

Consulte o glossário de símbolos no fim do folheto informativo.

Acridine Orange Stain	Para detecção de microrganismos em esfregaços directos pela técnica de coloração fluorescente.	1 x 250 mL 4 x 250 mL	N.º Cat. 212536 212537
-----------------------	--	--------------------------	---

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

Acridine Orange Stain é recomendado para utilização na detecção microscópica fluorescente de microrganismos em esfregaços directos preparados a partir de materiais clínicos e não clínicos. É particularmente útil no rastreio rápido de amostras normalmente estéreis como, por exemplo, líquido cefalorraquidiano, em que poucos organismos poderão estar presentes, e no exame rápido de esfregaços de sangue ou esfregaços contendo material proteináceo em que a diferenciação dos organismos em relação ao material de fundo poderá ser mais difícil.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A coloração fluorocromática de microrganismos utilizando laranja de acridina foi descrita pela primeira vez por Strugger e Hilbrich em 1942. Desde então tem sido muito utilizada no exame do solo e da água relativamente ao teor microbiano. Em 1975, Jones e Simon avaliaram métodos epifluorescentes utilizados nas contagens directas de bactérias aquáticas e determinaram que o laranja de acridina proporcionava a melhor estimativa da população bacteriana em amostras de lagos, rios e água do mar.¹ A metodologia de contagem directa do laranja de acridina (AODC) tem sido utilizada na enumeração de bactérias de lixeiras controladas.^{2,3} Heidelberg *et al.* utilizaram a AODC num estudo de alterações sazonais nas populações bacterianas marinhas e concluíram que a coloração do laranja de acridina se comparava favoravelmente com os procedimentos de contagem directa fluorescente de oligonucleótidos (FODC).⁴ A técnica de filtragem directa epifluorescente (DEFT) utilizando laranja de acridina é especificada nos métodos para o exame microbiano de alimentos e água.^{5,6,7,8}

O laranja de acridina tem sido igualmente utilizado em aplicações clínicas e a sua utilização para realçar bactérias em culturas de sangue tornou-se amplamente aceite. Em 1980, McCarthy e Senne compararam a coloração do laranja de acridina com subculturas cegas para a detecção de culturas de sangue positivas.⁹ Os seus resultados revelaram que a coloração do laranja de acridina constituía uma alternativa rápida e económica às subculturas cegas. Referiram igualmente que a coloração do laranja de acridina parecia ser mais sensível do que a coloração Gram na detecção de microrganismos e conseguia detectar bactérias em concentrações de aproximadamente 1×10^4 CFU/mL (unidades formadoras de colónias/mL). Lauer, Reller e Mirret compararam o laranja de acridina com a coloração Gram na detecção de microrganismos no líquido cefalorraquidiano e noutros materiais clínicos.¹⁰ Os seus resultados corresponderam aos referidos por McCarthy e Senne e revelaram que o laranja de acridina é um procedimento de coloração rápido e simples, que foi mais sensível do que a coloração Gram na detecção de microrganismos em materiais clínicos.

O laranja de acridina tem sido igualmente utilizado na detecção de *Trichomonas vaginalis* em esfregaços vaginais¹¹, no diagnóstico da malária^{12,13} e em micoplasmas.¹⁴

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O laranja de acridina é um corante fluorocromático que se liga aos ácidos nucleicos das bactérias e de outras células.¹⁵ Sob a luz UV, o laranja de acridina colora de laranja o ARN e o ADN monofilamentar; o ADN bifilamentar aparece a verde.

Quando tamponado com pH 3,5 – 4,0, o laranja de acridina colora diferencialmente os microrganismos de materiais celulares. As bactérias e os fungos adquirem uma coloração uniforme laranja vivo, enquanto que as células epiteliais e inflamatórias humanas e os detritos de fundo apresentam uma coloração verde-claro a amarelo. Os núcleos dos leucócitos activados apresentam uma coloração amarela, laranja ou vermelha devido ao aumento da produção de ARN resultante da activação. Os eritrócitos não adquirem qualquer coloração ou então aparecem a verde-claro.

Devido a esta propriedade de coloração diferencial, os esfregaços sujeitos a coloração com laranja de acridina preparados a partir de materiais clínicos podem ser rapidamente rastreados utilizando a microscopia fluorescente, com uma ampliação de 100X a 400X, quanto à presença de microrganismos que emitam fluorescência laranja vivo contra um fundo preto ou verde-claro a amarelo.

REAGENTES

Acridine Orange Stain

Fórmula aproximada*

Laranja de acridina	0,1 g
Tampão acetato, 0,5M	1000 mL

*Ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho.

Precauções: Para diagnóstico *in vitro*.

Seguir os procedimentos laboratoriais aceites e adequados para o manuseamento e eliminação de materiais infecciosos.

