

1.01597.0001 **REF**

Microscopy

AFB-Fluor phenol-free

Staining kit for the examination of acid-fast bacteria with fluorescence microscopy (Auramin-Rhodamine staining)

For professional use only

IVD In Vitro Diagnostic Medical Device



Intended purpose

This "AFB-Fluor phenol-free - Staining kit for the examination of acid-fast bacteria with fluorescence microscopy (Auramin-Rhodamine staining)" is used for human-medical cell diagnosis and serves the purpose of the bacteriological, cytological, and histological investigation of sample material of human origin. It is a ready-to-use staining kit that when used together with other *in vitro* diagnostic products from our portfolio makes bacterial target structures evaluable for diagnostic purposes (acid-fast bacteria (AFB)) by fixing, embedding, staining, counterstaining, mounting in bacteriological, cytological, and histological specimen materials, for example smears of enriched bacterial cultures or histological sections of e.g. the lung.

The decisive feature of the AFB-Fluor phenol-free staining kit is the presence of fluorescence dyes in the staining solution. This enables the swift and secure identification of the acid-fast bacteria under the fluorescence microscope. In addition, the staining solution is prepared without potentially hazardous phenol, enhancing the safety of the user.

This staining set is supplied ready-for-use in practical dropping bottles and contains all the reagents required for the staining of acid-fast bacteria in smear specimens and in histological tissue specimens.

Unstained structures are relatively low in contrast and are extremely difficult to distinguish under the light microscope. The images created using the staining solutions help the authorized and qualified investigator to better define the form and structure in such cases. Further tests must be carried out according to recognized, valid methods to reach a definitive diagnosis.

Principle

The classic Ziehl-Neelsen method is determined by the high proportion of wax and lipids in the cell wall, since acid-fast bacteria take up staining dyes only very slowly. As a measure to enhance the absorption of the fuchsin dye and thus the formation of the mycolate-fuchsin complex in the cell wall, the staining solution applied to the specimen is normally heated to evaporation point.

Once the acid-fast bacteria have absorbed the fuchsin dye, it is virtually impossible to decolorize them again, even when they are intensively treated with a decolorizing solution such as e.g. hydrochloric acid in ethanol. Accordingly, acid-fast bacteria are termed as acid- and alcohol-fast for staining.

When using the AFB-Fluor phenol-free staining kit, the use of the fluorescent dyes auramine and rhodamine in the AFB-Fluor phenol-free staining solution render the heating step unnecessary. These dyes deposit on the cell wall of the acid-fast bacteria and, depending on the microscope filter, appear yellow or red against a black background.

Pretreatment of the specimens with Sputofluor™ dissolves the bacteria from the surrounding viscid sputum and cell material.

Sample material

Smears of bacteriological material that have been air-dried, heat-fixed, and pretreated with Sputofluor™ like sputum, smears from fine needle aspiration biopsies (FNAB), rinses, imprints, effusions, pus, exudates, liquid and solid cultures

Sections of formalin-fixed tissue of human origin, embedded in paraffin (3 - 4 µm thick paraffin sections)

Reagents

Cat. No. 1.01597.0001

AFB-Fluor phenol-free

Staining kit for the examination of acid-fast bacteria with fluorescence microscopy (Auramin-Rhodamine staining)

Package components:

The staining kit contains

Reagent 1: Auramine-rhodamine solution	200 ml
Reagent 2: Decolorizing solution	2 x 200 ml
Reagent 3: Counterstaining solution (KMnO ₄)	200 ml

Also required:

Cat. No. 1.08000 Sputofluor™
for microscopy

Sample preparation

The sampling must be performed by qualified personnel.

All samples must be treated using state-of-the-art technology.

All samples must be clearly labeled.

Suitable instruments must be used for taking samples and their preparation. Follow the manufacturer's instructions for application / use.

When using the corresponding auxiliary reagents, the corresponding instructions for use must be observed.

Sputum

The acid-fast bacteria should be pretreated with Sputofluor™ to dissolve them from mucus and cellular structures. In this process, the active ingredient hypochlorite dissolves the organic material by oxidation and gently releases the mycobacteria so that they can be processed further.

Reagent preparation: Preparation of Sputofluor™ solution 15 %

For preparation of approx. 100 ml solution mix:

Sputofluor™	15 ml
Distilled water	85 ml

Preparing sample material in centrifuge tubes:	
Sample	1 part (min. 2 ml)
Sputofluor™ solution (15 % in distilled water)	3 parts
Shake vigorously	10 min
Centrifuge at 3000 - 4800 rpm	20 min
Decant supernatant Prepare smears of the sediment Air-dry	

Punction and lavage material, sediments

After carrying out the appropriate enrichment measures smear out samples on the microscopic slides and allow to air dry.

Histological sections

AFB-Fluor phenol-free can be used to stain histological sections.

Deparaffinize sections in the conventional manner and rehydrate in a descending alcohol series.

Fixation of smear samples

Fixation is carried out over the flame of a Bunsen burner (2 - 3 times, avoiding excessive heating).

It is also possible to fix the smears in an oven at 100 - 110 °C for 20 min. Impairment of staining must be expected if a higher temperature or longer heating is employed.

Reagent preparation

The reagents of the AFB-Fluor phenol-free - Staining kit for the examination of acid-fast bacteria with fluorescence microscopy (Auramin-Rhodamine staining) used for staining are ready-to-use, dilution of the solutions is not necessary and merely produces a deterioration of the staining result and their stability.

Due to its high viscosity, the phenol-free auramine-rhodamine staining solution (Reagent 1) must be vigorously shaken before use.

Procedure

Staining of smear samples

Staining on the staining rack

Slide with fixed smear		
Reagent 1 (auramine-rhodamine solution)	apply dropwise, cover completely, and stain	15 min
Running tap water	rinse carefully	30 sec
Reagent 2 (decolorizing solution)	apply dropwise, cover completely, and leave to react	1 min
Running tap water	rinse carefully	30 sec
Reagent 3 (counterstaining solution)	apply dropwise, cover completely, and stain	5 min
Running tap water	rinse carefully	30 sec
Air-dry		

Covering with non-aqueous mounting media (e. g. Neo-Mount™, Entellan™ new, or DPX new) and a cover glass is recommended for the storage of smear samples for several months. For this purpose, the stained specimens must be dried very well.

The use of immersion oil is recommended for the analysis of stained slides with a microscopic magnification >40x.

Staining of histological samples

Staining on the staining rack

Deparaffinize histological slides in the conventional manner and rehydrate in a descending alcohol series.

The staining solutions are applied onto the slides dropwise and should completely cover the paraffin section.

The stated times should be adhered to guarantee an optimal staining result.

Slide with histological tissue	
Distilled water	rinse
Reagent 1 (auramine-rhodamine solution)	15 min
Running tap water	30 sec
Reagent 2 (decolorizing solution)	1 min
Running tap water	30 sec
Reagent 3 (counterstaining solution)	5 min
Running tap water	30 sec
Ethanol 70 %	1 min
Ethanol 70 %	1 min
Ethanol 96 %	1 min
Ethanol 96 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Xylene or Neo-Clear™	5 min
Xylene or Neo-Clear™	5 min
Mount the Neo-Clear™-wet slides with Neo-Mount™ or the xylene-wet slides with e.g. Entellan™ new and cover glass.	

After dehydration (ascending alcohol series) and clarification with xylene or Neo-Clear™, histological slides can be covered with non-aqueous mounting agents (e.g. Neo-Mount™, Entellan™ new, or DPX new) and a cover glass and can then be stored.

Result

Acid-fast bacteria (in the fluorescence microscope)	red-orange (rhodamine) or yellow-green (auramine) depending on the combination of filters used
Background	dark to black

Staining for optical and fluorescence microscopy

The fluorescent stain using the AFB-Fluor phenol-free staining kit is also ideally suited for the additional staining of the acid-fast bacteria for diagnosis by optical microscopy, e. g. using the AFB-Color staining kit (Cat. No. 1.16450) or AFB-Color modified (Cat. No. 1.00497).

The unmounted specimens stained with AFB-Fluor phenol-free staining kit can be used directly for diagnostic purposes. Subsequently, after carefully removing any immersion oil that may have been used, the specimens can be further stained with the AFB-Color staining kit or AFB-Color modified. In the specimen treated in this manner, the acid-fast bacteria appear magenta-red against a light green (AFB-Color) or light blue (AFB-Color modified) background under the optical microscope.

Evaluation

A positive result means “acid-fast bacteria detected” and a negative result “acid-fast bacteria not detected”. A positive result does not mean that a taxonomic classification by microscopy is possible. If acid-fast bacteria are detected, further analyses must be performed in specially equipped laboratories. The vitality (active, inactive) of the bacteria can also not be determined. If the result is not conclusive, it is recommended to additionally stain the specimens for further optical-microscopy diagnosis, e. g. with the AFB-Color staining kit (Cat. No. 1.16450) or AFB-Color modified (Cat. No. 1.00497).

Trouble-shooting

Fixing of smear samples

A sufficient degree of heat-fixing using a Bunsen burner or in a heating cabinet is essential to prevent the infectious potential of the specimens and further proliferation of the bacteria.

No staining of acid-fast bacteria

The critical step of this staining process is the decolorizing step, which can be influenced by the thickness of the specimen smear. In addition, a fresh solution of hydrochloric acid in ethanol is highly reactive, meaning that the result should be evaluated with caution. The incubation times stated in this protocol should be kept accurately in the decolorizing step, since otherwise false-negative results may ensue.

Too strong background staining

In the event that the background is too strongly stained in the optical microscopic image (dark blue), Reagent 1 (auramine-rhodamine solution) should be better mixed and subsequently better decolorized. Since the staining solution is highly viscous, it is recommended to swirl the slide during the decolorizing step with Reagent 2 (decolorizing solution).

Technical note

The microscope used should meet the requirements of a medical diagnostic laboratory.

Recommended filter combination for fluorescence microscopy:

Excitation filter	490 - 570 nm
Color separator	525 and 635 nm
Emission filter	505 - 600 nm

When using automatic staining systems, please follow the instructions for use supplied by the supplier of the system and software.

Remove surplus immersion oil before filing.

Analytical performance characteristics

“AFB-Fluor phenol-free - Staining kit” stains and thereby visualizes biological structures, as described in the “Result” chapter of this IFU. The use of the product is only to be carried out by authorized and qualified persons, this includes, among other things, sample and reagent preparation, sample handling, histoprocessing, decisions regarding suitable controls and more.

The analytical performance of the product is confirmed by testing each production batch.

For the following stains, the analytical performance was confirmed in terms of specificity, sensitivity and repeatability of the product with a rate of 100 %:

	Inter-assay Specificity	Inter-assay Sensitivity	Intra-assay Specificity	Intra-assay Sensitivity
Histological staining				
Acid-fast bacteria (in the fluorescence microscope)	14/14	14/14	6/6	6/6
Background	14/14	14/14	6/6	6/6
Smear staining				
Acid-fast bacteria (in the fluorescence microscope)	14/14	14/14	6/6	6/6
Background	14/14	14/14	6/6	6/6

Analytical performance results

Intra- (performed on the same batch) and inter-assay (performed on different batches) data list the number of correctly stained structures in relation to the number of performed assays.

Clinical performance characteristics

Furthermore, the clinical performance of this product has been successfully proven in multiple scientific publications.

The AFB-Fluor phenol-free - Staining kit has been successfully used in the clinical setting for decades in a high number of applications.

The clinical performance of the AFB-Fluor phenol-free - Staining kit in particular was determined by establishing its sensitivity and specificity and its PPV and NPV in an in-house study:

	Auramin-Rhodamine Staining
Sensitivity	14/14
Specificity	15/15

Sensitivity: 14 samples out of 14: 100 %
Specificity: 15 samples out of 15: 100 %
Positive predictive value (PPV): 100 %
Negative predictive value (NPV): 100 %

The results of this Performance Evaluation confirms that the product is suitable for the intended use and performs reliably.

The diagnostic interpretation of the staining results, however, is to be carried out by qualified and authorized professionals, taking into account patient anamnesis, morphology, the use of adequate controls, and additional diagnostic tests, if appropriate. This method can be supplementarily used in human diagnostics.

Diagnostics

Diagnoses are to be made only by authorized and qualified personnel. Valid nomenclatures must be used.

This method can be supplementarily used in human diagnostics.

Further tests must be selected and implemented according to recognized methods.

Suitable controls (e.g. ISOSLIDE™ AFB, Cat. No. 1.02560.0001) should be conducted with each application in order to avoid an incorrect result. If the result is not conclusive, it is recommended to additionally stain the specimens for further optical-microscopy diagnosis, e.g. with the AFB-Color staining kit (Cat. No. 1.16450) or AFB-Color modified (Cat. No. 1.00497).

Storage

Store the AFB-Fluor phenol-free - Staining kit for the examination of acid-fast bacteria with fluorescence microscopy (Auramin-Rhodamine staining) at +15 °C to +25 °C.

Shelf-life

The AFB-Fluor phenol-free - Staining kit for the examination of acid-fast bacteria with fluorescence microscopy (Auramin-Rhodamine staining) can be used until the stated expiry date.

After first opening of the dropping bottle, the contents can be used up to the stated expiry date when stored at +15 °C to +25 °C.

The dropping bottles must be kept tightly closed at all times.

A coloration of the Decolorizing solution (Reagent 2) does not have an effect on staining processes and diagnostics.

Capacity

The package is sufficient for up to 60 - 65 applications, the yield may be even higher, depending on the thickness of the smears.

Additional instructions

For professional use only.

In order to avoid errors, the application must be carried out by qualified personnel only.

National guidelines for work safety and quality assurance must be followed. Microscopes equipped according to the standard must be used.

If necessary use a standard centrifuge suitable for medical diagnostic laboratory.

Protection against infection

Effective measures must be taken to protect against infection in line with laboratory guidelines.

Instructions for disposal

The package must be disposed of in accordance with the current disposal guidelines.

Used solutions and solutions that are past their shelf-life must be disposed of as special waste in accordance with local guidelines. Information on disposal can be obtained under the Quick Link "Hints for Disposal of Microscopy Products" at www.microscopy-products.com. Within the EU the currently applicable REGULATION (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 applies.

Auxiliary reagents

Cat. No. 1.00327	Hydrochloric acid in ethanol for microscopy	1 l, 5 l
Cat. No. 1.00496	Formaldehyde solution 4%, buffered, pH 6.9 (approx. 10% Formalin solution) for histology	350 ml and 700 ml (in bottle with wide neck), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Cat. No. 1.00497	AFB-Color modified Staining kit for the detection of acid-fast bacteria (AFB) by hot staining method	1 set
Cat. No. 1.00579	DPX new non-aqueous mounting medium for microscopy	500 ml
Cat. No. 1.00869	Entellan™ new for cover slipper for microscopy	500 ml
Cat. No. 1.02560	ISOSLIDE™ AFB Control Slides with reference tissue for the detection of acid-fast bacteria in histological tissue	25 tests
Cat. No. 1.03999	Formaldehyde solution min. 37% free from acid stabilized with about 10% methanol and calcium carbonate for histology	1 l, 2.5 l, 25 l
Cat. No. 1.04699	Immersion oil for microscopy	100-ml dropping bottle, 100 ml, 500 ml
Cat. No. 1.07164	Paraffin pastilles solidification point about 56-58°C for histology	10 kg (4x 2.5 kg)
Cat. No. 1.07961	Entellan™ new rapid mounting medium for microscopy	100 ml, 500 ml, 1 l

Cat. No. 1.08000	Sputofluo!™ for microscopy	1 l
Cat. No. 1.08298	Xylene (isomeric mixture) for histology	4 l
Cat. No. 1.09016	Neo-Mount™ anhydrous mounting medium for microscopy	100-ml dropping bottle, 500 ml
Cat. No. 1.09843	Neo-Clear™ (xylene substitute) for microscopy	5 l
Cat. No. 1.11609	Histosec™ pastilles solidification point 56-58°C embedding agent for histology	1 kg, 10 kg (4x 2.5 kg), 25 kg
Cat. No. 1.15161	Histosec™ pastilles (without DMSO) solidification point 56-58°C embedding agent for histology	10 kg (4x 2.5 kg), 25 kg
Cat. No. 1.16450	AFB-Color staining kit for the microscopic investigation of acid-fast bacteria (AFB) (cold staining)	1 set

Hazard classification

Cat. No. 1.01597.0001

Please observe the hazard classification printed on the label and the information given in the safety data sheet.

The safety data sheet is available on the website and on request.

Main components of the products

Cat. No. 1.01597.0001

Reagent 1

C.I. 41000	12.0 g/l
C.I. 45170	6.0 g/l
1 l = 1.117 kg	

Reagent 2

C ₃ H ₈ O	543.3 g/l
HCl min. 37 %	15.7 g/l
1 l = 0.878 kg	

Reagent 3

KMnO ₄	5.0 g/l
1 l = 1.013 kg	

General remark

If during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national authority.

Literature

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Highly flammable liquid and vapor.

H290: May be corrosive to metals.

H319: Causes serious eye irritation.

H336: May cause drowsiness or dizziness.

H411: Toxic to aquatic life with long lasting effects.

P210: Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.

P233: Keep container tightly closed.

P234: Keep only in original packaging.

P240: Ground and bond container and receiving equipment.

P273: Avoid release to the environment.

P305 + P351 + P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Reagent 1:

H226: Flammable liquid and vapor.

H319: Causes serious eye irritation.

Reagent 2:

H225: Highly flammable liquid and vapor.

H290: May be corrosive to metals.

H319: Causes serious eye irritation.

H336: May cause drowsiness or dizziness.

Reagent 3:
H411: Toxic to aquatic life with long lasting effects.

Revision History

Version	Modification Comment
2024-Jul-19	Initial version with the introduction of Revision History



Consult instructions
for use



Manufacturer



Catalog number



Batch code



Caution, consult
accompanying documents



Use by
YYYY-MM-DD



Temperature
limitation

Status: 2024-Jul-19

1.01597.0001 **REF**

Mikroskopie

AFB-Fluor phenolfrei

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

Nur für professionelle Anwendung



In Vitro Diagnostikum



Zweckbestimmung

Das vorliegende „AFB-Fluor phenolfrei - Färbeset für die Untersuchung von säurefesten Stäbchenbakterien mit der Fluoreszenzmikroskopie (Auramin-Rhodamin-Färbung)“ wird für die human-medizinische Zelldiagnostik verwendet und dient der bakteriologischen, zytologischen und histologischen Untersuchung von Proben humanen Ursprungs. Es handelt sich um ein gebrauchsfertiges Färbeset, welches zusammen mit anderen *In Vitro* Diagnostika aus unserem Portfolio bakteriellen Zielstrukturen (säurefesten Stäbchenbakterien (AFB)) mittels Fixieren, Einbetten, Anfärben, Gegenfärben, Eindecken in bakteriologischem, zytologischem und histologischem Untersuchungsgut, wie z. B. Ausstrichen von Anreicherungs-Bakterienkulturen oder histologischen Schnitten von z. B. Lunge, für die Diagnostik auswertbar macht.

Das AFB-Fluor phenolfrei Färbeset zeichnet sich durch den Zusatz von Fluoreszenzfarbstoffen in der Färbelösung aus. Damit ist eine schnelle und sicherere Erkennung der säurefesten Stäbchenbakterien im Fluoreszenzmikroskop möglich. Des Weiteren wurde in der Färbelösung auf den Gebrauch von potentiell schädlichem Phenol verzichtet, was die Sicherheit des Nutzers erhöht.

Das vorliegende Färbeset ist gebrauchsfertig und enthält alle notwendigen Reagenzien in praktischen Tropfflaschen für die Färbung von säurefesten Stäbchenbakterien in Ausstrichpräparaten und in histologischen Geweben. Ungefärbte Strukturen sind relativ kontrastarm und lassen sich kaum lichtmikroskopisch differenzieren. Durch die mit Hilfe der Färbelösungen erzeugten Bilder, kann die Form und Struktur durch einen autorisierten und qualifizierten Untersucher besser erkannt werden. Für eine abschließende Diagnostik sind weiterführende Tests nach anerkannten, validen Methoden durchzuführen.

Prinzip

Die klassische Ziehl-Neelsen Methode ist durch den hohen Wachs- und Lipidanteil in der Zellwand bestimmt, da säurefeste Stäbchenbakterien Farbstoffe nur sehr langsam aufnehmen. Um die Aufnahme des Fuchsin-Farbstoffs und damit die Bildung des Mykolat-Fuchsin-Komplexes in der Zellwand zu beschleunigen, wird die auf das Präparat aufgebraute Färbelösung normalerweise bis zur Dampfbildung erhitzt. Haben die säurefeste Stäbchenbakterien den Fuchsin-Farbstoff aufgenommen, ist ein Entfärben auch bei intensiver Behandlung mit Entfärbelösung, wie z. B. Salzsäure-Alkohol, praktisch unmöglich. Säurefeste Stäbchenbakterien werden deshalb als färberisch säure- und alkoholfest bezeichnet. Bei AFB-Fluor phenolfrei ist das Erhitzen durch den Einsatz der Fluoreszenzfarbstoffe Auramin und Rhodamin in der AFB-Fluor phenolfrei Färbelösung nicht notwendig. Diese werden an die Zellwand der säurefesten Stäbchenbakterien gelagert und erscheinen je nach Mikroskop-Filter gelb oder rot auf schwarzem Hintergrund. Durch eine Vorbehandlung der Präparate mit Sputofluor™, werden die Bakterien aus dem umgebenden, zähen Sputum und Zellmaterial gelöst.

Probenmaterial

Luftgetrocknete, hitzefixierte und Sputofluor™-vorbehandelte Ausstriche von bakteriologischem Material wie Sputum, Ausstriche von Feinnadel-Aspirations-Biopsien (FNAB), Spülflüssigkeiten, Imprinte, Ergüsse, Eiter, Exsudate, flüssige und feste Kulturen

Schnitte von Formalin fixiertem, Paraffin eingebettetem Gewebe humanen Ursprungs (3 - 4 µm dicke Paraffinschnitte)

Reagenzien

Art. 1.01597.0001

AFB-Fluor phenolfrei

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

Bestandteile der Packung:

Das Färbeset enthält

Reagenz 1: Auramin-Rhodamin Lösung

200 ml

Reagenz 2: Entfärbelösung

2 x 200 ml

Reagenz 3: Gegenfärbelösung (KMnO₄)

200 ml

Zusätzlich erforderlich:

Art. 1.08000 Sputofluor™

1 l

für die Mikroskopie

Probenvorbereitung

Die Probenentnahme darf nur durch Fachpersonal erfolgen.

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.

Bei Verwendung der entsprechenden Hilfsreagenzien sind die dazugehörigen Gebrauchsanweisungen zu beachten.

Sputum

Zur Freisetzung der säurefesten Stäbchenbakterien aus Schleim und Zellverbänden, sollte Sputum mit Sputofluor™ vorbehandelt werden. Der aktive Wirkstoff Hypochlorit löst dabei das organische Material oxidativ auf und setzt die Mykobakterien schonend frei.

Reagenzvorbereitung: Herstellung von Sputofluor™-Lösung 15 %

Zur Herstellung von etwa 100 ml Lösung werden zusammengegeben:

Sputofluor™	15 ml
Aqua dest.	85 ml

Probenansatz im Zentrifugenröhrchen:	
Probe	1 Teil (mind. 2 ml)
Sputofluor™-Lösung (15 %ig in Aqua dest.)	3 Teile
Kräftig schütteln	10 min
Bei 3000 - 4800 U/min zentrifugieren	20 min
Überstehende Flüssigkeit dekantieren Sediment austreichen Lufttrocknen	

Punktate, Lavagen, Sedimente

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

Histologische Schnitte

AFB-Fluor phenolfrei kann für die Färbung histologischer Schnitte verwendet werden.

Schnitte in typischer Weise entparaffinieren und in absteigender Alkoholreihe rehydratisieren.

Fixierung der Ausstrichpräparate

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.

Bei höheren Temperaturen oder längerer Erhitzung muss mit einer Verschlechterung der Färbeleistung gerechnet werden.

Reagenzvorbereitung

Die zur Färbung verwendeten Reagenzien des AFB-Fluor phenolfrei - Färbeset für die Untersuchung von säurefesten Stäbchenbakterien mit der Fluoreszenzmikroskopie (Auramin-Rhodamin-Färbung) sind gebrauchsfertig, das Verdünnen der Lösungen ist nicht notwendig, mindert das Färbeergebnis und die Haltbarkeit.

Die phenolfreie Auramin-Rhodamin-Färbelösung (Reagenz 1) ist vor Gebrauch sorgfältig zu schütteln, da sie sehr viskos ist.

Durchführung

Färbung von Ausstrichpräparaten

Färbung auf der Färbebank

Objektträger mit fixiertem Ausstrich		
Reagenz 1 (Auramin-Rhodamin Lösung)	auftropfen, vollständig bedecken und färben	15 min
Fließendes Leitungswasser	sorgfältig abspülen	30 sec
Reagenz 2 (Entfärbelösung)	auftropfen, vollständig bedecken und einwirken lassen	1 min
Fließendes Leitungswasser	sorgfältig abspülen	30 sec
Reagenz 3 (Gegenfärbelösung)	auftropfen, vollständig bedecken und färben	5 min
Fließendes Leitungswasser	sorgfältig abspülen	30 sec
Lufttrocknen		

Für die Lagerung von Ausstrichpräparaten über mehrere Monate, wird das Eindecken mit nicht-wässrigen Eindeckmitteln (z. B. Neo-Mount™, Entellan™ Neu oder DPX Neu) und Deckglas empfohlen. Die gefärbten Präparate müssen dafür sehr gut getrocknet werden.

