

VERDE MALACHITE

IMPIEGO PREVISTO

I coloranti qui descritti sono destinati alla colorazione di strisci preparati da campioni che potrebbero 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 acido resistenti rende difficoltosa la colorazione degli organismi. Nelle colorazioni per l'acido resistenza, il fenolo favorisce la penetrazione della colorazione anche dopo esposizione ai decoloranti. Per definire un organismo acido resistente, tale organismo deve resistere alla decolorazione con alcol-acido. Per evidenziare l'organismo sottoposto a colorazione si utilizza una colorazione di contrasto.

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

1. Le colorazioni per l'acido resistenza sono destinate solo all'uso *in vitro* e non sono previste in alcun modo per uno scopo terapeutico o di profilassi.
2. Durante e dopo l'utilizzo, manipolare tutti i materiali agendo in conformità alle Buone Pratiche di Laboratorio; ricordare sempre che il materiale da analizzare deve essere considerato a potenziale rischio biologico.
3. Il test non comporta un rischio ambientale superiore a quello costituito dai campioni clinici analizzati. 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 può essere adeguatamente affrontato mediante un opportuno smaltimento.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Conservare a temperatura ambiente. Tenere lontano da fonti di calore. 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 manuale di tecniche microbiologiche.

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-Neelsen classico.

1. Preparare uno striscio sottile, uniforme e lasciare asciugare.
2. Fissare a calore e lasciare raffreddare.
3. Versare sul vetrino Carbol-fucsina ZN e riscaldare delicatamente (non bollire). Lasciare riposare per 10 minuti applicando nuovamente calore dopo 5 minuti. Con Carbol-fucsina Kinyoun non riscaldare.
4. Sciacquare.
5. Versare sul vetrino il differenziatore per 10 minuti, facendo un cambio di differenziatore dopo 5 minuti.
6. Sciacquare.
7. Versare sul vetrino la colorazione di contrasto (blu metilene o verde malachite), lasciare riposare per 1 minuto.
8. Sciacquare bene con acqua, asciugare delicatamente in blotter o asciugare applicando un calore delicato.
9. Osservare con microscopio ad immersione in olio.

Metodo carbol-fucsina Kinyoun

1. Preparare uno striscio sottile, uniforme e lasciare asciugare.
2. Fissare a calore e lasciare raffreddare.
3. Versare sul vetrino Kinyoun Carbol-fucsina, attendere 10 minuti.
4. Sciacquare.
5. Versare sul vetrino il differenziatore per 10 minuti, facendo un cambio di differenziatore dopo 5 minuti.
6. Sciacquare.
7. Versare sul vetrino il Blu di Metilene o il Verde Malachite, attendere 1 minuto.
8. Sciacquare bene con acqua, asciugare delicatamente in blotter o asciugare applicando un calore lieve.
9. Osservare mediante microscopia fluorescente ad immersione in olio.

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. 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 acido resistenti 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 acido resistenti sono colorati in rosso, mentre altri organismi sono colorati in blu o in verde in base al tipo di colorazione di contrasto utilizzata.

AVVERTENZE

1. La presenza di detriti cellulari colorati con questa tecnica può determinare risultati inesatti.
2. Reazioni di colorazione positive forniscono la prova presuntiva della presenza di *M.tuberculosis* solo nel campione. Risultati di colorazione negativi non indicano necessariamente che il campione sarà negativo alla coltura. Per l'identificazione di *M.tuberculosis* dovrebbero essere utilizzati anche metodi di coltura.
3. Organismi diversi dai micobatteri mostrano proprietà di acido resistenza di diverso grado. Es. *Rhodococcus* spp., *Cryptosporidium* spp. e *Isopora* spp.
4. È difficile decolorare organismi acido resistenti. Assicurare 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 un affievolimento 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, Fifth Edition. Lennette.
5. The Practice of Medical Microbiology. 12° edizione. V2. R.Cruickshank, J.P.Duguid, B.P.Marmion, R.H.A.Swain.

REAGENTI**Reagenti pronti all'uso.**

17PL7030	Verde malachite	500ml
17PL7031	Verde malachite	1 litro

CND: W0104010804

