

1.01301.0050

Microscopie

Auramina O (C.I. 41000)

per microscopia



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



per la colorazione Tb in fluorescenza di strisci e sezioni

Il presente colorante "Auramina O (C.I. 41000) - per microscopia" è utilizzato per la diagnostica cellulare nell'uomo e serve per l'esame batteriologico ed istologico di campioni di origine umana. È un colorante secco, utilizzato nella preparazione di una soluzione colorante che, congiuntamente ad altri prodotti diagnostici in vitro del nostro portafoglio, consente l'analisi diagnostica delle strutture bersaglio (p.es., micobatteri acidoresistenti, mediante fissaggio, inclusione, colorazione con la soluzione auramina O summenzionata, controcolorazione, montaggio) nei campioni batteriologici ed istologici, quali ad esempio strisci di colture batteriche arricchite o sezioni istologiche di polmoni.

Principio

Colorazione di micobatteri secondo Hagemann-Hermann con legame non specifico del colorante fluorescente ad un substrato

Il meccanismo della colorazione fluorescente è paragonabile a quello della colorazione classica di Ziehl-Neelsen.

A causa dell'elevata percentuale di cera e lipidi nella membrana cellulare, i micobatteri assorbono i coloranti solo molto lentamente.

Una volta che i micobatteri hanno assorbito il colorante fucsina, non lo cedono praticamente più, anche se sottoposti a trattamenti intensivi con soluzioni decoloranti come ad esempio l'acido cloridrico alcolico. I micobatteri si caratterizzano dunque per la loro resistenza agli acidi e all'alcol.

Grazie al pretrattamento dei preparati con Sputofluo[®], i batteri vengono isolati dall'espettorato denso e dal materiale cellulare. Inoltre, svolgendo un'azione disinfettante, Sputofluo[®] uccide i microrganismi.

Materiale d'esame

Strisci di materiale batteriologico essiccati all'aria, termofissati e pretrattati con Sputofluo[®] quale espettorato, strisci ottenuti da agoaspirati (FNAB, Fine Needle Aspiration Biopsy = agobiopsia con ago sottile), lavaggi, impronte, effusioni, pus, essudati, colture liquide e solide
Sezioni incluse in paraffina e fissate in formalina (sezioni in paraffina con spessore di 3 - 4 µm)

Reattivi

Art. 1.01301.0050

Auramina O (C.I. 41000)
per microscopia

50 g

Color Index No.: 41000

Color Index Name: Basic yellow 2

Inoltre necessario:

Art. 100206 Fenolo 250 g, 1 kg
p. a. ACS, Reag. Ph Eur

Art. 100327 Acido cloridrico alcolico 1 l, 5 l
per microscopia

Art. 101287 Blu di metilene soluzione sec. Löffler 100 ml, 500 ml, 2,5 l
per microscopia

Art. 105082 Potassio permanganato 250 g, 1 kg
p.a. EMSURE[®] ACS, Reag. Ph Eur

Preparazione dei campioni

Il campionamento deve essere effettuato da personale specializzato.

Espettorato

Al fine di liberare i micobatteri dal muco e dai gruppi cellulari, si consiglia di pretrattare l'espettorato con Sputofluo[®]. Il principio attivo ipoclorito discioglie il materiale organico per ossidazione e libera i micobatteri senza intaccarli.

Preparazione del reattivo: Preparazione della soluzione di Sputofluo[®] 15 %

Per la preparazione di ca. 100 ml di soluzione si miselano:

Sputofluo [®]	15 ml
Acqua distillata	85 ml

Preparazione del campione nella provetta da centrifuga:	
Campione	1 parte (minimo 2 ml)
Soluzione di Sputofluo [®] (al 15 % con acqua distillata)	3 parti
Agitare fortemente	10 minuti
Centrifugare a 3000 - 4800 g/min	20 minuti
Decantare il liquido surnatante Strisciare il sedimento Lasciare asciugare all'aria	

Agoaspirati, lavaggi, sedimenti

Dopo opportuni passaggi di arricchimento, strisciare i campioni sui portaoggetti e lasciar asciugare all'aria.

Sezioni istologiche

Blu di metilene soluzione sec. Löffler può essere utilizzata per la colorazione di sezioni istologiche.

Sparaffinare e riportare le sezioni all'acqua attraverso una serie ascendente di alcoli come di consueto. Per i campioni fissati in formalina il pretrattamento con Sputofluo[®] non è necessario.

Fissaggio

Il fissaggio avviene con la fiamma del becco Bunsen (passare 2 - 3 volte evitando il forte calore).

Il materiale può anche essere fissato in un armadio di asciugatore o su una piastra di riscaldamento a 100 - 110 °C per 20 minuti.

Temperature più elevate o tempi di riscaldamento più lunghi compromettono necessariamente il risultato della colorazione.

