Kubica, G.P., Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Centers for the Disease Control and Prevention, Atlanta. 1985.
4. Kubica, G.P., et al. Sputum Digestion and Decontamination with N-acetyl-L-cysteine-Sodium Hydroxide for Culture of Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 1963. 87:775–779.
5. Kubica, G.P., et al. Comments on the Use of the New Mucolytic Agent, N-acetyl-L-cysteine, as a Sputum Digestant for the Isolation of Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 1964. 89:284–286.
6. Lennette, E.H., et al., Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology Third Edition. 1980.
7. Vestal, A.L., Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria. C.D.C., Atlanta, GA. 1975.
8. Yegian, D., Budd V. Toxic Effect of Sodium Hydroxide on Tubercle Bacilli. *Am. J. Clinical Pathology.* 1952. 22:456–460.

CONTACT

Pour obtenir une assistance technique, merci de nous contacter par courriel à Technical@AlphaTecSystems.com ; pour joindre le service clientèle, veuillez nous contacter par courriel à Sales@AlphaTecSystems.com ou par téléphone au [+1] 360.260.2779, du lundi au vendredi de 8 h à 16 h, heure de la côte pacifique des États-Unis.

GARANTIE

CalibreScientific US, Inc. garantit que ce produit présente des performances conformes à celles indiquées sur l'étiquetage et dans la documentation fournie. CalibreScientific US, Inc. décline toute garantie, garantie de conformité ou d'aptitude pour toute autre utilisation que celle prévue, et en aucun cas CalibreScientific US, Inc. ne saurait être tenu responsable d'éventuels dommages survenant à la suite d'un usage hors de la garantie expresse susmentionnée.

Instrucciones de uso para los siguientes lugares:
NPC-67® Solución Para Neutralizar

APLICACIÓN

El Buffer Neutralizante NPC-67 se utiliza para neutralizar los reactivos de pH básico usados en el proceso de digestión y descontaminación con N-acetil-L-cisteína (NALC) para así obtener mayor recuperación de las *Mycobacterium* spp. tanto del esputo como de otras muestras clínicas.

RESUMEN

El proceso de digestión y descontaminación utilizando el compuesto de N-acetil-L-cisteína (NALC) al combinarse con el hidróxido de sodio y el citrato de sodio (citrato trisódico), resulta en una mayor recuperación de bacilos tuberculosos. En el procedimiento NALC, la N-acetil-L-cisteína actúa como un compuesto mucolítico rompiendo las uniones químicas presentes en el moco. El hidróxido de sodio actúa como descontaminante bacteriano mientras que el citrato de sodio (citrato trisódico) estabiliza el compuesto NALC quelando (uniendo) cualquier ion de metal pesado presente en la muestra. Debido a que el pH del hidróxido de sodio es de aproximadamente 13.00, esto matará a las bacterias (incluyendo a las micobacterias pasadas los 15–20 minutos de exposición). Por ende, el tiempo de la descontaminación es determinante para limitar la cantidad de *Mycobacterium* spp. muertas a causa del pH básico. Se ha incorporado un indicador de pH en el reactivo de descontaminación para monitorear el pH durante el proceso de la descontaminación y buffering, permitiendo al técnico de laboratorio visualizar cuando se alcanza la neutralización. El proceso de descontaminación puede interrumpirse al llevar al pH a un valor neutro. NPC-67 se utiliza para neutralizar al NaOH después de haber alcanzado el tiempo adecuado de digestión y descontaminación, lo que resulta en un valor de pH inferior a 8.10. Si se agrega buffer fosfato convencional de tipo M/15 o solución salina amortiguada por fosfato, esto dará un rango de pH entre 9.40 y 12.20, requiriéndose entonces realizar una titulación a pH neutro con solución 1N de HCl, o de lo contrario, la descontaminación de *Mycobacterium* spp. seguirá ocurriendo. Diversos estudios indican que valores de pH por encima de 8.10 son tóxicos para la *Mycobacterium* spp., incluyendo al *Mycobacterium tuberculosis*. Una vez finalizada la decantación, se agrega Buffer de Resuspensión de Botón PRB™ para alcanzar un valor de pH neutro de rango estrecho (6.80–7.10) en el sedimento de la muestra, a fin de optimizar la recuperación de micobacterias.

PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO SOLAMENTE

PRECAUCIONES

Todas las muestras clínicas enviadas para diagnóstico de tuberculosis y demás *Mycobacterium* spp. deben manipularse con cuidado para evitar contaminar el resto de las muestras y/o al personal del laboratorio. Utilice equipamiento aprobado y regulado para los procedimientos de procesamiento y detección.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

NPC-67 se mantiene estable hasta el momento de la fecha de vencimiento siempre y cuando sea almacenado a temperatura adecuada. Antes de abrir, NPC-67 puede almacenarse a temperatura ambiente (15–30°C). Una vez abierto, almacene el producto entre 2–8°C. Permita que el producto alcance temperatura ambiente antes de usarlo.

CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO

Cualquier producto que presente turbidez, opacidad, precipitación o decoloración deberá ser descartado. Se deberán utilizar microorganismos de control de calidad para verificar los procedimientos, medios y reactivos según lo establezcan las normas de procedimiento locales y/o las agencias normativas aplicables a su laboratorio.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras adecuadas para la detección de *Mycobacterium* spp. se deben recolectar de acuerdo con los estándares establecidos y las mismas deberán ser enviadas al laboratorio en segura y a tiempo. Consulte las normas de procedimiento aplicables en su localidad.

PROCEDIMIENTO

Materiales provistos: Buffer Neutralizante NPC-67.