Für die Analyse von gefärbten Präparaten mit einer mikroskopischen Vergrößerung >40x wird die Verwendung von Immersionsöl empfohlen.

Färbung von histologischen Präparaten

Färbung auf der Färbebank

Histologische Präparate in typischer Weise entparaffinieren und in absteigender Alkoholreihe rehydratisieren.

Die Färbelösungen werden jeweils auf die Objektträger aufgetropft und sollten den Paraffinschnitt vollständig bedecken.

Für ein optimales Färbeergebnis sollten die angegebenen Zeiten eingehalten werden.

Objektträger mit histologischem Gewebe	
Aqua dest.	spülen
Reagenz 1 (Auramin-Rhodamin Lösung)	15 min
Fließendes Leitungswasser	30 sec
Reagenz 2 (Entfärbelösung)	1 min
Fließendes Leitungswasser	30 sec
Reagenz 3 (Gegenfärbelösung)	5 min
Fließendes Leitungswasser	30 sec
Ethanol 70 %	1 min
Ethanol 70 %	1 min
Ethanol 96 %	1 min
Ethanol 96 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Xylol oder Neo-Clear™	5 min
Xylol oder Neo-Clear™	5 min
Eindecken der Neo-Clear™-feuchten Präparate mit Neo-Mount™ oder der Xylol-feuchten Präparate mit z. B. Entellan™ Neu und Deckglas.	

Histologische Präparate können nach der Entwässerung (aufsteigende Alkoholreihe), klären mit Xylol oder Neo-Clear™, mit nicht-wässrigen Eindeckmitteln (z. B. Neo-Mount™, Entellan™ Neu oder DPX Neu) und Deckglas eingedeckt und gelagert werden.

Ergebnis

säurefeste Stäbchenbakterien (im Fluoreszenzmikroskop)	rot-orange (Rhodamin) oder gelb-grün (Auramin) - je nach verwendeter Filterkombination
Hintergrund	dunkel bis schwarz

Färbung für Lichtmikroskop und Fluoreszenzmikroskop

Die Fluoreszenzfärbung mit dem AFB-Fluor phenolfrei Färbeset eignet sich auch für die zusätzliche Färbung der säurefesten Stäbchenbakterien für eine lichtmikroskopische Diagnostik, z. B. mit AFB-Color Färbeset (Art. 1.16450) oder AFB-Color modifiziert (Art. 1.00497).

Die mit dem AFB-Fluor phenolfrei Färbeset angefärbten, nicht eingedeckten Präparate können direkt zur Diagnostik verwendet werden. Anschließend können die Präparate, nach sorgfältigem Entfernen von evtl. verwendetem Immersionsöl, mit dem AFB-Color Färbeset oder AFB-Color modifiziert zusätzlich gefärbt werden.

Im Resultat heben sich die säurefesten Stäbchenbakterien im Lichtmikroskop magentarot vor hellgrünem (AFB-Color) oder hellblauem (AFB-Color modifiziert) Hintergrund ab.

Auswertung

Ein positiver Befund bedeutet „säurefeste Stäbchenbakterien vorhanden“, und ein negativer Befund bedeutet „säurefeste Stäbchenbakterien nicht vorhanden“. Aufgrund eines positiven Ergebnisses ist eine taxonomische Klassifizierung mittels Mikroskopie nicht möglich. Werden säurefesten Stäbchenbakterien gefunden, müssen weitere Untersuchungen in Speziallabors durchgeführt werden.

Die Vitalität (aktiv, inaktiv) der Bakterien kann ebenfalls nicht bestimmt werden.

Bei einem nicht-eindeutigem Ergebnis wird die zusätzliche Anfärbung der Präparate für die lichtmikroskopische Diagnostik, z. B. mit AFB-Color Färbeset (Art. 1.16450) oder AFB-Color modifiziert (Art. 1.00497) empfohlen.

Fehlerfindung

Fixierung der Ausstrichpräparate

Eine ausreichende Hitzefixierung mit dem Bunsenbrenner oder in einem Hitzeschränk sind wichtig, um das infektiöse Potential der Präparate und ein Weiterwachsen der Bakterien zu verhindern.

Keine Färbung von säurefesten Stäbchenbakterien

Der kritische Schritt bei dieser Färbung ist der Entfärbeschritt, welcher durch die Dicke des Ausstrichs beeinflusst werden kann. Des Weiteren ist eine frische Salzsäure-Alkohol-Lösung sehr reaktiv, weshalb das Ergebnis sorgfältig ausgewertet werden sollte. Die hier angegebenen Zeiten sollten beim Entfärben genauestens eingehalten werden, da sonst falsch-negative Ergebnisse resultieren könnten.

Starke Hintergrundfärbung

Bei zu starker Färbung des Hintergrunds im Lichtmikroskop (dunkelblau) sollte das Reagenz 1 (Auramin-Rhodamin-Färbelösung) besser gemischt und besser entfärbt werden. Da die Färbelösung sehr viskos ist, wird ein Bewegen der Objektträger während der Entfärbung mit Reagenz 2 (Entfärbelösung) empfohlen.

Technische Hinweise

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

Empfohlene Filterkombination für die Fluoreszenzmikroskopie:

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

Werden Färbeautomaten verwendet, sind die Bedienungsanweisungen des Geräte- und Softwareherstellers zu beachten.

Überschüssiges Immersionsöl ist vor dem Archivieren zu entfernen.

Analytische Leistung

Das vorliegende „AFB-Fluor phenolfrei - Färbeset“ färbt und visualisiert dadurch biologische Strukturen, wie im Kapitel „Ergebnis“ dieser Gebrauchsanweisung beschrieben. Die Anwendung des Produkts ist hierbei nur von autorisierten und qualifizierten Personen durchzuführen, dies umfasst, unter anderem, die Proben- und Reagenzvorbereitung, Probenbehandlung, Histoprocessing, die Entscheidung über geeignete Kontrollen und mehr.

Die analytische Leistung des Produkts wird durch die Testung jeder Produktionscharge sichergestellt.

Für die folgenden Färbungen wurden die analytische Leistung in Form von Spezifität, Sensitivität und Wiederholbarkeit des Produkts mit einer Rate von 100 % bestätigt:

	Inter-assay Spezifität	Inter-assay Sensitivität	Intra-assay Spezifität	Intra-assay Sensitivität
Histologische Färbung				
säurefeste Stäbchenbakterien (im Fluoreszenzmikroskop)	14/14	14/14	6/6	6/6
Hintergrund	14/14	14/14	6/6	6/6
Ausstrichfärbung				
säurefeste Stäbchenbakterien (im Fluoreszenzmikroskop)	14/14	14/14	6/6	6/6
Hintergrund	14/14	14/14	6/6	6/6

Analytische Leistungsparameter

Die Daten der Intra- (durchgeführt an derselben Charge) und Inter-Assays (durchgeführt an verschiedenen Chargen) zeigen die Anzahl der erfolgreich angefärbten Strukturen im Verhältnis zur Gesamtzahl der durchgeführten Assays.

Klinische Leistung

Die klinische Leistung wurde durch die mehrfache erfolgreiche Anwendung in wissenschaftlichen Publikationen dargestellt.

Das AFB-Fluor phenolfrei - Färbeset wird seit Jahrzehnten erfolgreich im klinischen Umfeld in einer hohen Zahl von Anwendungen genutzt.

Die klinische Leistung des AFB-Fluor phenolfrei - Färbeset im Besonderen wurde durch die Ermittlung ihrer Sensitivität und Spezifität und ihres PPV und NPV im Rahmen einer In-house Studie ermittelt:

	Auramin-Rhodamin-Färbung
Sensitivität	14/14
Spezifität	15/15

Sensitivität: 14 Proben von 14: 100 %
Spezifität: 15 Proben von 15: 100 %
Positive predictive value (PPV): 100 %
Negative predictive value (NPV): 100 %

Die Ergebnisse der Performance Evaluation belegen, dass dieses Produkt für die beschriebene Zweckbestimmung geeignet ist und verlässlich korrekte Ergebnisse liefert.

Die diagnostische Interpretation der Färbeergebnisse darf nur von qualifizierten und autorisierten Personen durchgeführt werden, welche Morphologie, die Verwendung adäquater Kontrollen, weitere diagnostische Tests, wenn angemessen, Patientenanamnese und andere Aspekte berücksichtigen müssen. Diese Methode kann dem entsprechend ergänzend zur Humandiagnose verwendet werden.

Diagnostik

Diagnosen sind nur von autorisierten und qualifizierten Personen zu erstellen. Gültige Nomenklaturen sind anzuwenden. Diese Methode ist ergänzend in der Humandiagnostik anzuwenden. Weiterführende Tests sind nach anerkannten Methoden auszuwählen und durchzuführen.

Geeignete Kontrollen (z. B. ISOSLIDE™ AFB, Art. 1.02560.0001) sollten bei jeder Anwendung mitgeführt werden, um ein fehlerhaftes Ergebnis auszuschließen. Bei einem nicht-eindeutigem Ergebnis wird die zusätzliche Anfärbung der Präparate für die lichtmikroskopische Diagnostik, z. B. mit AFB-Color Färbeset (Art. 1.16450) oder AFB-Color modifiziert (Art. 1.00497) empfohlen.

Lagerung

AFB-Fluor phenolfrei - Färbeset für die Untersuchung von säurefesten Stäbchenbakterien mit der Fluoreszenzmikroskopie (Auramin-Rhodamin-Färbung) bei +15 °C bis +25 °C lagern.

Haltbarkeit

Das AFB-Fluor phenolfrei - Färbeset für die Untersuchung von säurefesten Stäbchenbakterien mit der Fluoreszenzmikroskopie (Auramin-Rhodamin-Färbung) kann bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen der Tropfflasche bei +15 °C bis +25 °C aufbewahrt bis zum Verfallsdatum verwendbar. Die Tropfflaschen sind stets gut geschlossen zu halten. Eine Verfärbung der Entfärbelösung (Reagenz 2) hat keinen Einfluss auf Färbung und Diagnostik.

Kapazität

Die Packung ist für bis zu 60 - 65 Anwendungen ausreichend und kann je nach Dicke der Ausstriche noch ergiebiger sein.

Gebrauchshinweise

Nur für professionelle Anwendung.
Um Fehler zu vermeiden, ist die Anwendung von Fachpersonal durchzuführen. 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

Die Packung ist entsprechend der gültigen Entsorgungsrichtlinien zu entsorgen. Gebrauchte Lösungen und Lösungen mit abgelaufener Haltbarkeit sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen, dabei ist den lokalen Entsorgungsrichtlinien zu folgen. Hinweise zur Entsorgung können unter dem Quick Link „Entsorgungshinweise für Mikroskopie-Produkte“ auf www.Mikroskopie-Produkte.com angefordert werden. Innerhalb der EU gilt die VERORDNUNG (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG), Nr. 1907/2006.

Hilfsreagenzien

Art.	1.00327	Salzsäure-Alkohol für die Mikroskopie	1 l, 5 l
Art.	1.00496	Formaldehydlösung 4%, gepuffert, pH 6,9 (ca. 10% Formalinlösung) für die Histologie	350 ml und 700 ml (in Weithalsflasche), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Art.	1.00497	AFB-Color modifiziert Färbekit für den Nachweis von säurefesten Stäbchenbakterien (AFB) mittels Heißfärbung	1 set
Art.	1.00579	DPX Neu wasserfreies Eindeckmittel für die Mikroskopie	500 ml
Art.	1.00869	Entellan™ Neu für Eindeckautomaten für die Mikroskopie	500 ml
Art.	1.02560	ISOSLIDE™ AFB Kontrollpräparate mit Referenzgewebe zum Nachweis von säurefesten Stäbchenbakterien im histologischen Gewebe	25 tests
Art.	1.03999	Formaldehydlösung min. 37% säurefrei stabilisiert mit etwa 10% Methanol und Calciumcarbonat für die Histologie	1 l, 2,5 l, 25 l
Art.	1.04699	Immersionsöl für die Mikroskopie	100-ml-Tropfflasche, 100 ml, 500 ml
Art.	1.07164	Paraffin Pastillen Erstarrungspunkt etwa 56-58°C für die Histologie	10 kg (4x 2,5 kg)
Art.	1.07961	Entellan™ Neu Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie	100 ml, 500 ml, 1 l
Art.	1.08000	SputofluoI™ für die Mikroskopie	1 l
Art.	1.08298	Xylol (Isomergemisch) für die Histologie	4 l
Art.	1.09016	Neo-Mount™ wasserfreies Eindeckmittel für die Mikroskopie	100-ml-Tropfflasche, 500 ml
Art.	1.09843	Neo-Clear™ (Xylol-Ersatz) für die Mikroskopie	5 l
Art.	1.11609	Histosec™ Pastillen Erstarrungspunkt 56-58°C Einbettungsmittel für die Histologie	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art.	1.15161	Histosec™ Pastillen (ohne DMSO) Erstarrungspunkt 56-58°C Einbettungsmittel für die Histologie	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art.	1.16450	AFB-Color Färbeset für die mikroskopische Untersuchung von säurefeste Stäbchenbakterien (AFB) mittels Kaltfärbung	1 set

Gefahrstoffeinstufung

Art. 1.01597.0001
Die Gefahrstoffeinstufung auf dem Etikett und die Angaben im Sicherheitsdatenblatt sind zu beachten. Das Sicherheitsdatenblatt ist erhältlich im Internet und auf Anfrage.

Hauptbestandteile der Produkte

Art. 1.01597.0001	
Reagenz 1	
C.I. 41000	12,0 g/l
C.I. 45170	6,0 g/l
1 l = 1,117 kg	
Reagenz 2	
C ₃ H ₈ O	543,3 g/l
HCl min. 37 %	15,7 g/l
1 l = 0,878 kg	
Reagenz 3	
KMnO ₄	5,0 g/l
1 l = 1,013 kg	

Allgemeiner Hinweis

Wenn während oder infolge des Gebrauchs ein schwerwiegender Vorfall aufgetreten ist, melden Sie diesen bitte dem Hersteller und / oder seinem Bevollmächtigten und Ihrer nationalen Behörde.

Literatur

- 1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
- 2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
- 3. Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
- 4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

H290: Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H319: Verursacht schwere Augenreizung.

H336: Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

H411: Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

P210: Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.

P233: Behälter dicht verschlossen halten.

P234: Nur in Originalverpackung aufbewahren.

P240: Behälter und zu befüllende Anlage erden.

P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Reagenz 1:

H226: Flüssigkeit und Dampf entzündbar.

H319: Verursacht schwere Augenreizung.

Reagenz 2:

H225: Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

H290: Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H319: Verursacht schwere Augenreizung.

H336: Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

Reagenz 3:

H411: Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

Revisionshistorie

Version	Modifikationsanmerkung
2024-Jul-19	Erste Version mit der Einführung der Revisionshistorie



Gebrauchsanweisung
beachten



Hersteller



Katalognummer



Chargen-
code



Achtung, Begleitdoku-
mentation beachten



Verwendbar bis
JJJJ-MM-TT



Temperatur-
begrenzung

Status: 2024-Jul-19

Der Unternehmensbereich Life Science von Merck tritt in den USA und in Kanada als MilliporeSigma auf.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland und/oder Tochterunternehmen. Alle Rechte vorbehalten. Merck und Sigma-Aldrich sind Marken der Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland. Alle anderen Marken sind Eigentum der jeweiligen Inhaber. Ausführliche Informationen zu Markennamen sind über öffentlich zugängliche Informationsquellen erhältlich.



Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.sigmaaldrich.com

MERCK

1.01597.0001 **REF**

Microscopie

AFB-Fluor exempt de phénol

Coffret de coloration pour l'examen en microscopie de fluorescence des bactéries acido-résistantes (coloration Auramine-Rhodamine)

Réservé à une utilisation professionnelle



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*



Objectif prévu

Le présent « AFB-Fluor exempt de phénol - Coffret de coloration pour l'examen en microscopie de fluorescence des bactéries acido-résistantes (coloration Auramine-Rhodamine) » est utilisé pour le diagnostic cellulaire dans la médecine humaine et sert à l'examen bactériologique, cytologique et histologique d'échantillons d'origine humaine. C'est un kit de coloration prêt à l'emploi, qui est utilisé conjointement avec d'autres diagnostics *in vitro* de notre portefeuille pour rendre des structures bactériennes cibles analysables pour le diagnostic (bactéries acido-résistantes (AFB)) par fixation, inclusion, coloration, contre-coloration, montage dans des épreuves bactériologiques, cytologiques et histologiques, telles que les frottis de cultures bactériennes d'enrichissement ou les coupes histologiques de poumon, p. ex.

Le kit de coloration AFB-Fluor exempt de phénol se caractérise par une addition de colorants fluorescents dans la solution de coloration. Ceci permet une identification rapide et plus sûre des bactéries acido-résistantes au microscope fluorescent. De plus, la solution de coloration est exempte de phénol potentiellement nocif, ce qui augmente la sécurité de l'utilisateur.

Le présent kit de coloration est prêt à l'emploi, il contient tous les réactifs nécessaires en flacons compte-gouttes pratiques et contient tous les réactifs requis pour la coloration de bactéries acido-résistantes dans les préparations de frottis et les tissus histologiques.

Les structures non colorées présentent des contrastes relativement faibles et ne peuvent à peine être différenciées par microscopie optique. Les images créées au moyen des solutions de coloration permettent à un examinateur formé et autorisé de mieux distinguer la forme et la structure. Pour un diagnostic final, il est nécessaire d'effectuer des examens supplémentaires selon des méthodes valides et reconnues.

Principe

La méthode classique selon Ziehl-Neelsen est déterminée par le taux élevé de cire et de lipides dans la paroi cellulaire, les bactéries acido-résistantes n'absorbant les colorants que très lentement. Pour accélérer l'absorption du colorant fuchsine et, de ce fait, la formation du complexe mycolate-fuchsine dans la paroi cellulaire, la solution de coloration appliquée sur la préparation est chauffée normalement jusqu'à la formation de vapeur.

Dès que les bactéries acido-résistantes ont absorbé le colorant de la fuchsine, une décoloration même par un traitement intensif avec une solution décolorante, telle que l'acide chlorhydrique alcoolique, est pratiquement impossible. C'est pourquoi les bactéries acido-résistantes sont désignées comme étant alcool-acido-résistantes colorées.

Avec AFB-Fluor exempt de phénol, le réchauffement n'est pas nécessaire par l'emploi des colorants fluorescents Auramine et Rhodamine dans la solution de coloration AFB-Fluor exempt de phénol. Ceux-ci sont logés dans la paroi cellulaire des bactéries acido-résistantes et apparaissent en jaune ou rouge sur fond noir, selon le filtre de microscope utilisé. Grâce à un traitement préliminaire des préparations avec Sputofluor™ les bactéries se détachent du crachat visqueux et du matériel cellulaire environnant.

Matériel des échantillons

Frottis de matériel bactériologique séchés à l'air, fixés par la chaleur et traités au préalable avec Sputofluor™ comme crachat, frottis de ponctions-biopsies à l'aiguille fine (BAAF), solutions de lavage, empreintes, liquides d'épanchement, pus, exsudats, cultures liquides et solides

Coupes de tissu d'origine humaine fixé à la formaline et inclus en paraffine (couche de paraffine de 3 - 4 µm d'épaisseur)

Réactifs

Art. 1.01597.0001

AFB-Fluor exempt de phénol

Coffret de coloration pour l'examen en microscopie de fluorescence des bactéries acido-résistantes (coloration Auramine-Rhodamine)

Composition d'emballage :

Le kit de coloration contient

Réactif 1 : Auramine-rhodamine en solution 200 ml

Réactif 2 : Solution de décoloration 2 x 200 ml

Réactif 3 : Solution de contre-coloration (KMnO₄) 200 ml

Nécessaire en plus :

Art. 1.08000 Sputofluor™

pour la microscopie

1 l

Préparation des échantillons

Le prélèvement d'échantillons doit être effectué par du personnel qualifié.

Tous les échantillons doivent être traités conformément aux règles de l'art. Tous les échantillons doivent être clairement identifiés.

Utiliser des instruments appropriés pour le prélèvement d'échantillons et la préparation, respecter les instructions du fabricant pour l'emploi / l'utilisation.

Lors de l'utilisation des réactifs auxiliaires adéquats, il y a lieu de respecter les consignes d'utilisation correspondantes.

Crachats

Pour libérer les bactéries acido-résistantes des muqueuses et complexes cellulaires, le crachat devrait être traité au préalable avec Sputofluor™.

L'actif hypochlorite dissout le matériel organique par oxydation et libère les bactéries acido-résistantes avec ménagement.

Préparation du réactif: Préparation de la solution au Sputofluor™ 15 %

Pour la préparation d'env. 100 ml de solution, il faut additionner :

Sputofluor™	15 ml
Eau distillée	85 ml

Préparation d'un échantillon en tube à centrifuger:	
Echantillon	1 partie (au moins 2 ml)
Solution au Sputofluor™ (15 % dans de l'eau distillée)	3 parties
Agiter vigoureusement	10 minutes
Centrifuger à 3000 - 4800 tours/min	20 minutes
Décanter le liquide excédentaire Étaler le sédiment Sécher à l'air	

Ponctions, lavages, sédiments

Étaler l'échantillon sur un porte-objet après avoir effectué les opérations d'enrichissement appropriées et laisser sécher à l'air.

Coupes histologiques

AFB-Fluor exempt de phénol peut être utilisé pour la coloration de coupes histologiques.

Déparaffiner les coupes de la manière habituelle et les réhydrater par une série d'alcools à concentration décroissante.

Fixation des préparations de frottis

La fixation s'effectue au dessus de la flamme d'un bec bunsen (2 à 3 fois en évitant une trop grande chaleur).

Le matériel peut aussi être fixé pendant 20 minutes à 100 - 110°C dans une étuve ou sur une plaque chauffante.

Une température plus élevée ou une durée d'échauffement plus longue sont susceptibles de nuire à la coloration.

Préparation du réactif

Les réactifs de AFB-Fluor exempt de phénol - Coffret de coloration pour l'examen en microscopie de fluorescence des bactéries acido-résistantes (coloration Auramine-Rhodamine) utilisés sont prêts à l'emploi ; il n'est pas nécessaire de diluer les solutions étant donné que cela réduit le résultat de coloration et la stabilité.

La solution de coloration Auramine-Rhodamine exempt de phénol (réactif 1) doit être agitée vigoureusement avant son utilisation car elle est très visqueuse.

Mode opératoire

Coloration des préparations de frottis

Coloration sur le banc de coloration

Porte-objet avec frottis fixé		
Réactif 1 (auramine-rhodamine en solution)	appliquer goutte à goutte, recouvrir complètement et colorer	15 minutes
Eau du robinet courante	rincer soigneusement	30 secondes
Réactif 2 (solution de décoloration)	appliquer goutte à goutte, recouvrir complètement et laisser agir	1 minute
Eau du robinet courante	rincer soigneusement	30 secondes
Réactif 3 (solution de contre-coloration)	appliquer goutte à goutte, recouvrir complètement et colorer	5 minutes
Eau du robinet courante	rincer soigneusement	30 secondes
Sécher à l'air		

Si l'on souhaite stocker des préparations de frottis pendant plusieurs mois, il est conseillé de les recouvrir d'un produit de montage anhydre (p.ex. Neo-Mount™, Entellan™ néo ou DPX néo) et d'une lamelle couvre-objet. Les préparations colorées doivent être alors parfaitement sèches.

Pour l'examen microscopique de préparations colorées avec un grossissement >40x, il est recommandé d'utiliser de l'huile d'immersion.

Coloration des préparations histologiques

Coloration sur le banc de coloration

Déparaffiner les préparations histologiques de la manière habituelle et les réhydrater par une série d'alcools à concentration décroissante.

Les solutions de coloration sont appliquées respectivement goutte à goutte sur les porte-objet et devraient recouvrir totalement la coupe paraffinée.

Pour obtenir un résultat de coloration optimal, il convient de respecter les durées indiquées.

Porte-objet avec tissu histologique	
Eau distillée	rincer
Réactif 1 (auramine-rhodamine en solution)	15 minutes
Eau du robinet courante	30 secondes
Réactif 2 (solution de décoloration)	1 minute
Eau du robinet courante	30 secondes
Réactif 3 (solution de contre-coloration)	5 minutes
Eau du robinet courante	30 secondes
Ethanol 70 %	1 minute
Ethanol 70 %	1 minute
Ethanol 96 %	1 minute
Ethanol 96 %	1 minute
Ethanol 96 %	1 minute
Ethanol 100 %	1 minute
Ethanol 100 %	1 minute
Xylène ou Neo-Clear™	5 minutes
Xylène ou Neo-Clear™	5 minutes
Monter les préparations humides de Neo-Clear™ avec le Neo-Mount™ ou les préparations humides de xylène avec p.ex. l'Entellan™ néo et couvre-objet.	

Après avoir été déshydratées (passage dans des alcools à concentration croissante) et clarifiées dans du xylène ou du Neo-Clear™, les préparations histologiques peuvent être montées avec des produits de montage anhydres (p. ex. Neo-Mount™, Entellan™ néo ou DPX néo) et une lamelle couvre-objets et être conservée.

Résultat

Bactéries acido-résistantes (au microscope fluorescent)	rouge-orange (Rhodamine) ou jaune-vert (Auramine) - selon la combinaison de filtres utilisée
Fond	foncé à noir

Coloration pour le microscope optique et fluore

La coloration fluorescente à l'aide du kit de coloration AFB-Fluor exempt de phénol convient également pour la coloration supplémentaire des bactéries acido-résistantes pour un diagnostic au microscope optique, par exemple avec le kit de coloration AFB-Color (art. 1.16450) ou AFB-Color modifié (art. 1.00497).

