

TABLE OF CONTENTS

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

INTENDED USE

NAC-PAC® EA3 contains the necessary reagents—NAC-PAC RED, NALC tablets or powder, NPC-67® Neutralizing Buffer, and PRB™ Pellet Resuspension Buffer—for use in the qualitative digestion and decontamination procedure of clinical specimens for the recovery of *Mycobacterium* spp.

SUMMARY

The decontamination and digestion procedure, utilizing the compound N-acetyl-L-cysteine (NALC) combined with sodium hydroxide and sodium citrate solution, 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 decontaminant and the sodium citrate stabilizes the NALC by chelating (binding) any heavy metal ions. Since the sodium hydroxide has a pH of approximately 13.00, it will kill bacteria (including mycobacteria after 15–20 minutes of exposure). Therefore, 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 NAC-PAC RED decontamination reagent to monitor the pH throughout the decontamination and buffering procedure. Bringing the pH to a neutral range stops the decontamination process. The NPC-67 is used to neutralize the NAC-PAC RED following the appropriate digestion and decontamination time, resulting in a pH below 8.10. Studies have documented that pH values above 8.10 are toxic to *Mycobacterium* spp., including *Mycobacterium tuberculosis*. Following the decanting step, PRB 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

NAC-PAC RED contains a caustic chemical (sodium hydroxide). Use appropriate care in the handling of this reagent. All clinical specimens submitted for the diagnosis of tuberculosis and other *Mycobacterium* spp. must be treated with appropriate care to avoid contaminating other specimens or laboratory personnel. Use approved and regulated equipment for processing and detection procedures.

STABILITY AND STORAGE

Reagents in the NAC-PAC EA3 are stable to the stated expiration date when stored at the required temperature. Store at room temperature (15–30°C).

QUALITY CONTROL

Any reagent 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: NAC-PAC RED, NALC tablets or powder, NPC-67 Neutralizing Buffer, PRB Pellet Resuspension Buffer.

Materials Not Provided: Centrifuge and 50 ml centrifuge tubes, vortex mixer, sterile pipettes, microscope slides, TB growth media, CELL-BOND® Slides.

SPECIMEN PROCESSING

1. Prior to opening the specimen tube(s), line up specimens (collected in centrifuge tubes) in a rack inside an appropriate biosafety hood.
2. Working in sets equivalent to your centrifuge capacity, loosen specimen container caps. To prevent the possibility of cross-contamination, work with one specimen at a time.
3. Open the bottle labeled "NALC" and place one tablet in each centrifuge tube containing a specimen. Or, add the NALC powder to the bottle labeled "NAC-PAC RED," tightly cap the bottle, and shake well or vortex to dissolve the NALC. **Once dissolved, the NAC-PAC RED/NALC solution will be stable for 72 hours. Store any unused portion at 2–8°C for up to 72 hours. Allow the refrigerated portion to come to room temperature prior to use.**
4. To the specimen tube containing the NALC tablet, add NAC-PAC RED (or the NAC-PAC RED/NALC solution) as follows:
 - a. For specimens **1–5 ml add a volume of NAC-PAC RED equal to that of the specimen volume.**
 - b. For specimens **6–7 ml add 5 ml of NAC-PAC RED.**
 - c. For specimens **8–10 ml add an equal volume of NAC-PAC RED 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.
5. Tighten the caps on the centrifuge tubes. Mix each specimen on a vortex until liquefied and the NALC tablet has dissolved (30 seconds per specimen).
6. Allow each specimen to stand for 15–20 minutes. Vortex every five minutes during this step.
7. 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:** Use each bottle of NPC-67 on a single specimen only. Using one bottle for multiple specimens can lead to cross-contamination and potentially erroneous results.
8. 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.
9. 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.
10. Resuspend the pellet with 0.5–1.0 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.
11. Mix the sediment and buffer well and inoculate the liquid broth for your automated detection equipment per the manufacturer's instructions.
12. 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.
13. 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 appropriate 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 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 further diagnostic procedures or reprocessing, if necessary.

PROCEDURE NOTES

1. Alpha-Tec NAC-PAC EA3 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: 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 the NALC tablet. In this case, the sample should be decontaminated with 5 ml of NAC-PAC RED 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 5% Oxalic Acid (OxA® Kit #0004805). Refer to the OxA Kit Directions For Use for complete instructions, or call Alpha-Tec Technical Services or the Alpha-Tec Sales Department for information on the pH effects of the oxalic acid procedure and the appropriate buffering requirements.
4. Bloody Specimens: 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 the 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

The products within NAC-PAC EA3 were tested on clinical samples and recovered all culture-appropriate *Mycobacterium* spp. when the designated procedures were followed.

BIBLIOGRAPHY

1. Kent, P, Kubica, GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1985.
2. Kubica, GP, 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.
3. Kubica, GP, 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.
4. Lennette, EH, et al. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 3rd ed. 1980.
5. Murray, P, Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 1985.
6. Mycobacterium Tuberculosis: Assessing Your Laboratory. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). March, 1995.
7. Vestal, AL. Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria. CDC. Atlanta, GA. 1975.
8. Yegian, D, Budd V. Toxic effect of sodium hydroxide on tubercle bacilli. Am J Clin Pathol 1952. 22:456–460.

CONTACT

For Technical Assistance email Technical@AlphaTecSystems.com and 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

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

TRADEMARKS

CELL-BOND®, NAC-PAC®, NPC-67®, OxA®, and PRB™ are trademarks of Alpha-Tec Systems, Inc., 1311 SE Cardinal Court, Suite 170, Vancouver, WA 98683 USA.

Notice d'utilisation du kit :
NAC-PAC® EA3

DOMAINE D'UTILISATION

NAC-PAC EA3 contient les réactifs nécessaires [NAC-PAC RED, NALC en poudre ou en comprimés, tampon de neutralisation NPC-67® et tampon de reprise du culot PRB™] utilisés pour la procédure de fluidification et de décontamination d'échantillons cliniques en vue du recouvrement de mycobactéries.

