

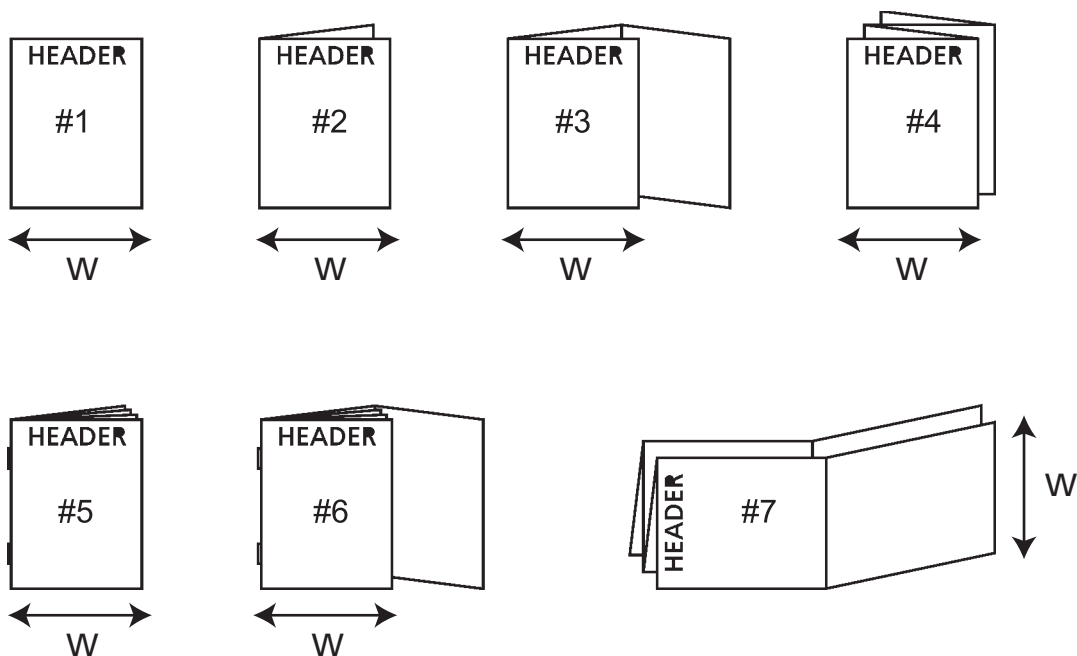
Revisions

BALTSO0191 Version 11.0 Template 4
Inserts

Rev from	Rev to	JOB #
01	02	9509-17

Notes:

- BD Catalog Number: 212536, 212537
- Blank (Sheet) Size: Length: 16 7/8 " Width: 8.5"
- Number of Pages: 12 Number of Sheets: 1
- Page Size: Length: 8.5" Width: 5.5" Final Folded Size: 4.25" x 5.5"
- Ink Colors: No. of Colors: 2 PMS#: 032 Red, Standard Black
- Printed two sides: Yes ☒ No ☐
- Style (see illustrations below): # 7
One vertical fold and two horizontal folds to form a final size of 4 1/4" x 5 1/2" showing English header



- Vendor Printed ☒ Online/In House Printed ☐ Web ☐
- See specification control no. N/A for material information.
- Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level.

Label Design	REVISED BY By Nancy Carlsen at 3:39 pm, Sep 19, 2017	COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION.	 BD Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA
Proofer	PROOFING APPROVED BY By Natalie Morio at 7:17 am, Sep 20, 2017		
Checked By	THIRD EYE BY By Kim Stone at 8:23 am, Sep 20, 2017		
Part Number:	8820211JAA	Category and Description Package Insert, Acridine Orange Stain	Sheet: 1 of 2 Scale: N/A A

BD BBL™ Acridine Orange Stain

English: pages 1 – 3 Italiano: pagine 7 – 9
Français : pages 3 – 5 Español: páginas 9 – 11
Deutsch: Seiten 5 – 7

R_x Only



8820211JAA(02)
2017-09

Contact your local BD representative for instructions. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Pokyny vám poskytne místní zástupce společnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Ota yhteyttä lähimpään BD:n edustajaan ohjeiden saamiseksi. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőjétől. / Нұсқаулар үшін жепринікті BD өкінімен хабарласыңыз. / Lai saņemtu norādījumus, sazinieties ar vietējo BD pārstāvi. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Neem contact op met uw plaatselijke BD-vertegenwoordiger voor instructies. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o representante local da BD para instruções. / Pentru instrucțiuni, contactați reprezentantul local BD. / Для получения указаний обратитесь к местному представителю компании BD. / Instrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Kontakta närmaste BD-representant för anvisningar. / Talimatlar için yerel BD temsilcinizle temasa geçin. / За інструкціями зверніться до місцевого представника компанії BD.

BD BBL™ Acridine Orange Stain	For detecting microorganisms in direct smears by the fluorescent staining technique		Cat. No.
			212536
		1 x 250 mL	212536
		4 x 250 mL	212537

INTENDED USE

BD BBL Acridine Orange Stain is recommended for use in the fluorescent microscopic detection of microorganisms in direct smears prepared from clinical and non-clinical materials. It is particularly useful in the rapid screening of normally sterile specimens, such as cerebrospinal fluid, where few organisms may be present and in the rapid examination of blood smears or smears containing proteinaceous material where differentiation of organisms from background material may be more difficult.

SUMMARY AND EXPLANATION

Fluorochromatic staining of microorganisms using acridine orange was first described by Strugger and Hilbrich in 1942. It has since been widely used in the examination of soil and water for microbial content. In 1975, Jones and Simon evaluated epifluorescent methods used in direct counts of aquatic bacteria and determined that acridine orange provided the best estimate of the bacterial population in lake, river and seawater samples.¹ Acridine orange direct count (AODC) methodology has been used in the enumeration of landfill bacteria.^{2,3} Heidelberg et al. used AODC in a study of seasonal changes in marine bacterial populations and concluded that the acridine orange stain compared favorably to fluorescent oligonucleotide direct counting (FODC) procedures.⁴ Direct epifluorescent filter technique (DEFT) using acridine orange is specified in methods for the microbial examination of food and water.^{5,6,7,8}

Acridine orange has also been used in clinical applications and its use in highlighting bacteria in blood cultures has become widely accepted. In 1980, McCarthy and Senne compared acridine orange staining with blind subcultures for the detection of positive blood cultures.⁹ Their results showed acridine orange staining to be a rapid, inexpensive alternative to blind subcultures. They also reported that the acridine orange stain appeared to be more sensitive than the Gram stain for detecting microorganisms and was able to detect bacteria in concentrations of approximately 1 x 10⁴ CFU (colony-forming units)/mL. Lauer, Reller and Mirret compared acridine orange with the Gram stain for detecting microorganisms in cerebrospinal fluid and other clinical materials.¹⁰ Their results were in agreement with those reported by McCarthy and Senne and showed acridine orange to be a simple, rapid staining procedure which was more sensitive than the Gram stain in detecting microorganisms in clinical materials.

Acridine orange has also been used for the detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal smears,¹¹ diagnosis of malaria^{12,13} and mycoplasmas.¹⁴

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Acridine orange is a fluorochromatic dye which binds to nucleic acids of bacteria and other cells.¹⁵ Under UV light, acridine orange stains RNA and single-stranded DNA orange; double-stranded DNA appears green.

