

IMPIEGO PREVISTO

Le colorazioni rapide con acido Pro-Lab sono previste per la colorazione di strisci preparati da campioni sospettati di contenere micobatteri.

INTRODUZIONE ED OBIETTIVO DEL TEST

I micobatteri possiedono caratteristiche di rapidità di reazione agli acidi uniche, che fanno della rispettiva tecnica di colorazione uno strumento prezioso per la rilevazione dei bacilli tubercolari.

PRINCIPIO

Il tenore lipidico della parete cellulare dei bacilli Acid-Fast rende difficoltosa la colorazione degli organismi. Con le colorazioni acid-fast, il fenolo favorisce la penetrazione della colorazione anche dopo esposizione ai decoloranti. Per definire un organismo Acid Fast, tale organismo deve resistere alla decolorazione con alcol-acido. Per evidenziare l'organismo sottoposto a colorazione si utilizza una colorazione di contrasto.

REAGENTI

Reagenti pronti all'uso.

PL.7018	Carbolfucsina ZN	500 ml
PL.7019	Carbolfucsina ZN	1 litro
PL.7020	Carbolfucsina ZN	2 litri
PL.7021	Carbolfucsina Kinyoun	500 ml
PL.7022	Carbolfucsina Kinyoun	1 litro
PL.7024	CF ZN e KinyounDifferenziatore	500 ml
PL.7025	CF ZN e KinyounDifferenziatore	1 litro
PL.7026	CF ZN e KinyounDifferenziatore	2 litri
PL.7027	Blu metilene	500 ml
PL.7028	Blu metilene	1 litro
PL.7029	Blu metilene	2 litri
PL.7030	Verde malachite	500 ml
PL.7031	Verde malachite	1 litro
PL.7032	Verde malachite	2 litri
PL.7033	Auramina fenolo	500 ml
PL.7034	Auramina fenolo	1 litro
PL.7035	Auramina fenolo	2 litri
PL.7036	Auramina fenolo	500 ml
PL.7037	Differenziatore auramina	1 litro
PL.7038	Differenziatore auramina	2 litri
PL.7059	Rosso tiazina	500 ml
PL.7060	Rosso tiazina	1 litro

Colorazioni concentrate - Diluire a 1 litro con acqua distillata prima dell'uso.

PL.8005	Carbolfucsina ZN	100 ml
PL.8006	Blu metilene	100 ml
PL.8007	Verde malachite	100 ml
PL.8008	Auramina fenolo	100 ml
PL.8013	Permanganato di potassio	100 ml

Colorazioni concentrate - Diluire a 4 litri con acqua distillata prima dell'uso.

PL.8005-4.0	ZN Carbolfucsina	400 ml
PL.8006-4.0	Blu Metilene	400 ml
PL.8007-4.0	Verde malachite	400 ml

PL.8008-4.0	Fenolo-auramina	400 ml
PL.8013-4.0	Permanganato di potassio	400 ml

Colorazioni concentrate - Diluire a 5 litri con acqua distillata prima dell'uso.

PL.8005-5.0	ZN Carbolfucsina	500 ml
PL.8006-5.0	Blu Metilene	500 ml
PL.8007-5.0	Verde malachite	500 ml
PL.8008-5.0	Fenolo-auramina	500 ml
PL.8013-5.0	Permanganato di potassio	500 ml

Kit di colorazione (Pronti all'uso)

PL.8060/25 Kit colorazione TB - Carbolfucsina ZN 250 ml, differenziatore ZN 2 x 250ml, blu metilene 250 ml.

PL.8061/25 Kit colorazione TB - Carbolfucsina ZN 250 ml, differenziatore ZN 2 x 250ml, verde malachite 250 ml.

Olio da immersione (Basso rischio - senza DBP)

PL.396 Olio da immersione 50 ml

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- Le colorazioni Acid-Fast di Pro-lab Diagnostics sono offerte solo come materiale *in vitro* e non sono previste in alcun modo per uno scopo curativo o profilattico.
- Durante e dopo l'utilizzo, manipolare tutti i materiali agendo in conformità delle Buone Pratiche di Laboratorio e ricordare sempre che il materiale da analizzare deve essere considerato come potenziale biorischio.
- Il dispositivo non costituisce un rischio ambientale superiore a quelli costituiti dai campioni clinici usati con il dispositivo. È opportuno seguire appropriate misure di sicurezza nel maneggiare, processare ed eliminare tutti i campioni clinici in quanto potrebbero essere presenti organismi patogeni. L'impatto ambientale sussiste ed è adeguatamente affrontato con un opportuno smaltimento.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Temperatura ambiente. Tenere lontano da fonti di combustione. Tenere al riparo dalle radiazioni solari dirette. Se conservati secondo le condizioni appena descritte i reagenti possono essere usati fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE DELLE COLTURE

Fare riferimento ad un testo di microbiologia standard.

MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO:

Vetrini puliti, ansa sterile, fiamma / aria calda, rack per colorazione, acqua di rubinetto, olio da immersione, microscopio, carta per blotting o sostituto equivalente.

PROCEDURA

Metodo Ziehl-Neelson classico.

- Preparare uno striscio sottile e uniforme e lasciare asciugare.