RÉSUMÉ

La procédure de fluidification et de décontamination à base de N-acétyl-L-cystéine (NALC) en association avec la soude 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. La soude a une action décontaminante antibactérienne, et le citrate trisodique stabilise la NALC par chélation des ions de métaux lourds présents dans l'échantillon. La soude détruit les bactéries (et dans une moindre mesure les mycobactéries après 15 à 20 minutes d'exposition) grâce à son pH alcalin d'environ 13. 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 fluidification et de décontamination NAC-PAC RED, ce qui permet de surveiller le pH tout au long des étapes de décontamination et de neutralisation. Le processus de décontamination est interrompu en ramenant le pH à des valeurs proches du neutre. NPC-67™ est utilisé pour neutraliser le NAC-PAC RED après un temps de fluidification et de décontamination approprié, et permet d'obtenir un pH inférieur à 8,10. Des études ont démontré que des valeurs de pH supérieures à 8,10 sont toxiques pour les mycobactéries, notamment pour *Mycobacterium tuberculosis*. Après l'étape de centrifugation, un PRB est ajouté pour obtenir une valeur de pH neutre (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

NAC-PAC RED contient un produit caustique (hydroxyde de sodium). Manipuler ce réactif avec les précautions d'usage. Tous les échantillons cliniques soumis au diagnostic de la tuberculose et d'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

Lorsqu'ils sont conservés à la température requise, tous les réactifs de la trousse NAC-PAC EA3 sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée. Conserver à température ambiante (entre 15 et 30°C).

CONTRÔLE QUALITÉ

Tout réactif présentant un aspect grumeleux, un trouble, une précipitation ou une altération de la coloration doit être éliminé. Des microorganismes contrôlés 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 & PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

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

PROCÉDURE

Matériel fourni : NAC-PAC RED, NALC en poudre ou en comprimés, tampon de neutralisation NPC-67, tampon de reprise du culot PRB.

Matériel non fourni : Centrifugeuse et tubes à centrifuger de 50 ml, vortex, micropipettes stériles, lames de microscope, milieux de culture pour mycobactéries, lames CELL-BOND®.

TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

1. Avant ouverture, disposer les échantillons (dans des tubes à centrifuger) dans un portoir à l'intérieur d'une enceinte de biosécurité.
2. Travailler par séries équivalentes à la charge de la centrifugeuse, dévisser les bouchons des tubes d'échantillons. Pour prévenir tout risque de contamination croisée, effectuer la procédure pour un tube d'échantillon à la fois.
3. Ouvrir un flacon étiqueté "NALC" et ajouter un comprimé à chaque tube à centrifuger contenant un échantillon. Ou, ajouter la poudre de NALC dans le flacon étiqueté "NAC-PAC RED," reboucher le flacon et agiter ou vortexer pour dissoudre le NALC. **Une fois dissoute, la solution NAC-PAC RED/NALC demeure stable pendant 72 heures. Conserver toute portion inutilisée à 2-8°C pendant un maximum de 72 heures. Équilibrer à température ambiante avant utilisation.**
4. Dans le tube d'échantillon contenant le comprimé de NALC, ajouter NAC-PAC RED (ou la solution NAC-PAC RED/NALC) dans les proportions suivantes :
 - a. échantillons de 1 à 5 ml : **ajouter un volume de NAC-PAC RED égal à celui de l'échantillon ;**
 - b. échantillons de 6 à 7 ml : **ajouter 5 ml de NAC-PAC RED ;**
 - c. échantillons de 8 à 10 ml : **ajouter un volume équivalent de NAC-PAC RED et répartir l'échantillon après l'étape 6 de manière égale en deux tubes ;** 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 tout en garantissant une neutralisation correcte.
5. Reboucher les tubes à centrifuger. Vortexer chaque échantillon jusqu'à liquéfaction puis dissolution du comprimé de NALC (30 secondes par échantillon).
6. Laisser reposer chaque échantillon pendant 15 à 20 minutes en vortexant toutes les 5 minutes.
7. Remplir chaque tube avec NPC-67 jusqu'à ce que la solution vire du rouge/rose à l'incolore, indiquant que la neutralisation du pH est terminée. Une fois que la solution est incolore, ne plus ajouter de NPC-67 à l'échantillon. Revisser le bouchon et secouer à la main pour mélanger. **N.B. :** Chaque flacon de NPC-67 doit être utilisé sur un seul échantillon. L'utilisation d'un flacon NPC-67 sur plusieurs échantillons peut provoquer une contamination croisée et entraîner des résultats potentiellement erronés.
8. Centrifuger les tubes d'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 et utiliser un nomogramme pour une sélection correcte de la vitesse de rotation [rpm] afin d'obtenir le champ centrifuge désiré 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 d'échantillon. Ne pas laisser le désinfectant couler à l'intérieur du tube.
10. Reprendre le culot avec 0,5 à 1,0 ml de PRB. Ne pas reprendre le culot ni 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 une 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 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. Alpha-Tec NAC-PAC EA3 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. Échantillons de faible volume : 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 du comprimé de NALC. Dans ce cas, l'échantillon doit être décontaminé avec 5 ml de solution NAC-PAC RED. 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 de l'acide oxalique à 5 % (OxA® Kit #0004805). Voir les instructions complètes sur la notice de l'OxA Kit, 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. Échantillons sanguinolents : 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 organismes de *Mycobacterium* spp. sont présents dans l'échantillon clinique et sont traités conformément aux procédures décrites dans ce document, on peut attendre l'obtention de populations de mycobactéries viables et significatives au plan clinique.

LIMITES

La durée de la décontamination, une neutralisation adéquate, la vitesse et la durée de centrifugation, la réalisation correcte de la décantation et l'ajout 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 de la culture.

CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DE PERFORMANCE

Les composants du kit NAC-PAC EA3 ont été testés sur des échantillons cliniques et ont permis dans tous les cas le recouvrement des mycobactéries lorsque les procédures ont été respectées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kent, P, Kubica, GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1985.
2. Kubica, GP, 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.
3. Kubica, GP, 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.
4. Lennette, EH, et al. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 3rd ed. 1980.
5. Murray, P, Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 1985.
6. Mycobacterium Tuberculosis: Assessing Your Laboratory. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). March, 1995.
7. Vestal, AL. Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria. CDC. Atlanta, GA. 1975.
8. Yegian, D, Budd V. Toxic effect of sodium hydroxide on tubercle bacilli. Am J Clin Pathol 1952. 22:456–460.