When buffered at pH 3.5–4.0, acridine orange differentially stains microorganisms from cellular materials. Bacteria and fungi uniformly stain bright orange, whereas human epithelial and inflammatory cells and background debris stain pale green to yellow. Nuclei of activated leukocytes stain yellow, orange or red due to increased RNA production resulting from activation. Erythrocytes either do not stain or appear pale green.

Due to this differential staining property, acridine orange-stained smears prepared from clinical materials may be rapidly screened using fluorescent microscopy at 100X to 400X magnification for the presence of microorganisms fluorescing bright orange against a black or pale green to yellow background.

REAGENTS

BD BBL Acridine Orange Stain

Approximate Formula*

Acridine Orange 0.1 g
Acetate Buffer, 0.5 M 1,000 mL

*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Warnings and Precautions: For *in vitro* Diagnostic Use.

Follow proper, established laboratory procedures in handling and disposing of infectious materials.

BD BBL Acridine Orange Stain:

WARNING



H315+H320 Causes skin and eye irritation. **H335** May cause respiratory irritation.

P261 Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapors/spray. **P280** Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. **P264** Wash thoroughly after handling. **P271** Use only outdoors or in a well-ventilated area. **P305+P351+P338** IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. **P321** Specific treatment (see on this label). **P304+P340** IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. **P312** Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell. **P332+P313** If skin irritation occurs: Get medical advice/attention. **P337+P313** If eye irritation persists: Get medical advice/attention. **P302+P352** IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. **P362+P364** Take off contaminated clothing and wash it before reuse. **P405** Store locked up. **P403+P233** Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed. **P501** Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Storage Instructions: Store at 15–30 °C. The expiration date applies to the product in its intact container when stored as directed.

Product Deterioration: Do not use if there is evidence of a precipitate or the solution shows other signs of deterioration.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Specimens should be collected in sterile containers or with sterile swabs and transported immediately to the laboratory in accordance with recommended guidelines.¹⁶

PROCEDURE

Materials Provided: BD BBL Acridine Orange Stain.

Materials Required But Not Provided: Fluorescent microscope suitable for use with acridine orange, glass microscope slides and methanol.

Preparation, Staining and Examination of Smears

1. Prepare a smear of the specimen to be stained on a clean glass slide.
2. Allow to air dry.
3. Fix smear with 50% or 100% methanol for 1–2 min.
4. Drain excess methanol and allow smear to dry.
5. Flood slide with acridine orange stain for 2 min.
6. Rinse thoroughly with tap water and allow to dry.
7. Smears may be initially examined at 100X to 400X magnification using a fluorescent microscope. Findings should be confirmed by examination at 1000X with an oil immersion objective.

USER QUALITY CONTROL

1. Examine the acridine orange staining solution for color and clarity. The solution should be clear, orange and without evidence of a precipitate.
2. Determine the pH of the solution. The pH should be 3.5–4.0.
3. Check the performance of the stain using 4–6 h Tryptic Soy Broth with 5% sheep blood cultures of the organisms indicated below. Prepare smears, one culture per slide, and proceed as described under Preparation, Staining and Examination of Smears.

Organisms	Bacteria	Background
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Bright orange	Pale green erythrocytes and yellow, yellow-green or orange leukocytes against a black field.
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 33186	Bright orange	Green, yellow, orange or red staining debris may be observed.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Acridine orange staining provides presumptive information on the presence and identification of microorganisms which may be present on the specimen. Since microorganisms seen in smears, including non-viables, may arise from external sources, i.e., specimen collection devices, slides, or water used for rinsing, all positive smears should be confirmed by culture.

Approximately 10⁴ CFU/mL are required for detection by this method.

Acridine orange staining does not distinguish between gram-positive and gram-negative organisms. The Gram reaction may be determined by Gram staining directly over the acridine orange after removal of the immersion oil.

Nuclei or granules from disintegrated activated leukocytes may resemble cocci at lower magnifications, i.e., 100X to 400X. They may be distinguished on the basis of morphology at higher magnifications, i.e., 1000X.

Certain types of debris may fluoresce in acridine orange stained smears. This debris may be distinguished from microorganisms on the basis of morphology when viewed at higher magnifications.

EXPECTED RESULTS AND PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Bacteria and fungi stain bright orange. The background appears black to yellow green. Human epithelial and inflammatory cells and tissue debris stain pale green to yellow. Activated leukocytes will stain yellow, orange or red depending upon the level of activation and amount of RNA produced, whereas erythrocytes either do not stain or stain pale green.

REFERENCES

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. Maurusick, and B.S. Schwab. 1993. Enumeration of fermentative and hydrolytic micro-organisms 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. 21:141-202.

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.

Technical Information: In the United States contact BD Technical Service and Support at 1.800.638.8663 or www.bd.com.

 BD BBL Acridine Orange Stain

Français

		N° réf.
BD BBL Acridine Orange Stain	Pour la détection des microorganismes dans les frottis directs par la technique 1 x 250 mL	212536
	de coloration fluorescente	4 x 250 mL 212537

APPLICATION

BD BBL Acridine Orange Stain est recommandée pour la détection microscopique fluorescente des microorganismes dans les frottis directs préparés à partir de matières cliniques et non cliniques. Cette méthode est particulièrement utile dans le dépistage rapide sur les échantillons normalement stériles, tels que le fluide cérébrospinal, où peu d'organismes sont susceptibles d'être présents, et dans l'examen rapide des frottis sanguins ou des frottis contenant des matières protéiniques dans lesquels les organismes sont difficilement différenciables des matières d'arrière-plan.

RESUME ET EXPLICATION

La coloration fluorochromatique des microorganismes utilisant l'orange d'acridine a d'abord été décrite par Strugger et Hilbrich en 1942. Elle est depuis largement répandue dans l'analyse des sols et de l'eau pour leur contenu microbien. En 1975, Jones et Simon ont évalué des méthodes épifluorescentes utilisées dans la numération directe des bactéries aquatiques et déterminé que l'orange d'acridine fournissait la meilleure évaluation de la population bactérienne dans les échantillons prélevés en lac, rivière et eau de mer.¹ La méthodologie de numération directe par l'orange d'acridine (AODC) a été utilisée dans la numération des bactéries de décharges.^{2,3} Heidelberg et al. ont utilisé la méthode AODC dans une étude des changements saisonniers sur les populations bactériennes marines et conclu que la coloration à l'orange d'acridine compare favorablement aux méthodes de numération fluorescente directe des oligonucléotides (FODC).⁴ La technique de filtrage épifluorescente directe (DEFT) utilisant l'orange d'acridine est désignée dans les méthodes liées à l'examen microbien dans les aliments et dans l'eau.^{5,6,7,8}

L'orange d'acridine a également été utilisé en applications cliniques et son rôle mettant en évidence les bactéries dans les hémocultures est maintenant largement accepté. En 1980, McCarthy et Senne ont comparé la coloration à l'orange d'acridine avec des sous-cultures en aveugle pour la détection des hémocultures positives.⁹ Leurs résultats ont montré que la coloration à l'orange d'acridine constitue une alternative rapide et économique aux sous-cultures aveugles. Ils ont également noté que la coloration à l'orange d'acridine paraissait plus sensible que la coloration de Gram pour détecter les microorganismes et qu'elle était capable de détecter les bactéries en concentrations d'environ 1×10^4 UFC (bactéries souches)/mL. Lauer, Reller et Mirret ont comparé l'orange d'acridine avec la coloration de Gram pour détecter les microorganismes dans le fluide cébrospinal et d'autres matières cliniques.¹⁰ Leurs résultats concordaient avec ceux rapportés par McCarthy et Senne et montraient que l'orange d'acridine était une méthode de coloration simple et rapide, plus sensible que la coloration de Gram pour détecter les microorganismes dans les matières cliniques.

