

Mikroskopie

- 1.00497 Tb-color modifiziert
- 1.09215 Ziehl-Neelsen Karbolfuchsin Lösung
- 1.01287 Löfflers Metylenblau Lösung
- 1.00327 Salzsäure-Alkohol



In Vitro Diagnostikum

Tb-color modifiziert

Färbekit für den Nachweis von Mykobakterien (AFB) mittels Heißfärbung

Prinzip

Bedingt durch den hohen Wachs- und Lipidanteil in der Zellwand nehmen Mykobakterien Farbstoffe nur sehr langsam auf. Um die Aufnahme des Fuchsin-Farbstoffs und damit die Bildung des Mykolat-Fuchsin-Komplexes in der Zellwand zu beschleunigen, wird die auf das Präparat aufgebrachte Karbolfuchsin-Lösung normalerweise bis zur Dampfentwicklung erhitzt. Haben die Mykobakterien den Farbstoff aufgenommen, geben sie ihn auch bei intensiver Behandlung mit Entfärbelösung wie z.B. Salzsäure-Alkohol kaum wieder ab. Die Mykobakterien werden deshalb als färberisch säure- und alkoholfest bezeichnet und erscheinen im mikroskopischen Präparat rot gefärbt, während alle nicht säurefesten Mikroorganismen sich entsprechend der Gegenfärbung anfärben

Anwendung

Mikroskopische Untersuchung von Mykobakterien.
Der Tb-color modifiziert Färbekit basiert auf der klassischen Ziehl-Neelsen Färbemethode.

Material

Luftgetrocknete, hitzefixierte Ausstriche von bakteriologischem Material wie Sputum, FNAB, Spülflüssigkeiten, Imprinte, Ergüsse, Eiter, Exsudate, flüssige und feste Kulturen, histologische Schnitte.

Probenvorbereitung

Sputum

Sputum sollte zur Freisetzung der Mykobakterien aus Schleim mit Sputofluol® vorbehandelt werden. Der aktive Wirkstoff im Sputofluol® ist Hypochlorit, das auf oxidativem Weg das organische Material bei weitgehender Schonung der Mykobakterien auflöst.

1 Teil der Probe (min. 2 ml) im Zentrifugenröhrchen mit 3 Teilen einer 15%igen, mit Aqua dest. angesetzten Sputofluol®-Lösung mischen, unter kräftigem Schütteln 10 min einwirken lassen. 20 min bei 3000 – 4800 U/ min zentrifugieren, die überstehende Flüssigkeit dekantieren, das Sediment austreichen und trocknen lassen.

Punktate, Lavagen, Sedimente

Proben nach geeigneten Anreicherungs-schritten auf dem Objektträger austreichen und lufttrocknen lassen.

Histologische Schnitte

Schnitte in typischer Weise entparaffinieren und in absteigender Alkoholreihe rehydratisieren.

Fixierung

Die Fixierung wird über der Bunsenbrennerflamme (2-3 mal unter Vermeidung zu starker Hitzeeinwirkung) durchgeführt.

Das Material kann auch 20 min bei 100-110°C in einem Trockenschrank oder auf einer Wärmeplatte fixiert werden.

Reagenzien

Merck Art. Nr. 1.00497, Tb-color modifiziert Färbekit
Inhalt:

Lösung 1	Tb-color modifiziert Karbolfuchsin Lösung	500 ml
Lösung 2	Tb-color modifiziert Salzsäure-Alkohol	500 ml (2x)
Lösung 3	Tb-color modifiziert Metylenblau Lösung	500 ml

Einzellösungen

Merck Art. Nr. 1.09215	Ziehl-Neelsen Karbolfuchsin Lösung	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Merck Art. Nr. 1.01287	Löfflers Metylenblau Lösung	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Merck Art. Nr. 1.00327	Salzsäure-Alkohol	1 l, 2,5 l

Durchführung

Färbebank

1. Präparate vollständig mit Tb-color modifiziert Karbolfuchsin Lösung bedecken. Vorsichtig mit dem Bunsenbrenner 3 x von unten erhitzen bis zur Dampfentwicklung und insgesamt 5 min färben. Die Färbelösung darf nicht kochen.
2. Mit Leitungswasser waschen, bis keine Farbwolken mehr abgehen
3. Präparate vollständig mit Tb-color modifiziert Salzsäure-Alkohol Lösung bedecken und in Abhängigkeit von der Dicke des Materials 15 - 30 sec einwirken lassen
4. Unverzüglich mit Leitungswasser spülen
5. Gegenfärbung für 30 sec mit Tb-color modifiziert Metylenblau Lösung oder 1 min mit verdünnter Tb-color modifiziert Metylenblau Lösung (Verdünnung: 1: 10 (1+9) mit dest. Wasser)
6. Sorgfältig mit Leitungswasser spülen
7. Trocknen

Präparate trocknen lassen und ggf. mit Entellan® Neu oder Neo-Mount® eindecken. Histologische Präparate entwässern (aufsteigende Alkoholreihe) und mit Entellan® Neu oder Neo-Mount® eindecken.