CONTACT

Veillez nous contacter par e-mail à Technical@AlphaTecSystems.com pour obtenir une assistance technique à Sales@AlphaTecSystems.com pour joindre le service clientèle. Vous pouvez également nous contacter au [+1] 360.260.2779, du lundi au vendredi de 8 h à 16 h, heure de la côte pacifique des États-Unis.

GARANTIE

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

MARQUES DÉPOSÉES

CELL-BOND®, NAC-PAC®, NPC-67®, OxA®, et PRB™ sont des marques déposées par Alpha-Tec Systems, Inc., 1311 SE Cardinal Court, Suite 170, Vancouver, WA 98683 USA.

Instrucciones de uso para lo siguiente:

NAC-PAC® EA3**USO PREVISTO**

NAC-PAC EA3 contiene los reactivos necesarios [NAC-PAC RED, tabletas o polvo de NALC, Buffer Neutralizante NPC-67®, y Buffer de Resuspensión de Botón PRB™] para el uso en el procedimiento cualitativo de digestión y decontaminación de muestras clínicas para la recuperación de *Mycobacterium* spp.

RESUMEN

El procedimiento de decontaminación y digestión utilizando el compuesto N-acetyl-L-cysteine (NALC) combinado con hidróxido de sodio y solución de citrato de sodio, resulta en mayor recuperación de bacilos tuberculosos. El procedimiento NALC utiliza N-acetyl-L-cysteine como compuesto mucolítico que rompe los enlaces químicos en las mucosidades. El hidróxido de sodio actúa como un decontaminante bacteriano y el citrato de sodio estabiliza el NALC quelando (uniendo) cualquier ion de metales pesados. Debido a que el hidróxido de sodio tiene un pH de aproximadamente 13.00, matará las bacterias (incluyendo las micobacterias, después de 15–20 minutos de exposición). De esta forma, llevar el tiempo de decontaminación es crítico para limitar la cantidad de *Mycobacterium* spp. destruidas por el pH básico. Se incorpora un indicador de pH en el reactivo de decontaminación NAC-PAC RED para monitorear el pH a través del procedimiento de decontaminación y de buffer. El llevar el pH a un rango neutral detiene el proceso de decontaminación. NPC-67 se usa para neutralizar el NAC-PAC RED luego de un apropiado tiempo de digestión y decontaminación, dando como resultado un pH menor de 8.10. Estudios han documentado que valores de pH arriba de 8.10 son tóxicos para *Mycobacterium* spp., incluyendo el *Mycobacterium tuberculosis*. Después de la etapa de decantado, se agrega el PRB para alcanzar un estrecho valor de pH neutro (6.80–7.10) en el sedimento de la muestra, optimizando la recuperación de micobacterias.

SOLO PARA USO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO**PRECAUCIONES**

NAC-PAC RED contiene un químico cáustico (hidróxido de sodio). Utilice las precauciones debidas al manejar este reactivo. Todas las muestras clínicas entregadas para el diagnóstico de la tuberculosis y otras *Mycobacterium* spp. se deben manejar con cuidado para evitar contaminar otras muestras y al personal de laboratorio. Utilice equipo aprobado y regulado para los procedimientos de procesamiento y detección.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos del NAC-PAC EA3 son estables hasta la fecha de expiración cuando se almacenan a la temperatura requerida. Almacena a temperatura ambiente (15–30°C).

CONTROL DE CALIDAD

Cualquier reactivo que esté opaco, turbio, precipitado o decolorado, se debe descartar. Se deben utilizar organismos de control de calidad para verificar los procedimientos, medios y reactivos como sea apropiado de acuerdo a las agencias regulatorias del laboratorio o de acuerdo a las guías locales de procedimientos.

PREPARACIÓN Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras apropiadas para la detección de *Mycobacterium* spp. se deben recolectar de acuerdo a los estándares prescritos y llevados al laboratorio en una forma segura y a tiempo. Para esta información refiérase a las guías de procedimientos locales.

PROCEDIMIENTO

Materiales Provistos: NAC-PAC RED, Tabletatas o polvo de NALC, Buffer Neutralizante NPC-67, PRB Buffer de Resuspensión de Botón.

Materiales No Provistos: Centrífuga y tubos de centrífuga de 50 ml, mezclador vortex, pipetas estériles, portaobjetos, medios de TB, Portaobjetos CELL-BOND®.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

1. Antes de abrir el o los tubos de muestras, coloque en línea las muestras (recolectadas en tubos de centrífuga) en una gradilla dentro de una campana de bioseguridad.
2. Trabajando en juegos equivalentes a la capacidad de su centrífuga, afloje las tapas de los contenedores de las muestras. Para prevenir la capacidad de contaminación cruzada, trabaje con una muestra a la vez.
3. Abra la botella rotulada "NALC" y coloque una tableta en cada tubo de centrífuga que contenga una muestra. O, agregue el polvo NALC a la botella rotulada "NAC-PAC RED", tape bien la botella, y agite bien o vortex para disolver las tabletas. **Una vez disuelta, la solución NAC-PAC RED/NALC será estable por 72 horas. Guarde cualquier porción no utilizada a 2–8°C por hasta 72 hrs. Permita que la porción refrigerada se atempere antes de su uso.**
4. Al tubo de muestra que contiene la tableta NALC, agregue NAC-PAC RED (o la solución NAC-PAC RED/NALC) de esta manera:
 - a. Para muestras de **1–5 ml agregue un volumen de NAC-PAC RED igual al del volumen de muestra.**
 - b. Para muestras entre **6–7 ml agregue 5 ml de NAC-PAC RED.**
 - c. Para muestras entre **8–10 ml agregue un volumen de NAC-PAC RED igual y luego divida equitativamente la muestra en dos tubos de centrífuga después del paso 6**, proceda con los pasos 7–9 y luego combine los sedimentos de ambos tubos en un tubo de centrífuga y proceda con el paso #10. Siguiendo este protocolo ayudará a alcanzar una efectiva decontaminación mientras que se permite una neutralización adecuada.
5. Apriete las tapas de los tubos de centrífuga. Mezcle cada muestra en vortex hasta que se fluidifique y que la tableta NALC se haya disuelto (30 segundos por muestra).
6. Deje en reposo la muestra por 15–20 minutos. Vortex cada cinco minutos durante esta etapa.
7. Llene cada tubo con NPC-67 hasta que la efectiva neutralización esté indicada por un cambio de color de rojo/rosado a incoloro. Una vez se alcance un punto incoloro, no continúe agregando NPC-67 a la muestra. Apriete las tapas y mezcle girando manualmente. **NOTA:** Use cada botella de NPC-67 por cada botella únicamente. Si usa una botella para múltiples muestras puede llevar a contaminación cruzada y resultados potencialmente erróneos.
8. Centrifugue los tubos de muestra a 3000 xg por 15 minutos. Se recomienda pero no se requiere usar una centrífuga refrigerada. Cada laboratorio debe verificar el radio del cabezal de la centrífuga, y usar un nomograma apropiado para una adecuada selección de la velocidad (rpm) para alcanzar el campo de centrífuga relativa deseado de 3000 xg.
9. Trabajando en una campana de bioseguridad, decante todo el sobrenadante en un recipiente a prueba de salpicaduras y que contenga un desinfectante apropiado. Use un desinfectante apropiado para desinfectar cualquier contaminación en el borde del tubo de muestra. **NO** permita que el desinfectante se corra por el lado interno del tubo de muestra.
10. Resuspenda el botón con 0.5–1.0 ml de PRB. No resuspenda el botón con NPC-67, agua o salina. **NOTA:** Para maximizar el tiempo de detección para sistemas automatizados rápidos de detección de crecimiento, resuspenda el botón con 1.0 ml de PRB. Dependiendo de las necesidades de su laboratorio, el botón se puede resuspender con 0.5 ml de PRB para crear una muestra más concentrada con una sensibilidad aumentada de tinción alcohol ácido resistente. Una vez preparados los frotis, agregue 1.0 ml de PRB para inocular los sistemas de detección rápida en caldo y otros medios.