L'orange d'acridine a également servi à la détection de *Trichomonas vaginalis* dans les frottis vaginaux¹¹ et le diagnostic de la malaria^{12,13} et des mycoplasmes.¹⁴

PRINCIPES DE LA METHODE

L'orange d'acridine est un colorant fluorochromatique qui se lie aux acides nucléiques des bactéries et d'autres cellules.¹⁵ Sous une lampe UV, l'orange d'acridine marque l'ARN et l'ADN à simple brin en orange ; l'ADN à double brin apparaît en vert.

Dans un tampon dont le pH est compris entre 3,5 et 4,0, l'orange d'acridine marque de manière différentielle les microorganismes par rapport aux matières cellulaires. Les bactéries et les champignons sont marqués uniformément en orange brillant, tandis que les cellules inflammatoires et épithéliales humaines, ainsi que les débris d'arrière-plan, sont marqués d'une couleur allant du vert pâle au jaune. Les noyaux de leucocytes activés sont marqués en jaune, orange ou rouge en raison de la production d'ARN accrue résultant de l'activation. Les érythrocytes ne sont pas marqués ou apparaissent en vert pâle.

En raison de cette propriété de marquage différentiel, les frottis colorés à l'orange d'acridine préparés à partir de matières cliniques peuvent être rapidement examinés en utilisant la microscopie fluorescente à un grossissement x100 ou x400 pour dépister la présence de microorganismes émettant une fluorescence orange brillant contre un arrière-plan noir ou vert pâle à jaune.

REACTIFS

BD BBL Acridine Orange Stain

Formule approximative*

Orange d'acridine 0,1 g

Tampon d'acétate 0,5 M 1 000 mL

*Ajustée et/ou complétée en fonction des critères de performances imposés.

Avertissements et précautions : Réservé au diagnostic *in vitro*.

Suivre les procédures de laboratoire homologuées pour la manipulation et l'élimination des matériaux infectieux.

BD BBL Acridine Orange Stain:

AVERTISSEMENT



H315+H320 Provoque une irritation cutanée et une irritation des yeux. **H335** Peut irriter les voies respiratoires.

P261 Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. **P280** Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. **P264** Se laver soigneusement après manipulation.

P271 Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé. **P305+P351+P338** EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. **P321** Traitement spécifique (voir l'étiquette). **P304+P340** EN CAS D'INHALATION: transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer.

P312 Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. **P332+P313** En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin. **P337+P313** Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin. **P302+P352** EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment à l'eau et au savon. **P362+P364** Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

P405 Garder sous clef. **P403+P233** Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche.

P501 Éliminer le contenu/récipient conformément aux règlements locaux/régionaux/nationaux/internationaux.

Instructions pour la conservation : Conserver à une température comprise entre 15 et 30 °C. La date de péremption s'applique au produit contenu dans son emballage intact et conservé conformément aux instructions.

Détérioration du produit : Ne pas utiliser si un précipité est observé ou si la solution présente des signes de détérioration.

PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Recueillir les échantillons dans des récipients stériles ou au moyen d'écouvillons stériles, et les transporter immédiatement vers le laboratoire en respectant les recommandations en vigueur.¹⁶

METHODE

Matériaux fournis : BD BBL Acridine Orange Stain.

Matériaux requis, mais non fournis : Microscope fluorescent convenant à l'orange d'acridine, lames microscopiques en verre et méthanol.

Préparation, coloration et examen des frottis

- 1. Préparer un frottis de l'échantillon à colorer sur une lame de verre propre.
- 2. Laisser sécher à l'air.
- 3. Fixer le frottis avec 50 % ou 100 % de méthanol pendant 1 à 2 min.
- 4. Eliminer le méthanol en excès et laisser le frottis sécher.
- 5. Recouvrir la lame d'une coloration orange d'acridine pendant 2 min.
- 6. Rincer soigneusement à l'eau courante et laisser sécher.
- 7. Les frottis peuvent être initialement examinés avec un microscope fluorescent en utilisant un grossissement de x100 à x400. Les résultats observés doivent être confirmés au microscope à x1000 avec un objectif à immersion dans l'huile.

CONTRÔLE QUALITE PAR L'UTILISATEUR

- 1. Examiner la couleur et la clarté de la solution d'Acridine Orange Stain. La solution doit être claire, orange et sans trace de précipité.
- 2. Déterminer le pH de la solution. Le pH doit être compris entre 3,5 et 4,0.
- 3. Vérifier les performances de la coloration en utilisant des cultures de bouillon de soja tryptique avec 5 % de sang de mouton pendant 4 à 6 h pour les organismes indiqués ci-dessous. Préparer les frottis, une culture par lame, et respecter la procédure décrite dans Préparation, coloration et examen des frottis.

Microorganismes	Bactéries	Arrière-plan
Escherichia coli ATCC 25922	Orange brillant	Erythrocytes vert pâle et leucocytes jaunes, jaune vert ou orange contre un champ noir.
Enterococcus faecalis ATCC 33186	Orange brillant	Des débris de coloration verte, jaune, orange ou rouge peuvent être observés.

LIMITES DE LA PROCEDURE

La coloration orange d'acridine fournit des informations présumées sur la présence et l'identification des microorganismes susceptibles de se trouver sur l'échantillon. Comme les microorganismes observés dans les frottis, y compris les organismes non viables, peuvent provenir de sources externes, p. ex. des dispositifs de prélèvement d'échantillons, des lames ou des eaux de rinçage usées, tous les frottis positifs doivent être confirmés par une culture.

Il faut environ 10⁴ CFU/mL pour une détection par cette méthode.

La coloration orange d'acridine ne fait pas la distinction entre les organismes Gram positifs et négatifs. La réaction de Gram peut être déterminée par coloration de Gram directement sur l'orange d'acridine après le retrait de l'huile d'immersion.

Les noyaux et les granules provenant des leucocytes activés désintégrés ressemblent parfois à des cocci observés à un grossissement inférieur, c.-à-d. entre x100 et x400. On peut les distinguer en fonction de leur morphologie aux grossissements plus élevés, c.-à-d. à x1000.

Certains types de débris peuvent fluorescer dans les frottis colorés à l'orange d'acridine. Ces débris se distinguent des microorganismes en fonction de leur morphologie lorsqu'ils sont observés aux grossissements supérieurs.

VALEURS ATTENDUES ET CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Les bactéries et les champignons sont marqués en orange brillant. L'arrière-plan affiché est noir à vert jaune. Les cellules inflammatoires et épithéliales humaines et les débris tissulaires sont colorés en vert pâle à jaune. Les leucocytes activés sont colorés en jaune, orange ou rouge, selon le niveau d'activation et la quantité d'ARN produite, tandis que les érythrocytes ne sont pas marqués, ou sont marqués en vert pâle.

RÉFÉRENCES : voir la rubrique « References » du texte anglais.

Service et assistance technique : contacter votre représentant local de BD ou consulter le site www.bd.com.