Materiales no provistos: Centrífuga, agitador de tipo vortex, pipetas estériles, portaobjetos para microscopía, medio de cultivo para tuberculosis, tubos para la centrifuga, NAC-PAC® o el sistema NAC-PAC RED, Buffer de Resuspensión de Botón PRB, y laminillas CELL-BOND®.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

1. Alinee las muestras (colocadas dentro de los tubos de centrifugación) en un gabinete de bioseguridad.
2. Afloje las tapas de los contenedores de las muestras. Trabaje en tandas o cantidades equivalentes a la carga de la centrifuga.
3. Abra la botella rotulada "NAC-PAC RED". Agregue el polvo NALC a la botella de NAC-PAC RED. Agitar bien para disolver el polvo de NALC. **NOTA:** Pudiera quedar polvo NALC residual en la ampolla. No es necesario licuar la porción remanente en la ampolla. **UNA VEZ MEZCLADA, LA SOLUCIÓN SERVIRÁ SOLO POR 72 HORAS.** Pasado ese período, deseche la solución mezclada.
4. Al tubo de centrifuga estéril de 50 ml que contiene la muestra a digerir agregue la solución de NAC-PAC RED/NALC en las siguientes proporciones:
 - a. Para muestras de **1 a 5 ml, agregue un volumen de NAC-PAC RED/NALC igual al volumen de la muestra.**
 - b. Para muestras de **6 a 7 ml, agregue 5 ml de solución de NAC-PAC RED/NALC.**
 - c. Para muestras de **8 a 10 ml, añada un volumen igual de NAC-PAC RED/NALC y divida la muestra una vez finalizado el paso 6** en partes iguales en dos tubos de centrifugación, prosiga con los pasos 7 a 9 y después combine los sedimentos de ambos tubos en un único tubo de centrifugación y continúe con el paso 10.
 - d. Siguiendo este protocolo se puede alcanzar una descontaminación efectiva y permitir una neutralización adecuada. Si de manera rutinaria trabaja con muestras que superan los 10 ml en volumen, por favor contáctese con Alpha-Tec Technical Services (Servicios Técnicos) para recibir las instrucciones especiales.
5. Cierre las tapas de los tubos de centrifugación. Mezcle cada muestra en un agitador tipo vortex hasta licuarlo (30 segundos pormuestra).
6. Deje reposar la muestra durante 15–20 minutos. Durante este paso, agite las muestras con el agitador de tipo vortex cada 5 minutos.
7. Llene cada tubo con NPC-67 hasta que el cambio de color (pasará de rojo/rosado a transparente) indique una neutralización efectiva. Una vez que haya alcanzado el punto incoloro, no agregue más solución NPC-67 a la muestra. Con la mano para mezclar. **NOTA:** NPC-67 se volverá una solución incolora [neutralización con pH básico] cuando se agregue el reactivo descontaminante [NAC-PAC RED] con NaOH de una concentración de 3% o menos.
8. Centrifugue los tubos de muestra a 3000 xg durante 15 minutos. Se recomienda, aunque no es requisito fundamental, la utilización de una centrifuga refrigerada. Cada laboratorio debe revisar el radio de la cabeza de la centrifuga y utilizar el nomograma correcto para la selección adecuada de la velocidad (RPM) para alcanzar el campo centrífugo deseado de 3000 xg.
9. Dentro del gabinete de bioseguridad, vierta todo el sobrenadante en un contenedor a prueba de salpicaduras que contenga un desinfectante adecuado. Utilice el desinfectante adecuado para desinfectar cualquier material contaminante que pudiera encontrarse sobre el borde del tubo de la muestra. Evite que el desinfectante se introduzca en el interior del tubo de la muestra.
10. Vuelva a suspender el botón utilizando 0.5 ml–1.0 ml de PRB. Evite volver a suspender el botón con NPC-67, agua o solución salina. **NOTA:** Para maximizar el tiempo de detección para sistemas

automatizados de detección de rápido crecimiento, resuspenda el botón con 1.0 ml de PRB. Dependiendo de las necesidades de su laboratorio, el botón puede ser resuspendido con 0.5 ml de PRB para crear una muestra más concentrada para el aumento de la sensibilidad de tinción de ácido-alcohol resistente. Una vez que se han hecho los frotis, agregar un adicional de 1.0 ml de PRB para inocular los caldos de sistemas de detección rápida y otros medios de cultivo.

- Mezcle bien el sedimento y el buffer, e inocule el medio líquido para su equipo de detección automatizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- Coloque dos gotas del sedimento en la superficie de cada medio de cultivo para tuberculosis utilizado. **NOTA:** En este momento del proceso se puede inocular una placa de Petri de control utilizando agar sangre (BAP) o agar tripticasa de soya (TSA), e incubando a 35–37°C durante 48 horas.
- Realice los frotis para la tinción ácido-alcohol resistente. Utilice las laminillas CELL-BOND adhesivas o las soluciones adhesivas de albúmina estériles adecuadas para adherir la muestra al vidrio de la laminilla. Seque los frotis y continúe con la tinción ácido-alcohol resistente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. **NOTA:** Se debe teñir una laminilla para control de la tinción ácido-alcohol resistente junto con las muestras de los pacientes para verificar tanto la técnica como los componentes de la tinción. Comuníquese con los Servicios Técnicos de Alpha-Tec para obtener una lista completa de las tinciones ácido-alcohol resistentes y laminillas control.
- Añada el resto de la Solución de PRB a la muestra que no fue utilizada y almacénala refrigerada a 2–8°C para procedimientos diagnósticos futuros o reprocesamientos que pudieran ser necesarios.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

- NPC-67 ha sido validado para su uso con múltiples métodos y sistemas de diagnóstico molecular. Para obtener más información sobre la compatibilidad con los métodos o sistemas específicos, póngase en contacto con los Servicios Técnicos de Alpha-Tec.
- Las muestras con pequeños volúmenes que se corresponden con volúmenes bajos después de la neutralización pueden dificultar el balance de la centrífuga. Si su laboratorio trabaja con frecuencia con muestras de bajo volumen, es aceptable añadir solución salina estéril a la muestra para de esta manera alcanzar un volumen combinado de 5 ml antes de agregar la solución NAC-PAC RED/NALC. En este caso, se deberá descontaminar la muestra con 5 ml de solución NAC-PAC RED/NALC. Esto aumentará el volumen final de la muestra una vez finalizada la neutralización, facilitando así el balance de las muestras durante la centrifugación.
- Las muestras que estén contaminadas con *Pseudomonas* spp. requerirán tratamiento adicional con la OxA® Oxalic Acid Reagent Kit (#0004805). Consulte las Instrucciones de Uso del Ácido Oxálico para tener acceso a las instrucciones completas o comuníquese con el servicio técnico de Alpha-Tec para obtener mayor información acerca de los efectos sobre el pH que tiene el procedimiento del ácido oxálico y cuáles son los requisitos adecuados para lograr la neutralización.
- Una vez lograda la descontaminación de la muestra con NAC-PAC RED, las muestras con sangre pudieran permanecer rosadas aún después de agregar NPC-67 debido a hemoglobina residual en la muestra. Si el cambio de color no puede visualizarse debido a la hemoglobina, agregue NPC-67 hasta la marca de 50 ml para asegurar la neutralización completa. Para obtener información adicional, póngase en contacto con los Servicios Técnicos de Alpha-Tec.