Les préparations non montées colorées avec le kit de coloration AFB-Fluor exempt de phénol peuvent être utilisées directement pour le diagnostic. Ensuite les préparations peuvent être colorées en plus, après avoir éliminé soigneusement l'huile d'immersion utilisée éventuellement, à l'aide du kit de coloration AFB-Color ou de AFB-Color modifié.

Dans le résultat, les bactéries acido-résistantes se détachent au microscope optique en rouge magenta sur fond vert clair (AFB-Color) ou bleu clair (AFB-Color modifié).

Evaluation

Un résultat positif signifie « il y a des bactéries acido-résistantes », et un résultat négatif signifie « il n'y a pas de bactéries acido-résistantes ». Sur la base d'un résultat positif, une classification taxonomique par le biais de la microscopie n'est pas possible. Si des bactéries acido-résistantes sont détectées, il faut effectuer d'autres examens en laboratoires spéciaux. La vitalité des bactéries (actives ou inactives) ne peut pas non plus être définie.

Si le résultat n'est pas évident, il est conseillé de pratiquer une coloration supplémentaire des préparations pour le diagnostic au microscope optique, par exemple avec le kit de coloration AFB-Color (art. 1.16450) ou AFB-Color modifié (art. 1.00497).

Diagnostic d'erreurs

Fixation des préparations de frottis

Il est important d'effectuer une fixation à la chaleur suffisante avec un bec Bunsen ou dans une étuve, afin d'empêcher le potentiel infectieux des préparations et une prolifération des bactéries.

Pas de coloration des bactéries acido-résistantes

L'opération critique lors de cette coloration est la décoloration, qui peut être influencée par l'épaisseur du frottis.

De plus, une solution fraîche à l'acide chlorhydrique alcoolique est très réactive. C'est pourquoi le résultat doit être analysé très soigneusement. Lors de la décoloration, les temps indiqués ici doivent être respectés scrupuleusement, faute de quoi on risque d'obtenir des résultats faux-négatifs.

Forte coloration du fond

Si la coloration du fond (bleu foncé) est trop forte au microscope optique, le réactif 1 (solution de coloration Auramine-Rhodine) devrait être mieux mélangée et mieux décolorée. La solution de coloration étant très visqueuse, il est conseillé de remuer les porte-objet au cours de la décoloration au réactif 2 (solution de décoloration).

Remarques techniques

Le microscope utilisé doit respecter les exigences d'un laboratoire de diagnostics médicaux.

Combinaison de filtres recommandée pour le microscope fluorescent :

Filtre d'excitation	490 - 570 nm
Séparateur de couleurs	525 et 635 nm
Filtre réjecteur	505 - 600 nm

En cas d'utilisation d'un automate de coloration, se conformer aux instructions du fabricant de l'appareil et du logiciel.

Éliminer l'excédent d'huile pour immersions avant l'archivage.

Caractéristiques de performance analytique

« AFB-Fluor exempt de phénol - Coffret de coloration » colore et permet donc la visualisation de structures biologiques, comme décrit dans le chapitre « Résultat » de ce mode d'emploi. Ce produit ne doit être utilisé que par des personnes agréées et qualifiées, ce qui englobe notamment la préparation des échantillons et des réactifs, la manipulation des échantillons, le traitement histologique (histoprocessing), la prise de décisions en matière de contrôles appropriés et autres.

La performance analytique du produit est confirmée via l'analyse de chaque lot de production.

Pour les colorants suivants, la performance analytique a été confirmée au niveau des spécificité, sensibilité et répétabilité du produit avec un taux de 100 %:

	Spécificité inter-essai	Spécificité inter-essai	Spécificité intra-essai	Spécificité intra-essai
Coloration histologique				
Bactéries acido-résistantes (au microscope fluorescent)	14/14	14/14	6/6	6/6
Fond	14/14	14/14	6/6	6/6
Coloration de frottis				
Bactéries acido-résistantes (au microscope fluorescent)	14/14	14/14	6/6	6/6
Fond	14/14	14/14	6/6	6/6

Résultats de la performance analytique

Les données des essais intra-lot (au sein du même lot) et inter-lot (sur différents lots) répertorient le nombre de structures dont la coloration est appropriée en relation avec le nombre d'essais effectués.

Caractéristiques de performance clinique

De plus, la performance clinique de ce produit a été prouvée avec succès dans de nombreuses publications scientifiques.

Le AFB-Fluor exempt de phénol - Coffret de coloration a été utilisé avec succès dans le contexte clinique pendant des décennies dans un grand nombre d'applications.

La performance clinique du AFB-Fluor exempt de phénol - Coffret de coloration en particulier a été définie en déterminant sa sensibilité, sa spécificité ainsi que ses valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN) dans le cadre d'une étude interne :

	Coloration Auramine-Rhodamine
Sensibilité	14/14
Spécificité	15/15

Sensibilité : 14 échantillons sur 14 : 100 %
Spécificité : 15 échantillons sur 15 : 100 %
Valeur prédictive positive (VPP) : 100 %
Valeur prédictive négative (VPN) : 100 %

Les résultats de cette évaluation de performance confirment que le produit est approprié à l'usage prévu et peut être utilisé de manière fiable.

L'interprétation diagnostique des résultats de coloration doit cependant être réalisée par des professionnels qualifiés et agréés, en tenant compte des antécédents du patient, de la morphologie, de l'utilisation de contrôles adéquats et d'autres tests de diagnostic, le cas échéant. Cette méthode peut être utilisée dans le diagnostic chez l'être humain comme approche complémentaire.

Diagnostic

Les diagnostics doivent être exclusivement effectués par des personnes autorisées et qualifiées.

Les nomenclatures en vigueur doivent être utilisées.

Cette méthode doit être appliquée dans le diagnostic humain à titre complémentaire.

Des tests plus poussés seront choisis et réalisés selon des méthodes reconnues.

Chaque étape doit être effectuée sous contrôle (p. ex. ISOSLIDE™ AFB, art. 1.02560.0001), afin d'exclure toute possibilité de résultat erroné.

Si le résultat n'est pas évident, il est conseillé de pratiquer une coloration supplémentaire des préparations pour le diagnostic au microscope optique, par exemple avec le kit de coloration AFB-Color (art. 1.16450) ou AFB-Color modifié (art. 1.00497).

Stockage

Stocker le AFB-Fluor exempt de phénol - Coffret de coloration pour l'examen en microscopie de fluorescence des bactéries acido-résistantes (coloration Auramine-Rhodamine) entre +15 °C et +25 °C.

Stabilité

Le AFB-Fluor exempt de phénol - Coffret de coloration pour l'examen en microscopie de fluorescence des bactéries acido-résistantes (coloration Auramine-Rhodamine) peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiqué.

Après la première ouverture du flacon compte-gouttes, conserver entre +15 °C et +25 °C et utiliser jusqu'à la date de péremption.

Tenir les flacons compte-gouttes toujours bien fermés.

Un coloration de solution de décoloration (réactif 2) ne affecte pas les colorations et le diagnostic.

Capacité

L'emballage suffit jusqu'à 60 - 65 applications ou encore plus, selon l'épaisseur des frottis.

Remarques sur l'utilisation

Réservé à une utilisation professionnelle.

Pour éviter les erreurs, l'application doit être effectuée par un personnel qualifié.

Respecter les directives nationales relatives à la sécurité au travail et à l'assurance de la qualité.

Utiliser des microscopes équipés conformément au standard.

En cas de besoin, utiliser une centrifugeuse conforme à la norme de laboratoire et aux critères.

Protection contre les infections

Veiller impérativement à une protection efficace conformément aux directives des laboratoires.

Consignes d'élimination

Éliminer l'emballage conformément à la réglementation en vigueur.

Les solutions usagées et les solutions dont la date de péremption est dépassée doivent être traitées comme des déchets dangereux, en respectant les directives locales relatives à l'élimination des déchets. Pour commander les instructions sur l'élimination des déchets, cliquer sur le Quick Link « Hints for Disposal of Microscopy Products » sur www.microscopy-products.com.

Au sein de l'UE s'applique le règlement CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) N° 1907/2006.

Réactifs auxiliaires

Art.	1.00327	Acide chlorhydrique alcoolique pour la microscopie	1 l , 5 l
Art.	1.00496	Formaldéhyde en solution à 4%, tamponnée, pH 6,9 (formaline en solution à env. 10%), pour l'histologie	350 ml et 700 ml (en flacon à col large), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Art.	1.00497	AFB-Color modifié Kit de coloration pour la mise en évidence de bactéries acido-résistantes (AFB) au moyen de la coloration a chaud	1 set
Art.	1.00579	DPX néo produit de montage anhydre pour la microscopie	500 ml
Art.	1.00869	Neo-Entellan™ pour colleuse de lamelles pour la microscopie	500 ml
Art.	1.02560	ISOSLIDE™ AFB Lames de contrôle avec tissu de référence pour la détection de bactéries acido-résistantes dans les tissus histologiques	25 tests
Art.	1.03999	Formaldéhyde en solution au moins 37% non acide stabilisé avec env. 10% de méthanol et calcium carbonate pour l'histologie	1 l, 2,5 l, 25 l
Art.	1.04699	Huile pour immersions pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art.	1.07164	Paraffine en pastilles P.S. 56-58°C coulante pour l'histologie	10 kg (4x 2,5 kg)
Art.	1.07961	Entellan™ néo produit de montage rapide pour la microscopie	100 ml, 500 ml, 1 l
Art.	1.08000	SputofluoI™ pour la microscopie	1 l
Art.	1.08298	Xylène (mélange isomérique) pour l'histologie	4 l
Art.	1.09016	Neo-Mount™ agent de montage anhydre pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 100 ml, 500 ml
Art.	1.09843	Neo-Clear™ (remplaçant du xylène) pour la microscopie	5 l
Art.	1.11609	Histosec™ en pastilles P.S. 56-58°C agent d'inclusion pour l'histologie	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art.	1.15161	Histosec™ en pastilles (sans DMSO) P.S. 56-58°C agent d'inclusion pour l'histologie	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art.	1.16450	AFB-Color Coffret de coloration pour l'analyse microscopique de bactéries acido-résistantes (AFB) par coloration à froid	1 set

Classification des matières dangereuses

Art. 1.01597.0001

Tenir compte de la classification des matières dangereuses indiquées sur l'étiquette et les indications de la fiche de données de sécurité.

La fiche de données de sécurité est disponible sur le site web et sur demande.

Composants principaux des produits

Art. 1.01597.0001		
Réactif 1		
C.I. 41000		12,0 g/l
C.I. 45170		6,0 g/l
1 l = 1,117 kg		
Réactif 2		
C ₃ H ₈ O		543,3 g/l
HCl au moins 37 %		15,7 g/l
1 l = 0,878 kg		
Réactif 3		
KMnO ₄		5,0 g/l
1 l = 1,013 kg		

Remarque générale

Si un incident grave s'est produit durant ou par suite de l'utilisation, veuillez informer de celui-ci le fabricant et/ou son mandataire et votre autorité nationale.

Littérature

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225 : Liquide et vapeurs très inflammables.

H290 : Peut être corrosif pour les métaux.

H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.

H336 : Peut provoquer somnolence ou vertiges.

H411 : Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P210 : Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d'inflammation. Ne pas fumer.

P233 : Maintenir le récipient fermé de manière étanche.

P234 : Conserver uniquement dans l'emballage d'origine.

P240 : Mise à la terre et liaison équipotentielle du récipient et du matériel de réception.

P273 : Éviter le rejet dans l'environnement.

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.

Réactif 1 :

H226 : Liquide et vapeurs inflammables.

H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.

Réactif 2 :

H225 : Liquide et vapeurs très inflammables.

H290 : Peut être corrosif pour les métaux.

H319 : Provoque une sévère irritation des yeux.

H336 : Peut provoquer somnolence ou vertiges.

Réactif 3 :

H411 : Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

Historique des révisions

Version	Commentaire concernant les modification
2024-Jul-19	Version initiale avec l'introduction de l'historique des révisions



Respectez les consignes d'utilisation



Fabricant



N° catalogue



Code de lot



Attention : observez la documentation complémentaire



Utilisable jusqu'au AAAA-MM-JJ



Limitation de température

Status: 2024-Jul-19

Aux États-Unis et au Canada, l'activité Life Science de Merck opère sous le nom de MilliporeSigma.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne et/ou ses sociétés affiliées. Tous droits réservés. Merck et Sigma-Aldrich sont des marques de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne. Toutes les autres marques citées appartiennent à leurs propriétaires respectifs. Des informations détaillées sur les marques sont disponibles via des ressources accessibles au public.



Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440

www.sigmaaldrich.com

MERCK

1.01597.0001 **REF**

Microscopía

AFB-Fluor exento de fenol

kit de tinción para examen de bacilos acidorresistentes por microscopía de fluorescencia (tinción con auramina-rodamina)

Solamente para uso profesional



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Finalidad prevista

El presente "AFB-Fluor exento de fenol - kit de tinción para examen de bacilos acidorresistentes por microscopía de fluorescencia (tinción con auramina-rodamina)" es utilizado para el diagnóstico celular en la medicina humana, se emplea en el examen bacteriológico, citológico e histológico de muestras de origen humano. Se trata de un kit de tinción listo para el uso que, junto con otros materiales de diagnóstico *in vitro* pertenecientes a nuestra cartera, hace evaluables determinadas para el diagnóstico estructuras de destino bacterianas (bacilos acidorresistentes (AFB)) mediante fijación, inclusión, tinción, contratinción, montaje en material de examen bacteriológico, citológico e histológico, como pueden ser frotis de cultivos bacterianos de enriquecimiento o cortes histológicos p.ej. del pulmón.

El kit de tinción AFB-Fluor exento de fenol destaca por la adición de colorantes fluorescentes en la solución de tinción. De esta manera se hace posible una identificación de manera rápida y fiable los bacilos acidorresistentes en el microscopio de fluorescencia. En la solución de tinción se ha prescindido además del uso del fenol potencialmente nocivo, aumentando de esta manera la seguridad del usuario.

El presente kit de tinción está listo para el uso y contiene en prácticos frascos goteros todos los reactivos necesarios para la tinción de bacilos acidorresistentes en preparados de frotis y en tejidos histológicos.

Las estructuras sin teñir son relativamente pobres en contrastes y apenas si pueden diferenciarse bajo el microscopio óptico. Las imágenes generadas con ayuda de las soluciones de tinción permiten a un examinador autorizado y cualificado reconocer mejor la forma y la estructura. Para un diagnóstico final deben realizarse pruebas más complejas según métodos reconocidos y válidos.

Principio

El método clásico según Ziehl-Neelsen está condicionado por la elevada proporción de cera y lípidos en la pared celular, ya que los bacilos acidorresistentes absorben los colorantes sólo muy lentamente. Normalmente, la solución de tinción aplicada al preparado es calentada hasta que se forma vapor para acelerar de esta manera la absorción del colorante de fucsina y, por consiguiente, la formación del complejo micolato-fucsina en la pared celular.

Una vez absorbido el colorante de fucsina por los bacilos acidorresistentes, será prácticamente imposible conseguir la descoloración, incluso a través de un tratamiento intensivo con una solución descolorante como p.ej. ácido clorhídrico-alcohol. Por eso, en lo que se refiere a sus propiedades de tinción, los bacilos acidorresistentes son denominados como resistentes a ácidos y alcohol.

Con AFB-Fluor exento de fenol, el calentamiento no será necesario gracias al uso de los colorantes fluorescentes auramina y rodamina en la solución de tinción AFB-Fluor exento de fenol. Estos colorantes son depositados en la pared celular de los bacilos acidorresistentes y, según el filtro del microscopio, aparecen en color amarillo o rojo sobre fondo negro.

A través de un tratamiento previo de los preparados con Sputofluor™ se liberan las bacterias del esputo viscoso y material celular circundante.

Material de las muestras

Frotis de material bacteriológico secados al aire, termofijados y sometidos a un tratamiento previo con Sputofluor™ como esputos, frotis tomados de punciones aspirativas con aguja fina (PAAF/FNAB), soluciones de lavado, imprints, efusiones, pus, exsudados, cultivos líquidos y sólidos

Cortes de tejido de origen humano fijados con formalina e incluidos en parafina (cortes de parafina con 3 - 4 µm de espesor)

Reactivos

Art. 1.01597.0001

AFB-Fluor exento de fenol

kit de tinción para examen de bacilos acidorresistentes por microscopía de fluorescencia (tinción con auramina-rodamina)

Componentes del envase:

El kit de tinción contiene

Reactivo 1:	Solución de auramina-rodamina	200 ml
Reactivo 2:	Solución de descoloración	2 x 200 ml
Reactivo 3:	Solución de contratinción (KMnO ₄)	200 ml

Necesario además:

Art. 1.08000	Sputofluor™ para microscopía	1 l
--------------	------------------------------	-----

Preparación de las muestras

La toma de muestra debe ser realizada por personal especializado.

Todas las muestras deben tratarse de acuerdo con el estado de la tecnología. Todas las muestras deben estar rotuladas inequívocamente.

Deben usarse instrumentos adecuados para la toma de muestras y en la preparación, y deben seguirse las instrucciones del fabricante para la aplicación / el empleo.

Al usar los correspondientes reactivos auxiliares deberán tenerse en cuenta las respectivas instrucciones de empleo.

Esputo

Para liberar bacilos acidorresistentes de mucosidad y conjuntos celulares se debería tratar el esputo previamente con Sputofluor™. En esto, el principio activo hipoclorita disuelve el material orgánico de forma oxidativa, liberando de esta manera las micobacterias con suavidad.

Preparación del reactivo: Preparación de la solución de Sputofluor™ 15 %

Para preparar aprox. 100 ml de solución se añaden juntos:

Sputofluor™	15 ml
Agua destilada	85 ml

Preparación de muestra en tubo de centrifuga:	
Muestra	1 parte (mínimo 2 ml)
Solución de Sputofluor™ (al 15 % en agua destilada)	3 partes
Agitar vigorosamente	10 minutos
Centrifugar a 3000 - 4800 R/min	20 minutos
Decantar el líquido excedente Extender el sedimento Secar al aire	

Líquidos extraídos por punción, lavados, sedimentos

Extender las muestras en el portaobjetos después de pasos convenientes de enriquecimiento, y dejarlas secar al aire.

Cortes histológicos

AFB-Fluor exento de fenol puede ser utilizado para la tinción de cortes histológicos.

Desparafinar de forma habitual los cortes y rehidratar en serie descendente de alcohol.

Fijación de preparados de frotis

La fijación se realiza sobre la llama del mechero de Bunsen (2 a 3 veces, evitando una acción excesiva del calor).

El material también puede ser fijado durante 20 minutos a una temperatura de 100 a 110 °C en un armario de secado o encima de una placa calefactora.

Si se aplican temperaturas más elevadas o un calentamiento más prolongado, deberá esperarse un empeoramiento de la capacidad de tinción.

Preparación del reactivo

Los reactivos del AFB-Fluor exento de fenol - kit de tinción para examen de bacilos acidorresistentes por microscopía de fluorescencia (tinción con auramina-rodamina) utilizados para los procesos de tinción están listos para el uso, la dilución de las soluciones no es necesaria y empeora el resultado de la tinción así como la estabilidad.

La solución de tinción de auramina-rodamina exento de fenol (reactivo 1) ha de ser agitada cuidadosamente antes de su uso, ya que presenta una consistencia muy viscosa.

Técnica

Tinción de preparados de frotis

Tinción en el banco de tinción

Portaobjetos con frotis fijado		
Reactivo 1 (solución de auramina-rodamina)	aplicar por goteo, cubrir completamente y teñir	15 minutos
Agua corriente del grifo	enjuagar cuidadosamente	30 segundos
Reactivo 2 (solución de descoloración)	aplicar por goteo, cubrir completamente y dejar actuar	1 minuto
Agua corriente del grifo	enjuagar cuidadosamente	30 segundos
Reactivo 3 (solución de contratinción)	aplicar por goteo, cubrir completamente y teñir	5 minutos
Agua corriente del grifo	enjuagar cuidadosamente	30 segundos
Secar al aire		

Para el almacenamiento de preparados de frotis durante varios meses se recomienda el montaje con medios de montaje anhidros (p.ej. Neo-Mount™, Entellan™ nuevo o DPX nuevo) y cubreobjetos. Para ello, los preparados han de ser secados con gran esmero.

Para el análisis de preparados teñidos con un aumento microscópico >40x se recomienda el uso de aceite de inmersión.

Tinción de preparados histológicos

Tinción en el banco de tinción

Desparafinar de forma habitual los preparados histológicos y rehidratar en serie descendente de alcohol.

Las soluciones de tinción son aplicadas por goteo en los diferentes portaobjetos y deben cubrir el corte de parafina en su totalidad.

Para conseguir un óptimo resultado de tinción, deberían respetarse los períodos indicados.

Portaobjetos con tejido histológico	
Agua destilada	enjuagar
Reactivo 1 (solución de auramina-rodamina)	15 minutos
Agua corriente del grifo	30 segundos
Reactivo 2 (solución de descoloración)	1 minuto
Agua corriente del grifo	30 segundos
Reactivo 3 (solución de contratinción)	5 minutos
Agua corriente del grifo	30 segundos
Etanol 70 %	1 minuto
Etanol 70 %	1 minuto
Etanol 96 %	1 minuto
Etanol 96 %	1 minuto
Etanol 100 %	1 minuto
Etanol 100 %	1 minuto
Xileno o Neo-Clear™	5 minutos
Xileno o Neo-Clear™	5 minutos
Montar con Neo-Mount™ los preparados humedecidos con Neo-Clear™, o los preparados humedecidos con xileno con p.ej. Entellan™ Nuevo y cubre-objetos.	

Los preparados histológicos pueden ser montados y almacenados con medios de montaje anhidros (p.ej. Neo-Mount™, Entellan™ Nuevo o DPX nuevo) y cubre-objetos después de la deshidratación (series de alcohol ascendentes) y la clarificación con xileno o Neo-Clear™.

Resultado

Bacilos acidorresistentes (en microscopio de fluorescencia)	rojo-naranja (rodamina) o amarillo-verde (auramina) - según la combinación de filtros utilizada
Fondo	oscuro a negro

Tinción para microscopio de luz y microscopio de fluorescencia

La tinción de fluorescencia mediante el kit de tinción AFB-Fluor exento de fenol también es adecuada para la tinción adicional del bacilos acidorresistentes para diagnósticos con microscopio de luz, p.ej. con el kit de tinción AFB-Color (art. 1.16450) o AFB-Color modificado (art. 1.00497).

Los preparados teñidos con el juego de tinción AFB-Fluor exento de fenol y no cubiertos pueden emplearse directamente para el diagnóstico. Luego pueden teñirse adicionalmente los preparados, después de quitar cuidadosamente el aceite de inmersión eventualmente empleado, con el juego de tinción AFB-Color o AFB-Color modificado.

Al final, los bacilos acidorresistentes destacarán bajo el microscopio de luz en color rojo magenta delante de un fondo verde claro (AFB-Color) o azul claro (AFB-Color modificado).

Evaluación

Un hallazgo positivo significa que “hay bacilos acidorresistentes”, y un hallazgo negativo significa que “no hay bacilos acidorresistentes”. Debido a un resultado positivo ya no es posible una clasificación taxonómica mediante la microscopia Si se encuentran bacilos acidorresistentes, deben efectuarse más pruebas en laboratorios especiales.

Tampoco se puede verificar la vitalidad de las bacterias (activas, inactivas).

En caso de obtener un resultado no inequívoco, se recomienda la tinción adicional de los preparados para el diagnóstico con microscopio de luz, p.ej. con el kit de tinción AFB-Color (art. 1.16450) o AFB-Color modificado (art. 1.00497).

Localización de errores

Fijación de preparados de frotis

Es importante realizar una termofijación suficiente por medio de un mechero Bunsen o en un armario de calor para eliminar el potencial infeccioso de los preparados y evitar que las bacterias sigan creciendo.

Ninguna tinción de bacilos acidorresistentes

El paso crítico en esta tinción es el paso de descoloración, que puede ser influenciado por el espesor del frotis.

Por lo demás, una solución fresca de ácido clorhídrico-alcohol es muy reactiva, por lo que el resultado debería ser evaluado con gran esmero. Durante la descoloración, los tiempos indicados aquí deberían ser respetados con máxima exactitud, ya que de lo contrario se podrían presentar resultados incorrectamente negativos.

Fuerte tinción de fondo

Si la tinción de fondo es demasiado intensa en el microscopio de luz (azul oscuro), el reactivo 1 (solución de tinción de auramina-rodamina) debería ser mezclado y descolorado con mayor eficacia. Dado que la solución de descoloración es muy viscosa, se recomienda mover los portaobjetos durante la descoloración con el reactivo 2 (solución de descoloración).

Notas técnicas

El microscopio usado debería corresponder a los requisitos de un laboratorio de diagnóstico médico.

Combinación recomendada de filtros para la microscopía de fluorescencia:

Filtro de excitación	490 - 570 nm
Espejo dicroico	525 y 635 nm
Filtro supresor	505 - 600 nm

Si se utilizan aparatos automáticos de tinción, deberán tenerse en cuenta las instrucciones de operación del fabricante, tanto del aparato como del software.

Eliminar el aceite de inmersión en exceso antes de archivar.

Características de rendimiento analítico

“AFB-Fluor exento de fenol - Kit de tinción” tiñe y, por lo tanto, visualiza estructuras biológicas, como se describe en el capítulo “Resultado” de estas instrucciones de uso. Solo deben utilizar el producto personas autorizadas y cualificadas. Esta utilización incluye, entre otras actividades, la preparación de muestras y reactivos, la manipulación de muestras, el procesamiento histológico, las decisiones relativas a los controles adecuados, etc.

El rendimiento analítico del producto se confirma analizando cada lote de producción.