Instruções de armazenamento: Conservar entre 15 – 30°C. O prazo de validade refere-se ao produto contido no recipiente intacto e armazenado conforme indicado.

Deterioração do produto: Não utilizar o produto caso apresente sinais de precipitação ou caso a solução apresente outros sinais de deterioração.

COLHEITA E MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras devem ser colhidas em recipientes estéreis ou com zaragoatas estéreis e transportadas imediatamente para o laboratório, de acordo com as linhas de orientação recomendadas.¹⁶

PROCEDIMENTO

Materiais fornecidos: Acridine Orange Stain.

Materiais necessários mas não fornecidos: Microscópio fluorescente indicado para utilização com laranja de acridina, lâminas de vidro para microscópio e metanol.

Preparação, coloração e exame dos esfregaços

1. Prepare, numa lâmina de vidro limpa, um esfregaço da amostra que pretende sujeitar a coloração.
2. Deixe secar ao ar.
3. Efectue a fixação do esfregaço com metanol a 50% ou 100% durante 1 – 2 min.
4. Escorra o excesso de metanol e deixe o esfregaço secar.
5. Inunde a lâmina com coloração de laranja de acridina durante 2 min.
6. Lave bem com água corrente e deixe secar.
7. Os esfregaços podem ser inicialmente examinados com uma ampliação de 100X a 400X utilizando um microscópio fluorescente. Os resultados devem ser confirmados por exame a 1000X com uma objectiva de imersão em óleo.

CONTROLO DE QUALIDADE PELO UTILIZADOR

1. Examine a solução de Acridine Orange Stain quanto à cor e à transparência. A solução deve apresentar-se transparente, laranja e sem sinais de precipitação.
2. Determine o pH da solução. O pH deve ser 3,5 – 4,0.
3. Verifique o desempenho da coloração utilizando caldo triptico de soja de 4 – 6 h com culturas de sangue de ovelha a 5% dos organismos abaixo indicados. Prepare os esfregaços, uma cultura por lâmina, e proceda conforme descrito na secção "Preparação, coloração e exame dos esfregaços".

Organismos	Bactérias	Fundo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Laranja vivo	Eritrócitos verde-claros e leucócitos amarelos, amarelo-esverdeados ou laranja contra um campo preto.
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 33186	Laranja vivo	Podem ser observados detritos de coloração verdes, amarelos, laranja ou vermelhos.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

A coloração do laranja de acridina faculta informações presuntivas sobre a presença e identificação de microrganismos que podem estar presentes na amostra. Uma vez que os microrganismos observados nos esfregaços, incluindo os não viáveis, podem ter origem em fontes externas, isto é, dispositivos de colheita de amostras, lâminas ou água utilizada para as lavagens, todos os esfregaços positivos devem ser confirmados por cultura.

Para detecção por este método são necessárias aproximadamente 10^4 CFU/mL.

A coloração com Acridine Orange Stain não distingue entre organismos gram-positivos e gram-negativos. A reacção Gram pode ser determinada por coloração Gram directamente sobre o laranja de acridina após remoção do óleo de imersão.

Os núcleos ou grânulos provenientes dos leucócitos activados desintegrados podem assemelhar-se a cocos quando examinados com ampliações inferiores, isto é, 100X a 400X. Podem ser distinguidos com base na morfologia quando examinados com ampliações superiores, isto é, 1000X.

Certos tipos de detritos podem emitir fluorescência em esfregaços sujeitos a coloração com laranja de acridina. Estes detritos podem ser distinguidos dos microrganismos com base na morfologia quando examinados com ampliações superiores.

RESULTADOS ESPERADOS E CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

As bactérias e os fungos adquirem uma coloração laranja vivo. O fundo aparece preto a amarelo esverdeado. As células epiteliais e inflamatórias humanas e os detritos dos tecidos adquirem uma coloração verde-claro a amarelo. Os leucócitos activados adquirem uma coloração amarela, laranja ou vermelha, dependendo do nível de activação e da quantidade de ARN produzido, enquanto que os eritrócitos não adquirem qualquer coloração ou então aparecem a verde-claro.