RESULTADOS ESPERADOS

Si las muestras clínicas contuvieran *Mycobacterium* spp. y fueran procesadas de acuerdo con los procedimientos descritos en este documento, pudiera esperarse la recuperación de *Mycobacterium* spp. cultivables, viables y clínicamente significativas.

LIMITACIONES DE LOS PROCEDIMIENTOS

Los tiempos de la etapa de descontaminación, una neutralización adecuada, la velocidad y el tiempo de centrifugación, la decantación adecuada y el agregado del PRB al sedimento son todos pasos vitales para la recuperación de *Mycobacterium* spp. Una falla en algunos de estos pasos anteriormente mencionados pudiera resultar en una disminución o pérdida total de *Mycobacterium* spp. y por lo tanto en un informe de cultivo inadecuado.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICAS

NPC-67 fue evaluado utilizando muestras clínicas y siguiendo los procedimientos antes descritos de manera rigurosa se recuperó todos los *Mycobacterium* spp. adecuados para cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Babakhani, F., Warren N., Henderson D., and Dalton H. Effect of Transportation and Acid Neutralization on Recovery of Mycobacteria from Processed Specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995. 104(1):65–68.
- Chapman J.S., Bernard, J.S. The Tolerance of Unclassified Mycobacteria. Limits of pH Tolerance. *Am. Rev Respir Dis.* 1962. 86:582–583.
- Kent, P., Kubica, G.P., Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Centers for the Disease Control and Prevention, Atlanta. 1985.
- Kubica, G.P., et al. Sputum Digestion and Decontamination with N-acetyl-L-cysteine-Sodium Hydroxide for Culture of Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 1963. 87:775–779.
- Kubica, G.P., et al. Comments on the Use of the New Mucolytic Agent, N-acetyl-L-cysteine, as a Sputum Digestant for the Isolation of Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 1964. 89:284–286.
- Lennette, E.H., et al., Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology Third Edition. 1980.
- Vestal, A.L., Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria. C.D.C., Atlanta, GA. 1975.
- Yegian, D., Budd V. Toxic Effect of Sodium Hydroxide on Tubercle Bacilli. *Am. J. Clinical Pathology.* 1952. 22:456–460.

CONTACTO

Para asistencia técnica, envíe un correo electrónico a Technical@AlphaTecSystems.com y para atención al cliente, mande un correo electrónico a Sales@AlphaTecSystems.com o llame al [+1] 360.260.2779 en horario de 8 am a 4 pm de lunes a viernes, hora del Pacífico.

GARANTÍA

CalibreScientific US, Inc. garantiza que este producto se desempeñará según la descripción de la etiqueta y la literatura incluida. CalibreScientific US, Inc. renuncia a cualquier garantía implícita de comercialización o adecuación para cualquier otro fin y, en ninguna circunstancia CalibreScientific US, Inc. será responsable de cualquier daño que pudiera surgir como consecuencia de la garantía expresa antes mencionada.

Indicazioni per l'uso di:

NPC-67® Tampone Neutralizzante

USO PREVISTO

Il Tampone Neutralizzante NPC-67 viene utilizzato per neutralizzare i reagenti a base pH utilizzati nella procedura di digestione e decontaminazione con N-acetil-L-cisteina (NALC) per aumentare la resa del recupero di *Mycobacterium* spp. da espettorato e altri campioni clinici.

SOMMARIO

La procedura di decontaminazione e digestione con utilizzo del composto N-acetil-L-cisteina (NALC) in abbinamento con idrossido di sodio e citrato di sodio (citrato trisodico) consente di aumentare le rese di recupero di bacilli della tubercolosi. La procedura NALC utilizza N-acetil-L-cisteina come composto mucolitico che agisce rompendo i legami chimici nel muco. L'idrossido di sodio agisce da decontaminante antibatterico e il citrato di sodio (citrato trisodico) stabilizza la NALC chelando (legandosi a) ioni di metalli pesanti eventualmente presenti nel campione. Poiché l'idrossido di sodio ha un pH di circa 13,00, ucciderà i batteri (inclusi i micobatteri dopo circa 15–20 minuti di esposizione). Per questo motivo la tempistica della decontaminazione è determinante nel limitare la quantità di *Mycobacterium* spp. uccisi dal pH alcalino. Nel reagente decontaminante è presente un indicatore di pH per monitorare la procedura di decontaminazione e tamponamento, il quale consente al tecnico di laboratorio di vedere quando viene raggiunta la neutralizzazione. Portando il pH a valori neutri, è possibile arrestare il processo di decontaminazione. Si utilizza il NPC-67 per neutralizzare l'idrossido di sodio una volta trascorso l'opportuno tempo di digestione e decontaminazione, con conseguente raggiungimento di un valore del pH inferiore a 8,10. L'aggiunta di tampone fosfato M/15 o soluzione salina tamponata di fosfato convenzionale porterà il pH a valori compresi tra 9,40 e 12,20, che richiederanno una titolazione a pH neutro con HCl 1N; in caso contrario si avrà la continua decontaminazione di *Mycobacterium* spp. Gli studi effettuati documentano che valori del pH superiori a 8,10 sono tossici per il *Mycobacterium* spp., compreso il *Mycobacterium tuberculosis*. In seguito alla fase di decantazione, viene aggiunta una soluzione tampone di risospensione pellet PRB™ per ottenere un valore del pH corrispondente esattamente alla condizione di neutralità (6,80–7,10) nel sedimento del campione, in modo da ottimizzare il recupero di micobatteri.

