



# Tb-Stain

## Färbekit (Kaltfärbung) für die mikroskopische Untersuchung von Mycobakterien

### Prinzip

Tb-Stain ist ein Farbeset zur mikroskopischen Färbung von Mycobakterien auf der Basis einer modifizierten Ziehl-Neelsen-Färbung. Die anzuwendende Kaltfärbung erübrigt die sonst notwendige Erwärmung der Karbolfuchsinlösung, dadurch werden Phenoldämpfe weitgehend vermieden. Säurefeste Bakterien, z. B. Tuberkulose-Bakterien, haben eine stark lipidhaltige, wachsartige Hülle. Diese verhindert, dass die durch Färbung aufgenommenen Farbstoffe durch Säurebehandlung (Salzsäure-Alkohol) wieder abgegeben werden. Die säurefesten Mycobakterien erscheinen im mikroskopischen Präparat rot gefärbt, nicht säurefeste Mikroorganismen erscheinen dagegen im Farbbild der Gegenfärbung.

### Reagenzien

Die Reagenzien sind bei angegebener Lagertemperatur haltbar bis zum Ende des aufgedruckten Verfallsdatums. Angebrochene Flaschen sind in kontaminationsfreiem Zustand mindestens ca. 4 Monate haltbar.

Flaschen stets gut geschlossen halten.

Bei Lagerung unter +15 °C können Farbstoffniederschläge auftreten. Diese können durch Erwärmung im Wasserbad bei 60 °C über einen Zeitraum von 4 Stunden (zwischendurch mischen) wieder gelöst werden.

Sputosolve kann durch Wärme- und Lichteinwirkung ausgasen. Um ein Aufblähen der Flasche (Berstgefahr) zu vermeiden, ist diese nach Erhalt gegen entstehenden Innendruck durch Lockern des Verschlusses zu sichern und danach stehend aufzubewahren.

Die Reagenzien sollen nicht unter Raumtemperatur 20 °C verwendet werden.

### Gefahren und Sicherheit

Beachten Sie die notwendigen Vorsichtsmaßnahmen im Gebrauch von Laborreagenzien und Körperflüssigkeiten, sowie mikrobiologischer Proben. Der Umgang sollte durch sachkundiges Personal erfolgen. Nationale und interne Labor-Richtlinien für Arbeitssicherheit und Infektionsschutz sind zu befolgen. Tragen Sie geeignete Schutzkleidung und Einmalhandschuhe während der Arbeit. Es ist auf wirksamen Infektionsschutz entsprechend der Laborrichtlinien zu achten.



Für weitere und allgemeine Sicherheitshinweise beachten Sie bitte auch die Angaben auf dem Etikett und das entsprechende Sicherheitsdatenblatt (SDB/SDS).

Die Sicherheitseinstufungen wurden nach den gesetzlichen Richtlinien vorgenommen. Bei Differenzen in der Kennzeichnung oder den Sicherheitsangaben zwischen Etikett und SDS gelten die Angaben des SDS.

Download über QR-Code oder Link:

- [www.sds-id.com/100144-9](http://www.sds-id.com/100144-9)
- [www.sds-id.com/100145-8](http://www.sds-id.com/100145-8)
- [www.sds-id.com/100146-7](http://www.sds-id.com/100146-7)
- [www.sds-id.com/100147-6](http://www.sds-id.com/100147-6)

- (Tb-Stain - Sputosolve)
- (Tb-Stain - Karbolfuchsin)
- (Tb-Stain - Entfärbelösung)
- (Tb-Stain - Malachitgrün)

### Inhalt/Hauptbestandteile

003831-...	Cont.	NaOCl ~5 %, NaOH ~7.5 %
003832-...	Cont.	6 g/l C.I. 42510/42520, 40 g/l C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH
003833-...	Cont.	Chlorwasserstoff 0,75 % in C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH.
003834-...	Cont.	2 g/l C.I. 42000

### 003830-6001 KIT Tb-Stain

003831-1010	R1	1x	1.0l	Tb-Stain Sputosolve (Konzentrat)
003832-0500	R2	1x	500 ml	Tb-Stain Karbolfuchsinlösung
003833-1010	R3	1x	1.0l	Tb-Stain Entfärbelösung (Salzsäure-Alkohol)
003834-0500	R4	1x	500 ml	Tb-Stain Malachitgrünoxalatlösung

Der Färbekit reicht für etwa 250 Färbungen

Die Lösungen stehen auch als Einzellösungen in verschiedenen Gebindegrößen zur Verfügung.

### Zusätzlich benötigte oder empfohlene Materialien

Immersionöl, Eindeckmittel, Objektträger etc.