- Fissare a calore e lasciare raffreddare.
- Versare sul vetrino Carbolfucsina ZN e riscaldare delicatamente (non bollire). Lasciare risopare per 10 minuti applicando nuovamente calore dopo 5 minuti.
- Sciacquare.
- Versare sul vetrino il differenziatore per 10 minuti, facendo un cambio di differenziatore dopo 5 minuti.
- Sciacquare.
- Versare sul vetrino la colorazione di contrasto (blu metilene e verde malachite), lasciare risopare per 1 minuto.
- Sciacquare bene con acqua, asciugare delicatamente in blotter o asciugare applicando un calore delicato.
- Visualizzare con microscopio ad immersione in olio.

Metodo carbolfucsina Kinyoun.

- Preparare uno striscio sottile e uniforme e lasciare asciugare.
- Fissare a calore e lasciare raffreddare.
- Versare sul vetrino la carbolfucsina Kinyoun e lasciare risopare per 10 minuti.
- Sciacquare.
- Versare sul vetrino il differenziatore per 10 minuti, facendo un cambio di differenziatore dopo 5 minuti.
- Sciacquare.
- Versare sul vetrino la colorazione di contrasto (blu metilene e verde malachite), lasciare risopare per 1 minuto.
- Sciacquare bene con acqua, asciugare delicatamente in blotter o asciugare applicando un calore delicato.
- Visualizzare con microscopio ad immersione in olio.

Metodo di colorazione fenolo auramina.

- Preparare uno striscio sottile, uniforme e lasciare asciugare.
- Fissare a calore e lasciare raffreddare.
- Versare sul vetrino fenolo auramina, attendere 10 minuti.
- Sciacquare.
- Versare sul vetrino il differenziatore per 10 minuti, facendo un cambio di differenziatore dopo 5 minuti.
- Sciacquare.
- Versare sul vetrino permanganato di potassio o rosso tiazina, attendere 30 secondi.
- Sciacquare bene con acqua, asciugare delicatamente in blotter o asciugare applicando un calore delicato.
- Visualizzare mediante microscopia fluorescente con olio da immersione.

CONTROLLO DI QUALITÀ

L'età delle colture ed il pH del terreno nel quale i batteri sono cresciuti può influenzare in modo evidente la reazione alla colorazione di Gram. Usare colture fresche di meno di 24 ore.

Colture consigliate per il CQ;

- Mycobacterium tuberculosis* HR37 Rv NCTC 7416
- Streptomyces griseus* NCTC 7807

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Metodo Ziehl-Neelson:

I bacilli Acid-Fast sono colorati in rosso, mentre altri organismi sono colorati in blu o in verde in base al tipo di colorazione di contrasto utilizzata.



Metodo carbolfucsina Kinyoun:

I bacilli Acid-Fast sono colorati in rosso, mentre altri organismi sono colorati in blu o in verde in base al tipo di colorazione di contrasto utilizzata.

Metodo fenolo auramina:

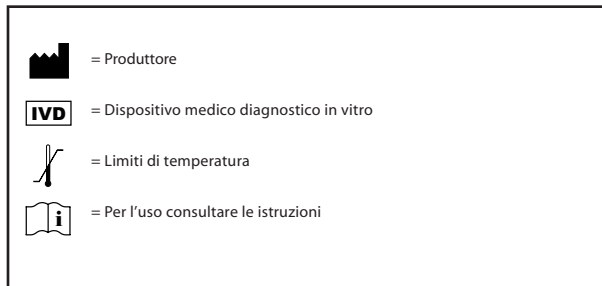
I bacilli Acid-Fast Bacilli appaiono come bastoncini luminosi su uno sfondo scuro.

AVVERTENZE

1. La presenza di detriti cellulari colorati con questa tecnica può determinare risultati falsi.
2. Reazioni di colorazione positive forniscono prova presuntiva della presenza di *M. tuberculosis* solo nel campione. Risultati di colorazione negativi non indicano necessariamente che il campione sarà negativo nella coltura. I metodi di coltura dovrebbe essere utilizzati anche per l'identificazione del *M. tuberculosis*.
3. Organismi diversi dai micobatteri mostrano proprietà acid-fast di diverso grado. Es. *Rhodococcus* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Isopora* spp.
4. È difficile sopra decolorare organismi acid-fast. Garantire una decolorazione completa.
5. Per la fase di colorazione di contrasto con permanganato di potassio è importante rispettare i tempi corretti al fine di evitare un quenching dei bacilli fluorescenti.
6. Leggere immediatamente i vetrini preparati, oppure conservarli al buio a 2-8° C per evitare uno sbiadimento della fluorescenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Ziehl, F. 1882. Zur Färbung des Tuberkelbacillus. Dtsch. Med. Wochenschr. 8:451
2. Neelson, F. 1883. Ein Casuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose. Centralbl. Med. Wiss. 21:497-501.
3. Kinyoun, J.J. 1915. A note on Uhlenhuth's method for sputum examination for tubercle bacilli. Am. J. Clin. Pathol. 46:472-4.
4. Manual of Clinical Microbiology, Lennette.
5. The Practice of Medical Microbiology. 12 Edition. V2. R. Cruickshank, J.P. Duguid, B.P. Marmion, R.H.A. Swain.



Le presenti istruzioni per l'uso sono state accuratamente tradotte dalla versione originale in lingua inglese. In caso di ambiguità o apparente discrepanza rivolgersi al servizio assistenza Pro-Lab.