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

PRECAUZIONI

Tutti i campioni clinici inoltrati per la diagnosi del *Mycobacterium tuberculosis* e di altri *Mycobacterium* spp. devono essere trattati con opportuna cautela, onde evitare di contaminare altri campioni o il personale di laboratorio. Utilizzare tutte le apparecchiature approvate e regolamentate per le procedure di trattamento e rilevazione.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

NPC-67 è stabile fino alla data di scadenza dichiarata quando viene conservato alla temperatura richiesta. Prima dell'apertura, è possibile conservare NPC-67 a temperatura ambiente (15–30°C). Dopo l'apertura, conservare a una temperatura tra 2 e 8°C. Attendere che il prodotto si porti a temperatura ambiente prima di utilizzarlo.

CONTROLLO QUALITÀ PRESSO L'UTILIZZATORE

Scartare il prodotto se si presenta opaco o torbido, o con segni di precipitazione o scolorimento. Utilizzare microrganismi di qualità controllata per verificare procedure, terreni e reagenti, come più opportuno secondo le linee guida degli enti di regolamentazione applicabili al proprio laboratorio o le linee guida procedurali locali.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Raccogliere opportuni campioni per la rilevazione di *Mycobacterium* spp. secondo gli standard prescritti e farli pervenire al laboratorio

tempestivamente e in modo sicuro. Per queste informazioni fare riferimento alle linee guida procedurali locali.

PROCEDURA

Materiali forniti: Il Tampone Neutralizzante NPC-67.

Materiali non forniti: Centrifuga, agitatore vortex, pipette sterili, vetrini da microscopio, terreni per TB, provette per centrifuga, NAC-PAC® o NAC-PAC RED, il tampone di risospensione pellet PRB, e vetrini CELL-BOND®.

TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

1. Allineare i campioni (in provette per centrifuga) in una cappa di biosicurezza.
2. Allentare i tappi dei contenitori dei campioni. Lavorare con serie equivalenti al carico di una centrifuga.
3. Aprire il flacone etichettato "NAC-PAC RED". Aggiungere la polvere di NALC al NAC-PAC RED. **NOTA** - È possibile che nell'ampolla rimangano residui di polvere di NALC. Non è necessario liquefare la parte che rimane nell'ampolla. **QUESTA SOLUZIONE SARÀ EFFICACE PER 72 ORE DOPO LA MISCELAZIONE.** Scartare la soluzione miscelata una volta trascorse 72 ore.
4. Alla provetta sterile per centrifuga da 50 ml contenente il campione da digerire, aggiungere la soluzione NAC-PAC RED/NALC come segue:
 - a. Per campioni da **1–5 ml**, aggiungere un volume di **NAC-PAC RED/NALC uguale a quello del campione.**
 - b. Per campioni da **6–7 ml**, aggiungere **5 ml di NAC-PAC RED/NALC.**
 - c. Per campioni da **8–10 ml**, aggiungere un volume uguale di **NAC-PAC RED/NALC e dopo il punto 6** ripartire il campione in parti uguali tra due provette per centrifuga, procedere con i punti 7–9 e quindi unire i sedimenti da entrambe le provette in un'unica provetta per centrifuga e procedere con il punto 10.
 - d. Il rispetto di questo protocollo contribuirà a ottenere una decontaminazione efficace, oltre a consentire un'opportuna neutralizzazione. Se si ha a che fare continuamente con campioni di volume superiore a 10 ml, contattare i Servizi tecnici Alpha Tec per istruzioni speciali.
5. Serrare i tappi sulle provette per centrifuga. Mescolare ciascun campione su un agitatore vortex fino a liquefazione (30 secondi per campione).
6. Lasciare ciascun campione a riposo per 15–20 minuti. Agitare con vortex ogni 5 minuti durante questo passaggio.
7. Riempire ciascuna provetta con NPC-67 fino a ottenere una neutralizzazione efficace, come indicato dal viraggio dal colore rosso/rosa a incolore. Una volta raggiunto il punto di viraggio (assenza di colore), non continuare ad aggiungere NPC-67 al campione. Serrare il tappo e far girare vorticosamente a mano per mescolare. **NOTA** - NPC-67 produrrà una soluzione incolore [neutralizzazione a pH alcalino], quando viene aggiunto ad un reagente decontaminante [NAC-PAC RED] con una concentrazione di NaOH del 3% o inferiore.
8. Centrifugare le provette a 3000 xg per 15 minuti. È consigliabile ma non obbligatorio utilizzare una centrifuga refrigerata. Ogni laboratorio dovrà controllare le dimensioni radiali della centrifuga e utilizzare un opportuno nomogramma per selezionare la velocità di rotazione opportuna [giri al minuto] onde ottenere il campo centrifugo relativo desiderato di 3000 xg.
9. Lavorando in una cappa di biosicurezza, versare tutto il supernatante in un contenitore a prova di spruzzo contenente un opportuno disinfettante. Utilizzare un opportuno disinfettante per disinfettare eventuali contaminazioni del bordo della provetta del campione. Evitare che il disinfettante scenda all'interno della provetta.
10. Sospendere nuovamente il pellet con 0,5 ml–1,0 ml di PRB. Non risospingere il pellet con NPC-67, acqua o soluzione salina. **NOTA** - Per massimizzare il tempo di rilevamento per i sistemi di rilevazione automatica a crescita rapida, risospingere il pellet con 1,0 ml di PRB. A seconda delle esigenze del laboratorio, il pellet

può essere risospeso con 0,5 ml di PRB per creare un campione più concentrato per una maggiore sensibilità degli strisci di colorazione acido-resistente. Una volta effettuati gli strisci, aggiungere un ulteriore 1,0 ml di PRB per inoculare sistemi di rilevamento rapidi in brodo e altri media.

11. Mescolare bene il sedimento e il tampone, inoculare il brodo liquido per la tua apparecchiatura di rilevamento automatico secondo le istruzioni del produttore.
12. Mettere due gocce del sedimento sulla superficie di ciascuno dei media TB utilizzati. **NOTA** - A questo punto è possibile inoculare una piastra di controllo di contaminazione (BAP o TSA) e incubarla a 35–37°C per 48 ore.
13. Fare strisci per colorazione acido-resistente. Utilizzare vetrini CELL-BOND adesivi o soluzioni adesive di albumina sterili per far aderire il campione al vetrino. Asciugare gli strisci e procedere con la colorazione seguendo le istruzioni del produttore. **NOTA** - Un vetrino di controllo di colorazione acido-resistente deve essere processato con gli strisci dei pazienti per verificare la tecnica e i componenti di colorazione. Contattare Alpha-Tec Technical Services per un elenco completo delle colorazioni acidoresistenti e vetrini di controllo.
14. Aggiungere il resto del PRB alla porzione inutilizzata del campione e refrigerare a 2–8°C per averne a disposizione per procedure diagnostiche future o ritrattamento se necessario.