 BD BBL Acridine Orange Stain		Deutsch	
BD BBL Acridine Orange Stain	Zum Nachweis von Mikroorganismen in Direktabstrichen mit der Fluoreszenzfärbetechnik.	1 x 250 mL	Best.-Nr. 212536
		4 x 250 mL	212537

VERWENDUNGSZWECK

BD BBL Acridine Orange Stain wird empfohlen für den Nachweis von Mikroorganismen in Direktabstrichen von klinischem und nichtklinischem Material unter dem Fluoreszenzmikroskop. Das Verfahren ist besonders nützlich für die schnelle Überprüfung von normalerweise sterilen Proben von z. B. Rückenmarksflüssigkeit, in denen vielleicht nur wenige Mikroorganismen vorhanden sind, oder von Abstrichen mit proteinartigem Material, bei denen die Unterscheidung von Mikroorganismen und Hintergrundmaterial schwierig sein kann.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Die fluorochrome Färbung von Mikroorganismen mit Acridinorange wurde zuerst 1942 von Strugger und Hilbrich beschrieben. Das Verfahren ist inzwischen weit verbreitet und wird für die Analyse von Boden- und Wasserproben auf Mikroorganismen verwendet. 1975 untersuchten Jones und Simon verschiedene Epifluoreszenzverfahren für die direkte quantitative Bestimmung von Mikroorganismen in Wasser und kamen zu dem Schluß, daß man mit Acridinorange die besten Schätzwerte für die bakterielle Population in Süßwassersee-, Fluß- und Meerwasserproben erhält.¹ Direkte Acridinorange-Zählverfahren (AODC)

wurden zur quantitativen Bestimmung von Bakterien auf Mülldeponien verwendet.^{2,3} Heidelberg et al. nutzten AODC-Verfahren für die Untersuchung jahreszeitlich bedingter Veränderungen von mikrobiologischen Meerespopulationen und kamen zu dem Schluß, daß die Acridineorange-Färbung im Vergleich mit direkten Fluoreszenz-Oligonucleotid-Zählverfahren (FODC) gut abschneidet.⁴ Direkte Epifluoreszenz-Filterverfahren (DEFT) unter Verwendung von Acridinorange werden zur mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmittel- und Wasserproben eingesetzt.^{5,6,7,8}

Acridinorange wird auch in klinischen Zusammenhängen verwendet. Zu den weltweit anerkannten Verfahren gehört die Markierung von Bakterien in Blutkulturen. 1980 verglichen McCarthy und Senne die Acridinorange-Färbung mit blinden Subkulturen zum Nachweis positiver Blutkulturen.⁹ Nach ihren Ergebnissen ist die Acridinorange-Färbung eine schnelle und kostengünstige Alternative zu blinden Subkulturen. Die Autoren berichteten auch, daß die Acridinorange-Färbung beim Nachweis von Mikroorganismen empfindlicher ist als die Gramfärbung und Bakterien selbst noch in Konzentrationen von etwa 1×10^4 KBE/mL nachgewiesen werden können. Lauer, Reller und Mirret verglichen Acridinorange mit der Gramfärbung zum Nachweis von Mikroorganismen in der Rückenmarksflüssigkeit und anderen klinischen Proben.¹⁰ Die Ergebnisse stimmen mit den von McCarthy und Senne berichteten überein und zeigten, daß die Acridinorange-Färbung ein einfaches und schnelles Färbeverfahren ist, das beim Nachweis von Mikroorganismen in klinischen Proben empfindlicher reagiert als die Gramfärbung. Acridinorange wird auch für den Nachweis von *Trichomonas vaginalis* in vaginalen Abstrichen,¹¹ zur Malaria-Diagnose^{12,13} und zum Nachweis von Mykoplasmen¹⁴ genutzt.

VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Acridinorange ist ein fluorochromer Farbstoff, der sich mit Nukleinsäuren in Bakterien und anderen Zellen verbindet.¹⁵ Unter UV-Licht färbt Acridinorange RNA und einsträngige DNA orange; doppelsträngige DNA erscheint grün.

Bei einem pH-Wert von 3,5–4,0 gepuffert färbt Acridinorange Mikroorganismen aus Zellmaterial differentiell. Bakterien und Fungi erscheinen einheitlich orange, während menschliche Epithel- und Entzündungszellen sowie Hintergrund-Zelltrümmer grün bis gelb erscheinen. Die Zellkerne aktivierter Leukozyten erscheinen wegen der aktivierungsbedingt gesteigerten RNA-Produktion gelb, orange oder rot. Erythrozyten erscheinen blaßgrün oder gar nicht gefärbt.

Wegen dieser Eigenschaft der differentiellen Färbung scheinen mit Acridinorange gefärbte Abstriche von klinischen Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 100- bis 400fachen Vergrößerung schnell auf das Vorhandensein von Mikroorganismen überprüft werden zu können, die sich hellorange fluoreszierend von einem schwarzen oder blaßgrünen bis gelben Hintergrund abheben.

REAGENZIEN

BD BBL Acridine Orange Stain

Ungefähre Zusammensetzung*

Acridinorange	0,1 g
Acetat-Pufferlösung 0,5 M	1.000 mL

*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen: *In-vitro*-Diagnostikum.

Beim Umgang mit infektiösem Material und bei dessen Entsorgung sind etablierte einschlägige Laborverfahren anzuwenden.

BD BBL Acridine Orange Stain:

WARNUNG



H315+H320 Verursacht Haut- und Augenreizungen. **H335** Kann die Atemwege reizen.

P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. **P280** Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. **P264** Nach Gebrauch gründlich waschen. **P271** Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden. **P305+P351+P338** BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. **P321** Besondere Behandlung (siehe auf diesem Kennzeichnungsetikett). **P304+P340** BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. **P312** Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. **P332+P313** Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. **P337+P313** Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. **P302+P352** BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. **P362+P364** Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. **P405** Unter Verschluss aufbewahren. **P403+P233** Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren. **P501** Inhalt/Behälter gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen.

Aufbewahrung: Bei 15–30 °C aufbewahren. Das angegebene Verfallsdatum gilt für das in der ungeöffneten Packung aufbewahrte Produkt bei Einhaltung der Lagervorschriften.

Haltbarkeit des Produkts: Produkt bei Ausfällungen oder sonstigen Verfallsanzeichen nicht verwenden.

PROBENTNAHME UND -HANDHABUNG

Proben in sterile Behälter oder mit sterilen Wattestäbchen entnehmen und diese entsprechend den Richtlinienempfehlungen unmittelbar zum Labor bringen.¹⁶

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial: BD BBL Acridine Orange Stain.

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial: Fluoreszenzmikroskop, geeignet für Acridinorange; Objektträger (Glas) und Methanol.

Vorbereitung, Färbung und Untersuchung von Abstrichen

- 1. Einen Abstrich der zu färbenden Probe auf einem sauberen Objektträger aus Glas herstellen.
- 2. An der Luft trocknen lassen.
- 3. Abstrich mit 50- oder 100%igem Methanol 1–2 Minuten fixieren.
- 4. Überschüssiges Methanol ablaufen und Abstrich trocknen lassen.
- 5. Objektträger 2 Minuten lang in Acridinorange tränken.
- 6. Gründlich mit Leitungswasser abspülen und trocknen lassen.
- 7. Die Abstriche können zunächst bei 100- bis 400facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Das Ergebnis sollte durch eine Untersuchung mit einem Mikroskop mit Immersionsöl-Objektiv bei 1000facher Vergrößerung bestätigt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE DURCH DEN ANWENDER

- 1. Lösung von Acridine Orange Stain auf Farbe und Transparenz überprüfen. Die Lösung sollte klar und orange sein und keine Niederschläge zeigen.
- 2. pH-Wert der Lösung bestimmen. Er sollte bei 3,5–4,0 liegen.
- 3. Leistung des Tests mit Kulturen der nachstehend aufgeführten Mikroorganismen nach 4–6 Stunden in tryptischer Sojabouillon mit 5 % Schafsblut überprüfen. Abstriche herstellen – eine Kultur pro Objektträger – und wie unter „Vorbereitung, Färbung und Untersuchung von Abstrichen“ vorgehen.