- Mezcle el sedimento y el buffer bien e inocule el caldo líquido para su equipo de detección automatizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- Coloque dos gotas del sedimento sobre la superficie de cada medio de TB utilizado. **NOTA:** Un plato de control de contaminación (Plato agar sangre o TSA) se puede inocular en este punto e incubar a 35–37°C por 48 horas.
- Haga los frotis para la tinción para bacilos alcohol ácido resistente (BAAR). Utilice placas CELL-BOND o soluciones estériles adhesivas de albúmina para adherir la muestra a la placa. Seque los frotis y proceda con la tinción por BAAR apropiada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. **NOTA:** Se debe teñir una placa control de la tinción por BAAR en adición a los frotis de los pacientes para verificar la técnica de tinción y sus componentes. Contacte Alpha-Tec para una lista completa de tinciones por BAAR y placas control.
- A la porción sin usar de la muestra, agregue el balance de PRB y refrigere a 2–8°C para guardar para procedimientos diagnósticos adicionales o para reprocesar si fuese necesario.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

- Alpha-Tec NAC-PAC EA3 ha sido validado para utilizarse con métodos y sistemas de diagnóstico moleculares. Para más información acerca de la compatibilidad con métodos o sistemas específicos, contacte al Servicio Técnico de Alpha-Tec.
- Muestra de poco volumen: Muestras de poco volumen con correspondientes volúmenes bajos después de la neutralización pueden hacer difícil el balance en la centrifuga. Si su laboratorio frecuentemente tiene muestras de poco volumen, es aceptable agregar salina **estéril** a la muestra para alcanzar un volumen combinado de 5 ml antes de la adición de la tableta NALC. En este caso la muestra se debe descontaminar con 5 ml de solución NAC-PAC RED. Esto aumentará el volumen final de muestra post-neutralización haciendo el balance en la centrifuga más fácil.
- Las muestras contaminadas con *Pseudomonas* spp. requerirán un tratamiento adicional con 5% Acido Oxálico (OxA® Kit #0004805). Refiérase a las Instrucciones con OxA Kit para instrucciones completas o llame al Servicio Técnico de Alpha-Tec o al Departamento de Ventas de Alpha-Tec para obtener información acerca de los efectos del procedimiento de ácido oxálico en el pH y sus requerimientos apropiados de amortiguación o buffering.
- Muestras con Sangre: Después de la descontaminación de la muestra con NAC-PAC RED, las muestras con sangre pueden permanecer rosadas después de la adición de NPC-67 debido a la hemoglobina residual en la muestra. Si el cambio de color no se puede visualizar debido a la hemoglobina, agregue NPC-67 hasta la marca de 50 ml para asegurar una neutralización completa. Para información adicional, contacte al Servicio Técnico de Alpha-Tec.

RESULTADOS ESPERADOS

Si *Mycobacterium* spp. están presentes en la muestra clínica y procesados de acuerdo a los procedimientos indicados en este documento, se puede esperar la recuperación de *Mycobacterium* spp. cultivables, viables y clínicamente significativos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Llevar el tiempo de la etapa de descontaminación, adecuado buffering, velocidad y tiempo de centrifugación, adecuado decantado y la adición de PRB al botón son vitales para la recuperación de *Mycobacterium* spp. El no seguir los procedimientos descritos puede dar como resultado un bajo número o pérdida total de *Mycobacterium* spp., llevando a un reporte de cultivo incorrecto.

CARACTERISTICAS DE DESEMPEÑO ESPECIFICAS

Los productos dentro del NAC-PAC EA3 fueron probados con muestras clínicas y se recuperaron todos los *Mycobacterium* spp. apropiados cuando se siguieron los procedimientos designados.

BIBLIOGRAFIA

- Kent, P, Kubica, GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1985.
- Kubica, GP, 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, GP, 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, EH, et al. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 3rd ed. 1980.
- Murray, P, Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 1985.
- Mycobacterium Tuberculosis: Assessing Your Laboratory. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). March, 1995.
- Vestal, AL. Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria. CDC. Atlanta, GA. 1975.
- Yegian, D, Budd V. Toxic effect of sodium hydroxide on tubercle bacilli. Am J Clin Pathol 1952. 22:456–460.

CONTACTO

Para Asistencia Técnica escriba al correo electrónico Technical@AlphaTecSystems.com y para Servicio al Cliente escriba al email Sales@AlphaTecSystems.com o llame al [+1] 360.260.2779 entre 8 am y 4 pm Lunes a Viernes, Hora del Pacífico.

GARANTIA

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

MARCAS REGISTRADAS

CELL-BOND®, NAC-PAC®, NPC-67®, OxA®, y PRB™ son marca registrada de Alpha-Tec Systems, Inc., 1311 SE Cardinal Court, Suite 170, Vancouver, WA 98683 USA.