NOTE PROCEDURALI

1. NPC-67 è stato validato per l'uso con più metodi e sistemi di diagnostica molecolare. Per ulteriori informazioni sulla compatibilità con i metodi o sistemi specifici, contattare Alpha-Tec Technical Services.
2. Campioni di volume esiguo con volumi corrispondentemente bassi di post-neutralizzazione possono rendere difficoltoso il bilanciamento della centrifuga. Se nel laboratorio capita spesso di avere a che fare con campioni di volume esiguo, è accettabile aggiungere una soluzione salina sterile al campione per ottenere un volume complessivo di 5 ml prima dell'aggiunta della soluzione NAC-PAC RED/NALC. In questo caso il campione dovrà essere decontaminato con 5 ml di soluzione NAC-PAC RED/NALC. In tal modo si farà aumentare il volume finale del campione dopo la neutralizzazione e sarà più facile ottenere il bilanciamento nella centrifuga.
3. Per i campioni contaminati da *Pseudomonas* spp. sarà necessario un ulteriore trattamento con il OxA® Oxalic Acid Reagent Kit (#0004805). Consultare le istruzioni per l'uso dell'acido ossalico per istruzioni complete o telefonare a Alpha-Tec Technical Services per informazioni sugli effetti sul pH della procedura all'acido ossalico e gli opportuni requisiti di tamponamento.
4. In seguito alla decontaminazione del campione con NAC-PAC RED, i campioni ematici possono rimanere rosa dopo l'aggiunta del NPC-67 a causa dell'emoglobina residua nel campione. Se il viraggio di colore non può essere visualizzato a causa dell'emoglobina, aggiungere il NPC-67 fino alla tacca dei 50 ml per garantire la completa neutralizzazione. Per ulteriori informazioni, contattare Alpha-Tec Technical Services.

RISULTATI ATTESI

Se nel campione clinico sono presenti *Mycobacterium* spp. e il trattamento avviene secondo le procedure elencate in questo documento, è possibile attendersi il recupero di bacilli *Mycobacterium* spp. coltivabili, vitali e clinicamente significativi.

LIMITAZIONI DELLE PROCEDURE

La tempistica della fase di decontaminazione, il tamponamento, la velocità e la tempistica corretta della fase di centrifugazione, la decantazione e l'aggiunta corretta del PRB al pellet sono essenziali per il recupero dei bacilli di *Mycobacterium* spp. L'inottemperanza delle procedure citate può dar luogo alla diminuzione del numero o alla perdita totale di *Mycobacterium* spp., che a sua volta si traduce nell'imprecisione del rapporto sulle colture.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DI PRESTAZIONE

NPC-67 è stato testato su campioni clinici e ha permesso di recuperare tutti i *Mycobacterium* spp. relativi alla coltura quando sono state seguite le procedure specificate.

BIBLIOGRAFIA

1. Babakhani, F., Warren N., Henderson D., and Dalton H. Effect of Transportation and Acid Neutralization on Recovery of Mycobacteria from Processed Specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 1995. 104(1):65–68.
2. Chapman J.S., Bernard, J.S. The Tolerance of Unclassified Mycobacteria. Limits of pH Tolerance. *Am. Rev Respir Dis.* 1962. 86:582–583.
3. Kent, P., Kubica, G.P., *Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory.* Centers for the Disease Control and Prevention, Atlanta. 1985.
4. Kubica, G.P., et al. Sputum Digestion and Decontamination with N-acetyl-L-cysteine-Sodium Hydroxide for Culture of Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 1963. 87:775–779.
5. Kubica, G.P., et al. Comments on the Use of the New Mucolytic Agent, N-acetyl-L-cysteine, as a Sputum Digestant for the Isolation of Mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* 1964. 89:284–286.
6. Lennette, E.H., et al., *Manual of Clinical Microbiology.* American Society for Microbiology Third Edition. 1980.
7. Vestal, A.L., *Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria.* C.D.C., Atlanta, GA. 1975.
8. Yegian, D., Budd V. Toxic Effect of Sodium Hydroxide on Tubercle Bacilli. *Am. J. Clinical Pathology.* 1952. 22:456–460.

CONTATTO

Per problemi di assistenza tecnica o per contattare il Servizio clienti, inviare una e-mail a Sales@AlphaTecSystems.com o telefonare al numero [+1] 360.260.2779 tra le 8 e le 16 (orario del Pacifico), dal lunedì al venerdì.

GARANZIA

CalibreScientific US, Inc. garantisce che le prestazioni di questo prodotto saranno conformi alle descrizioni contenute nelle etichette e nelle pubblicazioni fornite. CalibreScientific US, Inc. esclude qualsiasi garanzia implicita di commerciabilità o idoneità per qualsiasi altra finalità e in nessun caso risponderà di qualsivoglia danno consequenziale derivante dalla suddetta garanzia esplicita.