En el caso de las siguientes tinciones, se confirmó el rendimiento analítico en términos de especificidad, sensibilidad y repetibilidad del producto, con una tasa del 100 %:

	Especificidad inter-ensayos	Especificidad inter-ensayos	Especificidad intraensayos	Especificidad intraensayos
Tinción histológica				
Bacilos acidorresistentes (en microscopio de fluorescencia)	14/14	14/14	6/6	6/6
Fondo	14/14	14/14	6/6	6/6
Tinción de frotis				
Bacilos acidorresistentes (en microscopio de fluorescencia)	14/14	14/14	6/6	6/6
Fondo	14/14	14/14	6/6	6/6

Resultados de rendimiento analítico

Los datos intraensayos (realizados en el mismo lote) e interensayos (realizados en diferentes lotes) enumeran las estructuras correctamente teñidas en relación con el número de ensayos realizados.

Características de rendimiento clínico

Además, el rendimiento clínico de este producto se ha demostrado en múltiples publicaciones científicas.

El AFB-Fluor exento de fenol - Kit de tinción se ha usado con éxito en el ámbito clínico durante décadas en un gran número de aplicaciones.

El rendimiento clínico del AFB-Fluor exento de fenol - Kit de tinción en particular se determinó estableciendo su sensibilidad y especificidad y su VPP y VPN en un estudio interno:

	Tinción con auramina-rodamina
Sensibilidad	14/14
Especificidad	15/15

Sensibilidad: 14 muestras de 14: 100 %

Especificidad: 15 muestras de 15: 100 %

Valor predictivo positivo (VPP): 100 %

Valor predictivo negativo (VPN): 100 %

Los resultados de esta evaluación de rendimiento confirman la aptitud del producto para el uso previsto, así como su fiabilidad de funcionamiento.

No obstante, la interpretación diagnóstica de los resultados de las tinciones la deben llevar a cabo profesionales cualificados y autorizados, teniendo en cuenta la anamnesis del paciente, la morfología, el uso de controles adecuados y otras pruebas diagnósticas, si procede. Este método puede complementar el diagnóstico humano.

Diagnóstico

Los diagnósticos deberán ser establecidos solamente por personas autorizadas y cualificadas.

Deberán emplearse terminologías vigentes.

Este método debe aplicarse complementariamente en el diagnóstico humano. Deberán elegirse y realizarse ensayos ulteriores según métodos reconocidos.

Cada aplicación debería implicar controles adecuados (p.ej. ISOSLIDE™ AFB, art. 1.02560.0001) para descartar resultados erróneos.

En caso de obtener un resultado no inequívoco, se recomienda la tinción adicional de los preparados para el diagnóstico con microscopio de luz, p.ej. con el kit de tinción AFB-Color (art. 1.16450) o AFB-Color modificado (art. 1.00497).

Almacenamiento

Guardar el AFB-Fluor exento de fenol - kit de tinción para examen de bacilos acidorresistentes por microscopía de fluorescencia (tinción con auramina-rodamina) de +15 °C a +25 °C.

Estabilidad

El AFB-Fluor exento de fenol - kit de tinción para examen de bacilos acidorresistentes por microscopía de fluorescencia (tinción con auramina-rodamina) puede usarse hasta la fecha de caducidad indicada.

Después de abrir el frasco gotero por primera vez, el contenido almacenado entre +15 °C y +25 °C es utilizable hasta la fecha de caducidad indicada.

Los frascos goteros deben mantenerse siempre bien cerrados.

Una tinción de solución de decoloración (reactivo 2) no afecta a los procesos de tinción y el diagnóstico.

Capacidad

El envase es suficiente para hasta 60 - 65 aplicacionesy, según el espesor de los frotis, puede rendir incluso más.

Notas sobre el empleo

Solamente para uso profesional.

Para evitar errores, la aplicación debería ser realizada por personal especializado.

Deben cumplirse las directivas nacionales sobre seguridad en el trabajo y aseguramiento de la calidad.

Deben emplearse microscopios equipados de acuerdo con el estándar.

Si es necesario, deberá utilizarse una centrifugadora que corresponda al estándar de laboratorios y a las exigencias.

Protección contra infecciones

Debe observarse a toda costa una protección eficaz contra infecciones de acuerdo con las directivas de laboratorio.

Indicaciones para la eliminación de residuos

El envase debe ser eliminado de acuerdo con las directivas válidas de eliminación de residuos.

Las soluciones usadas y las soluciones caducadas deben eliminarse como desecho peligroso, debiéndose cumplir las directivas locales de eliminación de residuos. Podrá pedirse información sobre los procedimientos de eliminación bajo el Quick Link "Hints for Disposal of Microscopy Products" en www.microscopy-products.com. Dentro de la UE tiene validez el REGLAMENTO (CE) Nº 1272/2008 sobre la clasificación, el etiquetado y el envasado de sustancias y mezclas, por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) Nº 1907/2006.

Reactivos auxiliares

Art. 1.00327	Ácido clorhídrico-alcohol para microscopía	1 l, 5 l
Art. 1.00496	Formaldehído en solución 4%, tamponado, pH 6,9 (aprox. 10% de formalina en solución) para histología	350 ml y 700 ml (en frasco de cuello ancho), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Art. 1.00497	AFB-Color modificado kit de tinción de bacilos acidorresistentes (AFB) por tinción en caliente	1 set
Art. 1.00579	DPX nuevo medio de montaje anhidro para microscopía	500 ml
Art. 1.00869	Entellan™ nuevo para montadores de cubreobjetos para microscopía	500 ml
Art. 1.02560	ISOSLIDE™ AFB Preparados de control con tejido de referencia para la detección de bacilos acidorresistentes en tejido histológico	25 tests
Art. 1.03999	Formaldehído en solución mín. 37% exento de ácido estabilizado con aprox. 10% de metanol y carbonato cálcio para histología	1 l, 2,5 l, 25 l
Art. 1.04699	Aceite de inmersión para microscopía	frasco gotero de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 1.07164	Parafina pastillas punto de solidificación aprox. 56-58°C para histología	10 kg (4x 2,5 kg)
Art. 1.07961	Entellan™ Nuevo medio de montaje rápido para microscopía	100 ml, 500 ml, 1 l
Art. 1.08000	Sputofluo ™ para microscopía	1 l
Art. 1.08298	Xileno (mezcla de isómeros) para histología	4 l
Art. 1.09016	Neo-Mount™ medio de montaje anhidro para microscopía	frasco gotero de 100 ml, 500 ml
Art. 1.09843	Neo-Clear™ (sustituto de xileno) para microscopía	5 l
Art. 1.11609	Histosec™ pastillas punto de solidificación 56-58°C medio de inclusión para histología	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art. 1.15161	Histosec™ pastillas (sin DMSO) punto de solidificación 56-58°C, medio de inclusión para histología	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art. 1.16450	AFB-Color kit de tinción para examen microscópico de bacilos acidorresistentes (AFB) por tinción en frío	1 set

Clasificación de sustancias peligrosas

Art. 1.01597.0001

Tener en cuenta la clasificación de sustancias peligrosas en la etiqueta y las indicaciones en la ficha de datos de seguridad.

La ficha de seguridad está disponible en el sitio web y a solicitud.

Componentes principales de los productos

Art. 1.01597.0001		
Reactivo 1		
C.I. 41000	12,0 g/l	
C.I. 45170	6,0 g/l	
1 l = 1,117 kg		
Reactivo 2		
C ₃ H ₈ O	543,3 g/l	
HCl mín. 37 %	15,7 g/l	
1 l = 0,878 kg		
Reactivo 3		
KMnO ₄	5,0 g/l	
1 l = 1,013 kg		

Aviso general

Si se produce un incidente grave durante el uso o a causa del mismo, sírvase informar al fabricante y/o a su apoderado y a su autoridad nacional.

Literatura

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Líquido y vapores muy inflamables.
H290: Puede ser corrosivo para los metales.
H319: Provoca irritación ocular grave.
H336: Puede provocar somnolencia o vértigo.
H411: Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P210: Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar.
P233: Mantener el recipiente herméticamente cerrado.
P234: Conservar únicamente en el embalaje original.
P240: Toma de tierra y enlace equipotencial del recipiente y del equipo receptor.
P273: Evitar su liberación al medio ambiente.
P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

Reactivo 1:
H226: Líquidos y vapores inflamables.
H319: Provoca irritación ocular grave.

Reactivo 2:
H225: Líquido y vapores muy inflamables.
H290: Puede ser corrosivo para los metales.
H319: Provoca irritación ocular grave.
H336: Puede provocar somnolencia o vértigo.

Reactivo 3:
H411: Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Historial de revisiones

Versión	Comentario de modificación
2024-Jul-19	Versión inicial con la introducción del Historial de revisiones

Observe las instrucciones de uso

Fabricante

Número de catálogo

Código del lote

Atención, observar la documentación pertinente

Utilizable hasta AAAA-MM-DD

Delimitación de la temperatura

Status: 2024-Jul-19

1.01597.0001 **REF**

Microscopia

AFB-Fluor esente da fenolo

Kit di colorazione per l'analisi microscopica di batteri acido-resistenti per microscopia di fluorescenza (colorazione con auramina-rodamina)

Solo per uso professionale

IVD Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*



Scopo previsto

Il presente "AFB-Fluor esente da fenolo - Kit di colorazione per l'analisi microscopia di batteri acido-resistenti per microscopia di fluorescenza (colorazione con auramina-rodamina)" è utilizzato per la diagnostica cellulare nell'uomo e serve per l'esame batteriologico, citologico ed istologico di campioni di origine umana. È un kit di colorazione pronto all'uso che, congiuntamente ad altri prodotti diagnostici *in vitro* del nostro portafoglio, consente l'analisi diagnostica delle strutture bersaglio batteriche (batteri acido-resistenti (AFB)) mediante fissaggio, inclusione, colorazione, contro-colorazione, montaggio nei campioni batteriologici, citologici ed istologici, quali ad esempio strisci di colture batteriche arricchite o sezioni istologiche di polmoni.

Il kit di colorazione AFB-Fluor esente da fenolo si contraddistingue per l'aggiunta di coloranti fluorescenti nella soluzione di colorazione. In questo modo è possibile formulare un'identificazione rapida e più affidabile dei batteri acido-resistenti mediante microscopia a fluorescenza. La soluzione colorante è stata inoltre realizzata senza fenolo potenzialmente nocivo, aumentando così la sicurezza dell'utente.

Il presente kit di colorazione è pronto all'uso e contiene tutti i reattivi necessari nei pratici flaconi contagocce per la colorazione dei batteri acido-resistenti in preparati di strisci e tessuti istologici.

Le strutture non colorate presentano un contrasto relativamente poco marcato e sono difficili da distinguere al microscopio ottico. In virtù delle immagini ottenute con le soluzioni di colorazione, il ricercatore autorizzato e qualificato è in grado di distinguere in modo più preciso la forma e la struttura. Per una diagnosi definitiva devono essere eseguiti ulteriori test avvalendosi di metodi validi e riconosciuti.

Principio

Il metodo classico di Ziehl-Neelsen è determinato dall'elevata percentuale di cera e lipidi nella membrana cellulare, poiché i batteri acido-resistenti assorbono i coloranti solo molto lentamente. Per accelerare il processo di assorbimento della sostanza colorante fucsina e di conseguenza la formazione del complesso micolato-fucsina nella membrana cellulare, la soluzione colorante impiegata nel preparato viene generalmente riscaldata fino ad emissione di vapori.

Una volta che i batteri acido-resistenti hanno assorbito il colorante fucsina, non lo cedono praticamente più, anche se sottoposti a trattamenti intensivi con soluzioni decoloranti come ad esempio l'acido cloridrico alcolico. I batteri acido-resistenti si caratterizzano dunque per la loro resistenza agli acidi e all'alcol.

In virtù dei coloranti fluorescenti auramina e rodamina impiegati nella soluzione colorante AFB-Fluor esente da fenolo, il riscaldamento non è necessario con il kit AFB-Fluor esente da fenolo. I coloranti fluorescenti si depositano sulla membrana cellulare dei batteri acido-resistenti e, a seconda del filtro per microscopio utilizzato, assumono una colorazione gialla o rossa su sfondo nero.

Grazie al pretrattamento dei preparati con Sputofluor™, i batteri vengono isolati dall'espettorato denso e dal materiale cellulare.

Materiale d'esame

Strisci di materiale batteriologico essiccati all'aria, termofissati e pretrattati con Sputofluor™ quale espettorato, strisci ottenuti da agoaspirati (FNAB, Fine Needle Aspiration Biopsy = agobiopsia con ago sottile), lavaggi, impronte, effusioni, pus, essudati, colture liquide e solide

Sezioni di tessuto di origine umana fissate con formalina e incluse in paraffina (sezioni di paraffina dello spessore di 3 - 4 µm)

Reattivi

Art. 1.01597.0001

AFB-Fluor esente da fenolo

Kit di colorazione per l'analisi microscopia di batteri acido-resistenti per microscopia di fluorescenza (colorazione con auramina-rodamina)

Componenti della confezione:

Il kit di colorazione contiene

Reattivo 1: Soluzione di auramina-rodamina 200 ml

Reattivo 2: Soluzione di decolorazione 2 x 200 ml

Reattivo 3: Soluzione di controcolorazione (KMnO₄) 200 ml

Inoltre necessario:

Art. 1.08000 Sputofluor™ per microscopia 1 l

Preparazione dei campioni

Il campionamento deve essere effettuato da personale specializzato.

Tutti i campioni devono essere trattati secondo la tecnica standard vigente. Tutti i campioni vanno contrassegnati in modo tale da essere facilmente identificati.

Devono essere utilizzati strumenti adatti per il prelievo e la preparazione dei campioni; vanno osservate rigorosamente le indicazioni del produttore circa l'applicazione e le istruzioni d'uso.

Quando si utilizzano i reattivi ausiliari corrispondenti, osservare le relative istruzioni per l'uso.

Espettorato

Al fine di liberare i batteri acido-resistenti dal muco e dai gruppi cellulari, si consiglia di pretrattare l'espettorato con Sputofluor™. Il principio attivo ipoclorito discioglie il materiale organico per ossidazione e libera i batteri acido-resistenti senza intaccarli.

Preparazione del reattivo: Preparazione della soluzione di Sputofluor™ 15 %

Per la preparazione di ca. 100 ml di soluzione si miscelano:

Sputofluor™	15 ml
Acqua distillata	85 ml

Preparazione del campione nella provetta da centrifuga:	
Campione	1 parte (minimo 2 ml)
Soluzione di Sputofluor™ (al 15 % con acqua distillata)	3 parti
Agitare fortemente	10 minuti
Centrifugare a 3000 - 4800 g/min	20 minuti
Decantare il liquido surnatante Strisciare il sedimento Lasciare asciugare all'aria	

Agoaspirati, lavaggi, sedimenti

Dopo opportuni passaggi di arricchimento, strisciare i campioni sui portaoggetti e lasciar asciugare all'aria.

Sezioni istologiche

AFB-Fluor esente da fenolo può essere utilizzato per la colorazione di sezioni istologiche.

Sparaffinare e riportare le sezioni all'acqua attraverso una serie ascendente di alcoli come di consueto.

Fissaggio degli strisci

Il fissaggio avviene con la fiamma del becco Bunsen (passare 2 - 3 volte evitando il forte calore).

Il materiale può anche essere fissato in un armadio di asciugatore o su una piastra di riscaldamento a 100 - 110 °C per 20 minuti.

Temperature più elevate o tempi di riscaldamento più lunghi comprometteranno necessariamente il risultato della colorazione.

Preparazione del reattivo

I reattivi di AFB-Fluor esente da fenolo - Kit di colorazione per l'analisi microscopia di batteri acido-resistenti per microscopia di fluorescenza (colorazione con auramina-rodamina) utilizzati per la colorazione sono pronti all'uso, non è richiesta la diluizione delle soluzioni, poiché compromette la colorazione e ne riduce la stabilità.

Scuotere accuratamente la soluzione colorante di auramina-rodamina esente da fenolo (reattivo 1) prima dell'uso poiché è molto viscosa.

Esecuzione

Colorazione di preparati di strisci

Colorazione con rastrello di colorazione

Portaoggetti con striscio fissato		
Reattivo 1 (soluzione di auramina-rodamina)	versare a gocce, coprire completamente e colorare	15 minuti
Acqua di rubinetto corrente	sciacquare accuratamente	30 secondi
Reattivo 2 (soluzione di decolorazione)	versare a gocce, coprire completamente e lasciar agire	1 minuto
Acqua di rubinetto corrente	sciacquare accuratamente	30 secondi
Reattivo 3 (soluzione di contro-colorazione)	versare a gocce, coprire completamente e colorare	5 minuti
Acqua di rubinetto corrente	sciacquare accuratamente	30 secondi
Asciugare all'aria		

Per stoccare i preparati di strisci per diversi mesi, si raccomanda il montaggio con un mezzo di montaggio anidro (ades., Neo-Mount™, Entellan™ Neo o DPX Neo) e un vetrini coprioggetti. I preparati colorati devono essere ben essiccati.

Per l'analisi dei preparati colorati con ingrandimento al microscopio >40x, si consiglia di utilizzare olio di immersione.

Colorazione di preparati istologici

Colorazione con rastrello di colorazione

Sparaffinare e riportare le preparati istologici all'acqua attraverso una serie discendente di alcoli come di consueto.

Le soluzioni coloranti vengono dispensate goccia a goccia sui vetrini portaoggetti e in modo tale da coprire completamente la sezione in paraffina.

Per ottenere una colorazione ottimale si dovrebbero rispettare i tempi indicati.

Portaoggetti con tessuto istologico	
Acqua destillata	sciacquare
Reattivo 1 (soluzione di auramina-rodamina)	15 minuti
Acqua di rubinetto corrente	30 secondi
Reattivo 2 (soluzione di decolorazione)	1 minuto
Acqua di rubinetto corrente	30 secondi
Reattivo 3 (soluzione di controcolorazione)	5 minuti
Acqua di rubinetto corrente	30 secondi
Etanolo 70 %	1 minuto
Etanolo 70 %	1 minuto
Etanolo 96 %	1 minuto
Etanolo 96 %	1 minuto
Etanolo 100 %	1 minuto
Etanolo 100 %	1 minuto
Xilene o Neo-Clear™	5 minuti
Xilene o Neo-Clear™	5 minuti
Montare i preparati inumiditi con Neo-Clear™ con Neo-Mount™ o i preparati inumiditi con xilene con peres. Entellan™ Neo e coprioggetto.	

Dopo la disidratazione (con serie alcolica a concentrazione ascendente) i preparati istologici possono essere chiarificati con xilene o Neo-Clear™, montati con mezzi di montaggio anidri (per esempio, Neo-Mount™, Entellan™ Neo o DPX Neo), coperti con un vetrino coprioggetti e conservati.

Risultato

Batteri acido-resistenti (al microscopio a fluorescenza)	rosso-arancio (rodamina) o giallo-verde (auramina) - a seconda della combinazione di filtri usata
Sfondo	da scuro a nero

Colorazione al microscopio ottico e al microscopio a fluorescenza

La colorazione in fluorescenza con il kit di colorazione AFB-Fluor esente da fenolo è indicata anche per la colorazione aggiuntiva dei batteri acido-resistenti ai fini di diagnostica mediante microscopio ottico, p.es. con il kit di colorazione AFB-Color (art. 1.16450) o AFB-Color modificato (art. 1.00497).

I preparati non montati colorati con il kit di colorazione AFB-Fluor esente da fenolo possono essere utilizzati direttamente per la diagnostica. Una volta eliminato con cura l'olio di immersione eventualmente utilizzato, i preparati possono quindi essere ulteriormente colorati con il kit di colorazione AFB-Color o AFB-Color modificato.

Al microscopio ottico i batteri acido-resistenti appaiono quindi di colore rosso magenta su sfondo verde chiaro (AFB-Color) o azzurro (AFB-Color modificato).

Valutazione

In base al referto positivo "accertamento di batteri acido-resistenti" o negativo "non sono stati accertati batteri acido-resistenti". Alla luce di un risultato positivo non è possibile eseguire la classificazione tassonomica al microscopio. Dopo aver trovato batteri acido-resistenti nel campione è necessario eseguire ulteriori analisi in un laboratorio specializzato.

Non si può nemmeno determinare la vitalità dei batteri (attivi, inattivi).

In caso di risultato ambiguo, si raccomanda un'ulteriore colorazione dei preparati per la diagnostica al microscopio ottico, ades. con il kit di colorazione AFB-Color (art. 1.16450) o AFB-Color modificato (art. 1.00497).

Individuazione e soluzione di problemi

Fissaggio degli strisci

È importante eseguire un fissaggio adeguato con il becco Bunsen o in un essiccatore, in modo da prevenire le possibili infezioni dei preparati e l'ulteriore crescita batterica.

Nessuna colorazione dei batteri acido-resistenti

Il passo fondamentale di questa colorazione è la decolorazione che può essere influenzata dallo spessore dello striscio.

La soluzione fresca di acido cloridrico alcolico è inoltre molto reattiva equindi è necessario valutare con attenzione il risultato. I tempi qui indicati per la decolorazione devono essere rigorosamente osservati, poiché in caso contrario si possono ottenere risultati falsi negativi.

Forte colorazione di sfondo

In caso di colorazione eccessiva dello sfondo al microscopio ottico (blu scuro), occorre miscelare e decolorare meglio il reattivo 1 (soluzione colorante di auramina-rodamina). Poiché la soluzione colorante è molto viscosa, si consiglia di muovere i vetrini portaoggetti durante la decolorazione con il reattivo 2 (soluzione di decolorazione).

Annotazioni tecnici

Il microscopio utilizzato deve soddisfare i requisiti previsti in un laboratorio medico diagnostico.		
La combinazione di filtri raccomandata per la microscopia in fluorescenza è la seguente:		
Filtro d'eccitazione	490 - 570 nm	
Separatore di colore	525 e 635 nm	
Filtro soppressore	505 - 600 nm	

In caso di colorazione automatizzata, attenersi alle istruzioni per l'uso del produttore dello strumento e del software.

Eliminare l'olio di immersione in eccesso prima dell'archiviazione.

Caratteristiche delle prestazioni analitiche

„AFB-Fluor esente da fenolo - Kit di colorazione" colora e pertanto permette di visualizzare strutture biologiche, come descritto nel capitolo „Risultato" di questa IFU. Il prodotto deve essere utilizzato solo da persone autorizzate e qualificate; ciò include, a titolo esemplificativo, la preparazione del campione e del reagente, la manipolazione del campione, l'istoprocessazione, le decisioni relative ai controlli adeguati, ecc.

Le prestazioni analitiche del prodotto sono confermate per mezzo di test su ciascun lotto di produzione.

Per le seguenti colorazioni, le prestazioni analitiche sono state confermate in termini di specificità, sensibilità e ripetibilità del prodotto con un tasso del 100 %:

	Specificità intersaggio	Specificità intersaggio	Specificità intrasaggio	Specificità intrasaggio
Colorazione istologica				
Batteri acido-resistenti (al microscopio a fluorescenza)	14/14	14/14	6/6	6/6
Sfondo	14/14	14/14	6/6	6/6
Colorazione di striscio				
Batteri acido-resistenti (al microscopio a fluorescenza)	14/14	14/14	6/6	6/6
Sfondo	14/14	14/14	6/6	6/6

Risultati delle prestazioni analitiche

I dati intrasaggio (eseguiti sullo stesso lotto) e intersaggio (eseguiti su lotti diversi) elencano il numero di strutture correttamente colorate in relazione al numero di saggi eseguiti.

Caratteristiche delle prestazioni cliniche

Inoltre, le prestazioni cliniche di questo prodotto sono state dimostrate con successo in molteplici pubblicazioni scientifiche.

Il AFB-Fluor esente da fenolo - Kit di colorazione è stato utilizzato con successo in ambito clinico per decenni in un elevato numero di applicazioni.

In particolare, le prestazioni cliniche del AFB-Fluor esente da fenolo - Kit di colorazione sono state determinate stabilendo la sua sensibilità e specificità, il suo PPV e il suo NPV in uno studio interno:

	Colorazione con auramina-rodamina
Sensibilità	14/14
Specificità	15/15

Sensibilità: 14 campioni su 14: 100 %

Specificità: 15 campioni su 15: 100 %

Valore predittivo positivo (PPV): 100 %

Valore predittivo negativo (NPV): 100 %

I risultati di questa valutazione delle prestazioni confermano che il prodotto è adatto all'uso previsto e funziona in modo affidabile.

L'interpretazione diagnostica dei risultati della colorazione, tuttavia, deve essere effettuata da professionisti qualificati e autorizzati, tenendo conto dell'anamnesi del paziente, della morfologia, dell'uso di controlli adeguati e di ulteriori test diagnostici, se necessario. Questo metodo può essere utilizzato in modo supplementare nella diagnostica umana.

Diagnostica

Le diagnosi vanno eseguite solo da personale autorizzato e qualificato. Devono essere utilizzate nomenclature valide.

La presente metodologia deve essere utilizzata quale strumento integrativo per la diagnostica umana.

Ulteriori test vanno scelti ed eseguiti secondo metodi riconosciuti.

Per ogni applicazione devono essere eseguiti controlli appropriati (per esempio, ISOSLIDE™ AFB, art. 1.02560.0001), per escludere possibili risultati errati.

In caso di risultato ambiguo, si raccomanda un'ulteriore colorazione dei preparati per la diagnostica al microscopio ottico, ades. con il kit di colorazione AFB-Color (art. 1.16450) o AFB-Color modificato (art. 1.00497).

Conservazione

Il AFB-Fluor esente da fenolo - Kit di colorazione per l'analisi microscopia di batteri acido-resistenti per microscopia di fluorescenza (colorazione con auramina-rodamina) va conservato ad una temperatura compresa tra +15 °C e +25 °C.