Istruzioni per l'uso di quanto segue:
NAC-PAC® EA3

USO PREVISTO

NAC-PAC EA3 contiene i reagenti necessari [NAC-PAC RED, NALC compresse o polvere, NPC-67 buffer di neutralizzazione, e PRB™ buffer di risospensione pellet] destinati al procedimento di digestione e decontaminazione dei campioni clinici per il recupero di *Mycobacterium* spp.

SOMMARIO

La procedura di decontaminazione e digestione, utilizzando il composto N-acetil-L-cisteina (NALC) in combinazione con idrossido di sodio e soluzione di citrato di sodio, si traduce in un incremento delle rese di bacilli tubercolari. La procedura NALC utilizza N-acetil-L-cisteina come composto mucolitico rompendo legami chimici nel muco. L'idrossido di sodio agisce come un decontaminante batterico e il citrato di sodio stabilizza la NALC chelando (legando) eventuali ioni di metalli pesanti. Dal momento che l'idrossido di sodio ha un pH di circa 13,00, ucciderà i batteri (compresi i micobatteri dopo 15–20 minuti di esposizione). Pertanto, il tempo della decontaminazione è fondamentale per limitare la quantità di *Mycobacterium* spp. uccisi dal pH basico. Un indicatore di pH è incorporato nel NAC-PAC RED reagente di decontaminazione per monitorare il pH durante tutta la procedura di decontaminazione e buffering. Portando il pH a un intervallo neutro si arresta il processo di decontaminazione. Il NPC-67 viene utilizzato per neutralizzare il NAC-PAC RED seguendo i corretti tempi di digestione e decontaminazione, ottenendo un pH inferiore a 8,10. Studi hanno documentato che i valori di pH superiori a 8,10 sono tossici per *Mycobacterium* spp., Tra cui *Mycobacterium tuberculosis*. Dopo la fase di decantazione, il PRB viene aggiunto per ottenere un valore di pH neutro (6,80–7,10) al sedimento del campione, ottimizzando il recupero di micobatteri.

A SOLO USO DIAGNOSTICO IN VITRO

PRECAUZIONI

NAC-PAC RED contiene una sostanza chimica caustica (idrossido di sodio). Utilizzare l'attenzione appropriata nella gestione di questo reagente. Tutti i campioni clinici raccolti per la diagnosi di tubercolosi e altre *Mycobacterium* spp. devono essere trattati con cure appropriate per evitare di contaminare altri campioni o il personale di laboratorio. Utilizzare tutte le apparecchiature approvate e regolamentate per le procedure di trattamento e di rilevazione.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

I reagenti contenuti nel NAC-PAC EA3 sono stabili fino alla data di scadenza indicata, se conservati alla temperatura richiesta. Conservare a temperatura ambiente (15–30°C).

CONTROLLO DI QUALITÀ

Ogni reagente che mostra opacità, torbidità, precipitati o scolorimento deve essere eliminato. Microrganismi di controllo di qualità devono essere utilizzati per verificare le procedure, i media e i reagenti come più opportuno secondo le linee guida applicabili al proprio laboratorio dagli enti di regolamentazione o linee guida procedurali locali.

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Campioni appropriati per la rilevazione di *Mycobacterium* spp. devono essere raccolti secondo le norme prescritte e consegnati al laboratorio in modo sicuro e tempestivo. Fare riferimento alle linee guida procedurali locali per queste informazioni.

PROCEDURA

Materiale fornito: NAC-PAC RED, NALC compresse o polvere, NPC-67 buffer di neutralizzazione, e PRB buffer di risospensione pellet.

Materiale non fornito: Centrifuga e provette da centrifuga da 50 ml, vortex, pipette sterili, vetrini da microscopio, terreni di coltura TB, vetrini CELL-BOND®.

TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

1. Prima di aprire la provetta del campione (i), allineare i campioni (raccolti in provette da centrifuga) in un rack all'interno di una cappa di biosicurezza adeguata.
2. Lavorare in serie equivalenti alle capacità della vostra centrifuga, allentare i tappi dei contenitori dei campioni. Per evitare la possibilità di contaminazione incrociata, lavorare con un campione alla volta.
3. Aprire il flacone con l'etichetta "NALC" e mettere una compressa in ogni provetta da centrifuga contenente un campione. Oppure, aggiungere la polvere NALC al flacone etichettato "NAC-PAC RED," tappare ermeticamente il flacone e agitare bene o vortexare per sciogliere le compresse. **Una volta sciolte, la soluzione NAC-PAC RED/NALC sarà stabile per 72 ore. Conservare qualsiasi parte inutilizzata a 2–8°C per un massimo di 72 ore. Lasciare che la porzione refrigerata raggiunga la temperatura ambiente prima dell'uso.**
4. Per le provette contenenti le compresse NALC, aggiungere NAC-PAC RED (o la soluzione NAC-PAC RED/NALC) come segue:
 - a. Per i campioni da **1–5 ml aggiungere un volume di NAC-PAC RED uguale a quello del volume del campione.**
 - b. Per i campioni da **6–7 ml aggiungere 5 ml di NAC-PAC RED.**
 - c. Per i campioni da **8–10 ml aggiungere un uguale volume di NAC-PAC RED e poi dividere il campione dopo il punto 6,** equamente, in due provette da centrifuga, procedere con passaggi 7–9 e quindi unire i sedimenti da entrambe le provette in una provetta da centrifuga e procedere con punto #10. L'applicazione di questo protocollo contribuirà a realizzare una decontaminazione efficace consentendo anche una corretta neutralizzazione.
5. Serrare i tappi sulle provette da centrifuga. Mixare ciascun campione su un vortex fino a liquefazione anche della compressa NALC (30 secondi per campione).
6. Lasciare riposare ogni campione per 15–20 minuti. Agitare ogni cinque minuti durante questa fase.
7. Riempire ogni provetta con NPC-67 fino a neutralizzazione efficace indicata da un viraggio di colore dal rosso/rosa a incolore. Una volta che il punto incolore è stato raggiunto, non continuare ad aggiungere NPC-67 al campione. Serrare i tappi e agitare a mano per mescolare. **NOTA:** Utilizzare ogni flacone di NPC-67 solo su un singolo campione. L'utilizzo di uno stesso flacone per più campioni può portare a contaminazione incrociata e risultati potenzialmente errati.
8. Centrifugare le provette dei campioni a 3000 xg per 15 minuti. E' consigliabile ma non indispensabile utilizzare una centrifuga refrigerata. Ogni laboratorio deve controllare il raggio del rotore della centrifuga, e utilizzare un nomogramma appropriato per la selezione della velocità corretta [rpm] per ottenere il campo centrifuga relativo desiderato di 3000 xg.
9. Lavorare sotto una cappa di biosicurezza, travasare tutto il surnatante in un contenitore a prova di schizzi contenente un disinfettante appropriato. Utilizzare un disinfettante appropriato per disinfettare qualsiasi contaminazione sul bordo della provetta. Non lasciare che il disinfettante coli giù all'interno della provetta del campione.
10. Risospendere il pellet con 0,5–1,0 ml di PRB. Non risospendere il pellet con il NPC-67, acqua, o soluzione salina. **NOTA:** Per massimizzare il tempo di rilevamento per i sistemi di rilevazione a rapida crescita automatizzati, risospendere il pellet con 1,0 ml di PRB. A seconda delle esigenze del vostro laboratorio, il pellet può essere risospeso con 0,5 ml di PRB per creare un campione più concentrato per una maggiore sensibilità dello striscio 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 accuratamente il sedimento e il buffer e inoculare il brodo liquido per le vostre apparecchiature di rilevamento automatico seguendo le istruzioni del produttore.
12. Posizionare due gocce di sedimento sulla superficie di ciascuno dei media TB utilizzati. **NOTA:** Una piastra di controllo contaminazione [BAP o TSA] può essere inocolata e incubata a 35–37°C per 48 ore.
13. Approntare strisci per colorazione acido-resistente. Utilizzare vetrini CELL-BOND adesivi o soluzioni adesive di albumina sterili per fissare il campione al vetrino. Asciugare gli strisci e procedere con la giusta colorazione acido-resistente seguendo le istruzioni del produttore. **NOTA:** Una colorazione di controllo acido-fast deve essere processata contestualmente con i vetrini dei pazienti per verificare la tecnica di colorazione e i componenti. Contatta Alpha-Tec per una lista completa di vetrini acido-resistenti e vetrini di controllo.
14. Alla parte non utilizzata del campione, aggiungere il restante contenuto del PRB e conservare in frigorifero a 2–8°C per ulteriori procedure diagnostiche o di ritrattamento, se necessario.

NOTE PROCEDURA

1. Alpha-Tec NAC-PAC EA3 è stato validato per l'uso con diversi 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: i campioni di volume esiguo con volumi corrispondentemente bassi post-neutralizzazione possono rendere difficile il bilanciamento della centrifuga. Se in laboratorio è frequente la presenza di campioni con volume esiguo, è accettabile aggiungere una soluzione salina sterile al campione per ottenere un volume complessivo di 5 ml prima dell'aggiunta della compressa NALC. In questo caso, il campione deve essere decontaminato con 5 ml di soluzione NAC-PAC RED. In tal modo si farà aumentare il volume finale del campione post-neutralizzazione e sarà più facile ottenere il bilanciamento della centrifuga.
3. Per i campioni contaminati da *Pseudomonas* spp. sarà necessario un ulteriore trattamento con acido ossalico al 5% (OxA® Kit #0004805). Fare riferimento alle istruzioni per l'uso dell'OxA Kit per le indicazioni complete, o chiamare Alpha-Tec Technical Services o il reparto vendite Alpha-Tec per informazioni sugli effetti del pH della procedura con acido ossalico e dei requisiti di tamponamento appropriati.
4. Campioni ematici: In seguito alla decontaminazione dei campioni con NAC-PAC RED, campioni ematici possono rimanere rosa dopo l'aggiunta del tampone neutralizzante NPC-67 a causa dell'emoglobina residua nel campione. Se il viraggio di colore non può essere visualizzato per la presenza di 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 dei bacilli *Mycobacterium* spp. coltivabili, vitali e clinicamente significativi.

LIMITAZIONI DELLE PROCEDURE

La tempistica della fase di decontaminazione, il corretto buffering, la velocità e la tempistica della fase di centrifugazione, decantazione corretta e l'aggiunta del PRB per il pellet sono essenziali per il recupero di *Mycobacterium* spp. Il mancato rispetto delle procedure indicate può causare una diminuzione o la perdita totale dei *Mycobacterium* spp. con il conseguente risultato impreciso delle culture.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DI PRESTAZIONE

I prodotti all'interno di NAC-PAC EA3 sono stati testati su campioni clinici e hanno permesso di recuperare dalle relative culture tutti i *Mycobacterium* spp. quando sono state seguite le procedure previste.

BIBLIOGRAFIA

1. Kent, P, Kubica, GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1985.
2. Kubica, GP, 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.
3. Kubica, GP, 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.
4. Lennette, EH, et al. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 3rd ed. 1980.
5. Murray, P, Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 1985.
6. Mycobacterium Tuberculosis: Assessing Your Laboratory. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). March, 1995.
7. Vestal, AL. Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria. CDC. Atlanta, GA. 1975.
8. Yegian, D, Budd V. Toxic effect of sodium hydroxide on tubercle bacilli. Am J Clin Pathol 1952. 22:456–460.

CONTATTI

E-mail per assistenza tecnica Technical@AlphaTecSystems.com e e-mail per customer service, Sales@AlphaTecSystems.com o chiamare [+1] 360.260.2779, 08:00–16:00 dal Lunedì al Venerdì, ora del Pacifico.

GARANZIA

Alpha-Tec Systems, Inc. garantisce che le prestazioni di questo prodotto saranno conformi alle descrizioni contenute nelle etichette e nelle pubblicazioni fornite. Alpha-Tec Systems, 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.

MARCHI DI FABBRICA

CELL-BOND®, NAC-PAC®, NPC-67®, OxA®, e PRB™ sono marchi di fabbrica di Alpha-Tec Systems, Inc., 1311 SE Cardinal Court, Suite 170, Vancouver, WA 98683 USA.