### Reagenz Vorbereitung

R1a:	Sputosolve-Gebrauchslösung 15% (Verdünnung 15:100):		
Ansatz:	100 ml	500 ml	1000 ml
<b>Sputosolve Konzentrat</b>	<b>15 ml</b>	<b>75 ml</b>	<b>150 ml</b>
<b>Aqua dest.</b>	<b>85 ml</b>	<b>425 ml</b>	<b>850 ml</b>

Mischen und dunkel lagern.

### Hinweise

Nur kontaminationsfreie Arbeitsmittel verwenden. Vorsichtsmaßnahmen beachten.

### Geräte

Mikroskop, Färbekbank, Zentrifuge, Objektträger, Zentrifugenröhrchen, Aqua dem. Die Verwendung von Färbautomaten ist möglich.

### Probenmaterial

Bakteriologische Materialien wie Sputum, Imprinte, Spülflüssigkeiten, Ergüsse, Eiter, Exsudate, FNAB (fine needle aspiration biopsies), flüssige und feste Kulturen, histologische Schnitte.

Zur Tb-Diagnose dient vor allem Sputum, da dieser meist Tuberkulose-Bakterien in sehr hoher Zahl enthält (>10<sup>4</sup>/ml). Die Mindestprobenmenge beträgt etwa 2 ml. Untersuchungsgut möglichst am gleichen Tag verarbeiten oder im Kühlschrank über max. 24 h lagern.

Um die Tb-Bakterien aus dem Sputum freizusetzen, d.h. von den umhüllenden Schleim- und Zellmassen zu befreien, wird eine Behandlung mit Sputosolve durchgeführt. Dabei wird das organische Material unter weitgehender Schonung der säure- und alkalifester Tuberkulose-Bakterien aufgelöst. Die übrigen, meist unerwünschten Keime werden z. T. abgetötet

## Durchführung

### Probenvorbereitung:

#### Sputum

Zur Freisetzung von Mycobakterien aus dem Schleim und aus Zellverbänden des Sputums soll dieser mit Sputusolve vorbehandelt werden. Das enthaltene Hypochlorit wirkt oxidativ auf das Material und setzt die Mycobakterien schonend frei.

Probenansatz (im Zentrifugenröhrchen):	
<b>Probe</b>	<b>1 Teil</b>
<b>Tb-Stain R1a Sputusolve 15%</b>	<b>3 Teile</b>
Verschließen und kräftig schütteln	10 min
Zentrifugieren bei 3000...4800 RPM (U/min)	20 min
Überstehende Flüssigkeit dekantieren. Von dem Sediment Ausstrich anfertigen. Lufttrocknen lassen.	

#### Histologische Schnitte

Schnitte wie bekannt entparaffinieren und in absteigender Ethanol-Reihe rehydratisieren. Die Vorbehandlung mit Sputusolve entfällt für formalinfizierte Proben.

#### Sonstiges Probenmaterial

Ausstriche nach geeignetem Anreicherungsschritt anfertigen, lufttrocknen und hitzefixieren.

#### Fixierung:

Die Ausstriche werden über einer Bunsenbrennerflamme fixiert (2...3 mal unter Vermeidung zu starker Hitzeeinwirkung).

Alternativ kann auch 20 min bei 100...110 °C im Trockenschrank oder auf einer Wärmeplatte fixiert werden. Intensive Wärmeeinwirkung beeinträchtigt die Färbbarkeit der Zellen.

#### Färbung auf der Färbebank:

Objektträger mit fixiertem Ausstrich waagrecht ausrichten.	
<b>Tb-Stain R2 (Karbolfuchsin)</b>	<b>5 min</b>
Vollständig bedecken, danach mit Leitungswasser abspülen, bis keine Farbwolken mehr abgehen.	
<b>Tb-Stain R3 (Entfärbung)</b>	<b>15...30 sec *</b>
Ganz überschichten und einwirken lassen. Mit Leitungswasser unverzüglich abspülen. * Einwirkdauer Abhängig von der Dicke des Materials.	
<b>Tb-Stain R4 (Malachitgrünloxalat)</b>	<b>1...2 min</b>
Präparat vollständig bedecken. Mit fließendem Leitungswasser sorgfältig abspülen 10 sec. Lufttrocknung über Nacht oder bei 50 °C im Trockenschrank.	

Histologische Schnitte dürfen nach der Gegenfärbung nicht entwässert werden, da sonst Farbstoff ausgewaschen wird.

Löst sich Untersuchungsgut öfters vom Objektträger ab, so ist das vorausgehende Beschichten der Objektträger mit einem Albumin-Glycerin-Gemisch angebracht (Produktinformation und Albumin-Glycerin-Reagenz auf Anfrage).

Bei der Durchführung der Färbung streng darauf achten, dass keine säurefesten Stäbchen von einem zum anderen Objektträger verschleppt werden können.