Stabilità

Il AFB-Fluor esente da fenolo - Kit di colorazione per l'analisi microscopia di batteri acido-resistenti per microscopia di fluorescenza (colorazione con auramina-rodamina) può essere utilizzato entro la data di scadenza indicata.

Una volta aperto il flacone contagocce, il contenuto si mantiene stabile fino alla data di scadenza indicata se conservato ad una temperatura compresa tra +15 °C e +25 °C.

Conservare sempre i flaconi contagocce ben chiusi.

La colorazione di soluzione di decolorazione (reattivo 2) non influenza la colorazione e la diagnostica.

Capacità

La confezione è sufficiente per un massimo de 60 - 65 applicazioni o addirittura di più, a seconda dello spessore degli strisci.

Istruzioni per l'uso

Solo per uso professionale.

Per evitare errori, la applicazione deve essere eseguita da personale specializzato.

Vanno osservate le direttive nazionali in materia di sicurezza sul lavoro e di assicurazione di qualità.

Vanno utilizzati microscopi conformi agli standard vigenti.

All'occorrenza utilizzare una centrifuga che soddisfi gli standard di laboratorio ed i rispettivi requisiti.

Protezione contro le infezioni

Vanno rigorosamente osservate le norme di laboratorio relative alla protezione contro le infezioni.

Istruzioni per lo smaltimento

La confezione deve essere smaltita nel rispetto delle vigenti direttive in materia.

Le soluzioni usate e le soluzioni scadute vanno smaltite come rifiuti pericolosi, in conformità alle disposizioni locali vigenti in materia di smaltimento dei rifiuti. Per richiedere informazioni sullo smaltimento selezionare il Quick link "Hints for Disposal of Microscopy Products" all'indirizzo www.microscopy-products.com. Nell'Unione europea trova applicazione il Regolamento (CE) n. 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006.

Reattivi ausiliari

Art. 1.00327	Acido cloridrico alcolico per microscopia	1 l, 5 l
Art. 1.00496	Aldeide formica soluzione al 4%, tamponata, pH 6,9 (formalina soluzione ca. 10%), per istologia	350 ml e 700 ml (in flacone a collo largo), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Art. 1.00497	AFB-Color modificato Kit di colorazione per la rilevazione di batteri acido-resistenti (AFB) mediante colorazione a caldo	1 set
Art. 1.00579	DPX Neo mezzo di montaggio anidro per microscopia	500 ml
Art. 1.00869	Entellan™ Nuovo montante per vetrini per microscopia	500 ml
Art. 1.02560	ISOSLIDE™ AFB Preparati di controllo con tessuto di riferimento per il rilevamento di batteri acido-resistenti nei tessuti sottoposti a esame istologico	25 tests
Art. 1.03999	Aldeide formica soluzione min. 37% esente da acidi stabilizzata con circa 10% metanolo e calcio carbonato per istologia	1 l, 2,5 l, 25 l
Art. 1.04699	Olio di immersione per microscopia	flacone contagocce di 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 1.07164	Paraffina in pastiglie p.s. 56-58°C per istologia	10 kg (4x 2,5 kg)
Art. 1.07961	Entellan™ Neo mezzo di montaggio rapido per microscopia	100 ml, 500 ml, 1 l
Art. 1.08000	SputofluoI™ per microscopia	1 l
Art. 1.08298	Xilene (miscela di isomeri) per istologia	4 l
Art. 1.09016	Neo-Mount™ mezzo di montaggio anidro per microscopia	flacone contagocce di 100 ml, 500 ml
Art. 1.09215	Ziehl-Neelsen carbolfucsina soluzione per microscopia	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Art. 1.09843	Neo-Clear™ (sostituto xilolo) per microscopia	5 l
Art. 1.11609	Histosec™ in pastiglie p.s. 56-58°C mezzo d'inclusione per istologia	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art. 1.15161	Histosec™ in pastiglie (senza DMSO) p.s. 56-58°C mezzo d'inclusione per istologia	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art. 1.16450	AFB-Color Kit colorante per l'esame microscopico dei batteri acido-resistenti (AFB) (colorazione a freddo)	1 set

Classificazione di sostanze pericolose

Art. 1.01597.0001

Osservare la classificazione delle sostanze pericolose riportata sull'etichetta e seguire le indicazioni della scheda di sicurezza.

La scheda di sicurezza è disponibile su sito Internet e su richiesta.

Componenti principali dei prodotti

Art. 1.01597.0001	
Reattivo 1	
C.I. 41000	12,0 g/l
C.I. 45170	6,0 g/l
1 l = 1,117 kg	
Reattivo 2	
C ₃ H ₈ O	543,3 g/l
HCl min. 37 %	15,7 g/l
1 l = 0,878 kg	
Reattivo 3	
KMnO ₄	5,0 g/l
1 l = 1,013 kg	

Indicazione generale

Se durante o in seguito all'uso del dispositivo si verifica un incidente, segnalare l'evento al fabbricante e/o al suo mandatario e alle autorità nazionali.

Letteratura

- 1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
- 2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
- 3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
- 4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Liquido e vapori facilmente infiammabili.
H290: Può essere corrosivo per i metalli.
H319: Provoca grave irritazione oculare.
H336: Può provocare sonnolenza o vertigini.
H411: Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

P210: Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.
P233: Tenere il recipiente ben chiuso.
P234: Conservare soltanto nell’imballaggio originale.
P240: Mettere a terra e a massa il contenitore e il dispositivo ricevente.
P273: Non disperdere nell’ambiente.

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.

Reattivo 1:
H226: Liquido e vapori infiammabili.
H319: Provoca grave irritazione oculare.

Reattivo 2:
H225: Liquido e vapori facilmente infiammabili.
H290: Può essere corrosivo per i metalli.
H319: Provoca grave irritazione oculare.
H336: Può provocare sonnolenza o vertigini.

Reattivo 3:
H411: Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

Cronologia delle revisioni

Versione	Commento relativo alla modifica
2024-Jul-19	Versione iniziale con l’introduzione della Cronologia delle revisioni

Attenersi alle istruzioni per l’uso

Fabbricante

N. di catalogo

Codice del lotto

Attenzione, consultare la documentazione di accompagnamento

Data di scadenza
AAAA-MM-GG

Limiti di temperatura

Status: 2024-Jul-19

1.01597.0001 **REF****Μικροσκοπία****AFB-Fluor χωρίς φαινόλη**

Σετ χρώσης για την εξέταση οξεάντοχων βακτηρίων με μικροσκοπία φθορισμού (χρώση αουραμίνης - ροδαμίνης)

Για επαγγελματική χρήση μόνο

IVD *In Vitro* διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
**Προβλεπόμενος σκοπός**

Το «AFB-Fluor χωρίς φαινόλη - Σετ χρώσης για την εξέταση οξεάντοχων βακτηρίων με μικροσκοπία φθορισμού (χρώση αουραμίνης - ροδαμίνης)» χρησιμοποιείται για ιατρική κυτταρολογική διάγνωση στον άνθρωπο και εξυπηρετεί τον σκοπό της βακτηριολογικής, κυτταρολογικής και ιστολογικής διερεύνησης υλικού δείγματος ανθρώπινης προέλευσης. Πρόκειται για ένα κιτ χρώσης που, όταν χρησιμοποιείται μαζί με άλλα *in vitro* διαγνωστικά προϊόντα από το χαρτοφυλάκιό μας, κάνει τις βακτηριακές δομών-στόχων (οξεάντοχων βακτηρίων (AFB)) σε υλικό βακτηριολογικών, κυτταρολογικών και ιστολογικών δειγμάτων (π.χ. όπως επιχρίσματα εμπλουτισμένων βακτηριακών) αξιολογήσιμες για διαγνωστικούς σκοπούς, μέσω μονιμοποίησης, έγκλεισης, χρώσης, αντιχρώσης και στερέωσης.

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του κιτ χρώσης χωρίς φαινόλη AFB-Fluor είναι η παρουσία φθορίζουσών χρωστικών στο διάλυμα χρώσης. Αυτό καθιστά δυνατή τη γρήγορη και ασφαλή ταυτοποίηση των οξεάντοχων βακτηρίων με μικροσκοπία φθορισμού. Επιπλέον, το διάλυμα χρώσης παρασκευάζεται χωρίς δυνητικά επικίνδυνη φαινόλη, ενισχύοντας την ασφάλεια του χρήστη.

Το σετ χρώσης παρέχεται έτοιμο προς χρήση σε εύχρηστες σταγονομετρικές φιάλες και περιέχει όλα τα αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα για τη χρώση οξεάντοχων βακτηρίων σε δείγματα επιχρισμάτων και σε δείγματα ιστολογικού υλικού.

Οι άβαφες βακτηριακές δομές παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή αντίθεση και είναι εξαιρετικά δύσκολη η διάκρισή τους με το οπτικό μικροσκόπιο. Οι ει-κόνες που δημιουργούνται χρησιμοποιώντας τα διαλύματα χρώσης βοηθούν τον εξουσιοδοτημένο και εξειδικευμένο ερευνητή να προσδιορίσει καλύτερα τον τύπο και το βακτήριο σε αυτές τις περιπτώσεις. Πρέπει να διενεργούνται επιπλέον εξετάσεις σύμφωνα με αναγνωρισμένες και έγκυρες μεθόδους για την πραγματοποίηση της οριστικής διάγνωσης.

Αρχή της μεθόδου

Η κλασική μέθοδος Ziehl-Neelsen καθορίζεται από την υψηλή αναλογία κηρός και λιπιδίων στο κυτταρικό τοίχωμα, επειδή τα οξεάντοχα βακτήρια απορροφούν τις χρωστικές μόνο πολύ αργά. Προκειμένου να επιταχυνθεί η απορρόφηση της χρωστικής φουξίνης και έτσι ο σχηματισμός του συμπλόκου μυκολικού-φουξίνης στο κυτταρικό τοίχωμα, το διάλυμα καρμπολ φουξίνης που εφαρμόζεται στο παρασκεύασμα θερμαίνεται κανονικά έως ότου σχηματιστεί ατμός.

Μόλις τα οξεάντοχα βακτήρια απορροφήσουν τη χρωστική φουξίνη, είναι ουσιαστικά αδύνατος ο αποχρωματισμός τους, ακόμα και εάν υποβληθούν σε εντατική επεξεργασία με ένα διάλυμα αποχρωματισμού, όπως υδροχλωρικό οξύ σε αιθανόλη. Αντιστοίχως, τα οξεάντοχα βακτήρια ορίζονται ως οξεάντοχα και αλκοολάντοχα για χρώση.

Όταν χρησιμοποιείται το κιτ χρώσης AFB-Fluor χωρίς φαινόλη, η χρήση των φθορίζουσών χρωστικών αουραμίνης και ροδαμίνης στο διάλυμα χρώσης χωρίς φαινόλη AFB-Fluor καθιστά το βήμα της θέρμανσης περιττό. Οι χρωστικές αυτές εναποτίθενται στο κυτταρικό τοίχωμα των οξεάντοχων βακτηρίων και, ανάλογα με το φίλτρο του μικροσκοπίου, εμφανίζονται κίτρινες ή κόκκινες σε μαύρο υπόστρωμα.

Η προεπεξεργασία των δειγμάτων με Sputofluor™ διαλύει τα βακτήρια από το περιβάλλον ιξώδες πτύελο και κυτταρικό υλικό.

Υλικό δείγματος

Επιχρίσματα βακτηριολογικού υλικού που έχουν υποβληθεί σε στέγνωμα στον αέρα, μονιμοποίηση με θερμότητα και προεπεξεργασία με Sputofluor™, όπως πτύελα, επιχρίσματα από βιοψία αναρρόφησης λεπτής βελόνας (FNAB), εκπλύσεις, αποτυπώματα, συλλογές, πύον, εξιδρώματα υγρές και στερεές καλλιέργειες.

Τομές μονιμοποιημένου με φορμαλίνη ιστού ανθρώπινης προέλευσης, εγκλεισμένου σε παραφίνη (τομές παραφίνης πάχους 3 - 4 μm)

Αντιδραστήρια

Αρ. καταλόγου AFB-Fluor χωρίς φαινόλη
1.01597.0001 Σετ χρώσης για την εξέταση οξεάντοχων βακτηρίων με μικροσκοπία φθορισμού (χρώση αουραμίνης - ροδαμίνης)

Μέρη συσκευασίας:

Το κιτ χρώσης περιέχει

Αντιδραστήριο 1:	Διάλυμα αουραμίνης-ροδαμίνης	200 ml
Αντιδραστήριο 2:	Διάλυμα αποχρωματισμού	2 x 200 ml
Αντιδραστήριο 3:	Διάλυμα αντίχρωσης (KMnO ₄)	200 ml

Απαιτούνται επίσης:

Αρ. καταλόγου	Sputofluor™	1 l
1.08000	για μικροσκοπία	

Προετοιμασία δείγματος

Η δειγματοληψία πρέπει να πραγματοποιείται από έμπειρο προσωπικό.

Όλα τα δείγματα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία με χρήση προηγμένης τεχνολογίας.

Όλα τα δείγματα πρέπει να φέρουν σαφή σήμανση.

Για τη λήψη και την προετοιμασία των δειγμάτων πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα όργανα. Ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή για εφαρμογή / χρήση.

Κατά τη χρήση των αντίστοιχων βοηθητικών αντιδραστηρίων, πρέπει να τηρούνται οι αντίστοιχες οδηγίες χρήσης.

Πτύελα

Τα οξεάντοχα βακτήρια θα πρέπει να υποβάλλονται σε προηγούμενη επεξεργασία με Sputofluor™ για τη διάλυσή τους από τους βλεννογόνους και από τις κυτταρικές δομές. Σε αυτή τη διαδικασία, το ενεργό συστατικό υποχλωριώδες διαλύει το οργανικό υλικό με οξείδωση και ελευθερώνει απαλά τα οξεάντοχα βακτήρια, έτσι ώστε να μπορούν να υποβληθούν σε περαιτέρω επεξεργασία.

Προετοιμασία αντιδραστηρίου: Προετοιμασία διαλύματος Sputofluor™ 15%

Για προετοιμασία περίπου 100 ml διαλύματος, αναμειξτε:

Sputofluor™	15 ml
Απεσταγμένο νερό	85 ml

Προετοιμασία υλικού δείγματος σε σωληνάρια φυγόκεντρου:	
Δείγμα	1 μέρος (τουλάχισ. 2 ml)
Διάλυμα Sputofluor™ (15% σε απεσταγμένο νερό)	3 μέρη
Ανακινήστε ζωηρά	10 λεπτά
Φυγοκεντρήστε σε 3.000 - 4.800 rpm	20 λεπτά
Αδειάστε το υπερκείμενο Προετοιμάστε τα επιχρίσματα του ιζήματος Στεγνώστε στον αέρα.	

Σπικτά, πλύσεις, ιζήματα

Μετά από κατάλληλα μέτρα εμπλουτισμού, απλώστε υλικό δείγματος επί της πλάκας και αφήστε το να στεγνώσει στον αέρα.

Ιστολογικές τομές

Το AFB-Fluor χωρίς φαινόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη χρώση ιστολογικών τομών.

Κάντε αποπαραφίνωση ενόητες με συμβατικό τομών και επανενυδάτωση σε φθίνουσα σειρά αλκοόλης.

Μονιμοποίηση δειγμάτων επιχρίσματος

Τα δείγματα μονιμοποιούνται πάνω από μια φλόγα καύσης Bunsen (2 - 3 φορές, φροντίζοντας να αποφεύγετε την υπερβολική θέρμανση). Τα δείγματα μπορούν επίσης να μονιμοποιηθούν με θέρμανση σε 100 - 110 °C σε θάλαμο στεγνώματος ή σε πλάκα θέρμανσης για 20 λεπτά. Ακραίες θερμοκρασίες ή παρατεταμένη θέρμανση μπορεί να συνεπάγονται επιδείνωση της απόδοσης της χρώσης.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Τα αντιδραστήρια του AFB-Fluor χωρίς φαινόλη - Σετ χρώσης για την εξέταση οξεάντοχων βακτηρίων με μικροσκοπία φθορισμού (χρώση αουραμίνης - ροδαμίνης) είναι έτοιμα για χρήση. Η αραίωση αυτών των διαλυμάτων δεν είναι αναγκαία και προκαλεί μόνο αλλοίωση του αποτελέσματος χρώσης και μείωση της σταθερότητάς τους.

Λόγω του υψηλού ιξώδους του, το διάλυμα χρώσης αουραμίνης-ροδαμίνης χωρίς φαινόλη (Αντιδραστήριο 1) πρέπει να ανακινήθει έντονα πριν από τη χρήση.

Διαδικασία

Χρώση δειγμάτων επιχρίσματος

Χρώση στον δειγματοφορέα χρώσης

Αντικειμενοφόρος πλάκα με μονιμοποιημένο επίχρισμα		
Αντιδραστήριο 1 (διάλυμα αυραμίνης-ροδαμίνης)	εφαρμόστε στάγδην, καλύψ-τε πλήρως και χρωματίστε	15 λεπτά
Τρεχούμενο νερό βρύσης	εκπλύνετε προσεκτικά	30 δευτ.
Αντιδραστήριο 2 (διάλυμα αποχρωματισμού)	εφαρμόστε στάγδην, καλύψ-τε πλήρως και αφήστε να αντιδράσει	1 λεπτό
Τρεχούμενο νερό βρύσης	εκπλύνετε προσεκτικά	30 δευτ.
Αντιδραστήριο 3 (διάλυμα αντίχρωσης)	εφαρμόστε στάγδην, καλύψ-τε πλήρως και χρωματίστε	5 λεπτά
Τρεχούμενο νερό βρύσης	εκπλύνετε προσεκτικά	30 δευτ.
Στεγνώστε στον αέρα		

Η κάλυψη με μη υδατικά μέσα στερέωσης (π.χ. Neo-Mount™, DPX νέο ή Entellan™ νέο) και μια καλυπτρίδα συνιστώνται για τη φύλαξη των δειγμά-των επιχρίσματος για αρκετούς μήνες. Για τον σκοπό αυτό, τα χρωσθέντα δείγματα πρέπει να στεγνώνονται πολύ καλά.

Η χρήση ελαίου εμβάπτισης συνιστάται για την ανάλυση πλακών που έχουν υποβληθεί σε χρώση με μεγέθυνση μικροσκοπίου >40x.

Χρώση ιστολογικών δειγμάτων

Χρώση στον δειγματοφορέα χρώσης

Κάντε ιστολογικών δειγμάτων πλακών με συμβατικό τρόπο και επανενυδά-τωση σε φθίνουσα σειρά αλκοόλης.

Τα διαλύματα χρώσης εφαρμόζονται στάγδην στις Αντικειμενοφόορσκαι πρέπει να καλύπτουν πλήρως το τομές παραφίνης.

Οι αναγραφόμενοι χρόνοι θα πρέπει να τηρούνται για τη διασφάλιση ενός βέλτιστου αποτελέσματος χρώσης.

Αντικειμενοφόρος πλάκα με ιστολογικό ιστό	
Απεσταγμένο νερό	εκπλύνετε
Αντιδραστήριο 1 (διάλυμα αυραμίνης-ροδαμίνης)	15 λεπτά
Τρεχούμενο νερό βρύσης	30 δευτ.
Αντιδραστήριο 2 (διάλυμα αποχρωματισμού)	1 λεπτά
Τρεχούμενο νερό βρύσης	30 δευτ.
Αντιδραστήριο 3 (διάλυμα αντίχρωσης)	5 λεπτά
Τρεχούμενο νερό βρύσης	30 δευτ.
Αιθανόλη 70 %	1 λεπτό
Αιθανόλη 70 %	1 λεπτό
Αιθανόλη 96 %	1 λεπτό
Αιθανόλη 96 %	1 λεπτό
Αιθανόλη 100 %	1 λεπτό
Αιθανόλη 100 %	1 λεπτό
Ξυλένιο ή Neo-Clear™	5 λεπτά
Ξυλένιο ή Neo-Clear™	5 λεπτά
Στερεώστε τις εφυγραμμένες με Neo-Clear™ πλάκες με Neo-Mount™ ή τις εφυγραμμένες με ξυλένιο πλάκες με π.χ. Entellan™ νέο και καλυπτρίδα.	

Μετά από αφυδάτωση (ανιούσα σειρά αλκοόλης) και διαύγαση με ξυλένιο ή Neo-Clear™, τα ιστολογικά δείγματα μπορούν να στερεωθούν με παράγοντες στερέωσης χωρίς νερό (π.χ. Neo-Mount™, Entellan™ νέο ή DPX νέο) και μια καλυπτρίδα και κατόπιν μπορούν να αποθηκευτούν.

Αποτέλεσμα

οξεάντοχων βακτηρίων (στο μικροσκόπιο φθορισμού)	κόκκινο-πορτοκαλί (ροδαμίνη) ή κίτρινο-πράσινο (αυραμίνη) - ανάλογα με τον συνδυασμό των χρησιμοποιούμενων φίλτρων
Υπόβαθρο	σκούρο έως μαύρο

Χρώση για οπτική μικροσκοπία και μικροσκοπία φθορισμού

Η φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιεί το κιτ AFB-Fluor χωρίς φαινόλη είναι επίσης κατάλληλη για την επιπρόσθετη χρώση των οξεάντοχων βα-κτηρίων για διάγνωση με οπτική μικροσκοπία, π.χ. χρησιμοποιώντας το κιτ χρώσης AFB-Color (αρ. κατ. 1.16450) ή το Κιτ τροποποιημένης χρώσης κατά AFB-Color (αρ. κατ. 1.00497).

Τα ακάλυπτα δείγματα που υποβάλλονται σε χρώση με το κιτ AFB-Fluor χω-ρίς φαινόλη μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας για διαγνωστικούς σκο-πούς. Στη συνέχεια, μετά την προσεκτική αφαίρεση του λαδιού εμβάπτισης που έχει ενδοχομένως χρησιμοποιηθεί, τα δείγματα μπορούν να υποβληθούν σε περαιτέρω χρώση με το κιτ χρώσης AFB-Color ή το Κιτ τροποποιημένης χρώσης κατά AFB-Color.

Στο δείγμα που υποβάλλεται σε επεξεργασία με αυτόν τον τρόπο, τα οξε-άντοχα βακτήρια εμφανίζονται ματζέντα-κόκκινα σε ανοιχτό πράσινο υπό-στρωμα (AFB-Color) ή ανοιχτό μπλε υπόστρωμα (τροποποιημένο AFB-Color) στο οπτικό μικροσκόπιο.

Αξιολόγηση

Ένα θετικό αποτέλεσμα σημαίνει «παρουσία οξεάντοχα βακτήρια», ενώ ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει «απουσία οξεάντοχα βακτήρια». Το θετικό αποτέλεσμα δεν σημαίνει ότι είναι δυνατή η ταξινόμηση μέσω μικροσκοπίας. Εάν ανιχνευθούν οξεάντοχα βακτήρια, πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπλέον αναλύσεις σε ειδικά εξοπλισμένα εργαστήρια.

Η ζωτικότητα των βακτηρίων (ενεργά, ανενεργά) δεν μπορεί επίσης να προσ-διοριστεί.

Εάν το αποτέλεσμα δεν είναι οριστικό, συνιστάται η επιπλέον χρώση των δειγμάτων για περαιτέρω διάγνωση με οπτική μικροσκοπία, π.χ. με το κιτ χρώσης AFB-Color (αρ. κατ. 1.16450) ή το τροποποιημένο AFB-Color (αρ. κατ. 1.00497).

Αντιμετώπιση προβλημάτων

Μονιμοποίηση δειγμάτων επιχρίσματος

Επαρκής βαθμός μονιμοποίησης με θερμότητα με λύχνο Bunsen ή σε θάλαμο θέρμανσης είναι βασικής σημασίας για την αποφυγή πιθανότητας μόλυνσης των δειγμάτων και περαιτέρω πολλαπλασιασμού των βακτηρίων.

Μη χρώση των οξεάντοχα βακτήρια

Το κρίσιμο βήμα της διαδικασίας χρώσης μυκοβακτηριδίων αυτής της διαδικασίας χρώσης είναι το βήμα αποχρωματισμού, το οποίο μπορεί να επηρεαστεί από το πάχος του δείγματος επιχρίσματος. Επιπρόσθετα, ένα φρέσκο διάλυμα υδροχλωρικού οξέος σε αιθανόλη είναι υψηλά αντιδρόν, που σημαίνει ότι το αποτέλεσμα θα πρέπει να αξιολογείται με προσοχή. Οι χρόνοι επώασης που αναγράφονται σε αυτό το πρωτόκολλο θα πρέπει να τηρούνται με ακρίβεια στο βήμα αποχρωματισμού, επειδή δια-φορετικά μπορεί να προκύψουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Πολύ ισχυρή χρώση υποστρώματος

Στην περίπτωση που το υπόστρωμα είναι πολύ ισχυρά χρωματισμένο στην εικόνα του οπτικού μικροσκοπίου (σκούρο μπλε), το Αντιδραστήριο 1 (διάλυμα αυραμίνης-ροδαμίνης) θα πρέπει να αναμειχθεί καλύτερα και στη συνέχεια να αποχρωματιστεί καλύτερα. Επειδή το διάλυμα χρώσης έχει υψηλό ιξώδες, συνιστάται η περιδίνηση της αντικειμενοφόρου πλάκας κατά τη διάρκεια του βήματος αποχρωματισμού με το Αντιδραστήριο 2 (διάλυμα αποχρωματισμού).

Τεχνικές σημειώσεις

Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιείται θα πρέπει να πληροί τις απαιτήσεις ενός ιατρικού διαγνωστικού εργαστηρίου.