Gebrauchsanweisung für:
NAC-PAC® EA3

VERWENDUNGSZWECK

NAC-PAC EA3 enthält alle notwendigen Reagenzien (NAC-PAC RED, NALC Tabletten oder Pulver, NPC-67® Neutralisierungspuffer und PRB™ Pelletresuspensionspuffer) für die Dekontamination und den Aufschluss klinischer Proben zur Gewinnung von *Mykobakterien* spp.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Dekontaminations- und Aufschlussverfahren unter der Verwendung von N-acetyl-L-cystein (NALC) kombiniert mit Natriumhydroxid und einer Natriumcitratlösung optimiert die Anzahl der TB-Bakterien. Das NALC Verfahren verwendet N-acetyl-L-cystein als mukolytische Komponente zum Lösen der chemischen Verbindungen im Schleim. Das Natriumhydroxid wirkt bakteriell dekontaminierend und die Natriumcitratlösung stabilisiert das NALC durch Bindung der in der Probe vorhandenen Schwermetallionen. Da Natriumhydroxid einen pH-Wert von ca. 13 aufweist, werden dadurch alle Bakterien abgetötet (nach 15–20 Min. auch Mycobakterien). Deshalb ist das Timing während der Dekontamination sehr wichtig um die Anzahl an getöteten *Mykobakterien* spp. so gering wie möglich zu halten. Zur Kontrolle des pH-Wertes während des Dekontaminations- und Pufferverfahrens ist im Dekontaminationsreagenz ein optischer pH-Indikator enthalten der es ermöglicht durch Farbumschlag die Neutralisierung der Probe zu erkennen. Dadurch wird der Dekontaminationsprozess gestoppt. Der NPC-67 wird zur Neutralisierung des NAC-PAC RED nach erfolgter Dekontamination verwendet und erzielt einen pH-Wert unter 8.1 Durch Studien wurde gezeigt dass ein pH-Wert über 8.1 für *Mykobakterien* spp. incl. *M. tuberculosis* toxisch ist. Nach dem Dekantieren wird der PRB dazugegeben wodurch ein neutraler pH-Wert (6.80–7.10) erreicht wird und so die Erholung der Mykobakterien optimiert.

NUR FÜR DIE IN VITRO DIAGNOSTIK VERWENDEN

VORSICHTSMAßNAHMEN

NAC-PAC RED enthält eine ätzende Chemikalie (Natriumhydroxid). Dieses Reagenz ist mit angemessener Vorsicht zu behandeln, wie auch alle klinischen Proben zur Diagnose von Tuberkulose und anderen *Mycobacterium* spp., um eine Kontamination anderer Proben oder des Laborpersonals zu verhindern. Verwenden Sie für die Weiterverarbeitung nur dafür vorgesehene und genehmigte Gerätschaften.

STABILITÄT UND AUFBEWAHRUNG

Alle Produkte des NAC-PAC EA3 sind bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil, sofern sie korrekt gelagert wurden. Die Lagerung sollte bei Raumtemperatur erfolgen (15–30°C).

QUALITÄTSKONTROLLE

Alle Reagenzien, welche eine Trübung, Ausfällung oder Verfärbung aufweisen, sollten verworfen werden. Zur Qualitätskontrolle sollten dafür geeignete Mikroorganismen verwendet werden, um Verfahren, Medien und Reagenzien entsprechend den lokalen Verfahrensrichtlinien zu überprüfen.

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Die betreffenden Proben zum Nachweis von *Mycobacterium* spp. sollten gemäß den vorgeschriebenen Standards gesammelt werden, sowie sicher und zeitnah an das Labor geliefert werden. Befolgen Sie dazu die lokalen Richtlinien.

ARBEITSABLAUF

Bereitgestellte Materialien: NAC-PAC RED, NALC Tabletten oder Pulver, NPC-67 Neutralisierungspuffer, PRB Pelletresuspensionspuffer.

Nicht mitgelieferte Materialien: Zentrifuge und 50 ml Zentrifugenröhrchen, Vortexmixer, sterile Pipetten, Mikroskop-Objekträger, TB-Medien, CELL-BOND® Objekträger.

PROBENVORBEREITUNG

1. Bevor Sie die Probenröhrchen öffnen, stellen Sie diese in ein Zentrifugengestell unter einer entsprechenden Abzugshaube.
2. Passen Sie die Probenanzahl Ihrer Zentrifugenkapazität an, öffnen Sie die Kappen der Probenbehälter. Um mögliche Kreuzkontamination zu vermeiden arbeiten Sie möglichst nur mit einer Probe gleichzeitig.
3. Öffnen Sie die Flasche „NALC“ und geben Sie je eine Tablette in ein Zentrifugenröhrchen. Oder geben Sie das NALC-Pulver in die Flasche mit der Aufschrift „NAC-PAC RED“ geben, verschließen Sie die Flasche gut und schütteln oder vortexen Sie nun bis sich die Tabletten aufgelöst haben. **Sobald die Tabletten aufgelöst sind ist die NAC-PAC RED/NALC Lösung für 72 Stunden stabil. Nicht benötigtes Material kann bei 2–8°C für 72 Stunden gelagert werden. Bevor Sie die Proben wieder verwenden sollten diese auf Raumtemperatur gebracht werden.**
4. Geben Sie NAC-PAC RED (oder die NAC-PAC RED/NALC Lösung) wie folgt in das Proben Röhrchen:
 - a. Für Proben von **1–5 ml geben Sie die gleiche Menge des NAC-PAC RED hinzu.**
 - b. Für Proben von **6–7 ml geben Sie 5 ml des NAC-PAC RED hinzu.**
 - c. Für Proben von **8–10 ml geben Sie die gleiche Menge des NAC-PAC RED hinzu und teilen Sie die Proben nach Schritt 6** zu gleichen Teilen in 2 Zentrifugenröhrchen, fahren Sie mit Schritt 7–9 fort und vermengen Sie die Sedimente von beiden Röhrchen in ein Zentrifugenröhrchen und machen Sie mit Schritt 10 weiter. Die Einhaltung dieses Protokolls ermöglicht eine wirksame Dekontaminierung bei gleichzeitiger ordnungsgemäßer Neutralisierung.
5. Verschließen Sie die Kappen der Zentrifugengläser. Vortexen Sie die Proben bis diese sich verflüssigt haben und die NALC Tablette aufgelöst ist (30 Sekunden pro Probe).
6. Lassen Sie die Proben nun für 15–20 Minuten ruhen. Vortexen Sie während dieser Zeit alle 5 Minuten.
7. Befüllen Sie jedes Röhrchen mit dem NPC-67 bis eine wirksame Neutralisation durch einen Farbwechsel von rot/pink nach farblos angezeigt wird. Sobald die Probe farblos ist, sollte kein weiterer NPC-67 hinzugefügt werden. **HINWEIS:** Benutzen Sie für jede Probe nur eine Flasche des NPC-67. Das Verwenden von einer Flasche NPC-67 bei mehreren Proben kann zu Kreuzkontamination und potenziell falschen Resultaten führen.
8. Zentrifugieren Sie die Probenröhrchen bei 3000 xg für 15 Minuten. Falls vorhanden empfehlen wir die Verwendung einer Kühlfuge. Abhängig vom Rotorradius der Zentrifuge und der Anzahl der Umdrehungen [U/min] kann die relative Zentrifugalbeschleunigung von 3000 xg errechnet werden (siehe Herstellerangaben der Zentrifuge).
9. Arbeiten Sie unter einer Abzugshaube, wenn Sie den gesamten Überstand in einen spritzwassergeschützten Behälter geben, welcher ein geeignetes Desinfektionsmittel enthält. Benutzen Sie ein geeignetes Desinfektionsmittel um mögliche Kontaminationen am Rand des Probenröhrchens zu vermeiden. Vermeiden Sie ein Herunterlaufen des Desinfektionsmittels an der Innenseite des Probenröhrchens.
10. Resuspendieren Sie das Pellet mit 0,5–1,0 ml vom PRB. Resuspendieren Sie das Pellet *nicht* mit NPC-67, Wasser oder Salz. **HINWEIS:** Resuspendieren Sie das Pellet mit 1,0 ml vom PRB, um die Zeit für einen 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 erhitzen 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°C für evtl. notwendige Nachkontrollen.

