

Medical Chemical Corp., 19430 Van Ness Avenue,
Torrance, California 90501 • (310)787-6800, Fax (310)787-4464

EC REP CEpartner4U, 3951 DB; 13. NL. tel: +31 (0)6.516.536.26

Kit colorazione per acido-resistenza (Kinyoun)

N. catalogo 483K

Si ritiene che l'elevato contenuto lipidico, con particolare riferimento alla componente di acido micolico, sia correlato al meccanismo dell'acido-resistenza. Da tempo è noto che anche un leggero danno meccanico alla parete cellulare fa sì che i micobatteri perdano la proprietà dell'acido-resistenza; ciò suggerisce che la permeazione attraverso le membrane cellulari ha un ruolo importante in questo meccanismo. I due coloranti carbol-fucsina più comunemente usati sono Ziehl-Neelsen e Kinyoun. Ziehl-Neelsen è utilizzato a temperatura elevata; Kinyoun è utilizzato a temperatura ambiente, ha una maggiore concentrazione di fucsina basica e contiene anche DMSO. Il decolorante di prima scelta per entrambe le procedure è acido-alcol 3%, ma per la procedura Kinyoun si impiega anche acido solforico acquoso 5%. Blu di metilene, verde brillante o verde malachite sono i coloranti di contrasto comunemente usati. Un vetrino colorato correttamente mostrerà i batteri acido-resistenti colorati in rosso rispetto al colore di contrasto.

Reagenti forniti

I materiali forniti nel kit da 8 oz, numero di catalogo 483K, sono:

1. Carbol-fucsina, Kinyoun (n. catalogo 483A).
2. Acido-alcol, HCl 3% in alcol reagente (n. catalogo 311A).
3. Colorante di contrasto blu di metilene, 1% p/V (catalogo n. 675A).

Reagenti necessari ma non forniti

È necessaria acqua purificata priva di batteri. Per le sezioni incluse in paraffina sono necessari xilene o sostituti dello xilene, nonché i consueti solventi per idratazione/disidratazione.

Avvertenze di pericolo



Pericolo: Liquido e vapori altamente infiammabili. Tenere lontano da fonti di calore, scintille, fiamme libere e superfici calde. Non fumare. Tenere il contenitore ben chiuso. Utilizzare solo strumenti che non producono scintille. Prendere precauzioni contro le scariche statiche. Indossare indumenti protettivi e protezioni oculari. In caso di contatto con la cute, rimuovere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Risciacquare con acqua o fare una doccia. In caso di incendio, utilizzare estintori approvati per incendi alcolici. Il fenolo è altamente tossico e la presenza di DMSO può incrementare l'assorbimento degli altri ingredienti.

Raccolta dei campioni e allestimento per l'analisi

Strisci

I vetrini vengono generalmente allestiti da un terreno di coltura solido o liquido inoculato con campioni provenienti dalla fonte originale (per esempio, tamponi faringei, espettorato eccetera). Una piccola quantità della sospensione solida viene sospesa in una goccia d'acqua priva di batteri su un vetrino portaoggetti. Nel caso in cui il terreno sia liquido, si utilizza una goccia prelevata direttamente dal terreno di coltura. Fissare a calore o in metanolo la sospensione ottenuta. Nessuno di questi metodi di fissazione è garantito per uccidere i micobatteri. Tutti i campioni devono essere considerati a rischio biologico.

Sezioni tissutali

Sezioni da 5-6 micron fissate in formalina e incluse in paraffina o sezioni congelate.

Procedura

Strisci

1. Posizionare lo striscio fissato su un rack per colorazione e coprirlo con carbol-fucsina, lasciando agire per 3 minuti.
2. Risciacquare accuratamente con acqua purificata priva di batteri. Far defluire il colorante dal vetrino in modo che i residui di colorante non vi aderiscano.
3. Decolorare con acido-alcol fino a quando non cola più nessun colore dallo striscio.
4. Risciacquare accuratamente con acqua purificata priva di batteri.
5. Versare sul vetrino il colorante di contrasto e lasciare agire da uno a due minuti.
6. Risciacquare accuratamente con acqua purificata priva di batteri e lasciare asciugare all'aria.
7. Esaminare a elevato ingrandimento a secco e verificare ad immersione in olio.

Sezioni tissutali

1. Deparaffinare e idratare come di consueto.
2. Colorare in carbol-fucsina per 20-30 minuti.
3. Decolorare con acido-alcol fino a quando le sezioni non diventano rosa pallido.
4. Risciacquare accuratamente con acqua purificata priva di batteri.
5. Versare sul vetrino il colorante di contrasto e lasciare agire da uno a due minuti.
6. Risciacquare accuratamente con acqua purificata priva di batteri e lasciare asciugare all'aria.
7. Disidratare e diafanizzare con xilene o un sostituto dello xilene.

Procedura a microonde per sezioni tissutali

1. Deparaffinare e idratare come di consueto.
2. Porre in carbol-fucsina nel microonde per 45 secondi e lasciare il vetrino nel colorante riscaldato per 5 minuti.
3. Decolorare con acido-alcol fino a quando le sezioni non diventano rosa pallido.
4. Risciacquare accuratamente con acqua purificata priva di batteri.
5. Versare sul vetrino il colorante di contrasto e lasciare agire un minuto.
6. Risciacquare accuratamente con acqua purificata priva di batteri e lasciare asciugare all'aria.
7. Disidratare e diafanizzare con xilene o un sostituto dello xilene.

NB: Tutti i tempi sono approssimativi. Si consiglia all'utente di regolare i tempi di colorazione come appropriato.

Fonti di errore

Gli strisci devono essere fissati a calore e lasciati asciugare. I campioni fissati in modo inadeguato potrebbero non colorarsi correttamente. Il controllo deve essere eseguito a ogni processo, preferibilmente sullo stesso vetrino. Pulire la superficie posteriore del vetrino dopo la colorazione. Se non risciacquati adeguatamente, i residui di colorante aderiranno al vetrino.

CE

Revisione: 14 giugno 2016