Συνιστώμενος συνδυασμός φίλτρων για μικροσκοπία φθορισμού:

Φίλτρο διέγερσης	490 - 570 nm
Διαχωριστής χρωμάτων	525 και 635 nm
Φίλτρο εκπομπής	505 - 600 nm

Όταν χρησιμοποιούνται συστήματα αυτόματης χρώσης, παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης που παρέχονται από τον προμηθευτή του συστήματος και του λογισμικού.

Αφαιρέστε το επιπλέον έλαιο εμβάπτισης πριν από την αρχειοθέτηση.

Χαρακτηριστικά αναλυτικής απόδοσης

Το «AFB-Fluor χωρίς φαινόλη - Σετ χρώσης» χρωματίζει και κατ’ αυτόν τον τρόπο απεικονίζει βιολογικές δομές, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «Απο-τέλεσμα» αυτών των οδηγιών χρήσης. Το προϊόν πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο από εξουσιοδοτημένα και εξειδικευμένα άτομα και η χρήση του περι-λαμβάνει, μεταξύ άλλων, την προετοιμασία δειγμάτων και αντιδραστηρίων, τον χειρισμό δειγμάτων, την ιστοεπεξεργασία, τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τους κατάλληλους μάρτυρες και άλλα.

Η αναλυτική απόδοση του προϊόντος επιβεβαιώνεται με τον έλεγχο κάθε παρτίδας παραγωγής.

Για τις ακόλουθες χρώσεις επιβεβαιώθηκε η αναλυτική απόδοση όσον αφορά την ειδικότητα, την ευαισθησία και την επαναληψιμότητα του προϊόντος με ποσοστό 100%:

	Ειδικότητα μεταξύ προσδιορι-σμών	Ευαισθησία μεταξύ προσδιορι-σμών	Ειδικότητα εντός του προσδιορι-σμού	Ευαισθησία εντός του προσδιορι-σμού
Ιστολογική χρώση				
οξεάντοχων βακτηρίων (στο μικροσκόπιο φθο-ρισμού)	14/14	14/14	6/6	6/6
Υπόβαθρο	14/14	14/14	6/6	6/6
Χρώση επιχρισμά-των				
οξεάντοχων βακτηρίων (στο μικροσκόπιο φθο-ρισμού)	14/14	14/14	6/6	6/6
Υπόβαθρο	14/14	14/14	6/6	6/6

Αποτελέσματα αναλυτικής απόδοσης

Τα δεδομένα εντός του προσδιορισμού (στην ίδια παρτίδα) και μεταξύ των προσδιορισμών (σε διαφορετικές παρτίδες) δείχνουν τον αριθμό των δομών που χρωματίστηκαν ορθά σε σχέση με τον αριθμό των προσδιορισμών που εκτελέστηκαν.

Χαρακτηριστικά κλινικής απόδοσης

Επιπλέον, η κλινική απόδοση αυτού του προϊόντος έχει αποδειχθεί με επιτυχία σε πολλές επιστημονικές δημοσιεύσεις.

Το AFB-Fluor χωρίς φαινόλη - Σετ χρώσης χρησιμοποιείται με επιτυχία στο κλινικό περιβάλλον εδώ και δεκαετίες σε μεγάλο αριθμό εφαρμογών.

Η κλινική απόδοση του AFB-Fluor χωρίς φαινόλη - Σετ χρώσης προσδιορίστηκε συγκεκριμένα με τον καθορισμό της ευαισθησίας και ειδικότητάς του και της θετικής προγνωστικής τιμής (PPV) και αρνητικής προγνωστικής τιμής (NPV) του σε μια εσωτερική μελέτη:

	Χρώση αουραμίνης - ροδαμίνης
Ευαισθησία	14/14
Ειδικότητα	15/15

Ευαισθησία: 14 στα 14 δείγματα: 100%

Ειδικότητα: 15 στα 15 δείγματα: 100%

Θετική προγνωστική τιμή (PPV): 100%

Αρνητική προγνωστική τιμή (NPV): 100%

Τα αποτελέσματα από αυτήν την αξιολόγηση της απόδοσης επιβεβαιώνουν ότι το προϊόν είναι αξιόπιστο και κατάλληλο για τη χρήση για την οποία προορίζεται.

Ωστόσο, η διαγνωστική ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης πρέπει να πραγματοποιείται από εξειδικευμένους και εξουσιοδοτημένους επαγγελματίες, λαμβάνοντας υπόψη το ιστορικό του ασθενούς, τη μορφολογία, τη χρήση επαρκών μαρτύρων και επιπρόσθετες διαγνωστικές εξετάσεις, κατά περίπτωση. Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά για τη διάγνωση στους ανθρώπους.

Διάγνωση

Οι διαγνώσεις θα πρέπει να γίνονται μόνο από αρμόδιο και εξουσιοδοτημένο προσωπικό. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται έγκυρη ονοματολογία. Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά για τη διάγνωση στους ανθρώπους. Θα πρέπει να επιλεγούν και να εφαρμοστούν περισσότερες δοκιμασίες σύμφωνα με αναγνωρισμένες μεθόδους.

Κατάλληλοι έλεγχοι (π.χ. ISOSLIDE™ AFB, αρ. καταλόγου 1.02560.0001) θα πρέπει να διεξάγονται με κάθε εφαρμογή για την αποφυγή λανθασμένου αποτελέσματος.

Εάν το αποτέλεσμα δεν είναι οριστικό, συνιστάται η επιπλέον χρώση των δειγμάτων για περαιτέρω διάγνωση με οπτική μικροσκοπία, π.χ. με το κιτ χρώσης AFB-Color (αρ. κατ. 1.16450) ή το τροποποιημένο AFB-Color (αρ. κατ. 1.00497).

Φύλαξη

Αποθηκεύστε το AFB-Fluor χωρίς φαινόλη - Σετ χρώσης για την εξέταση οξεάντοχων βακτηρίων με μικροσκοπία φθορισμού (χρώση αουραμίνης - ροδαμίνης) σε +15 °C έως +25 °C.

Διάρκεια ζωής

Το AFB-Fluor χωρίς φαινόλη - Σετ χρώσης για την εξέταση οξεάντοχων βακτηρίων με μικροσκοπία φθορισμού (χρώση αουραμίνης - ροδαμίνης) μπορεί να χρησιμοποιηθεί έως την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης.

Μετά το πρώτο άνοιγμα της σταγονομετρική φιάλης, το περιεχόμενο μπορεί να χρησιμοποιηθεί έως και την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης όταν αποθηκεύεται σε θερμοκρασία +15 °C έως +25 °C.

Οι σταγονομετρική φιάλες πρέπει να διατηρούνται ερμητικά κλειστές συνεχώς. Ο αποχρωματισμός του διαλύματος αποχρωματισμού (Αντιδραστήριο 2) δεν επηρεάζει τη διαδικασία χρώσης και τη διάγνωση.

Ικανότητα

Η συσκευασία επαρκεί για μέχρι 60 - 65 εφαρμογές, αλλά αυτός ο αριθμός μπορεί να είναι μεγαλύτερος ανάλογα με το πάχος των επιχρισμάτων.

Πρόσθετες οδηγίες

Για επαγγελματική χρήση μόνο.

Για την αποφυγή σφαλμάτων, η εφαρμογή πρέπει να πραγματοποιείται μόνο από έμπειρο προσωπικό. Θα πρέπει να ακολουθούνται οι εθνικές κατευθυντήριες γραμμές για την ασφάλεια στην εργασία και τη διασφάλιση ποιότητας. Πρέπει να χρησιμοποιούνται μικροσκόπια εξοπλισμένα σύμφωνα με τα πρότυπα. Εάν απαιτείται χρησιμοποιήστε μια πρότυπη φυγόκεντρο κατάλληλη για ιατρικό διαγνωστικό εργαστήριο.

Προστασία από λοίμωξη

Θα πρέπει να λαμβάνονται αποτελεσματικά μέτρα για την προστασία από λοίμωξη σύμφωνα με τις εργαστηριακές κατευθυντήριες γραμμές.

Οδηγίες απόρριψης

Η συσκευασία πρέπει να απορρίπτεται σύμφωνα με τις τρέχουσες οδηγίες απόρριψης. Τα χρησιμοποιημένα διαλύματα και τα διαλύματα των οποίων η ημερομηνία λήξης έχει παρέλθει πρέπει να απορρίπτονται ως ειδικά απόβλητα σύμφωνα με τις τοπικές κατευθυντήριες γραμμές. Οι πληροφορίες για την απόρριψη παρέχονται στον σύνδεσμο «Hints for Disposal of Microscopy Products» (Συμβουλές για την απόρριψη των προϊόντων μικροσκοπίας) στη διεύθυνση www.microscopy-products.com. Εντός της ΕΕ, ο τρεχόντως εφαρμοζόμενος ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ είναι ο κανονισμός (ΕΚ) Αρ. 1272/2008 για την ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων, την τροποποίηση και την κατάργηση των Οδηγιών 67/548/ΕΟΚ και 1999/45/ΕΚ, και την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αρ. 1907/2006.

Βοηθητικά αντιδραστήρια

Αρ. καταλόγου 1.00327	Υδροχλωρικό οξύ σε αιθανόλη για μικροσκοπία	1 l, 5 l
Αρ. καταλόγου 1.00496	Διάλυμα φορμαλδεϋδης 4%, ρυθμιστικό, pH 6,9 (περίπου 10% διάλυμα φορμαλίνης) για ιστολογία	350 ml και 700 ml (σε ευρύλαιμη φιάλη), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Αρ. καταλόγου 1.00497	Κιτ τροποποιημένης χρώσης κατά AFB-Color για την ανίχνευση οξεάντοχων βακτηρίων (AFB) με μέθοδο θερμής χρώσης	1 set
Αρ. καταλόγου 1.00579	DPX νέο μη υδατικό μέσο στερέωσης για μικροσκοπία	500 ml
Αρ. καταλόγου 1.00869	Entellan™ νέο για καλυπτρίδα για μικροσκοπία	500 ml
Αρ. καταλόγου 1.02560	Πλάκες ελέγχου AFB ISOSLIDE™ με ιστό αναφοράς για ανίχνευση οξεάντοχων βακτηρίων στο ιστολογικό υλικό	25 δοκιμασίες
Αρ. καταλόγου 1.03999	Διάλυμα φορμαλδεϋδης τουλάχιστον 37% χωρίς οξύ σταθεροποιημένο με περίπου 10% μεθανόλη και ανθρακικό ασβέστιο για ιστολογία	1 l, 2,5 l, 25 l
Αρ. καταλόγου 1.04699	Έλαιο εμβάπτισης για μικροσκοπία	Σταγονομετρική φιάλη 100ml, 100 ml, 500 ml
Αρ. καταλόγου 1.07164	Παστίλιες παραφίνης με σημείο στερεοποίησης περίπου 56-58 °C για ιστολογία	10 kg (4 x 2,5 kg)
Αρ. καταλόγου 1.07961	Entellan™ νέο μέσο ταχείας στερέωσης για μικροσκοπία	100 ml, 500 ml, 1 l
Αρ. καταλόγου 1.08000	Sputofluol™ για μικροσκοπία	1 l
Αρ. καταλόγου 1.08298	Ξυλένιο (ισομερές μείγμα) για ιστολογία	4 l
Αρ. καταλόγου 1.09016	Neo-Mount™ άνυδρο μέσο στερέωσης για μικροσκοπία	Σταγονομετρική φιάλη 100 ml, 500 ml
Αρ. καταλόγου 1.09843	Neo-Clear™ (υποκατάστατο Ξυλενίου) για μικροσκοπία	5 l
Αρ. καταλόγου 1.11609	Παστίλιες Histosec™ με σημείο στερεοποίησης 56-58 °C μέσο έγκλεισης για ιστολογία	1 kg, 10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Αρ. καταλόγου 1.15161	Παστίλιες Histosec™ (χωρίς DMSO) με σημείο στερεοποίησης 56-58 °C μέσο έγκλεισης για ιστολογία	10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Αρ. καταλόγου 1.16450	AFB-Color Σετ χρώσης για τη μικροσκοπική ανίχνευση οξεάντοχων βακτηρίων (AFB) μέσω ψυχρής χρώσης	1 set

Ταξινόμηση κινδύνου

Αρ. καταλόγου 1.01597.0001

Παρακαλούμε ανατρέξτε στην ταξινόμηση κινδύνου που είναι εκτυπωμένη επί της ετικέτας και στις πληροφορίες που παρέχονται στο φύλλο δεδομένων ασφάλειας. Το φύλλο δεδομένων ασφάλειας διατίθεται στον ιστότοπο και κατόπιν αιτήματος.

Κύρια συστατικά του προϊόντος

Αρ. καταλόγου 1.01597.0001

Αντιδραστήριο 1

C.I. 41000 12,0 g/l

C.I. 45170 6,0 g/l

1 l = 1,117 kg

Αντιδραστήριο 2

C₃H₈O 543,3 g/l

HCl τουλάχιστον 37 % 15,7 g/l

1 l = 0,878 kg

Αντιδραστήριο 3

KMnO₄ 5,0 g/l

1 l = 1,013 kg

Γενική παρατήρηση

Εάν κατά τη χρήση αυτής της συσκευής ή εξαιτίας της χρήσης της, προκληθεί σοβαρό συμβάν, να το αναφέρετε στον κατασκευαστή και/ή στον εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπό του καθώς και στις εθνικές αρχές.

Δογοτεχνία

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Υγρό και ατμοί πολύ εύφλεκτα.

H290: Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα.

H319: Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.

H336: Μπορεί να προκαλέσει υπνηλία ή ζάλη.

H411: Τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.

P210: Μακριά από θερμότητα, θερμές επιφάνειες, σπινθήρες, γυμνή φλόγα και άλλες πηγές ανάφλεξης. Μην καπνίζετε.

P233: Να διατηρείται ο περιέκτης ερμητικά κλειστός.

P234: Να διατηρείται μόνο στην αρχική συσκευασία.

P240: Γείωση και ισοδυναμική σύνδεση του περιέκτη και του εξοπλισμού του δέκτη.

P273: Να αποφεύγεται η ελευθέρωση στο περιβάλλον.

P305 + P351 + P338: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Αν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, αν είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.

Αντιδραστήριο 1:

H226: Υγρό και ατμοί εύφλεκτα.

H319: Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.

Αντιδραστήριο 2:

H225: Υγρό και ατμοί πολύ εύφλεκτα.

H290: Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα.

H319: Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.

H336: Μπορεί να προκαλέσει υπνηλία ή ζάλη.

Αντιδραστήριο 3:

H411: Τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.

Ιστορικό αναθεώρησης

Έκδοση	Σχόλιο τροποποίησης
2024-Jul-19	Αρχική έκδοση με την εισαγωγή του ιστορικού αναθεώρησης



Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης



Κατασκευαστής



Αριθμός καταλόγου



Κωδικός παρτίδας



Προσοχή, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα

Χρήση έως
EEEE-MM-HH

Όρια θερμοκρασίας

Status: 2024-Jul-19

H Life Science Business της Merck λειτουργεί ως MilliporeSigma στις Η.Π.Α. και τον Καναδά

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany και/ή οι συνδεδεμένες αυτής εταιρείες. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος. Το Merck και το Sigma-Aldrich είναι εμπορικά σήματα της Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Όλα τα άλλα εμπορικά σήματα αποτελούν ιδιοκτησία των αντίστοιχων κατόχων τους. Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τα εμπορικά σήματα είναι διαθέσιμες μέσω πόρων που διατίθενται δημοσίως.



Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440

www.sigmaaldrich.com

1.01597.0001 **REF**

Mikroskopi

AFB-Fluor fenolfritt

färgningskit för undersökning av syrefasta bakterier med fluorescensmikroskop (auramin-rodamin-färgning)

Endast för yrkesmässig användning

Medicinteknisk produkt för *in vitro*-diagnostik

Avsett syfte

Denna "AFB-Fluor fenolfritt - färgningskit för undersökning av syrefasta bakterier med fluorescensmikroskop (auramin-rodamin-färgning)" används till humanmedicinsk celldiagnostik för bakteriologisk, cytologisk och histologisk undersökning av provmaterial av mänskligt ursprung. Det är en bruksfärdig färgningssats som, när den används tillsammans med andra *in vitro*-diagnostiska produkter från vårt sortiment, möjliggör en diagnostisk utvärdering av bakteriella målstrukturer (syrefasta bakterier (AFB)) genom fixering, inbäddning, färgning, motfärgning och montering i bakteriologiska, cytologiska och histologiska provmaterial, t.ex. utstryk av berikade bakterieodlingar eller histologiska snitt av t.ex. lunga.

Den avgörande egenskapen för färgningssatsen AFB-Fluor fenolfritt är närvaron av fluorescerande färgämnen i färgningslösningen. Detta medger snabb och säker identifiering av de syrefasta bakterierna under fluorescensmikroskop. Dessutom bereds färgningslösningen utan potentiellt farlig fenol, så att säkerheten för användaren ökas.

Färgningssatsen levereras bruksfärdig i praktiska droppflaskor och innehåller alla reagenser som behövs vid färgning av syrefasta bakterier i utstryk och i histologiska vävnadsprover.

Ofärgade strukturer har relativt låg kontrast och är extremt svåra att särskilja i ljusmikroskop. De bilder som skapas med färgningslösningen underlättar för den behöriga och kvalificerade forskaren att bättre definiera formen och strukturen i sådant fall. Ytterligare tester måste utföras enligt erkända, validerade metoder för att ställa en slutlig diagnos.

Princip

Den klassiska Ziehl-Neelsen-metoden bestäms av den höga andelen vax och lipider i cellväggen, eftersom syrefasta bakterier bara tar upp färgningsämnen mycket långsamt. För att påskynda absorptionen av fuchsinfärgämnet och därmed bildandet av mykolate-fuchsin-komplexet i cellväggen upphettas normalt carbolfuchsinlösningen som appliceras på beredningen tills den bildar ånga.

När syrefasta bakterier har absorberat fuchsinfärgämnet är det nästan omöjligt att avfärga dem igen, även om de intensivt behandlas med en avfärgande lösning som saltsyra i etanol. Följaktligen betecknas syrefasta bakterier som syra- och alkoholfasta när det gäller färgning. Vid användning av den färgningssatsen AFB-Fluor fenolfritt gör innehållet av fluorescensfärgerna auramin och rodamin i färgningssatsen att uppvärmningssteget inte behövs. Dessa färgämnen avsätts på de syrefasta bakteriernas cellvägg, och beroende av mikroskopfilter visas de gula eller röda mot en svart bakgrund. Förbehandling av prover med Sputofluol™ löser upp bakterierna från omgivande klibbigt slem och cellmaterial.

Provmaterial

Utstryk av bakteriologiskt material som har lufttorkats, värmefixerats och förbehandlats med Sputofluol™, t.ex. sputum, utstryk från finnålsaspirationsbiopsier (FNAB), sköljningar, imprint, effusioner, pus, exsudat och flytande samt fasta odlingar

Snitt av formalinfixerad human vävnad, inbäddad i paraffin (snittjocklek 3–4 µm)

Reagens

Kat.nr 1.01597.0001 AFB-Fluor fenolfritt färgningskit för undersökning av syrefasta bakterier med fluorescensmikroskop (auramin-rodamin-färgning)

Paketinnehåll:

Färgningssatsen innehåller

Reagens 1:	Auramin-rodaminlösning	200 ml
Reagens 2:	Avfärgningslösning	2 x 200 ml
Reagens 3:	Motfärgningslösning (KMnO ₄)	200 ml

Dessutom behövs:

Kat.nr 1.08000 Sputofluol™ för mikroskopi

1 l

Provberedning

Provtagningen måste utföras av kvalificerad personal.

Alla prover måste bearbetas med modern teknik.

Alla prover måste märkas tydligt.

Lämpliga instrument ska användas för provtagning och provberedning. Följ tillverkarens instruktioner för applicering/användning.

Vid användning av respektive hjälpmedel måste respektive bruksanvisningar följas.

Sputum

Syrefasta bakterier ska förbehandlas med Sputofluol™ för att lösas upp från slem och cellulära strukturer. Under processen löser den aktiva ingrediensen hypoklorit upp det organiska materialet genom oxidation och frisätter försiktigt syrefasta bakterier så att de kan bearbetas ytterligare.

Reagensberedning: Beredning av Sputofluol™-lösning 15 %

För beredning av ca 100 ml lösning blandas:

Sputofluol™	15 ml
Destillerat vatten	85 ml

Bereda provmaterial i centrifugrör:	
Prov	1 del (min. 2 ml)
Sputofluol™-lösning (15 % i destillerat vatten)	3 delar
skaka den kraftigt	10 min.
Centrifugera vid 3 000–4 800 rpm	20 min
Dekantera supernatanten Bered utstryk av sedimentet Lufttorka	

Punktat, sköljningar, sediment

Efter lämpliga anrikningsåtgärder smetar du ut provmaterialet på objektglaset och låter det lufttorka.

Histologiska snitt

AFB-Fluor fenolfritt kan användas till att färga histologiska snitt.

Avparaffinera de snitten på sedvanligt vis och rehydrera med alkohol i fallande koncentrationer.

Fixering av utstryksprover

Proverna fixeras över lågan på en Bunsenbrännare (2–3 gånger, undvik överhettning).

Proverna kan även fixeras genom upphettning vid 100–110 °C i ett torkskåp eller på en värmeplatta i 20 minuter.

Alltför höga temperaturer eller långvarig uppvärmning kan försämra färgningsprestandan.

Reagensberedning

Reagensen i AFB-Fluor fenolfritt - färgningskit för undersökning av syrefasta bakterier med fluorescensmikroskop (auramin-rodamin-färgning) är bruksfärdiga. Spädning av lösningarna är inte nödvändigt – det resulterar i ett försämrat färgningsresultat och en försämrad färgningsstabilitet.

På grund av hög viskositet måste den fenolfria auramin-rodamin-färgningslösningen (reagens 1) skakas kraftfullt före användning.

Förfarande

Färgning av utstryksprover

Färgning på färgningsställ

Objektglas med fixerat utstryk		
Reagens 1 (auramin-rodaminlösning)	applicera droppvis, äck fullständigt och färga	15 min.
Rinnande kranvatten	skölj noggrant	30 s
Reagens 2 (avfärgningslösning)	aftropfen, täck fullständigt och låt reagera	1 min.
Rinnande kranvatten	skölj noggrant	30 s
Reagens 3 (motfärgningslösning)	applicera droppvis, äck fullständigt och färga	5 min.
Rinnande kranvatten	skölj noggrant	30 s
Lufttorka		

Det rekommenderas att täcka med icke-vattenhaltiga monteringsmedier (t.ex. Neo-Mount™, Entellan™ ny eller DPX ny) och täckglas om de utstryks-prover ska förvaras i flera månader. De infärgade proverna måste också torkas mycket ordentligt om så är fallet.

Det rekommenderas att immersionsolja används för analys av infärgade objektglas med en mikroskopisk förstoring på >40 x.

Färgning av histologiska prover

Färgning på färgningsställ

Avparaffinera de histologiska objektglasen på sedvanligt vis och rehydrera med alkohol i fallande koncentrationer.

Färglösningarna appliceras på objektglasen droppvis och bör helt täcka paraffinsnitt.

De angivna tiderna ska följas för att ett optimalt färgningsresultat ska kunna garanteras.

Objektglas med histologisk vävnad	
Destillerat vatten	skölj
Reagens 1 (auramin-rodaminlösning)	15 min.
Rinnande kranvatten	30 s
Reagens 2 (avfärgningslösning)	1 min.
Rinnande kranvatten	30 s
Reagens 3 (motfärgningslösning)	5 min.
Rinnande kranvatten	30 s
Etanol 70%	1 min.
Etanol 70%	1 min.
Etanol 96%	1 min.
Etanol 96%	1 min.
Etanol 100%	1 min.
Etanol 100%	1 min.
Xylen eller Neo-Clear™	5 min.
Xylen eller Neo-Clear™	5 min.
Montera de Neo-Clear™-våta objektglasen med Neo-Mount™ eller de xylen-våta objektglasen med t.ex. Entellan™ ny och täckglas.	

Efter dehydratisering (med alkohol i stigande koncentrationer) och klargö-rande med xylene eller Neo-Clear™ kan histologiska prover monteras med vattenfria monteringsmedel (t.ex. Neo-Mount™, Entellan™ ny eller DPX ny) och täckglas. Efter det är de redo att förvaras.

Resultat

syrefasta bakterier (i fluorescensmikroskop)	rödorange (rodamin) eller gulgrönt (auramin) - beroende av använd filterkombination
Bakgrund	mörkt till svart

Färgning för ljus- och fluorescensmikroskopi

Fluorescensfärgningen med färgningssatsen AFB-Fluor fenolfritt är även idealiskt för ytterligare färgning av syrafasta bakterier för diagnos med ljusmikroskopi, t.ex. med färgningssatsen AFB-Color (kat.nr 1.16450) eller AFB-Color modifierat (kat.nr 1.00497).

De omonterade prover som färgats med färgningssatsen AFB-Fluor fenolfritt kan användas mot flera decennier inte att en taxonomisk klassificering med mikroskop är möjlig. Om syrefasta bakterier upptäcks måste ytterligare analyser göras i lagoratorier med särskild utrustning. Inte heller bakteriernas vitalitet (akti-va, inaktiva) kan fastställas.

I prover som behandlats på det här sättet syns de syrafasta bakterierna magenta-röda mot ljusgrön (AFB-Color) eller ljusblå (AFB-Color modifierat) bakgrund under ljusmikroskop.