Organismus	Bakterium	Hintergrund
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Hellorange	Blaßgrüne Erythrozyten und gelbe, gelb-grüne oder orange Leukozyten vor schwarzem Hintergrund.
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 33186	Hellorange	Ggf. können grün, gelb, orange oder rot gefärbte Zelltrümmer beobachtet werden.

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Die Acridinorange-Färbung liefert Präsumtivinformationen zum Vorhandensein und zur Identifizierung von Mikroorganismen, die auf einer Probe vorhanden sein können. Da Mikroorganismen in Abstrichen – ebenso nicht lebensfähige – auch externen Ursprungs sein könnten, zum Beispiel von Probensammelgefäßen, Objektträgern oder dem zum Spülen verwendeten Wasser, sollten alle positiven Abstriche durch Kultivierung bestätigt werden.

Für den Nachweis mit Hilfe dieser Methode sind etwa 10⁴ KBE/mL erforderlich.

Die Färbung mit Acridine Orange Stain unterscheidet nicht zwischen grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen. Die Gramreaktion kann durch Gramfärbung direkt über dem Acridinorange nach Entfernen des Immersionsöls bestimmt werden. Zellkerne oder Granulae von zerfallenen aktivierten Leukozyten können bei geringerer Vergrößerung – 100- oder 400fach – Kokken ähneln. Sie lassen sich aber aufgrund ihrer Morphologie bei stärkerer Vergrößerung – 1000fach – differenzieren.

Bestimmte Arten von Zelltrümmern fluoreszieren in mit Acridinorange gefärbten Abstrichen. Diese Zelltrümmer lassen sich aufgrund ihrer Morphologie bei stärkerer Vergrößerung von Mikroorganismen differenzieren.

ZU ERWARTENDE ERGEBNISSE UND LEISTUNGSMERKMALE

Bakteria und Fungi ergeben eine hellorange Färbung. Der Hintergrund erscheint schwarz bis gelblich-grün. Menschliche Epithel- und Entzündungszellen sowie Zelltrümmer erscheinen grün bis gelb. Aktivierte Leukozyten erscheinen gelb, orange oder rot, je nach Aktivierungsgrad und produzierter RNA-Menge. Erythrozyten erscheinen blaßgrün oder gar nicht gefärbt.

LITERATUR: S. „References“ im englischen Text.

Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung in Verbindung oder besuchen Sie www.bd.com.

 BD BBL Acridine Orange Stain			Italiano
			N. di cat.
BD BBL Acridine Orange Stain	Per la rilevazione di microrganismi in strisci diretti mediante tecnica di colorazione in fluorescenza	1 x 250 mL	212536
		4 x 250 mL	212537

USO PREVISTO

L'uso di **BD BBL Acridine Orange Stain** (colorazione con arancio di acridina) è consigliato nella rilevazione microscopica in fluorescenza di microrganismi in strisci diretti allestiti da materiale clinico e non clinico ed è particolarmente utile nello screening rapido di campioni normalmente sterili, come per esempio liquido cerebrospinale, dove possono essere presenti pochi microrganismi e nell'esame rapido di strisci di sangue periferico oppure strisci contenenti materiale proteinaceo in cui la differenziazione di microrganismi dal materiale di fondo può essere più complessa.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

La colorazione fluorocromatica di microrganismi mediante arancio di acridina è stata per la prima volta descritta da Strugger e Hilbrich nel 1942 e da allora ampiamente usata nell'esame del contenuto microbico del terreno e dell'acqua. Nel 1975, Jones e Simon valutarono metodiche in epifluorescenza impiegate in conte dirette di batteri acquatici e conclusero che l'arancio di acridina forniva la stima migliore della popolazione batterica in campioni di acqua lacustre, fluviale e marina.¹ La metodica della conta diretta con arancio di acridina (AODC) è stata impiegata nel calcolo dei batteri di discarica.^{2,3} Heidelberg et al. hanno

usato l'AODC in uno studio delle variazioni stagionali nelle popolazioni batteriche marine, concludendo che la colorazione con arancio di acridina è superiore alle procedure di conta diretta con oligonucleotide fluorescente (FODC).⁴ La tecnica diretta di filtro epifluorescente (DEFT) con arancio di acridina è indicata nelle metodiche per l'esame microbico di alimenti e acqua.^{5,6,7,8}

L'arancio di acridina è stata usata anche in applicazioni cliniche e il suo impiego nell'evidenziazione di batteri in emocoltura è ormai ampiamente accettato. Nel 1980, McCarthy e Senne compararono la colorazione con arancio di acridina con subcolture in cieco per la rilevazione di emocolture positive,⁹ ottenendo risultati attestanti la validità della colorazione con arancio di acridina come alternativa rapida ed economica alle subcolture in cieco. Osservarono inoltre che la colorazione con arancio di acridina appariva più sensibile della colorazione di Gram nella rilevazione di microrganismi ed era in grado di rilevare batteri a concentrazioni di circa 1×10^4 CFU (unità formanti colonie)/mL. Lauer, Reller e Mirret compararono l'arancio di acridina con la colorazione di Gram nella rilevazione di microrganismi nel liquido cerebrospinale e in altro materiale clinico,¹⁰ ottenendo risultati concordi con quelli documentati da McCarthy e Senne, che ne attestavano la semplicità e rapidità e la maggiore sensibilità rispetto alla colorazione di Gram nella rilevazione di microrganismi in materiale clinico.

L'arancio di acridina è stato usato anche per la rilevazione di *Trichomonas vaginalis* in strisci vaginali,¹¹ diagnosi di malaria^{12,13} e micoplasmi.¹⁴

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

L'arancio di acridina è un colorante fluorocromatico che si lega agli acidi nucleici di batteri e di altre cellule.¹⁵ Alla luce UV, l'arancio di acridina colora di arancio l'RNA e il DNA monofilamento, mentre il DNA a doppio filamento appare verde.

All'aggiunta di un tampone con pH 3,5–4,0, l'arancio di acridina colora i microrganismi in modo differente rispetto al materiale cellulare. Batteri e funghi si colorano uniformemente di arancio brillante, mentre le cellule epiteliali e infiammatorie umane e i detriti di fondo si colorano di verde pallido – giallo. I nuclei dei leucociti attivati si colorano di giallo, arancio o rosso a causa della maggiore produzione di RNA derivante dall'attivazione. Gli eritrociti o non si colorano o appaiono di colore verde pallido.

Grazie a questa proprietà di colorazione differenziale, gli strisci colorati con arancio di acridina allestiti da materiale clinico possono essere sottoposti a screening rapido mediante microscopia in fluorescenza a ingrandimento 100X–400X per la presenza di microrganismi con fluorescenza arancio brillante rispetto a un fondo nero o verde pallido – giallo.

REAGENTI

BD BBL Acridine Orange Stain

Formula approssimativa*

Arancio di acridina	0,1 g
Tampone acetato, 0,5M	1000 mL

*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di performance.

Avvertenze e precauzioni- Per uso diagnostico *in vitro*.