Gebrauchsanweisung für:
NPC-67® Neutralisierungspuffer

VERWENDUNGSZWECK

Der Neutralisierungspuffer NPC-67 dient der Neutralisierung von Reagenzien mit einem basischen pH-Wert, die beim Aufschluss- und Dekontaminierungsverfahren von N-Acetyl-L-Cystein (NALC) verwendet werden, um eine verbesserte Wiederbelebung des *Mycobacterium* spp. vom Auswurf und anderen klinischen Proben zu ermöglichen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Dekontaminierungs- und Aufschlussverfahren ergeben, mithilfe der Verbindung N-Acetyl-L-Cystein (NALC) in Kombination mit Natriumhydroxid und Natriumcitrat (Trinatriumcitrat), eine erhöhte Menge an Tuberkelbacilli. Das NALC-Verfahren nutzt N-Acetyl-L-Cystein als mukolytische Verbindung, bei der die chemischen Verbindungen des Schleims gelöst werden. Das Natriumhydroxid fungiert dabei bakteriell dekontaminierend, und das Natriumcitrat (Trinatriumcitrat) stabilisiert das NALC, indem es in der Probe vorhandene Schwermetallionen chelatiert (bindet). Da Natriumhydroxid einen pH-Wert von annähernd 13,00 aufweist, werden dadurch Bakterien abgetötet (einschließlich Mykobakterien, nach einer Einwirkung von 15–20 Minuten). Daher ist eine gute zeitliche Koordinierung der Dekontaminierung wichtig für die Begrenzung der durch den basischen pH-Wert abgetöteten Menge an *Mycobacterium* spp. Zur Überwachung des pH-Werts während des Dekontaminierungs- und Pufferverfahrens ist im Dekontaminationsreagenz ein pH-Indikator integriert, damit der Laborant durch Sichtprüfung erkennen kann, wann eine Neutralisierung erreicht ist. Durch Verschiebung des pH-Werts in einen neutralen Bereich kann der Dekontaminationsprozess gestoppt werden. Der NPC-67 wird zur Neutralisierung des NaOH im Anschluss an einer entsprechenden Aufschluss- und Dekontaminierungszeit verwendet, wodurch ein pH-Wert von unter 8,10 erreicht wird. Durch Zugabe eines konventionellen M/15-Phosphatpuffers oder eines phosphatgepufferten Salzes wird ein pH-Wert zwischen 9,40 und 12,20 erreicht, wodurch eine Titration auf einen neutralen pH-Wert mit 1n HCL erforderlich wird, da sonst eine fortgesetzte Dekontaminierung von *Mycobacterium* spp. auftreten wird. Studien haben gezeigt, dass pH-Werte über 8,10 für *Mycobacterium* spp., einschließlich *Mycobacterium tuberculosis*, toxisch sind. Nach dem Umfüllen wird der Pelletresuspensionspuffer PRB™ hinzugefügt, um einen exakt neutralen pH-Wert (6,80 bis 7,10) im Sediment der Probe zu erhalten, wodurch die Wiederbelebung der Mycobacteria optimiert wird.

NUR ZUR VERWENDUNG FÜR IN-VITRO-DIAGNOSEN

VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle klinischen Proben zur Diagnose von Tuberkulose und anderen *Mycobacterium* spp. sind mit angemessener Vorsicht zu behandeln, um eine Kontamination anderer Proben oder des Laborpersonals zu verhindern. Verwenden Sie für die Weiterverarbeitung und Kennzeichnungsverfahren nur dafür genehmigte Gerätschaften.

STABILITÄT UND AUFBEWAHRUNG

Der NPC-67 ist bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil, wenn er bei der erforderlichen Temperatur aufbewahrt wird. Vor dem Öffnen kann der NPC-67 bei Raumtemperatur (15–30°C) aufbewahrt werden. Nach dem Öffnen bewahren Sie ihn bei 2 bis 8°C auf. Vor Verwendung ist er an die Raumtemperatur anzupassen.

QUALITÄTSKONTROLLE DURCH DEN ANWENDER

Bei einer Eintrübung, Trübheit, Ausfällung oder Verfärbung ist das Produkt zu entsorgen. Nur qualitätsüberwachte Mikroorganismen verwenden, um die Eignung von Verfahren, Medien und Reagenzien für Ihr Labor gemäß den geltenden Vorschriften oder lokalen Richtlinien zu verifizieren.

ENTNAHME UND PRÄPARATION VON PROBEN

Die passenden Proben zur Erkennung von *Mycobacterium* spp. sind gemäß den vorgeschriebenen Standards zu entnehmen sowie sicher und zeitnah an das Labor zu liefern. Lesen Sie dazu die lokalen Verfahrensrichtlinien.

ARBEITSABLAUF

Bereitgestellte Materialien: Neutralisierungspuffer NPC-67.

Nicht bereitgestellte Materialien: Zentrifuge, Vortex-Mischer, sterile Pipetten, Mikroskop-Objektträger, TB-Medien, Zentrifugengläser, NAC-PAC® oder NAC-PAC RED, Pelletresuspensionspuffer PRB, und CELL-BOND® Objektträger.

VERARBEITUNG DER PROBEN

1. Proben in einer Reihe (in Zentrifugengläsern) in einem Digestorium für Biosicherheit platzieren.
2. Kappen der Probenbehälter lösen. In Sätzen arbeiten, die einer Zentrifugenladung entsprechen.
3. Öffnen sie die Flasche mit NAC-PAC RED. Geben sie das NALC Pulver in die NAC-PAC RED Flasche. Schütteln sie diese bis das NALC Pulver aufgelöst ist. **HINWEIS:** Es kann vorkommen, das Rückstände des NALC Pulvers in der Ampulle verbleiben. Es ist nicht notwendig den Anteil in der Ampulle zu verflüssigen. **DIESE LÖSUNG IST VERWENDBAR INNERHALB VON 72 STUNDEN NACH DEM VERMISCHEN.** Entsorgen sie die gemischte Lösung nach Ablauf von 72 Stunden.
4. Geben sie in das sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen, welches die Proben zur Verarbeitung enthält, NAC-PAC RED/NALC Lösung wie folgt hinzu:
 - a. Für Proben von **1–5 ml geben sie die gleiche Menge des NAC-PAC RED/NALC hinzu.**
 - b. Für Proben von **6–7 ml geben sie 5 ml des NAC-PAC RED/NALC hinzu.**
 - c. Bei Proben von **8–10 ml geben sie die gleiche Menge des NAC-PAC RED/NALC hinzu und teilen sie die Proben nach Schritt 6** zu gleichen Teilen in 2 Zentrifugenröhrchen, fahren sei mit Schritt 7–9 fort und vermengen sie die Sedimente von beiden Röhrchen anschließend in ein Zentrifugenröhrchen und machen sie mit Schritt 10 weiter.
 - d. Wenn sie den Anweisungen folgen, erreichen sie die bestmögliche Dekontaminierung als auch die gewünschte Neutralisation. Bitte kontaktieren sie Alpha-Tec Technical Services, sofern sie regelmäßig Probenvolumen von mehr als 10 ml verarbeiten.
5. Drehen Sie die Kappen der Zentrifugengläser fest. Durchmischen Sie jede Probe auf einem Vortex-Schüttelgerät, bis sich diese verflüssigt haben (30 Sekunden pro Probe).
6. Lassen Sie jede Probe 15–20 Minuten lang ruhen. Während dieses Schrittes alle 5 Minuten durchmischen.
7. Befüllen Sie jedes Glas mit dem NPC-67, bis ein Farbwechsel von rot/rosa nach farblos eine wirksame Neutralisierung anzeigt. Sobald eine Farblosigkeit erreicht ist, stoppen Sie mit der Hinzugabe des Neutralisierungspuffers NPC-67 zur Probe. Schrauben Sie die Kappe fest, und durchmischen Sie durch Rühren per Hand. **BEACHTEN SIE:** Der NPC-67 wird bei Hinzugabe zu einem Dekontaminationsreagenz [NAC-PAC RED] mit einer NaOH-Konzentration von 3 % oder niedriger zu einer farblosen Lösung [Neutralisierung durch basischen pH-Wert].
8. Zentrifugieren Sie die Probengläser 15 Minuten lang bei 3000 xg. Obwohl dies nicht Bedingung ist, empfiehlt sich die Verwendung einer gekühlten Zentrifuge. Jedes Labor muss den Kopfradius der Zentrifuge prüfen und zur entsprechenden Umdrehungsauswahl [U/min] ein entsprechendes Nomogramm verwenden, um die relative Zentrifugalbeschleunigung von 3000 xg zu erreichen.
9. Während Sie in einem Digestorium für Biosicherheit arbeiten, schütten Sie alle Überstände in einen spritzwassergeschützten Behälter, in dem sich ein geeignetes Desinfektionsmittel befindet. Verwenden Sie zum Desinfizieren aller Kontaminationen an der Lippe des Probenröhrchens ein geeignetes Desinfektionsmittel.