Utvärdering

Ett positivt resultat innebär ”förekomst av syrefasta bakterier” och ett ne-gativt resultat innebär ”ingen förekomst av syrefasta bakterier”. Ett positivt resultat betyder inte att en taxonomisk klassificering med mikroskop är möjlig. Om syrefasta bakterier upptäcks måste ytterligare analyser göras i lagoratorier med särskild utrustning. Inte heller bakteriernas vitalitet (akti-va, inaktiva) kan fastställas.

Om resultatet inte är utslagsgivande, rekommenderas ytterligare färgning av proverna för vidare ljusmikroskopisk diagnos, t.ex. med färgningssatsen AFB-Color (kat.nr 1.16450) eller AFB-Color modifierat (kat.nr 1.00497).

Felsökning

Fixering av utstryksprover

Tillräcklig värmefixering med en Bunsenbrännare eller ett värmeskåp är viktigt för att förebygga provernas infektiösa potential såväl som ytterligare bakteriell proliferation.

Ingen färgning av syrefasta bakterier

De kritiska stegen i färgningsprocessen är avfärgningssteget, vilket kan påverkas av utstrykets tjocklek. Dessutom är en färsk lösning av saltsyra i etanol ytterst reaktiv, vilket innebär att resultatet ska bedömas med försiktighet. Under avfärgningssteget ska inkubationstiderna som anges i det här protokollet följas exakt. Annars kan resultaten bli falskt negativa.

För kraftig bakgrundsfärgning

Om bakgrunden är för kraftigt färgad i den ljusmikroskopiska bilden (mörk-blå), bör reagens 1 (auramin-rodaminlösning) blandas bättre följt av bättre avfärgning. Eftersom färglösningen är mycket viskös, bör objektglaset vaggas under avfärgningssteget med reagens 2 (avfärgningslösning).

Tekniska anmärkningar

Mikroskopet som används ska uppfylla kraven för ett laboratorium för med-icinsk diagnostik.

Rekommenderad filterkombination för fluorescensmikroskopi:

Excitationsfilter	490 - 570 nm
Färgseparator	525 och 635 nm
Emissionsfilter	505 - 600 nm

Om ett automatiskt färgningssystem används ska du följa bruksanvisningen från leverantören av systemet och programvaran

Ta bort överskott av immersionsolja före inmatningen.

Analytiska prestandaegenskaper

”AFB-Fluor fenolfritt - färgningskit” infärgar och visualiserar därmed biologiska strukturer enligt beskrivningen i kapitlet ”Resultat” i den här bruksanvisningen. Produkten får bara användas av behöriga och kvalificera-de personer för bland annat prov- och reagenspreparering, provhantering, vävnadsanalys, val av lämpliga kontroller med mera.

Produktens analytiska prestanda bekräftas genom att varje produktionssats testas.

För följande infärgningar verifierades analytiska prestanda avseende speci-ficitet, känslighet och repeterbarhet hos produkten i 100 % av fallen:

	Specificitet mellan analyser	Känslighet mellan analyser	Specificitet inom en analys	Känslighet inom en analys
Histologisk infärgning				
syrefasta bakte-rier (i fluorescens-mikroskop)	14/14	14/14	6/6	6/6
Bakgrund	14/14	14/14	6/6	6/6
Utstryksfärgning				
syrefasta bakte-rier (i fluorescens-mikroskop)	14/14	14/14	6/6	6/6
Bakgrund	14/14	14/14	6/6	6/6

Analytiska prestandaresultat

Intradata (erhållna från samma sats) och interdata (erhållna från olika satser) anger antalet korrekt infärgade strukturer i förhållande till antalet genomförda analyser.

Kliniska prestandaegenskaper

Dessutom har produktens kliniska prestanda bevisats framgångsrikt i flera vetenskapliga publikationer.

AFB-Fluor fenolfritt - färgningskit har använts med lyckat resultat i klinisk miljö i flera decennier inom många olika användningsområden.

I synnerhet har klinisk prestanda för AFB-Fluor fenolfritt - färgningskit bestämts genom att fastställa känslighet och specificitet samt PPV och NPV i en intern studie:

	Auramin-rodamin-färgning
Känslighet	14/14
Specificitet	15/15

Känslighet: 14 prover av 14: 100 %
Specificitet: 15 prover av 15: 100 %
Positivt prediktivt värde (PPV): 100 %
Negativt prediktivt värde (NPV): 100 %

Resultatet av prestandautvärderingen bekräftar att produkten är lämplig för den avsedda användningen och fungerar tillförlitligt.

Men den diagnostiska tolkningen av infärgningsresultatet ska utföras av kvalificerade och behöriga yrkesverksamma personer med hänsyn till pa-tientanamnes, morfologi, användning av adekvata kontroller och eventuella andra diagnostiska test. Den här metoden kan användas som tillägg vid humandiagnostik.

Diagnostik

Diagnoser ska ställas av behörig och kvalificerad personal.
Giltiga nomenklaturer måste användas.
Den här metoden kan användas som tillägg vid humandiagnostik.
Ytterligare tester måste väljas och genomföras i enlighet med erkända metoder.
Lämpliga kontroller (t.ex. ISOSLIDE™ AFB, kat.nr 1.02560.0001) ska genomföras med varje applicering för att undvika ett felaktigt resultat.
Om resultatet inte är utslagsgivande, rekommenderas ytterligare färgning av proverna för vidare ljusmikroskopisk diagnos, t.ex. med färgningssatsen AFB-Color (kat.nr 1.16450) eller AFB-Color modifierat (kat.nr 1.00497).

Förvaring

Förvara AFB-Fluor fenolfritt - färgningskit för undersökning av syrefasta bakterier med fluorescensmikroskop (auramin-rodamin-färgning) vid +15 °C till +25 °C.

Hållbarhetstid

AFB-Fluor fenolfritt - färgningskit för undersökning av syrefasta bakterier med fluorescensmikroskop (auramin-rodamin-färgning) kan användas fram till angivet utgångsdatum.
När droppflaskan har öppnats för första gången kan innehållet användas fram till angivet utgångsdatum om den förvaras vid +15 °C till +25 °C.
Droppflaskorna måste alltid vara väl tillslutna.
Färgning av avfärgningslösningen (reagens 2) har ingen effekt på färgningsprocesserna eller diagnostiseringen.

Kapacitet

Paketet räcker för upp till 60 - 65 appliceringar. Utbytet kan bli ännu högre, beroende av utstrykens tjocklek.

Ytterligare instruktioner

Endast för yrkesmässig användning.
För att undvika fel får appliceringen endast utföras av kvalificerad personal.
Nationella riktlinjer för arbetsskydd och kvalitetssäkring måste följas.
Mikroskop som används måste vara utrustade enligt standard.
Använd om nödvändigt en standardcentrifug som är lämplig i laboratorier för medicinsk diagnostik.

Skydd mot infektion

Effektiva åtgärder måste vidtas för att skydda mot infektion i linje med laboratoriets riktlinjer.

Instruktioner för avfallshantering

Paketet måste kasseras i enlighet med gällande riktlinjer för avfallshantering.
Använda lösningar och lösningar som passerat utgångsdatum måste tas om hand som farligt avfall i enlighet med lokala riktlinjer. Information om avfallshantering finns under snabbblänken "Hints for Disposal of Microscopy Products" (Tips för kassering av mikroskopiprodukter) på www.microscopy-products.com. Inom EU gäller förordning (EG) nr 1272/2008 om klassificering, märkning och förpackning av ämnen och blandningar, ändring och upphävande direktiv 67/548/EEG och 1999/45/EG och ändring av förordning (EG) nr 1907/2006 tillämpas.

Hjälpagens

Kat.nr 1.00327	Saltsyra i etanol för mikroskopi	1 l, 5 l
Kat.nr. 1.00496	Formaldehydlösning 4%, buffrad, pH 6,9 (ca 10% formalinlösning) för histologi	350 ml och 700 ml (i bredhalsad flaska), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Kat.nr 1.00497	AFB-Color modifierat färgningskit för detektion av syrefasta bakterier (AFB) genom varmfärgning	1 set
Kat.nr 1.00579	DPX ny vattenfritt monteringsmedium för mikroskopi	500 ml
Kat.nr 1.00869	Entellan™ ny täckglas för mikroskopi	500 ml
Kat.nr 1.02560	ISOSLIDE™ AFB kontrollglas med referensvävnad för detektion av syrefasta bakterier i histologisk vävnad	25 test
Kat.nr 1.03999	Formaldehydlösning min. 37%, fri från syra, stabiliserad med ca 10% metanol och kalciumkarbonat för histologi	1 l, 2,5 l, 25 l
Kat.nr 1.04699	Immersionsolja för mikroskopi	100 ml dropp-flaska, 100 ml, 500 ml
Kat.nr 1.07164	Paraffinpastiller stelningspunkt ca 56-58 °C för histologi	10 kg (4 x 2,5 kg)

Kat.nr 1.07961	Entellan™ ny snabbt monteringsmedium för mikroskopi	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat.nr 1.08000	Sputofluo™ för mikroskopi	1 l
Kat.nr 1.08298	Xylen (isomerblandning) för histologi	4 l
Kat.nr 1.09016	Neo-Mount™ vattenfritt monteringsmedel för mikroskopi	100 ml dropp-flaska, 500 ml
Kat.nr 1.09843	Neo-Clear™ (xylensubstitut) för mikroskopi	5 l
Kat.nr 1.11609	Histosec™ pastiller stelningspunkt 56–58 °C, inbäddningsmedel för histologi	1 kg, 10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Kat.nr 1.15161	Histosec™ pastiller (utan DMSO) stelningspunkt 56–58 °C, inbäddningsmedel för histologi	10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Kat. nr 1.16450	AFB-Color färgningskit för mikroskopundersökning av syrefasta bakterier (AFB) genom kallfärgning	1 set

Faroklassificering

Kat.nr 1.01597.0001
Observera faroklassificeringen på etiketten och uppgifterna i säkerhetsdatabladet.
Säkerhetsdatabladet finns på webbplatsen och går att få på begäran.

Produktens huvudsakliga beståndsdelar

Kat.nr 1.01597.0001		
Reagens 1		
Färgindex 41000	12,0 g/l	
Färgindex 45170	6,0 g/l	
1 l = 1,117 kg		
Reagens 2		
C ₃ H ₈ O	543,3 g/l	
HCl min. 37 %	15,7 g/l	
1 l = 0,878 kg		
Reagens 3		
KMnO ₄	5,0 g/l	
1 l = 1,013 kg		

Generell anmärkning

Om en allvarlig händelse inträffat vid eller som ett resultat av användning av den här enheten ska den rapporteras till tillverkaren eller dess auktoriserade representant och till den nationella myndigheten.

Litteratur

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Mycket brandfarlig vätska och ånga.
H290: Kan vara korrosivt för metaller.
H319: Orsakar allvarlig ögonirritation.
H336: Kan göra att man blir dåsig eller omtöcknad.
H411: Giftigt för vattenlevande organismer med långtidseffekter.

P210: Får inte utsättas för värme, heta ytor, gnistor, öppen låga eller andra antändningskällor. Rökning förbjuden.
P233: Behållaren ska vara väl tillsluten.
P234: Förvaras endast i originalförpackningen.
P240: Jorda och potentialförbind behållare och mottagarutrustning.
P273: Undvik utsläpp till miljön.
P305 + P351 + P338: VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.

Reagens 1:
H226: Brandfarlig vätska och ånga.
H319: Orsakar allvarlig ögonirritation.

Reagens 2:
H225: Mycket brandfarlig vätska och ånga.
H290: Kan vara korrosivt för metaller.
H319: Orsakar allvarlig ögonirritation.
H336: Kan göra att man blir dåsig eller omtöcknad.

Reagens 3:
H411: Giftigt för vattenlevande organismer med långtidseffekter.

Revisionshistorik

Version	Ändringskommentar
2024-Jul-19	Första version med införande av revisionshistorik



Se bruksanvisningen



Tillverkare



Katalognummer



Satskod



Försiktighet, se medföljande dokument



Används före
ÅÅÅÅ-MM-DD



Temperatur-
begränsning

Status: 2024-Jul-19

1.01597.0001 **REF****Mikroskopie****AFB-Fluor bez obsahu fenolu**

Barvicí souprava pro stanovení acidorezistentních bakterií pomocí fluorescenční mikroskopie (barvení směsí auramin-rhodamin)

Pouze pro profesionální použití**IVD**Zdravotnický prostředek pro diagnostiku *in vitro*

CE

Zamýšlený účel

Tato „AFB-Fluor bez obsahu fenolu - Barvicí souprava pro stanovení acidorezistentních bakterií pomocí fluorescenční mikroskopie (barvení směsí auramin-rhodamin)“ se používá k buněčné diagnostice v oblasti humánní medicíny a slouží k bakteriologickému, cytologickému a histologickému vyšetření vzorků lidského původu. Jedná se o barvicí soupravu, kterou lze použít v kombinaci s jinými výrobky pro diagnostiku *in vitro* z našeho portfolia umožňuje hodnotit cílové bakteriální struktury (acidorezistentní bakterie (AFB)) prostřednictvím fixace, barvení, dobarvení, montování v materiálech bakteriologických, cytologických a histologických vzorků, například v náterech z pomnožených bakteriálních kultur nebo histologické řezy, například plic, pro diagnostické účely.

Rozhodující vlastností soupravy pro barvení AFB-Fluor bez obsahu fenolu je přítomnost fluorescenčních barviv v barvicím roztoku. To umožňuje rychlou a bezpečnou identifikaci acidorezistentních bakterií pod fluorescenčním mikroskopem. Kromě toho je barvicí roztok připraven bez potenciálně nebezpečného fenolu, což zvyšuje bezpečnost uživatele.

Tato souprava pro barvení se dodává připravená k použití v praktických kapacitách lahvičkách a obsahuje všechna činidla potřebná k barvení acidorezistentních bakterií v náterech a histologických vzorcích tkání.

Nebarvené struktury mají naopak relativně nízký kontrast a je velmi obtížné je rozlišit pod světelným mikroskopem. V takových případech pomáhají autorizovanému a kvalifikovanému výzkumnému pracovníkovi lépe definovat formu a strukturu snímky získané použitím barvicích roztoků. Ke stanovení definitivní diagnózy je třeba provést další testy podle uznávaných platných metod.

Princip

Klasická Ziehl-Neelsenova metoda vychází z vysokého podílu vosku a lipidů v buněčné stěně, protože acidorezistentní bakterie přijímají barvicí barviva jen velmi pomalu. Aby se urychlila absorpce fuchsinového barviva a tím tvorba komplexu mykolát-fuchsin v buněčné stěně, roztok karbolfuchsinu aplikovaný na přípravek se normálně zahřívá, dokud nevytvoří páru.

Jakmile acidorezistentní bakterie absorbují fuchsinové barvivo, je prakticky nemožné je znovu odbarvit, i po intenzivním ošetření odbarvujícím roztokem jako je např. kyselina chlorovodíková v ethanolu. Acidorezistentní bakterie jsou proto označovány jako acidorezistentní a alkohol-rezistentní bakterie. Při použití soupravy pro barvení AFB-Fluor bez obsahu fenolu je díky použití fluorescenčních barviv auraminu a rhodaminu v roztoku pro barvení AFB-Fluor bez obsahu fenolu zahřívání zbytečné. Tato barviva se usazují na buněčné stěně acidorezistentních bakterií a v závislosti na filtru mikroskopu se na černém pozadí jeví jako žlutá nebo červená.

Předběžné ošetření vzorků roztokem Sputofluor™ oddělí bakterie od okolního vazkého sputa a buněčného materiálu.

Materiál vzorku

Volně zaschlé a teplem fixované nátěry bakteriologických materiálů předem ošetřené přípravkem Sputofluor™, jako jsou sputum, nátěry z aspirátu získaného biopsií tenkou jehlou (FNAB), výplachy, otisky, efuze, hnis, exudáty, tekuté nebo pevné kultury.

Řezy formalínem fixované tkáně lidského původu zalité do parafinu (3-4 µm silné parafinové řezy)

Činidla

Kat.nr 1.01597.0001 AFB-Fluor bez obsahu fenolu
Barvicí souprava pro stanovení acidorezistentních bakterií pomocí fluorescenční mikroskopie (barvení směsí auramin-rhodamin)

Složky balení:

Barvicí souprava obsahuje

Činidlo 1:	Roztok auraminu a rhodaminu	200 ml
Činidlo 2:	Odbarvovací roztok	2 x 200 ml
Činidlo 3:	Kontrabarvicí roztok (KMnO ₄)	200 ml

Další potřebné materiály:

Kat. č. 1.08000	Sputofluor™ pro mikroskopii	1 l
-----------------	-----------------------------	-----

Příprava vzorku

Odběr vzorku musí provést kvalifikovaný personál.

Se všemi vzorky je nutné nakládat za použití nejmodernější technologií. Všechny vzorky musejí být jasně označené.

K odběru vzorků a jejich přípravě je nutné použít vhodné nástroje. Dodržujte pokyny výrobce týkající se aplikace/použití.

Při použití odpovídajících pomocných činidel je třeba dodržovat příslušné pokyny k použití.

Sputum

Acidorezistentní bakterie je třeba předem ošetřit přípravkem Sputofluor™ a oddělit je tak od hlenu a buněčných struktur. V tomto procesu aktivní složka, chlornan, rozpustí organický materiál oxidací a jemně uvolní acidorezistentní bakterie, aby je bylo možné dále zpracovat.

Příprava činidla: Příprava roztoku Sputofluor™ 15 %

Na přípravu přibližně 100 ml roztoku smíchejte:

Sputofluor™	15 ml
Destilovaná voda	85 ml

Příprava materiálu vzorku v centrifugačních zkumavkách:	
Vzorek	1 díl (min. 2 ml)
Roztok Sputofluor™ (15% v destilované vodě)	3 dílů
Řádné protřeptejte	10 min
Centrifugujte při 3 000–4 800 ot./min	20 min
Slijte supernatant Připravte nátěry sedimentu Sušení na vzduchu	

Punktáty, laváže a sedimenty

Po příslušném obohacení naneste materiál vzorku na sklíčko a ponechte volně zaschnout.

Histologické řezy

K barvení histologických řezů lze použít AFB-Fluor bez obsahu fenolu.

Řezy zbavte obvyklým způsobem parafinu a rehydratujte je sestupnou alkoholovou řadou.

Fixace nátěrů vzorků

Vzorky se fixují nad plamenem Bunsenova kahanu (2–3krát; dávejte pozor, abyste vzorky nezahřáli příliš).

Vzorky lze také fixovat zahřátím na 100–110 °C v sušárně nebo na zahřívací desce po dobu 20 minut.

Nadměrné teploty nebo příliš dlouhé zahřívání mohou vést ke zhoršení výsledku barvení.

Příprava činidla

Činidla AFB-Fluor bez obsahu fenolu - Barvicí souprava pro stanovení acidorezistentních bakterií pomocí fluorescenční mikroskopie (barvení směsí auramin-rhodamin) jsou určena k přímému použití, ředění roztoků není nutné a pouze vede ke zhoršení výsledného barvení a jeho stability.

Vzhledem k vysoké viskozitě je třeba barvicí roztok auraminu a rhodaminu bez fenolu (Činidlo 1) před použitím silně protřepat.

Postup

Barvení nátěrů vzorků

Barvení v barvicím stojánku

Skličko s fixovaným nátěrem		
Činidlo 1 (roztok auraminu a rhodaminu)	aplikujte po kapkách, zcela zakryjte a obarvěte	15 min
Tekoucí vodovodní voda	pečlivě opláchněte	30 sekundy
Činidlo 2 (odbarvovací roztok)	aplikujte po kapkách, zcela zakryjte a nechte reagovat	1 min
Tekoucí vodovodní voda	pečlivě opláchněte	30 sekundy
Činidlo 3 (Kontrabarvicí roztok)	aplikujte po kapkách, zcela zakryjte a obarvěte	5 min
Tekoucí vodovodní voda	pečlivě opláchněte	30 sekundy
Ponechteje volně uschnout		

V případě skladování nátěrů vzorků po několik měsíců se doporučuje pře-krytí nevodným montovacím médiem (např. Neo-Mount™, Entellan™ nový nebo DPX nový) a použití krycího sklička. Pro tyto účely musejí být barvené vzorky velmi dobře vysušené.

Při analýze obarvených nátěrů pod mikroskopem při více než 40násobném zvětšení se doporučuje používat imerzní olej.

Barvení histologických vzorků

Barvení v barvicím stojánku

Histologická sklička zbavte obvyklým způsobem parafínu a rehydratujte je sestupnou alkoholovou řadou.

Barvicí roztoky se nanášejí po kapkách na podložní skličko a měly by zcela pokrýt parafínové řezy.

Uvedené časy by měly být dodrženy, aby byl zaručen optimální výsledek barvení.

Skličko s histologické tkání	
Destilovaná voda	opláchněte
Činidlo 1 (roztok auraminu a rhodaminu)	15 min
Tekoucí vodovodní voda	30 sekundy
Činidlo 2 (odbarvovací roztok)	1 min
Tekoucí vodovodní voda	30 sekundy
Činidlo 3 (kontrabarvicí roztok)	5 min
Tekoucí vodovodní voda	30 sekundy
Ethanol 70 %	1 min
Ethanol 70 %	1 min
Ethanol 96 %	1 min
Ethanol 96 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Xylen nebo Neo-Clear™	5 min
Xylen nebo Neo-Clear™	5 min
Vlhká sklička Neo-Clear™ montujte za použití přípravku Neo-Mount™, případně xylenová vlhká sklička např. za použití přípravku Entellan™ nový a krycího sklička.	

Po dehydrataci (vzestupnou alkoholovou řadou) a pročištění xylenem nebo přípravkem Neo-Clear™ lze histologické vzorky montovat za použití bezvodých montovacích přípravků (např. Neo-Mount™, Entellan™ nový nebo DPX nový) a krycího sklička a poté uskladnit.

Výsledek

Acidorezistentní bakterie (pod fluorescenčním mikroskopem)	červenooranžové (rhodamin) nebo žlutozelené (auramin) - podle použité kombinace filt
Pozadí	tmavé až černé

Barvení pro optický a fluorescenční mikroskop

Fluorescenční barvení pomocí soupravy AFB-Fluor bez obsahu fenolu je také ideální pro dodatečné barvení acidorezistentních bakterií pro diagnostiku pomocí optické mikroskopie, např. pomocí soupravy pro barvení AFB-Color (kat. č. 1.16450) nebo soupravy AFB-Color modifikovaná (kat. č. 1.00497).

Nemontované vzorky barvené soupravou AFB-Fluor bez obsahu fenolu lze používat přímo pro diagnostické účely. Po pečlivém odstranění oleje, do něhož byly vzorky případně ponořeny, lze vzorky dále barvit soupravou pro barvení AFB-Color nebo barvami pro barvení AFB-Color modifikovaná.

V takto ošetřeném vzorku se acidorezistentní bakterie pod optickým mikroskopem zobrazují purpurově červeně na světle zeleném (AFB-Color) nebo světle modrém (AFB-Color modifikovaná) pozadí.

Hodnocení

Pozitivní výsledek znamená „přítomnost acidorezistentní bakterie“, negativní výsledek znamená „nepřítomnost acidorezistentní bakterie“. Pozitivní výsledek ještě neznamená, že lze provést taxonomickou klasifikaci mikroskopicky. V případě detekce acidorezistentní bakterie je nutné provést další vyšetření ve specializovaných laboratořích. Nelze také stanovit vitalitu (aktivní, neaktivní) bakterií.

Pokud není výsledek průkazný, doporučuje se vzorky dodatečně obarvit pro další diagnostiku pod optickým mikroskopem, např. pomocí soupravy pro barvení AFB-Color (kat. č. 1.16450) nebo soupravy AFB-Color modifikovaná (kat. č. 1.00497).

Odstraňování potíží

Fixace nátěrů vzorků

Pro prevenci infekčního potenciálu vzorků a další proliferace bakterií je nezbytný dostatečný stupeň tepelné fixace pomocí Bunsenova kahanu nebo v horké komoře.

Absence obarvení acidorezistentní bakterie

Kritickým je v tomto procesu barvení krok odbarvení, který může být ovlivněn tloušťkou nátěru vzorku.

Čerstvý roztok kyseliny chlorovodíkové v ethanolu je navíc vysoce reaktivní, proto je třeba výsledky hodnotit s obezřetností. Inkubační doby uvedené v tomto protokolu v kroku odbarvení je nutné přesně dodržet. V opačném případě můžete získat falešně negativní výsledky.

Příliš silně obarvené pozadí

V případě, že je pozadí na snímku z optického mikroskopu příliš silně zbarvené (tmavě modré), je třeba činidlo 1 (roztok auraminu a rhodaminu) lépe promíchat a pozadí následně lépe odbarvit. Vzhledem k tomu, že barvicí roztok je vysoce viskózní, doporučuje se během odbarvování činidlem 2 (odbarvovací roztok) skličkem rychle kroužit.

Technické poznámky

Použitý mikroskop by měl splňovat požadavky zdravotnické diagnostické laboratoře.

Doporučená kombinace filtrů pro fluorescenční mikroskop:

Excitační filtr	490 - 570 nm
Monochromátor	525 a 635 nm
Emisní filtr	505 - 600 nm

Při používání automatizovaných barvicích systémů dodržujte prosím návod k použití poskytnutý dodavatelem systému a softwaru.

Před uložením odstraňte přebytek imerzního oleje.

Analytické výkonnostní parametry

„AFB-Fluor bez obsahu fenolu - barvicí souprava“ barví a tím vizualizuje biologické struktury, jak je popsáno v kapitole „Výsledek“ tohoto návodu k použití. Výrobek smějí používat pouze oprávněné a kvalifikované osoby, což platí mimo jiné pro přípravu vzorků a činidel, manipulaci se vzorky, zpracování histogramů, rozhodnutí o vhodných kontrolách a další.