Seguire le prassi di laboratorio in materia di manipolazione e smaltimento di materiali infettanti.

BD BBL Acridine Orange Stain:

AVVERTENZA



H315+H320 Provoca irritazione cutanea e oculare. **H335** Può irritare le vie respiratorie.

P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. **P280** Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. **P264** Lavarsi accuratamente dopo l'uso. **P271** Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato.

P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. **P321** Trattamento specifico (vedere l'etichetta).

P304+P340 IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. **P312** In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. **P332+P313** In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. **P337+P313** Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico. **P302+P352** IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone. **P362+P364** Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. **P405** Conservare sotto chiave. **P403+P233** Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato. **P501** Smaltire il prodotto/recipiente in conformità alle normative locali/regionali/nazionali/internazionali.

Modalità di conservazione - Conservare a 15–30 °C. La data di scadenza indicata si riferisce al prodotto in confezionamento integro, correttamente conservato.

Deterioramento del prodotto - Non utilizzare in caso di formazione di precipitati o se la soluzione presenta altri segni di deterioramento.

RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Raccogliere i campioni in contenitori sterili o con tamponi sterili e trasportarli immediatamente in laboratorio secondo le linee guida consigliate.¹⁶

PROCEDURA

Materiali forniti - BD BBL Acridine Orange Stain.

Materiali necessari ma non forniti - Microscopio a fluorescenza adatto all'uso con arancio di acridina, vetrini (di vetro) per microscopio e metanolo.

Preparazione, colorazione ed esame degli strisci

- 1. Allestire uno striscio del campione da colorare su un vetrino pulito.
- 2. Lasciare asciugare all'aria.
- 3. Fissare lo striscio con metanolo al 50% o 100% per 1–2 min.
- 4. Rimuovere il metanolo in eccesso e lasciare asciugare lo striscio.
- 5. Irrorare il vetrino con la colorazione arancio di acridina per 2 min.
- 6. Risciacquare con cura con acqua corrente e lasciare asciugare all'aria.
- 7. Con un microscopio a fluorescenza, esaminare inizialmente gli strisci con un ingrandimento 100X–400X. Confermare i riscontri con un esame a 1000X usando un obiettivo a immersione in olio.

CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

- 1. Esaminare la soluzione di arancio di acridina per verificarne colore e trasparenza. La soluzione deve essere di colore arancio, trasparente e non presentare segni di precipitati.
- 2. Determinare il pH della soluzione. Il pH deve essere 3,5–4,0.
- 3. Controllare le performance della colorazione usando Tryptic Soy Broth di 4–6 h con colture di sangue di montone al 5% dei microrganismi sotto indicati. Allestire gli strisci con una coltura per vetrino e procedere come descritto in Preparazione, colorazione ed esame degli strisci.

Microrganismi	Batteri	Fondo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Arancio brillante	Eritrociti di colore verde pallido e leucociti di colore giallo, giallo-verde o arancio su campo nero.
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 33186	Arancio brillante	Si possono osservare detriti con colorazione verde, gialla, arancio o rossa.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

La colorazione con arancio di acridina fornisce dati presuntivi sulla presenza e l'identificazione di microrganismi eventualmente presenti nel campione. Poiché i microrganismi osservati negli strisci, inclusi quelli non vitali, possono originare da fonti esterne, vale a dire dispositivi di raccolta dei campioni, vetrini o acqua usata per il risciacquo, tutti gli strisci positivi devono essere confermati mediante coltura.

Per la rilevazione con questa metodica, sono necessari circa 10⁴ CFU/mL.

La colorazione con arancio di acridina non distingue i microrganismi gram-positivi da quelli gram-negativi. La reazione di Gram può essere determinata mediante colorazione di Gram direttamente sull'arancio di acridina dopo la rimozione dell'olio di immersione.

A ingrandimenti inferiori, come 100X–400X, i nuclei o i granuli di leucociti attivati frammentati possono rassomigliare a cocci; è comunque possibile distinguerli in base alla morfologia a ingrandimenti superiori, vale a dire 1000X.

Alcuni tipi di detriti possono sviluppare fluorescenza in strisci colorati con arancio di acridina. Questi detriti possono essere distinti dai microrganismi in base alla morfologia, se osservati a ingrandimenti superiori.

RISULTATI ATTESI E PERFORMANCE

Batteri e funghi si colorano di arancio brillante. Il fondo appare nero – giallo/verde. Le cellule epiteliali e infiammatorie umane e i detriti di tessuto si colorano di verde pallido – giallo. I leucociti attivati si colorano di giallo, arancio o rosso a seconda del livello di attivazione e della quantità di RNA prodotto, mentre gli eritrociti o non si colorano o si colorano di verde pallido.

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.

Assistenza e supporto tecnico: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito www.bd.com.

 BD BBL Acridine Orange Stain

Español

		N.º ref.	
BD BBL Acridine Orange Stain	Para la detección de microorganismos en frotis directos mediante la técnica de tinción fluorescente.	1 x 250 mL	212536
		4 x 250 mL	212537

USO PREVISTO

BD BBL Acridine Orange Stain se recomienda para uso en la detección microscópica fluorescente de microorganismos en frotis directos preparados a partir de muestras clínicas y no clínicas. Representa un método particularmente útil para la rápida detección de muestras normalmente estériles, tales como el líquido cefalorraquídeo, en el que pocos organismos pueden estar presentes y en el examen rápido de frotis de sangre o material de naturaleza proteica, en el que sea difícil la diferenciación de los organismos y el material de fondo.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La tinción fluorocromática de microorganismos mediante naranja de acridina fue descrita por primera vez por Strugger y Hilbrich en 1942. Desde entonces se ha utilizado ampliamente para el examen de tierra y agua en busca de contenido microbiano. En 1975, Jones y Simon evaluaron los métodos epifluorescentes utilizados en recuentos directos de bacterias acuáticas y determinaron que la naranja de acridina proporcionaba el mejor cálculo de población bacteriana en muestras de agua marina, fluvial y lacustre¹. La metodología de recuento directo con naranja de acridina (AODC) se ha utilizado para el recuento de bacterias de vertederos de residuos^{2,3}. Heidelberg y col. utilizaron el método AODC en un estudio de cambios

estacionales en las poblaciones de bacterias marinas y llegaron a la conclusión de que la tinción con naranja de acridina presentaba ventajas en comparación con los procedimientos de recuento directo de oligonucleótidos con fluorescencia (FODC).⁴ La técnica de filtro epifluorescente directo (DEFT) con naranja de acridina se especifica en métodos de examen microbiano de alimentos y agua^{5,6,7,8}.

La naranja de acridina también se ha utilizado en aplicaciones clínicas, y su uso para resaltar las bacterias en los hemocultivos se ha aceptado ampliamente. En 1980, McCarthy y Senne compararon la detección con naranja de acridina con los subcultivos a ciegas para la detección de hemocultivos positivos⁹. Sus resultados demostraron que la tinción con naranja de acridina era una alternativa rápida y económica a los subcultivos a ciegas. También reseñaron que la tinción con naranja de acridina parecía ser más sensible que la tinción de Gram para la detección de microorganismos, y fue capaz de detectar bacterias en concentraciones de aproximadamente 1×10^4 UFC (unidades formadoras de colonias)/mL. Lauer, Reller y Mirret compararon la naranja de acridina con la tinción de Gram para la detección de microorganismos en el líquido cefalorraquídeo y otras muestras clínicas¹⁰. Sus resultados concordaron con los publicados por McCarthy y Senne y demostraron que la naranja de acridina era un procedimiento de tinción sencillo y rápido, además de más sensible que la tinción de Gram en la detección de microorganismos en muestras clínicas.