Vermeiden Sie ein Herunterlaufen des Desinfektionsmittels an der Innenseite des Probenröhrchens.

10. Resuspensieren sie das Pellet mit 0,5–1,0ml vom PRB. Resuspensieren sie das Pellet nicht mit NPC-67, Wasser oder Salzlösung. **HINWEIS:** Resuspensieren sie das Pellet mit 1,0 ml vom PRB, um die Zeit für den Nachweis bei Flüssigmedien zu reduzieren. Je nach den Anforderungen Ihres Labor kann das Pellet mit 0,5 ml PRB suspendiert werden, um eine konzentriertere Probe zu erhalten und damit die Sensitivität bei der Färbung der säurefesten Stäbchen zu erhöhen. Sobald sie den Abstrich gemacht haben, geben sie 1,0 ml des PRB dazu und beimpfen sie damit Flüssigmedien und andere Medien.
11. Vermischen sie das Sediment und den Puffer und beimpfen sie die Flüssigmedien für ihr automatisches Erkennungssystem laut Herstellerangaben.
12. Geben sie je zwei Tropfen des Sediments auf alle verwendeten TB-Medium. **HINWEIS:** Eine Platte zur Kontaminationskontrolle [BAP oder TSA] kann jetzt ebenfalls beimpft und für 48 Stunden bei 35–37°C inkubiert werden.
13. Ausstriche für säurefeste Stäbchen. Wir empfehlen CELL-BOND Objektträger oder sterile Albuminlösungen um die Proben auf dem Objektträger zu fixieren. Trocknen sie die Ausstriche und färben sie die säurefesten Stäbchen nach Anleitung. **HINWEIS:** Ein Objektträger für die Kontrolle mit säurefesten Stäbchen sollte in Verbindung mit der Patienten Probe gefärbt werden, um die Färbung und die Reagenzien zu kontrollieren. Bei Bedarf erhalten sie bei uns auch die entsprechenden Färbereagenzien und Kontrollobjektträger.
14. Geben sie dem übriggebliebenen Probenmaterial den restlichen PRB hinzu und lagern sie dieses bei 2–8° für evtl. notwendige Nachkontrollen.

BESONDERE VERFAHREN

1. NPC-67 ist für die gängigsten molekularen Diagnosesysteme und Methoden geeignet. Für mehr Informationen bezüglich der Kompatibilität mit speziellen Methoden oder Systemen setzen sie sich bitte mit dem technischen Service von Alpha-Tec in Verbindung.
2. Kleine Probenmengen mit entsprechend geringem Volumen vor der Neutralisation können das Ausbalancieren in der Zentrifuge erschweren. Sollte ihr Labor regelmäßig kleine Probenmengen haben, so ist es möglich sterile Kochsalzlösung in die Proben zu geben, um ein gesamt Volumen von 5 ml vor der Zugabe der NAC-PAC RED/NALC Lösung zu erreichen. In einem solchen Fall sollte die Probe mit 5 ml NAC-PAC RED/NALC Lösung dekontaminiert werden. Dies wird das Probenvolumen vor der Neutralisation erhöhen und dadurch die Gewichtsverteilung und die Balance in der Zentrifuge vereinfachen.
3. Proben die mit *Pseudomonas* spp. kontaminiert sind benötigen zusätzlich noch der OxA® Oxalic Acid Reagent Kit (#0004805). Verwenden sie diese nach Gebrauchsanweisung der Oxalsäure oder kontaktieren sie den technischen Service, um Informationen über den pH Effekt durch die Oxalssäure Anwendung und den entsprechenden Bedarf an Puffer zu erhalten.
4. Nach der Dekontamination der Proben mittels des NAC-PAC RED kann es vorkommen, dass blutige Proben auch nach der Zugabe des NPC-67 oder XPR-PLUS pink bleiben, dies wird durch das noch vorhandene Hämoglobin in den Proben verursacht. Sollte ein Farbwechsel durch das verbliebende Hämoglobin nicht möglich sein, fügen sie den NPC-67 bis zur 50 ml Marke hinzu, damit eine Neutralisation gewährleistet ist. Für weiterführende Informationen kontaktieren sie bitte den technischen Service von Alpha-Tec.

ERWARTETE ERGEBNISSE

Wenn in der klinischen Probe *Mycobacterium* spp. vorhanden sind und diese gemäß den in diesem Dokument aufgeführten Verfahren verarbeitet worden sind, kann eine Wiederbelebung der kultivierbaren, lebensfähigen und klinisch signifikanten *Mycobacterium* spp. erwartet werden.