#### Färbung im Färbeautomaten:

Objektträger sollen zwischen den Färbeschritten gut abtropfen um eine unnötige Verschleppung von Reagenz zu vermeiden.

Objektträger mit fixiertem Ausstrich.	Zeit:	Station:
<b>Tb-Stain R2 (Karbolfuchsinlösung) *</b>	<b>5 min</b>	<b>1</b>
Waschen mit Leitungswasser	45 sec	5
<b>Tb-Stain R3 (Entfärbelösung)</b>	<b>15 sec</b>	<b>2</b>
Waschen mit Leitungswasser	15 sec	5
<b>Tb-Stain R4 (Malachitgrünloxalatlösung)</b>	<b>60 sec</b>	<b>3</b>
Waschen mit Leitungswasser	10 sec	5
Lufttrocknung über Nacht auf Station 6 oder Trocknung im Trockenschrank bei 50 °C. * Lösung in Station 1 nach ca. 12 Durchgängen oder bei Bedarf wechseln.		

## Auswertung

Die mikroskopisch Durchmusterung des gefärbten Präparates im Hellfeld mind. 5 min bei 100× Objektivvergrößerung mit Immersionsöl durchführen. Die säurefesten Mycobakterien heben sich bei guter Färbung deutlich rot von dem amorphen, hellgrünen Hintergrund ab.

## Befund

Positiver Befund: "säurefeste Stäbchen nachgewiesen".

Negativer Befund: "säurefeste Stäbchen nicht nachgewiesen".

Es kann keine Aussage gemacht werden darüber, ob es sich bei den säurefesten Stäbchen um Tuberkulose-Bakterien (*Mycobacterium tuberculosis*), oder um andere Mycobakterien handelt. Ebenso kann nicht zwischen lebenden (aktiven) und abgestorbenen (inaktiven) Bakterien unterschieden werden. Nach Diagnose säurefester Stäbchen im Untersuchungsmaterial sind weiterführende Untersuchungen in einem Speziallabor angebracht.

## Diagnostik

Diagnosen sind nur von autorisierten und ausreichend geschulten Personen zu erstellen. Anzuwenden sind gültige Nomenklaturen.

Weiterführende Tests sind nach anerkannten Methoden auszuwählen und durchzuführen.

Geeignete Kontrollen sollten bei jeder Durchführung mitgeführt werden, um ein fehlerhaftes Ergebnis auszuschließen.

## Infektionsschutz

Es sind die einschlägigen Unfallverhütungsvorschriften und die jeweils gültigen Richtlinien über Desinfektionsmaßnahmen bei Tuberkulose zu beachten. Es muss die sichere Abtötung der evtl. vorhandenen Mycobakterien gewährleistet sein. Bei der Arbeit mit flüssigem Untersuchungsgut empfiehlt sich die Abdeckung des Arbeitsplatzes mit desinfektionsmittelgetränktem Zellstoff. Arbeiten, bei denen die Gefahr einer Aerosolbildung besteht, (z.B. Entfernen von Röhrchenverschlüssen) müssen unter einem Abzug mit Bakterienfilter durchgeführt werden. Zentrifugieren darf ebenfalls wegen der Gefahr der Aerosolbildung nur in dicht verschlossenen Gefäßen erfolgen. Abfall (Zentrifugat-Überstand, gebrauchte Zentrifugenröhrchen, Objektträger etc.) gelten als infektiös und sind entsprechend zu behandeln bzw. zu entsorgen.

## Hinweise

### Klassifizierungen

Nicht für die Humandiagnostik.

### Unterstützung / Infoservice

Methodische und technische Unterstützung erhalten Sie per E-Mail unter [support@bioanalytic.de](mailto:support@bioanalytic.de).

Überprüfen Sie die Aktualität dieser Produktinformation regelmäßig auf unseren Internetseiten.

### Rückmeldungen

Hinweise der Anwender können an [support@bioanalytic.de](mailto:support@bioanalytic.de) berichtet werden. Vorschläge werden für weitere Entwicklungen berücksichtigt.

### Entsorgung

Bitte beachten Sie die gesetzlichen Vorschriften.

Gebrauchte und verfallene Lösungen sind entsprechend der lokalen Vorschriften zu entsorgen. Innerhalb der EU gelten die Vorschriften auf der Grundlage Richtlinie 67/548/EWG des Rates der Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe, in der jeweils gültigen Fassung.

Dekontaminierte Verpackungen können dem Hausmüll oder Recycling zugeführt werden, soweit nicht anders geregelt.

Infektiöse Materialien entsorgen Sie inaktiviert entsprechend der behördlichen Vorschriften.

### Bestellinformation

Alle Reagenzien sind auch separat erhältlich (auch in anderen Abfüllungen), bei Bedarf ebenso Löffler's Methyleneblaulösung und Albumin-Glycerin-Lösung.