BIBLIOGRAFIA

1. Jones, J.G. and B.M. Simon. 1975. An investigation of errors in direct counts of aquatic bacteria by epifluorescence microscopy, with reference to a new method for dyeing membrane filters. *J. Appl. Bacteriol.* 39: 317 – 329.
2. Barlaz, M.A. 1997. Microbial studies of landfills and anaerobic refuse decomposition, p. 541 – 557. *In* C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach, and M.V. Walter (ed.), *Manual of environmental microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Palmisano, A.C., D.A. Mauruscik, and B.S. Schwab. 1993. Enumeration of fermentative and hydrolytic microorganisms from three sanitary landfills. *J. Gen. Microbiol.* 139:387-391.
4. Heidelberg, J.F., K.B. Heidelberg, and R.R. Colwell. 2002. Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5488-5497.
5. Splittstoesser, D.F. 1992. Direct microscopic count, p. 97 – 104. *In* C.V. Vanderzant and D.F. Splittstoesser (ed.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 3rd ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
6. Packard, V.S., Jr., S. Tatini, R. Fugua, J. Heady, and C. Gilman. 1992. Direct microscopic methods for bacteria or somatic cells, p. 309 – 325. *In* R.T. Marshall (ed.), *Standard methods for the examination of dairy products*, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

7. Duffy, G., Kilbride, B., Fitzmaurice, J., Sheridan, J.J. 2001. Routine diagnostic tests for food-borne pathogens. The National Food Centre, Dublin.
8. Eaton, A.D., L.S. Clesceri, and A.E. Greenberg (ed.). 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
9. McCarthy, L.R. and J.E. Senne. 1980. Evaluation of acridine orange stain for detection of microorganisms in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* *11*:281-285.
10. Lauer, B.A., L.B. Reller, and S. Mirrett. 1981. Comparison of acridine orange and Gram stains for detection of microorganisms in cerebrospinal fluid and other clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* *14*:201-205.
11. Greenwood, J.R., and K. Kirk-Hillaire. 1981. Evaluation of acridine orange stain for detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal specimens. *J. Clin. Microbiol.* *14*:699.
12. Keiser, J., J. Utzinger, Z. Premji, Y. Yamagata, and B.H. Singer. 2002. Acridine orange for malaria diagnosis: its diagnostic performance, its promotion and implementation in Tanzania, and the implications for malaria control. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* *96*:643-654.
13. Bosch, I., C. Bracho, and H.A. Perez. 1996. Diagnosis of malaria by acridine orange fluorescent microscopy in an endemic area of Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* *91*:83-86.
14. Rosendal, S. and A. Valdivieso-Garcia. 1981. Enumeration of mycoplasmas after acridine orange staining. *Appl. Environ. Microbiol.* *41*:1000-1002.
15. Kasten, F.H. 1967. Cytochemical studies with acridine orange and the influence of dye contaminants in the staining of nucleic acids. *Internat. Rev. Cytol.* *27*:141-202.
16. Shea, Y.R. 1994. Specimen collection and transport, p. 1.1.1-1.1.30. *In* H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1, American Society for Microbiology, Washington, D.C.



Manufacturer / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas / Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare



Use by / Spottebujtje do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použítte do / Usar antes de / Använd före / YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) / RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutning af måned) / JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) / AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp) / VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) / AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) / JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) / EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) / ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja) / AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) / MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mêsio pabaiga) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av måneden) / RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) / AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) / RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiacja) / aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden)



Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalogusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalógové číslo / Número de catálogo



Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Auktorizovaný gale atstovas Europos Bendrijoje / Autorisert representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Representante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU



In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostika meditsiiniaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietais / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik



Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturlimit / Temperaturi piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturenbereich / Όριο θερμοκρασίας / Hörmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrænsning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenie teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning



Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch kode (Lot) / Chargennummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-kode (Serie) / Kod partii (seria) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (partii)



Contains sufficient for <n> tests / Dostatečné množství pro <n> testů / Ineholder tilstrækkeligt til <n> test / Voldoende voor <n> tests / Küllaldane <n> testide jaoks / Sisältöön riittävä <n> testejä varten / Contenu suffisant pour <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα <n> εξετάσεις / <n> teszthez elegendő / Contenido suficiente per <n> test / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Inholder tilstrækkelig for <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Contêmo suficiente para <n> testes / Obsah vystačí na <n> testov / Contenido suficiente para <n> pruebas / Räckertill <n> antal tester



Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeda kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen



Negative control / Negativní kontrola / Negativ kontrol / Negatieve controle / Negatiivne kontroll / Negatiivinkontrolli / Contrôle négatif / Negative Kontrolle / Αρνητικός έλεγχος / Negativ kontroll / Controllo negativo / Neigiama kontrolė / Negativ kontroll / Kontrola ujemna / Controllo negativo / Negativna kontrola / Control negativo



Positive control / Pozitivní kontrola / Positiv kontrol / Positieve controle / Positiivne kontroll / Positiivinkontrolli / Contrôle positif / Positive Kontrolle / Θετικός έλεγχος / Pozitiv kontroll / Controllo positivo / Teigiama kontrolė / Positiv kontroll / Kontrola dodatnia / Controllo positivo / Pozitivna kontrola / Control positivo



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 USA
800-638-8663



BENEX Limited
Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate
Shannon, County Clare, Ireland
Tel: 353-61-47-29-20
Fax: 353-61-47-25-46

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD and BD Logo are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2004 BD.