Tutti i campioni devono essere trattati secondo la tecnica standard vigente. Tutti i campioni vanno contrassegnati in modo tale da essere facilmente identificati.

Devono essere utilizzati strumenti adatti per il prelievo e la preparazione dei campioni; vanno osservate rigorosamente le indicazioni del produttore circa l'applicazione e le istruzioni d'uso.

Preparazione del reattivo

Fenolo liquefatto

Per la preparazione si miselano:

Fenolo	10 parti
liquefare in un bagnomaria tiepido	
Acqua distillata	1 parte
aggiungere e mescolare	

Fenolo - auramina O soluzione

Per la preparazione di ca. 1 l di soluzione si miselano:

Auramina O (C.I. 41000)	1 g
Acqua distillata	1 l
sciogliere	
Fenolo liquefatto	50 g
aggiungere, mescolare e se necessario, filtrare	

La soluzione colorante preparata a fresco deve essere filtrata prima dell'uso.

Potassio permanganato soluzione 0,1 %

Per la preparazione di ca. 1 l di soluzione si miselano:

Potassio permanganato	1 g
Acqua distillata	1 l
sciogliere	

Esecuzione

Colorazione con rastrello di colorazione

Per ottenere un risultato ottimale si dovrebbero rispettare i tempi indicati.

Portaoggetti con striscio asciugato all'aria o preparato istologico		
Fenolo - auramina O soluzione	coprire i preparati, far bollire e lasciar agire, quindi eliminare la soluzione in eccesso e ripetere la colorazione	lasciar agire per 5 minuti ciascuno
Acqua di rubinetto	sciacquare accuratamente	
Acido cloridrico alcolico	differenziare fino alla decolorazione	15 - 20 secondi
Acqua di rubinetto	sciacquare	
Eventualmente controcolorazione:		
Potassio permanganato soluzione 0,1 %	immergere	5 secondi
Acqua di rubinetto	sciacquare	
Blu di metilene soluzione sec. Löffler	immergere	1 secondo
Acqua di rubinetto	sciacquare	
Asciugare all'aria (ad es. per una notte o a 50°C nell'armadio di asciugatura)*		

* I preparati istologici non vengono asciugati all'aria, però dopo la disidratazione (con serie alcolica a concentrazione ascendente) i preparati possono essere chiarificati con xilene o Neo-Clear®, montati con mezzi di montaggio anidri (ad es., Neo-Mount®, Entellan®, DPX Neo o Entellan® Neo), coperti con un vetrino coprioggetti e conservati.

Per stoccare i preparati batteriologici per diversi mesi, si raccomanda il montaggio con un mezzo di montaggio anidro (ad es., Neo-Mount®, Entellan®, DPX Neo o Entellan® Neo) e un vetrino coprioggetti. I preparati colorati devono essere ben essiccati. Senza montaggio, la colorazione è stabile per circa 3 giorni, se coperta con olio ad immersione è stabile solo per alcune ore.

Per l'analisi dei preparati colorati con ingrandimento al microscopio >40x, si consiglia di utilizzare olio di immersione.

Risultato

Micobatteri	fluorescenza giallo-oro
Sfondo	violetto scuro

Valutazione

In base al referto positivo "accertamento di bastoncini resistenti all'acido" o negativo "non sono stati accertati bastoncini resistenti all'acido", non si può affermare se si tratti del *Mycobacterium tuberculosis* o di un micobatterio di altro tipo. Non si può nemmeno determinare la vitalità dei batteri (attivi, inattivi). Dopo aver trovato micobatteri nel campione è necessario eseguire ulteriori analisi in un laboratorio specializzato.

Individuazione e soluzione di problemi

Fissaggio

È importante eseguire un fissaggio adeguato con il becco Bunsen o in un essiccatore, in modo da prevenire le possibili infezioni dei preparati e l'ulteriore crescita batterica.

Nessuna colorazione dei micobatteri

Il passo fondamentale della colorazione dei micobatteri è la decolorazione che può essere influenzata dallo spessore dello striscio. La soluzione di acido cloridrico alcolico appena preparata è inoltre molto reattiva e quindi è necessario valutare con attenzione il risultato. I tempi qui indicati per la decolorazione devono essere rigorosamente osservati, poiché in caso contrario si possono ottenere risultati falsi negativi.

Annotazioni tecnici

Il microscopio utilizzato deve soddisfare i requisiti previsti in un laboratorio medico diagnostico. In caso di colorazione automatizzata, attenersi alle istruzioni per l'uso del prodotto dello strumento e del software. La soluzione colorante preparata a fresco deve essere filtrata prima dell'uso. Eliminare l'olio di immersione in eccesso prima dell'archiviazione.