VERFAHRENSHINWEISE

1. Alpha-Tec NAC-PAC EA3 ist für die gängigsten molekulare 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: Kleine Probenmengen mit entsprechend geringem Volumen vor der Neutralisation kann 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 NALC Tabletten zu erreichen. In einem solchen Fall sollte die Probe mit 5 ml NAC-PAC RED 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 5% Oxalsäure (OxA® Kit #0004805). Verwenden sie diese nach Gebrauchsanweisung der OxA Kit oder kontaktieren sie den technischen Service oder die Verkaufsabteilung von Alpha-Tec, um Informationen über den pH Effekt durch die Oxalssäure Anwendung und den entsprechenden Bedarf an Puffer zu erhalten.
4. Blutige Proben: Folgen sie der Dekontaminierung der Proben mit dem NAC-PAC RED, blutige Proben können durch Hämoglobin auch nach der Zugabe des NPC-67 pink bleiben. Sollte ein Farbumschlag, durch das Hämoglobin ausbleiben, so geben sie bis zur 50 ml Marke den NPC-67 hinzu um eine durchgehende Neutralisation zu gewährleisten. Für zusätzliche Informationen wenden sie sich an den Technischen Service von Alpha-Tec.

ERWARTETE ERGEBNISSE

Wenn *Mycobacterium* spp. in der Probe vorhanden sind und sie den Anweisungen dieser Anleitung wie folgen, ist die Wiedergewinnung von kultivierbaren, lebensfähigen und klinisch signifikanten *Mycobacterium* spp. zu erwarten

GRENZEN DES VERFAHRENS

Das Timing der Dekontamination, die korrekte Pufferung, die Verarbeitungszeit vor und während des Zentrifugierens, eine exakte Dekantierung, sowie die Zugabe des PRB zum Pellet sind ausschlaggebend für die Wiedergewinnung der *Mycobacterium* spp. Die unsachgemäße Durchführung kann in eine verringerte Anzahl oder gar den Verlust der *Mycobacterium* spp. als Ergebnis führen und dadurch zu einem falschen Kulturergebnis führen

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Die im NAC-PAC EA3 enthaltenen Produkte wurden an klinischen Proben, dem Protokoll entsprechend, getestet und wiesen alle kulturrelevanten *Mycobacterium* spp. nach.

LITERATUR

1. Kent, P, Kubica, GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1985.
2. Kubica, GP, 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.
3. Kubica, GP, 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.
4. Lennette, EH, et al. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 3rd ed. 1980.
5. Murray, P, Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. 1985.
6. Mycobacterium Tuberculosis: Assessing Your Laboratory. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). March, 1995.
7. Vestal, AL. Procedures for the Isolation and Identification of Mycobacteria. CDC. Atlanta, GA. 1975.
8. Yegian, D, Budd V. Toxic effect of sodium hydroxide on tubercle bacilli. Am J Clin Pathol 1952. 22:456–460.

KONTAKT

Für technische Informationen wenden sie sich bitte per Mail an Technical@AlphaTecSystems.com und für den Kundenservice senden sie eine Mail an Sales@AlphaTecSystems.com oder rufen sie uns zwischen 8:00 und 16:00 unter der Nummer [+1] 360.260.2779 an.

GEWÄHRLEISTUNG

Die Funktionalität des Produktes, laut Beschreibung wird durch Alpha-Tec Systems, Inc. gewährleistet. Eine Gewährleistung durch Alpha-Tec Systems erfolgt nur bei sachgemäßem Gebrauch und Alpha-Tec Systems, Inc. lehnt jegliche implizierte Garantie durch Weiterverkauf oder Zweckentfremdung ab, und haftet auch nicht für daraus resultierenden Folgeschäden.

WARENZEICHEN

CELL-BOND®, NAC-PAC®, NPC-67®, OxA®, und PRB™ sind Warenzeichen von Alpha-Tec Systems, Inc., 1311 SE Cardinal Court, Suite 170, Vancouver, WA 98683 USA.

PRODUCT CODES

0004813 NAC-PAC EA3 (3.0%) with NALC powder / 60 patient tests
0004815 NAC-PAC EA3 (3.0%) with NALC tablets / 60 patient tests
0004817 NAC-PAC EA3 (2.5%) with NALC tablets / 60 patient tests
0004819 NAC-PAC EA3 (2.5%) with NALC powder / 60 patient tests



Manufactured by Alpha-Tec Systems, 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 navadenega 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 / Vsebinsa 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