GRENZEN DER VERFAHREN

Eine gute zeitliche Koordinierung der Dekontaminierung, die richtige Pufferung, das genaue Timing der Zentrifugierungsschritte, ein ordnungsgemäßes Umfüllen und Zugeben des PRB zum Pellet sind für die Wiederbelebung von *Mycobacterium* spp. von zentraler Bedeutung. Eine Nichtbeachtung der aufgeführten Verfahrensschritte kann zu einer verringerten Anzahl oder einem Totalverlust der *Mycobacterium* spp. führen, was wiederum einen ungenauen Kulturenbericht nach sich zieht.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Der NPC-67 wurden an klinischen Proben, dem Protokoll entsprechend, getestet und wies alle kulturrelevanten *Mycobacterium* spp. nach.

LITERATUR

1. Babakhani, F., Warren N., Henderson D., and Dalton H. Effect of Transportation and Acid Neutralization on Recovery of Mycobacteria from Processed Specimens. Am. J. Clin. Pathol. 1995. 104(1):65–68.
2. Chapman J.S., Bernard, J.S. The Tolerance of Unclassified Mycobacteria. Limits of pH Tolerance. Am. Rev Respir Dis. 1962. 86:582–583.
3. Kent, P., Kubica, G.P., Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Centers for the Disease Control and Prevention, Atlanta. 1985.
4. Kubica, G.P., et al. Sputum Digestion and Decontamination with N-acetyl-L-cysteine-Sodium Hydroxide for Culture of Mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1963. 87:775–779.
5. Kubica, G.P., et al. Comments on the Use of the New Mucolytic Agent, N-acetyl-L-cysteine, as a Sputum Digestant for the Isolation of Mycobacteria. Am Rev Respir Dis. 1964. 89:284–286.
6. Lennette, E.H., et al., Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology Third Edition. 1980.
7. Vestal, A.L., Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria. C.D.C., Atlanta, GA. 1975.
8. Yegian, D., Budd V. Toxic Effect of Sodium Hydroxide on Tubercle Bacilli. Am. J. Clinical Pathology. 1952. 22:456–460.

KONTAKT

Für technische Unterstützung wenden Sie sich per E-Mail an Technical@AlphaTecSystems.com, den Kunden dienst erreichen Sie per E-Mail unter Sales@AlphaTecSystems.com oder telefonisch unter [+1] 360.260.2779 zwischen 8.00 Uhr und 16.00 Uhr von Montag bis Freitag, Nordamerikanische Westküstenzeit (Pacific Time).

GEWÄHRLEISTUNG

CalibreScientific US, Inc. gewährleistet die Funktionsfähigkeit dieses Produkts gemäß der Produktkennzeichnung und der Begleiddokumente. CalibreScientific US, Inc. schließt eine Haftung für Gewährleistungsansprüche und die allgemeine Gebrauchstauglichkeit oder Eignung für einen anderen Zweck aus und haftet unter keinen Umständen für Folgeschäden, die sich aus oben genannter ausdrücklicher Gewährleistung ergeben.

PRODUCT CODES

0003939 NPC-67 Neutralizing Buffer, 50 x 40 ml
0003940 NPC-67 Neutralizing Buffer, 50 x 50 ml
0003941 NPC-67 Neutralizing Buffer, 8 x 250 ml
0003942 NPC-67 Neutralizing Buffer, 10 x 500 ml



Manufactured by CalibreScientific US, Inc.
1311 SE Cardinal Court, Suite 170
Vancouver, WA 98683 USA



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany



GLOSSARY OF SYMBOLS



Batch code / Numéro de lot / Número de Lote / Numero di lotto / Lot Nummer / Lotnummer / Lotnummer / Šaržna številka / Número de lote



Catalog number / Référence du catalogue / Número de catálogo / Numero di catalogo / Katalognummer / Catalog number / Het aantal van de catalogus / Kataloška številka / Número de catálogo



In vitro diagnostic medical device / Pour usage diagnostique in vitro / Para uso diagnóstico in vitro solamente / Solo per uso diagnostico in vitro / Nur zur Verwendung als in vitro-Diagnostikum / Alleen voor in vitro diagnostisch gebruik / För invitrodiagnostik enbart / Samo za invitro diagnostiko / Apenas para uso em diagnóstico in vitro



Authorized representative in the European Community / Représentant européen autorisé / Representante Europeo Autorizado / Rappresentante europeo autorizzato / Autorisierter Europäischer Repräsentant / Germachtigde Europese vertegenwoordiger / Auktoriserad europeisk representant / Pooblaščen evropski predstavnik / Representante Europeo Autorizado



Use-by date / Utiliser avant la date de péremption indiquée / Use antes de la fecha indicada / Utilizzare entro la data indicata / Bis zum angegebenen datum verbrauchen / Gebruik door vermelde datum / Använd innan angivet datum / Porabiti do navedenega datuma / Usar até à data indicada



Manufacturer / Fabricant / Fabricante / Produttore / Hersteller / Fabrikant / Fabrikant / Proizvajalec / Fabricante



Caution / Attention / Cuidado / Attenzione / Achtung / Voorzichtig / Iakttag försiktighet / Previdno / Atenção



Temperature limit / Conserver aux températures indiquées / Almacene entre las temperaturas indicadas / Conservare a temperatura comprese fra quelle indicate / Im angegebenen temperaturbereich aufbewahren / Opslaan bij een temperatuur tussen / Förvara mellan angivna temperaturer / Shranjevati med navedenimi temperaturami / Armazene entre as temperaturas indicadas



Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour <n> tests / Contiene suficiente para <n> pruebas / Contenido suficiente per <n> tests / Enthält ausreichend für <n> untersuchungen / Inhoud voldoende voor <n> testen / Innehåller tillräckligt för <n> tester / Vsebina zadostuje za <n> testov / Contém quantidade suficiente para <n> testes



Consult instructions for use / Consulter la notice d'utilisation / Consulte las instrucciones para el uso / Consultare le istruzioni per l'uso / Bitte beachten Sie die Anwendungsvorschriften / Raadpleeg instructies voor gebruik / Konsultera bruksanvisningen innan användning / Glej navodila za uporabo / Consulte instruções para o uso



Do not reuse / Ne pas réutiliser / No reutilizar / Non riutilizzare / Nicht wiederverwenden / Niet hergebruiken / Återanvänd inte / Ne uporabljajte znova / Não reutilize