Resultat

Mykobakterien	rot
Hintergrund	hellblau

Auswertung

Ein positiver Befund bedeutet "säurefeste Stäbchen vorhanden", und ein negativer Befund bedeutet "säurefeste Stäbchen nicht vorhanden". Es kann nicht unterschieden werden, ob es sich um Mykobakterien tuberculosis oder andere Mykobakterien handelt, auch kann man nicht feststellen, ob die Bakterien aktiv oder abgestorben sind.
Werden Mykobakterien gefunden, sollten weitere Untersuchungen in Speziallabors durchgeführt werden.

Technischer Hinweis

Das verwendete Mikroskop sollte den Anforderungen eines medizinisch-diagnostischen Labors entsprechen.

Präparation der Proben

Alle Proben sind entsprechend dem Stand der Technik zu behandeln.
Alle Proben sind eindeutig zu kennzeichnen.
Geeignete Instrumente sind zur Probenentnahme und bei der Präparation zu verwenden, die Anweisungen des Herstellers für die Anwendung/ den Gebrauch sind zu befolgen.

Diagnostik

Diagnosen sind nur von autorisierten und geschulten Personen zu erstellen. Gültige Nomenklaturen sind anzuwenden.
Weiterführende Tests sind nach anerkannten Methoden auszuwählen und durchzuführen.

Lagerung

Den Färbekit und die Färbelösungen bei +15°C bis +25°C lagern. Nach dem ersten Öffnen der Flasche bei +15°C bis +25°C aufbewahrt bis zum Verfallsdatum verwendbar.

Haltbarkeit

Die Lösungen sind bis zum angegebenen Verfallsdatum zu verwenden.
Die Flaschen sind stets gut geschlossen zu halten.

Kapazität

Der Kit ist für bis zu 200 Präparate und die Lösungen sind für 200/>1000 Präparate je nach Packungsgröße ausreichend.

Gebrauchshinweise

Um Fehler zu vermeiden, ist die Färbung von Fachpersonal durchzuführen. Nur für professionelle Anwendung.
Nationale Richtlinien für Arbeitssicherheit und Qualitätssicherung sind zu befolgen.
Entsprechend dem Standard ausgestattete Mikroskope sind zu verwenden. Bei Bedarf ist eine dem Laborstandard und den Anforderungen entsprechende Zentrifuge zu verwenden.

Infektionsschutz

Auf wirksamen Infektionsschutz entsprechend der Laborrichtlinien ist unbedingt zu achten.

Entsorgungshinweise

Gebrauchte Lösungen und Lösungen mit abgelaufener Haltbarkeit sind als Sondermüll zu entsorgen, dabei ist den lokalen Entsorgungsrichtlinien zu folgen.
Merck bietet neben der Rücknahme gebrauchter oder verfallener Produkte über den Retrologistik Service, auch die technische Unterstützung für lokale Entsorgungslösungen an.

Hilfsmittel

Art. Nr. 1.08000	Sputofluol®	1 l
1.04699	Immersionöl	100 ml, 500 ml
1.15577	Immersionöl	100 ml
	nach DIN ISO 8036-1	
1.06965	Zedernholzöl	100 ml

Art. Nr. 1.07961.	Entellan® Neu (Schnelleindeckmittel)	100 ml, 500 ml
Art. Nr. 1.09016	Neo-Mount®	500 ml
Art. Nr. 1.09843	Neo-Clear®	5 l
Art. Nr. 1.00974	Ethanol vergällt mit 1% Ethylmethylketon zur Analyse	1l, 2,5 l
Art. Nr. 1.00983	Ethanol absolut z.A. ACS, ISO	1l, 2,5 l
Art. Nr. 1.08681	Xylol z.A. ACS, ISO	1l, 2,5 l

GefahrstoffEinstufung

Art. Nr. 1.00497

Die GefahrstoffEinstufung auf dem Etikett und die Angaben im Sicherheitsdatenblatt beachten.

Das Merck Sicherheitsdatenblatt ist erhältlich im Internet und auf Anfrage.

Hauptbestandteile des Produktes

Art. Nr. 1.00497

Lösung 1 oder Art.Nr. 1.09215

C.I. 42520	6,3 g/l
C ₆ H ₅ OH	40 g/l
1l =	0,99 kg

Lösung 2 oder Art. Nr. 1.00327 (2X)

HCl	0.75 %
Enthält C ₂ H ₅ OH	
1 l =	0,90 kg

Lösung 3 oder Art. Nr. 1.01287

C.I. 52015	4.2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 – 8,6
1l =	0,97 kg

August 2004



Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany, Tel.: +49 6151 72 0