

Mikroskopie

1.01597 Tb-fluor, phenolfrei



In Vitro Diagnostikum

Tb-fluor phenolfrei

Färbeset für die Untersuchung von Mykobakterien mit der Fluoreszenzmikroskopie (Auramin-Rhodamin-Färbung)

Prinzip

Die Säurefestigkeit von Mykobakterien beruht darauf, daß eine wachsartige Hülle der Membran bei diesen Keimen die Abgabe einmal aufgenommener Farbstoffe durch Säurebehandlung verhindert. Hier wird durch den Einsatz einer **modifizierten** Färbelösung auf Phenol in der Färbelösung verzichtet. Sensitivität und Spezifität der Färbergebnisse sind identisch mit der klassischen (phenolhaltigen) Färbemethode.

Material

Als Untersuchungsgut kommen Sputum, Pleurapunktate, Bronchiallavage, Urinsedimente, FNAB, Imprinte, Kulturpräparate und histologische Schnitte in Frage.

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.

Zusammensetzung des Färbesets

Das Färbeset enthält 4 Flaschen à 200 ml mit:

Lösung 1 Auramin-Rhodamin-Färbelösung	200 ml
Lösung 2 Entfärbelösung	2 x 200 ml
Lösung 3 Gegenfärbelösung (KMnO ₄)	200 ml

Färbung auf der Färbekbank

- Die luftgetrockneten, hitzefixierten Präparate vollständig mit Auramin-Rhodamin-Färbelösung (Lös. 1) bedecken und 15 min färben.
- Sorgfältig mit Leitungswasser abspülen – 30 sek
- Die Präparate vollständig mit Entfärbelösung (Lös. 2) bedecken und 1 min einwirken lassen
- Sorgfältig mit Leitungswasser abspülen – 30 sek.
- Die Präparate vollständig mit KMnO₄ Gegenfärbelösung (Lös. 3) bedecken und 5 min färben
- Sorgfältig mit Leitungswasser abspülen – 30 sek.

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.

Färbergebnis

Säurefeste Stäbchen erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop rot-orange oder gelb-grün, je nach verwendeter Filterkombination, vor dunklem Hintergrund.

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 tuberkulosis 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.

Technische Ausstattung

Empfohlene Filterkombination für die Fluoreszenzmikroskopie:

Anregungsfilter	490 – 570 nm
Farbteiler	525 und 635 nm
Sperrfilter	505 – 600 nm

Doppelte Anfärbung

Jedes zweifelhafte oder verdächtige Ergebnis kann mit der Durchführung der doppelten Anfärbung „Tb-fluor – Tb-color“ oder „Tb-fluor – Tb-color modifiziert“ bestätigt werden. Für die mit Tb-fluor angefärbten, nicht eingedeckten Präparate wird zuerst nur Immersionsöl zur Diagnostik verwendet. Danach wird das Immersionsöl sorgfältig entfernt, die trocknen Präparate werden dann mit Tb-color oder Tb-color modifiziert gefärbt. Die Mykobakterien heben sich magentafarbig vor hellgrünem (Tb-color) oder hellblauen (Tb-color mod.) Hintergrund ab.

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

Der Färbekit ist bei +15°C bis +25°C zu lagern. Nach dem ersten Öffnen der Flasche bei +15°C bis +25°C aufbewahrt bis zum Verfallsdatum verwendbar. Die Lösungen sind bis zum angegebenen Verfallsdatum zu verwenden.

Haltbarkeit

Die Flaschen sind stets gut geschlossen zu halten.

Kapazität

Der Kit ist für bis zu 60-65 Präparate 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.

Hilfsreagenzien

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. 1.15577.	Immersionöl nach DIN ISO 8036-1	100 ml
Art. Nr. 1.04699.	Immersionsöl	100 ml, 500 ml
Art. Nr. 1.16450.	Tb-color (Kaltfärbung)	1 Kit
Art. Nr. 1.09215	Ziehl-Neelsen Karbofuchsin Lösung	500 ml, 2.5l
Art. Nr. 1.01287	Löfflers Metylenblau Lösung	500 ml, 2.5l
Art. Nr. 1.00327	Salzsäure-Alkohol	500 ml, 2.5l
Art. Nr 1.00974	Ethanol vergällt mit 1% Ethylmethylketon zur Analyse	1l, 2,5l
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. 1.01597

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

Das Merck Sicherheitsdatenblatt ist erhältlich im Internet und auf Anfrage.

Hauptbestandteile des Produkts

Lösung 1

C.I. 45170	6,0 g/l
C.I. 41000	12,0 g/l
Dichte	1,117

Lösung 2; 3

C ₃ H ₆ O	543,3 g/l
HCl	15,7 g/l
Dichte	0,878

Lösung 4

KMnO ₄	5,0 g/l
Dichte	1,013

September 2004



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