La naranja de acridina también se utilizó para la detección de *Trichomonas vaginalis* en frotis vaginales¹¹, el diagnóstico de paludismo^{12,13} y las micoplasmas¹⁴.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La naranja de acridina es un colorante fluorocromático que se une a los ácidos nucleicos de las bacterias y otras células¹⁵. Bajo la luz ultravioleta, las tinciones de naranja de acridina en el ARN y el ADN monocatenario son de color naranja, y las del ADN bicatenario, verde.

Tamponada con un pH de 3,5–4,0, la naranja de acridina hace posible las tinciones que diferencien los microorganismos de las muestras celulares. Las tinciones de bacterias y hongos son uniformes y de color naranja brillante, mientras que las tinciones de células de inflamación y epiteliales humanas y restos de fondo son de color de verde pálido a amarillo. Las tinciones de los núcleos de leucocitos activados son de color amarillo, naranja o rojo, dado que hay una mayor producción de ARN debido a la activación. Los eritrocitos no producen tinción, o ésta es de color verde pálido.

Debido a esta propiedad de tinción diferencial, las frotis de tinción con naranja de acridina preparadas a partir de muestras clínicas pueden analizarse rápidamente en análisis microscópico fluorescente con un aumento de 100X a 400X en busca de microorganismos de color naranja brillante fluorescente contra un fondo negro o de verde pálido a amarillo.

REACTIVOS

BD BBL Acridine Orange Stain

Fórmula aproximada*

Naranja de acridina	0,1 g
Solución tampón de acetato, 0,5M	1.000 mL

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Advertencias y precauciones: Para uso diagnóstico *in vitro*.

Deben seguirse los procedimientos de laboratorio adecuados y establecidos para la manipulación y la eliminación de materiales infecciosos.

BD BBL Acridine Orange Stain:

ADVERTENCIA



H315+H320 Provoca irritación cutánea y ocular. **H335** Puede irritar las vías respiratorias.

P261 Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. **P280** Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. **P264** Lavarse concienzudamente tras la manipulación. **P271** Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado. **P305+P351+P338** EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. **P321** Se necesita un tratamiento específico (ver en esta etiqueta). **P304+P340** EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. **P312** Llamar a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico en caso de malestar. **P332+P313** En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. **P337+P313** Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. **P302+P352** EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. **P362+P364** Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. **P405** Guardar bajo llave. **P403+P233** Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente cerrado herméticamente. **P501** Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con las normativas locales, regionales, nacionales e internacionales.

Instrucciones para el almacenamiento: Conservar a 15–30 °C. La fecha de caducidad se aplica al producto conservado en su envase intacto de la forma indicada.

Deterioro del producto: No utilizar si existen signos de precipitado o la solución muestra otros signos de deterioro.

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recoger las muestras en recipientes estériles o con torundas estériles y transportarlas de inmediato al laboratorio siguiendo las directrices recomendadas¹⁶.

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados: BD BBL Acridine Orange Stain.

Materiales necesarios pero no suministrados: Microscopio fluorescente adecuado para uso con naranja de acridina, portaobjetos de vidrio para microscopio y metanol.

Preparación, tinción y examen de frotis

1. Prepare un frotis de la muestra a la que se realizará la tinción en un portaobjetos de vidrio limpio.
2. Dejar secar al aire.
3. Fijar el frotis con metanol al 50% o 100% durante 1–2 minutos.
4. Quitar el exceso de metanol para permitir que el frotis se seque.
5. Cubrir el portaobjetos con tinción con naranja de acridina durante 2 minutos.
6. Aclarar a conciencia con agua corriente y dejar secar.
7. El frotis debe examinarse inicialmente con un aumento de 100X a 400X mediante un microscopio fluorescente. Los hallazgos deben confirmarse con un examen a 1000X con un objetivo de inmersión en aceite.

CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO

1. Examine la solución de Acridine Orange Stain para determinar su color y claridad. Dicha solución debe ser transparente, naranja y sin precipitados.
2. Determine el pH de la solución. El pH debe ser de 3,5–4,0.
3. Compruebe el rendimiento de la tinción por medio de caldo triptico de soja de 4–6 h con cultivos de sangre de carnero al 5% inoculados con los organismos que se indican a continuación. Prepare el frotis, un cultivo por portaobjetos, y continúe el procedimiento según se describe en “Preparación, tinción y examen de frotis”.

Microorganismos	Bacterias	Fondo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Naranja brillante	Eritrocitos de color verde pálido y leucocitos de color amarillo, amarillo-verde o naranja contra un fondo negro.
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 33186	Naranja brillante	Se puede observar restos de tinción de color verde, amarillo, naranja o rojo.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La tinción con naranja de acridina proporciona información de la supuesta presencia e identificación de microorganismos que pueden estar presentes en la muestra. Dado que los microorganismos que se observan en frotis, incluidos los no viables, pueden tener un origen externo, es decir, de los dispositivos de recogida de muestras, el portaobjetos o el agua utilizada para aclarar, todos los frotis positivos deben confirmarse mediante un cultivo.

Se requieren aproximadamente 10⁴ UFC/mL para la detección por medio de este método.

La Acridine Orange Stain no distingue entre los organismos grampositivos y los gramnegativos. La reacción de Gram se puede determinar mediante la tinción de Gram de manera directa sobre la naranja de acridina después de retirar el aceite de inmersión.

Los núcleos o gránulos de leucocitos activados desintegrados pueden asemejarse a los cocos si se utiliza un aumento menor, es decir, de 100X a 400X. Se pueden distinguir por su morfología con un aumento mayor, es decir, 1000X.

Ciertos tipos de restos pueden presentar fluorescencia en frotis con tinción con naranja de acridina. Estos restos pueden distinguirse de los microorganismos por su morfología al observarse con un aumento mayor.

RESULTADOS PREVISTOS Y CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Las tinciones de bacterias y hongos son de color naranja brillante. El fondo aparece de color negro a amarillo-verde. Las tinciones de células de inflamación, células epiteliales humanas y restos de tejido son de color verde pálido a amarillo. Las tinciones de leucocitos activados son de color amarillo, naranja o rojo, según el nivel de activación y cantidad de ARN producido, mientras que las tinciones de eritrocitos no presentan color o éste es verde pálido.

REFERENCIAS: Ver “References” en el texto en inglés.

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite www.bd.com.