Diagnostica

Le diagnosi vanno eseguite solo da personale qualificato ed autorizzato. Devono essere utilizzate nomenclature valide. Ulteriori test vanno scelti ed eseguiti secondo metodi riconosciuti. Per ogni applicazione devono essere eseguiti controlli appropriati, per escludere possibili risultati errati.

Conservazione

Auramina O (C.I. 41000) - per microscopia va conservato ad una temperatura compresa tra +5 °C e +30 °C.

Stabilità

Auramina O (C.I. 41000) - per microscopia può essere utilizzato fino alla data di scadenza indicata. Una volta aperto il flacone, il contenuto si mantiene stabile fino alla data di scadenza indicata se conservata ad una temperatura compresa tra +5 °C e +30 °C. Conservare sempre i flaconi ben chiusi.

Istruzioni per l'uso

Solo per uso professionale.

Per evitare errori, la applicazione deve essere eseguita da personale specializzato. Vanno osservate le direttive nazionali in materia di sicurezza sul lavoro e di assicurazione di qualità. Vanno utilizzati microscopi conformi agli standard vigenti. All'occorrenza utilizzare una centrifuga che soddisfi gli standard di laboratorio ed i rispettivi requisiti.

Protezione contro le infezioni

Vanno rigorosamente osservate le norme di laboratorio relative alla protezione contro le infezioni.

Istruzioni per lo smaltimento

La confezione deve essere smaltita nel rispetto delle vigenti direttive in materia. Le soluzioni usate e le soluzioni scadute vanno smaltite come rifiuti pericolosi, in conformità alle disposizioni locali vigenti in materia di smaltimento dei rifiuti. Per richiedere informazioni sullo smaltimento selezionare il Quick link "Hints for Disposal of Microscopy Products" all'indirizzo www.microscopy-products.com. Nell'Unione europea trova applicazione il Regolamento (CE) n. 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006.

Reattivi ausiliari

Art. 100206	Fenolo p. a. ACS, Reag. Ph Eur	250 g, 1 kg
Art. 100327	Acido cloridrico alcolico per microscopia	1 l, 5 l
Art. 100579	DPX Neo mezzo di montaggio anidro per microscopia	500 ml
Art. 101287	Blu di metilene soluzione sec. Löffler per microscopia	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Art. 104699	Olio di immersione per microscopia	flacone conta- gocce di 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 105082	Potassio permanganato p.a. EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur	250 g, 1 kg
Art. 107960	Entellan® mezzo di montaggio rapido per microscopia	500 ml
Art. 107961	Entellan® Neo mezzo di montaggio rapido per microscopia	100 ml, 500 ml, 1 l
Art. 108000	Sputofluol® per microbiologia e microscopia	1 l
Art. 108298	Xilene (miscela di isomeri) per istologia	4 l
Art. 109016	Neo-Mount® mezzo di montaggio anidro per microscopia	flacone conta- gocce di 100 ml, 500 ml
Art. 109843	Neo-Clear® (sostituto xilolo) per microscopia	5 l

Classificazione di sostanze pericolose

Art. 1.01301.0050

Osservare la classificazione delle sostanze pericolose riportata sull'etichetta e seguire le indicazioni della scheda di sicurezza. La scheda di sicurezza è disponibile su sito Internet e su richiesta.

Componenti principali dei prodotti

Art. 1.01301.0050

C.I. 41000

C₁₇H₂₂ClN₃

M = 303,84 g/mol

Perdita all'essiccazione

≤ 5 %

Altri prodotti d'IVD

Art. 105174	Ematossilina soluzione modificata secondo Gill III per microscopia	500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 109093	Tb-Fluor Kit di colorazione in fluorescenza per la ricerca di micobatteri	6x 500 ml
Art. 109204	Giemsa soluzione azur-eosina-blu di metilene per microscopia	100 ml, 500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 109844	Eosina G soluzione acquosa 0,5% per microscopia	1 l, 2,5 l
Art. 111609	Histosec® in pastiglie p.s. 56-58°C mezzo d'inclusione per istologia	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art. 111885	Gram-color Kit di colorazione per la colorazione di Gram	1 set
Art. 115161	Histosec® in pastiglie (senza DMSO) p.s. 56-58°C mezzo d'inclusione per istologia	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art. 116450	Tb-color Kit colorante per l'esame microscopico dei micobatteri (colorazione a freddo)	1 set

Letteratura

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Theory and application of Microbiological Assay, Hewitt, W. and Vincent, S., 1989, Academic Press
4. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002



Consult instructions
for use



Manufacturer



Catalog number



Batch code



Caution, consult
accompanying documents



Use by
YYYY-MM-DD



Temperature
limitation

Status: 2017-08-15

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.microscopy-products.com

EMD Millipore Corporation, 290 Concord Road, Billerica,
MA 01821, USA, Tel. +1-978-715-4321