Manufacturier / Производители / Výrobce / Fabrikant / Hersteller / Κατασκευαστής / Fabricante / Fabricant / Produzovateľ / Gyártó / Fabricante / Атыраушы / 製造元 / Gamnitojas / Ražotājs / Tilviker / Producent / Produčar / Производители / Výrobca / Proizvodac / Tilverkare / Üretici / Виробник / 生产厂商



Use by / Исполняйте до / Spoftebjeite do / Brug før / Verwendbar bis / Χρήση έως / Usar antes de / Kasutada enne / Date de préemption / 사용 기한 / Upotrebiti do / Felhasználásig datuma / Usare entro / Девін надалішня / Naudokite iki / Izljetiot līdz / Houdbaar tot / Brukes før / Stosować do / Prazo de validade / A se utiliza până la / Исполняється до / Použije do / Upotrebiti do / Använd före / Son kullanna tarhi / Використати до / 使用截止日期

YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month)
TTTT-MM-DD / TTTT-MM (MM = края на месеца)
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutning af måned)
JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende)
EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fin del mes)
AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp)
AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois)
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)
EEEE-HH-NN / EEEE-HH (HH = hónap utolsó napja)
AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese)
ЖОЖОК-АА-КК / ЖОЖОК-АА / (АА = айдың соңы)
YYYY-MM-DD/YYYY-MM(MM = 월말)
MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mēnesio pabaiga)
GGGG-MM-DD/GGGG-MM (MM = mēnēsa beigās)
JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = sluttet av måneden)
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês)
AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii)
TTTT-MM-DD / TTTT-MM (MM = koniec miesiąca)
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = sluttet av månaden)
YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu)
PPPP-MM-DD / PPPP-MM (MM = кінєць місяця)
YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = 月末)



Catalog number / Каталоген номер / Katalogové číslo / Katalognummer / Αριθμός καταλόγου / Número de catálogo / Katalognummer / Numéro catalogue / Kataloški broj / Katalogszám / Numero di catalogo / Katalognummer / Каталогный номер / Katalognummers / Catalogus nummer / Numer katalogowy / Numár de catalog / Номер по каталогу / Katalogové číslo / Kataloški broj / Katalog numaras / Номер за каталогом / 目录号



Authorized Representative in the European Community / Официален представител в Европейската общност / Autorizovaný zástupce pro Evropské společenství / Autoriseret representant i De Europæiske Fællesskaber / Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Volltattut esindaja Euroopa Nõukogu / Représentant autorisé pour la Communauté européenne / Autorizirani predstavnik u Evropskoj uniji / Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségben / Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Autorizovano predstavništvo u Evropskoj uniji / Autoriserad representant i Europeiska gemenskapen / Автура Трлпужлиу Үеҗили Темсисли / Уповноважений представник у країнах ЄС / 歐洲共同體授權代表



In Vitro Diagnostic Medical Device / Медицински уред за диагностика ин витро / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostic medical instrument anordning / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro diagnostický iстрický soukceř / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In vitro diagnostika meditsiinaparatuur / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medicinska pomagala za In Vitro Diagnostiku / In vitro diagnostiskil orvosi eszköz / Dispositivo medicale per diagnostica in vitro / Жасанды жағдайда жұмыс істейтін медициналық диагностика аспабы / In vitro Diagnostisch 의료 기기 / In vitro diagnostikos prietaisai / Medicinas ierices, ko lieto in vitro diagnostika / Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek / In vitro diagnostische medischus hulst / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Dispositiv medical pentru diagnostic in vitro / Медицинский прибор для диагностики in vitro / Medicinska pomôcka na diagnostiku in vitro / Medicinski uređaj za in vitro diagnostiku / Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik / In Vitro Diaynoskoti Tibbi Chihaz / Медичний пристрій для діагностики in vitro / 体外诊断医疗设备



Temperature limitation / Температурни ограничения / Teplotni omezení / Temperaturbegrensning / Temperaturbegrenzung / Περιορισμοί θερμοκρασίας / Limitación de temperatura / Temperatuuri piirang / Limites de température / Dovoljena temperatura / Hőmérsékleti határ / Limiti di temperatura / Температураны шектеү / 온도 제한 / Laikymo temperatūra / Temperatūras ierobežojumi / Temperaturlimit / Temperaturbegrensning / Ograniczenie temperatury / Limites de temperatura / Limite de temperatură / Ограничение температуры / Ograničenje teploty / Ograničenje temperature / Temperaturgränser / Sicaklık sınırlaması / Обмеження температури / 温度限制



Batch Code (Lot) / Код на партидата / Kód (císló) száze / Batch-code (lot) / Batch-Code (Charge) / Κυβικός παρτίδας (παρτίδα) / Código de lote (lote) / Partii kod / Número de lot / Lot (kod) / Tétel száma (Lot) / Codice batch (loto) / Топтамa коды / 배치 코드(코드) / Partijos numeris (Lot) / Partijas kods (laidiens) / Lot number / Batch-code (partij) / Kod partii / Код партии / Código do lote / Cod de serie (Lot) / Код серии (lot) / Kód série (šarža) / Lot number / Lot series / Partnummer (Lot) / Partii Kodu (Lot) / Partii Kodu / Код партии / 批号 (亚批)



Contents sufficient for <n> tests / Съдържанието е достатъчно за <n> теста / Dostatečné množství pro <n> testů / Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα για <n> εξετάσεις / Contenido suficiente para <n> pruebas / Küllidane <n> testide jaoks / Contenu suffisant pour <n> tests / Sadržaj za <n> testova / <n> testezhez elegendő / Contenido suficiente per <n> test / <n> testleri yeteri jeniüniki / <n> testler / Innehåller tillräckligt för <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Conteúdo suficiente para <n> testes / Contenu suffisant pentru <n> teste / Достаточо для <n> тестова / <n> testea / Obsah vystačí na <n> testov / Sadržaj dovoljan za <n> testova / Innehåller tillräckligt för <n> analyser / <n> test için yeterli malmeye içerir / Вистачить для аналізів: <n> / 足够进行 <n> 次检测



Consult Instructions for Use / Направете справка в инструкциите за употреба / Prostudujte pokyny k použití / Se brugsanvisningen / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Consultar las instrucciones de uso / Lugeada kasutusjuhendit / Consulter la notice d'emploi / Koristi upute za upotrebu / Olvassa el a használati útastást / Consultare le istruzioni per l'uso / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / 사용 지침 읽으 / Skatylkite naudojimo instrukcijas / Skaffi litošanas pamācību / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consultar as instruções de utilização / Consultă instrucțiunile de utilizare / См. руководство по эксплуатации / Pozri Pokyny na používanie / Pogledajte uputstvo za upotrebu / Se bruksanvisningen / Kullannim Talimatları na basyrum / Див. інструкції за використання / 请参阅使用说明



Positive control / Позитивен контрол / Pozitivni kontrola / Positiv kontrol / Positive Kontrolle / Отрицательный контроль / Control positivo / Positive kontrol / Contrôle positif / Pozitivna kontrola / Pozitiv kontrol / Controllo positivo / Он баылау / 양성 컨트롤 / Teigiama kontrolė / Pozitivná kontrola / Positiveve controle / Kontrola dodatnia / Controllo positivo / Control pozitiv / Позитивный контроль / Pozitiv kontrol / Позитивный контроль / 阳性对照试剂



Negative control / Отрицательный контроль / Negativni kontrola / Negativ kontrol / Negative Kontrolle / Аргитивный мұртұр / Control negativo / Negativeve kontrol / Contrôle négatif / Negativna kontrola / Negativ kontrol / Controllo negativo / Негативтік баылау / 음성 컨트롤 / Neigiama kontrolė / Negativná kontrola / Negativeve controle / Kontrola ujemna / Controllo negativo / Control negativ / Отрицательный контроль / Negatif kontrol / Негативный контроль / 阴性对照试剂

R_x Only
This only applies to US: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner." / S'applique uniquement aux États-Unis: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner." / Vale solo per gli Stati Uniti: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner." / Gilt nur für die USA: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner." / Sólo se aplica a los EE.UU.: "Caution: Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a licensed practitioner."



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

Australian Sponsor:
Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde, NSW 2113
Australia

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
© 2017 BD. BD, the BD Logo and BBL are trademarks of Becton, Dickinson and Company.