Analytické parametry výrobku jsou validovány testováním každé výrobní šarže.

U následujícího barvení byla potvrzena analytická výkonnost výrobku z hlediska specifičnosti, senzitivity a opakovatelnosti na 100 %:

	Specifič-nost mezi testy	Senzitivita mezi testy	Specifič-nost v rámci testu	Senzitivita v rámci testu
Histologické barvení				
Acidorezistentní bakterie (pod fluorescenčním mikroskopem)	14/14	14/14	6/6	6/6
Pozadí	14/14	14/14	6/6	6/6
Barvení nátěru				
Acidorezistentní bakterie (pod fluorescenčním mikroskopem)	14/14	14/14	6/6	6/6
Pozadí	14/14	14/14	6/6	6/6

Výsledky testování analytických výkonnostních parametrů

Výsledky v rámci jednoho testu (provedeného na stejné šarži) a mezi testy (provedenými na různých šaržích) uvádějí počet správně obarvených struktur v poměru k počtu provedených testů.

Klinické výkonnostní parametry

Klinická účinnost tohoto výrobku byla také prokázána v mnoha odborných publikacích.

AFB-Fluor bez obsahu fenolu - barvicí souprava se už desítky let úspěšně používá v klinickém prostředí ve velkém počtu aplikací.

Klinická účinnost AFB-Fluor bez obsahu fenolu - barvicí souprava byla stanovena zejména stanovením její senzitivity a specifity a hodnot PPV a NPV v interní studii:

	Barvení auramin-rhodamin
Senzitivita	14/14
Specifičnost	15/15

Senzitivita: 14 vzorků z 14: 100 %
Specifičnost: 15 vzorků z 15: 100 %
Prediktivní hodnota pozitivního testu (PPV): 100 %
Prediktivní hodnota negativního testu (NPV): 100 %

Výsledky tohoto hodnocení funkčnosti potvrzují, že výrobek je vhodný pro zamýšlené použití a spolehlivě funguje.

Diagnostickou interpretaci výsledků barvení však musejí provádět kvalifikovaní a oprávnění odborníci po zvážení pacientovy anamnézy, morfologie, použití vhodných kontrol a případně dalších diagnostických testů. Tuto metodu lze používat jako doplňkovou v diagnostice u lidí.

Diagnostika

Stanovení diagnóz může provádět pouze autorizovaní a kvalifikovaní personál.
Je nutné používat platné nomenklatury.
Tuto metodu lze používat jako doplňkovou v diagnostice u lidí.
Další testy je nutné vybírat a používat na základě uznaných metod.
Při každé aplikaci použijte vhodné kontroly (např. ISOSLIDE™ AFB, kat. č. 1.02560.0001), předejdete tak nesprávným výsledkům.
Pokud není výsledek průkazný, doporučuje se vzorky dodatečně obarvit pro další diagnostiku pod optickým mikroskopem, např. pomocí soupravy pro barvení AFB-Color (kat. č. 1.16450) nebo soupravy AFB-Color modifikovaná (kat. č. 1.00497).

Skladování

AFB-Fluor bez obsahu fenolu - Barvicí souprava pro stanovení acidorezistentních bakterií pomocí fluorescenční mikroskopie (barvení směsí auramin-rhodamin) skladujte při teplotě +15 °C až +25 °C.

Doba použitelnosti

AFB-Fluor bez obsahu fenolu - Barvicí souprava pro stanovení acidorezistentních bakterií pomocí fluorescenční mikroskopie (barvení směsí auramin-rhodamin) lze používat až do uplynutí uvedené doby použitelnosti.
Po prvním otevření kapací lahvičky lze obsah používat až do uplynutí uvedené doby použitelnosti, je-li skladován při teplotě +15 °C až +25 °C.
Kapací lahvičky musejí být vždy těsně uzavřené.
Zabarvení odbarvovacího roztoku (čínidlo 2) nemá vliv na barvicí procesy ani diagnostiku.

Kapacita

Obsah balení stačí pro až 60 - 65 aplikací, výtěžnost může být i vyšší podle tloušťky stěrů.

Další pokyny

Pouze pro profesionální použití.
Aby nedocházelo k chybám, smí aplikaci provádět pouze kvalifikovaný personál.
Je nutno dodržovat vnitrostátní směrnice týkající se bezpečnosti práce a zajištění kvality.
Je nutno používat standardně vybavené mikroskopy.
V případě potřeby použijte standardní centrifugu vhodnou pro lékařskou diagnostickou laboratoř.

Ochrana před infekcí

Je nutno přijmout účinná opatření na ochranu před infekcí v souladu s laboratorními směrnicemi.

Pokyny ohledně likvidace

Balení musí být zlikvidováno v souladu se stávajícími směrnicemi týkajícími se likvidace.
Použité roztoky a roztoky po uplynutí doby použitelnosti je nutno likvidovat jako zvláštní odpad v souladu s místními směrnicemi. Informace ohledně likvidace lze získat pod rychlým odkazem „Hints for Disposal of Microscopy Products“ (Tipy pro likvidaci výrobků pro mikroskopii) na adrese www.microscopy-products.com. V rámci EU platí stávající příslušné NAŘÍZENÍ (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, měnící a rušící Směrnice 67/548/EHS a 1999/45/ES a měnící nařízení (ES) č. 1907/2006.

Pomocná čínidla

Kat. č. 1.00327	Kyselina chlorovodíková v ethanolu pro mikroskopii	1 l, 5 l
Kat. č. 1.00496	Formaldehydový roztok 4 %, pufrovaný, pH 6,9 (cca 10 % roztok formalínu) pro histologii	350 ml a 700 ml (v lahvičce s širokým hrdlem), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®

Kat. č. 1.00497	AFB-Color modifikovaná barvicí souprava pro detekci acidorezistentních bakterie (AFB) metodou horkého barvení	1 set
Kat. č. 1.00579	DPX nový bezvodé montovací médium pro mikroskopii	500 ml
Kat. č. 1.00869	Entellan™ nový pro coverslipper pro mikroskopii	500 ml
Kat. č. 1.02560	ISOSLIDE™ AFB Kontrolní sklíčka s referenční tkání pro detekci acidorezistentních bakterie v histologické tkáni	25 testů
Kat. č. 1.03999	Formaldehydový roztok min. 37 %, bez kyseliny stabilizovaný cca. 10 % methanolem a uhličitane m vápenatým pro histologii	1 l, 2,5 l, 25 l
Kat. č. 1.04699	Imerzní olej pro mikroskopii	100 ml kapací lahvička, 100 ml, 500 ml
Kat. č. 1.07164	Parafinové pastilky bod tuhnutí cca. 56-58°C pro histologii	10 kg (4 x 2,5 kg)
Kat. č. 1.07961	Entellan™ nový rychlé zalévací médium pro mikroskopii	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. č. 1.08000	Sputofluo™ pro mikroskopii	1 l
Kat. č. 1.08298	Xylen (isomerická směs) pro histologii	4 l
Kat. č. 1.09016	Neo-Mount™ bezvodé montovací medium pro mikroskopii	100 ml kapací lahvička, 500 ml
Kat. č. 1.09843	Neo-Clear™ (náhražka xylenu) pro mikroskopii	5 l
Kat. č. 1.11609	Histosec™ pastilky bod tuhnutí 56-58°C, zalévací médium pro histologii	1 kg, 10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Kat. č. 1.15161	Histosec™ pastilky (bez DMSO) bod tuhnutí 56-58°C, zalévací médium pro histologii	10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Kat. č. 1.16450	AFB-Color barvicí souprava pro mikroskopické vyšetření acidorezistentních bakterie (AFB) (barvení za studena)	1 set

Klasifikace rizik

Kat. č. 1.01597.0001
Řiďte se prosím klasifikacemi rizik vytisknutými na štítku a informacemi uvedenými v bezpečnostním listě.
Bezpečnostní list je dostupný na internetových stránkách a na požádání.

Hlavní složky výrobku

Kat. č. 1.01597.0001		
Čínidlo 1		
C.I. 41000	12,0 g/l	
C.I. 45170	6,0 g/l	
1 l =	1,117 kg	
Čínidlo 2		
C ₃ H ₈ O	543,3 g/l	
HCl min. 37 %	15,7 g/l	
1 l =	0,878 kg	
Čínidlo 3		
KMnO ₄	5,0 g/l	
1 l =	1,013 kg	

Obecná poznámka

Pokud při používání tohoto zdravotnického prostředku nebo v důsledku jeho použití dojde k závažné nežádoucí příhodě, oznamte ji výrobcí a/nebo jeho oprávněnému zástupci a příslušnému národnímu úřadu.

Literaturu

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002



H225: Vysoce hořlavá kapalina a páry.

H290: Může být korozivní pro kovy.

H319: Způsobuje vážné podráždění očí.

H336: Může způsobit ospalost nebo závratě.

H411: Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.

P210: Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.

P233: Uchovávejte obal těsně uzavřený.

P234: Uchovávejte pouze v původním balení.

P240: Uzemněte a upevněte obal a odběrové zařízení.

P273: Zabraňte uvolnění do životního prostředí.

P305 + P351 + P338: PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

Činidlo 1:

H226: Hořlavá kapalina a páry.

H319: Způsobuje vážné podráždění očí.

Činidlo 2:

H225: Vysoce hořlavá kapalina a páry.

H290: Může být korozivní pro kovy.

H319: Způsobuje vážné podráždění očí.

H336: Může způsobit ospalost nebo závratě.

Činidlo 3:

H411: Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.

Historie revizí

Verze	Komentář k úpravám
2024-Jul-19	Původní verze s přidanou tabulkou historie revizí



Viz návod k použití



Výrobce



Katalogové číslo



Kód šarže



Pozor, přečtěte si
připojené dokumenty



Spotřebujte do
RRRR-MM-DD



Teplotní
omezení

Status: 2024-Jul-19

Divize Life Science společnosti Merck používá v USA a Kanadě název MilliporeSigma.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany, a/nebo její dceřiné a sesterské společnosti. Všechna práva vyhrazena. Merck a Sigma-Aldrich jsou ochranné známky společnosti Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Všechny ostatní ochranné známky jsou vlastnictvím příslušných vlastníků. Podrobné informace o ochranných známkách lze získat ve veřejně dostupných zdrojích.



Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.sigmaaldrich.com

MERCK

1.01597.0001 **REF****Microscopie****AFB-Fluor fără fenol**

Kit de colorare pentru examinarea bacteriilor rezistente la acizi cu microscopie fluorescentă (colorarea cu auramină - rodamină)

Exclusiv pentru uz profesional**IVD**Dispozitiv medical pentru diagnostic *in vitro***Scopul preconizat**

Acest „AFB-Fluor fără fenol - Kit de colorare pentru examinarea bacteriilor rezistente la acizi cu microscopie fluorescentă (colorarea cu auramină - rodamină)” este utilizat pentru diagnosticul medical al celulelor umane și servește scopului de investigație bacteriologică, citologică și histologică a eșantioanelor de origine umană. Acesta este un kit de colorare gata de utilizare care, atunci când este utilizat împreună cu alte produse pentru diagnostic *in vitro* din portofoliul nostru, face posibilă evaluarea în scop de diagnostic a structurilor țintă bacteriene (bacterii rezistente la acizi (AFB)) prin fixare, încastrare, colorare, contracolorare, montare din eșantioanele de testat bacteriologic, citologice și histologice, de ex. frotiuri din culturi bacteriene îmbogățite sau de exemplu secțiuni histologice de exemplu plămâni.

Cea mai importantă caracteristică a kitului de colorare AFB-Fluor fără fenol este prezența colorantului fluorescent în soluția de colorare. Acest lucru permite identificarea rapidă și sigură a bacteriilor rezistente la acid sub microscopul fluorescent. În plus, soluția de colorare este preparată fără fenoli potențial periculoși, asigurând astfel o mai mare siguranță a utilizatorului.

Setul de colorare este furnizat gata de utilizare în flacoane practice cu picurător și conține toți reactivii necesari pentru colorarea bacteriilor acidorezistente în eșantioanele de frotiu și eșantioanele histologice.

Structurile necolorate au un contrast relativ scăzut și sunt extrem de dificil de distins sub microscopul optic. Imaginile create folosind soluțiile de colorare ajută investigatorul autorizat și calificat să definească mai bine forma și structura în astfel de cazuri. Testele suplimentare trebuie efectuate în conformitate cu metodele valide, recunoscute, pentru a ajunge la un diagnostic definitiv.

Principiu de funcționare

Metoda clasică Ziehl-Neelsen este determinată de proporția ridicată de ceară și lipide din peretele celular, deoarece bacteriile acidorezistente absorb colorantul foarte încet. Pentru a accelera absorbția colorantului fucsina și, astfel, formarea complexului micolat-fucsina în peretele celular, soluția de carbol-fuchsină aplicată preparatului este încălzită în mod normal până când formează abur.

După ce bacterii rezistente la acizi au absorbit colorantul fucsina, este practic imposibil să fie decolorate din nou, chiar dacă sunt tratate intensiv cu soluții de decolorare, cum ar fi acidul clorhidric din etanol. Prin urmare, bacterii rezistente la acizi sunt considerate rezistente la acizi și la alcool pentru colorare.

Dacă se utilizează kitul de colorare AFB-Fluor fără fenol, datorită coloranților fluorescenți auramină și rodamină prezenți în soluția de colorare AFB-Fluor fără fenol, pasul de încălzire nu mai este necesar. Acești coloranți se depun de peretele celular al bacteriilor acidorezistente și, în funcție de filtrul microscopului, sunt evidențiați în galben sau roșu pe fond negru. Pretratarea specimenelor cu Sputofluor™ dizolvă bacteriile din sputa vâscoasă și materialul celular din jur.

Eșantion de probă

Frotiuri de probe bacteriologice care au fost uscate la aer, fixate la căldură și pretratate cu Sputofluor™, de exemplu sputa, frotiurile din biopsii aspirative cu ac fin (FNAB), spălături, imprimări, scurgeri, puroi, exsudate, culturi lichide și solide

Secțiuni de țesut de origine umană fixate în formol, incluse în parafină (secțiuni în parafină de 3 - 4 μm grosime)

Reactivi

Cat. nr. 1.01597.0001 AFB-Fluor fără fenol
Kit de colorare pentru examinarea bacteriilor rezistente la acizi cu microscopie fluorescență (colorarea cu auramină - rodamină)

Componentele pachetului:

Kitul de colorare conține

Reactiv 1:	Soluție auramină-rhodamină	200 ml
Reactiv 2:	Soluție de decolorare	2 x 200 ml
Reactiv 3:	Soluție de contracolorare (KMnO ₄)	200 ml

De asemenea, este necesar:

Cat. nr. 1.08000	Sputofluor™ pentru microscopie	1 l
------------------	--------------------------------	-----

Prepararea probelor

Prelevarea probelor trebuie efectuată de personal calificat.

Toate probele vor fi tratate cu ajutorul tehnologiei de ultimă oră.

Toate probele vor fi etichetate clar.

Vor fi utilizate instrumente adecvate pentru prelevarea și pregătirea probelor. Vor fi respectate instrucțiunile producătorului privind aplicarea/utilizarea.

La utilizarea reactivilor auxiliari corespunzători, trebuie respectate instrucțiunile de utilizare corespunzătoare.

Sputa

Bacterii rezistente la acizi trebuie pretate cu Sputofluor™ pentru a le dizolva din mucus și din structurile celulare. În acest proces, ingredientul activ hipoclorit dizolvă materialul organic prin oxidare și eliberează ușor bacterii rezistente la acizi, astfel încât acestea să poată fi procesate în continuare.

Prepararea reactivului: Pregătirea soluției de Sputofluor™ 15%

Pentru prepararea a aprox. 100 ml soluție, amestecați:

Sputofluor™	15 ml
Apă distilată	85 ml

Pregătirea eșantionului de probă în tuburi centrifuge:	
Probă	1 parte (min. 2 ml)
Soluție de Sputofluor™ (15% în apă distilată)	3 părți
Agitați puternic	10 min
Centrifugați la 3000 - 4800 rpm	20 min
Decantați supernatantul Preparați frotiuri din sediment Uscare la aer	

Puncții, spălături, sedimente

După măsurile adecvate de îmbogățire, aplicați eșantionul de probă pe lamă și lăsați să se usuce la aer.

Secțiuni histologice

AFB-Fluor fără fenol poate fi utilizat pentru colorarea secțiunilor histologice.

Deparafinizați secțiunile prin metoda convențională și rehidratați într-o serie descendentă de alcooli.

Fixarea probelor de frotiu

Specimenele sunt fixate deasupra unui arzător Bunsen (de 2 - 3 ori, având grijă să evitați încălzirea excesivă).

Specimenele pot fi fixate și prin încălzirea la 100 - 110 °C într-o cameră de uscare sau pe o placă de încălzire timp de 20 de min.

Temperaturile excesive sau încălzirea prelungită pot cauza o deteriorare a performanței de colorare.

Prepararea reactivului

Reactivii din AFB-Fluor fără fenol - Kit de colorare pentru examinarea bacteriilor rezistente la acizi cu microscopie fluorescentă (colorarea cu auramină - rodamină) sunt gata de utilizare, diluarea soluțiilor nu este necesară și mai degrabă provoacă o deteriorare a rezultatelor colorării și a stabilității lor.

Datorită viscozității ridicate pe care o prezintă, soluția de colorare auramină-rhodamină fără fenoli (reactiv 1) trebuie agitată puternic înainte de utilizare.

Procedură

Colorarea probelor de frotiu

Colorarea pe suportul de colorare

Lamă cu frotiu fixat		
Reactiv 1 (soluție auramină-rhodamină)	se aplică în formă de picătură, acoperiți complet și se colorează	15 min
Apă de la robinet	clătiți cu atenție	30 sec
Reactiv 2 (soluție de decolorare)	se aplică în formă de picătură, acoperiți complet și lăsați să reacționeze	1 min
Apă de la robinet	clătiți cu atenție	30 sec
Reactiv 3 (soluție de contracolorare)	se aplică în formă de picătură, acoperiți complet și se colorează	5 min
Apă de la robinet	clătiți cu atenție	30 sec
Uscați la aer		

Acoperirea cu medii de montare ne-apoase (de ex. Neo-Mount™, Entellan™ nou sau DPX nou) este recomandată pentru depozitarea probelor de frotiu pentru o perioadă de câteva luni. În acest scop, speci­me­nele colorate trebuie uscate foarte bine.

Utilizarea uleiului de imersie este recomandată pentru analiza lamelor colorate cu mărire microscopică >40x.

Colorarea probelor histologice

Colorarea pe suportul de colorare

Deparafinizați lamele histologice prin metoda convențională și rehidratați într-o serie descendentă de alcooli.

Soluțiile de colorare se aplică în picături pe lamă și ar trebui să acopere complet secțiunea de parafină.

Trebuie respectate perioadele de timp specificate, pentru a garanta un rezultat optim al colorării.

Lamă cu țesutul histologic	
Apă distilată	clătiți
Reactiv 1 (soluție auramină-rhodamină)	15 min
Apă de la robinet	30 sec
Reactiv 2 (soluție de decolorare)	1 min
Apă de la robinet	30 sec
Reactiv 3 (soluție de contracolorare)	5 min
Apă de la robinet	30 sec
Etanol 70%	1 min
Etanol 70%	1 min
Etanol 96%	1 min
Etanol 96%	1 min
Etanol 100%	1 min
Etanol 100%	1 min
Xilen sau Neo-Clear™	5 min
Xilen sau Neo-Clear™	5 min
Montați lamele umezite cu Neo-Clear™ cu Neo-Mount™ sau lamele umezite cu xilen cu de ex. Entellan™ nou și capac de sticlă.	

După deshidratare (serie descendentă de alcooli) și curățare cu xilen sau Neo-Clear™, probe histologice pot fi montate cu agenți de montare fără apă (ex. Neo-Mount™, Entellan™ nou sau DPX nou) și un capac de sticlă, apoi pot fi depozitate.

Rezultat

Bacterii rezistente la acizi (la microscopul cu fluorescență)	roșu-portocaliu (rhodamină) sau galben-verde (auramină) - în funcție de combinația de filtre folosită
Fundal	întuneric până la negru

Colorarea pentru microscopia optică și de fluorescență

Colorarea fluorescentă cu kitul de colorare AFB-Fluor fără fenol este, de asemenea, potrivită pentru colorarea adițională a bacterii rezistente la acizi, pentru diagnosticarea la microscopul optic, de ex. prin utilizarea kitului de colorare AFB-Color (Cat. nr. 1.16450) sau AFB-Color modificat (Cat. nr. 1.00497).

Eșantioanele nemontate colorate cu kitul de colorare AFB-fluor fără fenol pot fi utilizate direct pentru diagnosticare. Ulterior, după îndepărtarea cu atenție a uleiului de imersie utilizat, eşantioanele pot fi colorate în continuare cu kitul de colorare AFB-color sau AFB-color modificat.

În eşantioanele astfel preparate, bacteriile acidorezistente apar colorate în roșu-magenta pe fond verde deschis (AFB-Color) și albastru deschis (AFB-Color modificat) la microscopul optic.

Evaluare

Un rezultat pozitiv înseamnă „bacterii rezistente la acizi prezente”, un rezultat negativ „bacterii rezistente la acizi nu sunt prezente”. Un rezultat pozitiv nu înseamnă că este posibilă o clasificare taxonomică prin microscopie. Dacă sunt detectate bacterii rezistente la acizi, trebuie efectuate analize suplimentare în laboratoare special echipate. Nici vitalitatea bacteriilor (active, inactive) nu poate fi stabilită.

Dacă rezultatul nu este concludent, se recomandă colorarea adițională a eşantioanelor pentru diagnosticări suplimentare la microscopul optic, de ex. cu kitul de colorare AFB-Color (Cat. Nr. 1.16450) sau AFB-Color modificat (Cat. Nr. 1.00497).

Depanarea

Fixarea probelor de frotiu

Un grad suficient de fixare la căldură, folosind arzătorul Bunsen sau într-o cameră de încălzire, este esențial pentru a preveni potențialul infecțios al speci­me­nelor și proliferarea ulterioară a bacteriilor.

Nu există colorare a bacterii rezistente la acizi

Faza critică a acestui proces de colorare este faza de decolorare, care poate fi influențată de grosimea frotiului de specimen. În plus, o soluție proaspătă de acid clorhidric în etanol este puternic reactivă, ceea ce înseamnă că rezultatul trebuie evaluat cu atenție. Perioadele de incubare specificate în acest protocol trebuie respectate cu strictețe în faza de decolorare, pentru că, în caz contrar, pot fi obținute rezultate fals-negative.

Colorarea prea puternică a fondului

În cazul în care fondul este prea colorat în imaginea de la microscopul optic (albastru închis), reactiv 1 (soluția de auramină-rhodamină) trebuie amestecată mai bine și ulterior decolorată mai bine. Deoarece soluția de colorare este foarte vâscoasă, se recomandă realizarea de mișcări concentrice ale lamei în timpul etapei de decolorare cu reactiv 2 (soluția de decolorare).

Observații tehnice

Microscopul utilizat trebuie să corespundă cerințelor laboratorului pentru diagnostic medical.

Combinația de filtre recomandată pentru microscopia de fluorescență:

Filtru de excitație	490 - 570 nm
Separator de culoare	525 și 635 nm
Filtru de emisie	505 - 600 nm

Atunci când folosiți sisteme pentru colorare automată, respectați instrucțiunile de utilizare oferite de furnizorul sistemului și al software-ului. Înlăturați excesul de ulei de imersie înainte de umplere.

Caracteristici de performanță analitică

„AFB-Fluor fără fenol - kit de colorare” colorează și, prin urmare, vizibilizează structurile biologice, așa cum este descris în capitolul „Rezultat” al acestei IDU. Produsul trebuie utilizat numai de către persoane autorizate și calificate, utilizarea incluzând, printre altele, pregătirea probelor și a reactivilor, manipularea probelor, histoprocесarea, deciziile privind controalele adecvate și multe altele.

Performanța analitică a produsului este confirmată prin testarea fiecărui lot de producție.

Pentru următoarele colorări, performanța analitică a fost confirmată din punct de vedere al specificității, sensibilității și repetabilității produsului cu o rată de 100%:

	Speci-ficate inter-test	Senzi-tivitate inter-test	Speci-ficate intra-test	Senzi-tivitate intra-test
Colorație histologică				
Bacterii rezis-tente la acizi (la microscopul cu fluorescență)	14/14	14/14	6/6	6/6
Fundal	14/14	14/14	6/6	6/6
Colorarea probelor de frotiu				
Bacterii rezis-tente la acizi (la microscopul cu fluorescență)	14/14	14/14	6/6	6/6
Fundal	14/14	14/14	6/6	6/6

Rezultate de performanță analitică

Datele intra- (efectuate pe același lot) și inter-test (efectuate pe loturi diferite) indică numărul de structuri colorate corect în raport cu numărul de teste efectuate.

Caracteristici de performanță clinică

În plus, performanța clinică a acestui produs a fost dovedită cu succes în mai multe publicații științifice.

AFB-Fluor fără fenol - kit de colorare a fost utilizat cu succes în contextul clinic de zeci de ani într-un număr mare de aplicații.

Performanța clinică a AFB-Fluor fără fenol - kit de colorare, în special, a fost determinată prin stabilirea sensibilității și specificității acesteia și a PPV și NPV într-un studiu intern:

	Colorarea cu auramină - rodamină
Sensitivitate	14/14
Specificitate	15/15

Sensibilitate: 14 mostre din 14: 100%

Specificitate: 15 mostre din 15: 100%

Valoare predictivă pozitivă (PPV): 100%

Valoare predictivă negativă (NPV): 100%

Rezultatele acestei evaluări de performanță confirmă faptul că produsul este potrivit pentru utilizarea prevăzută și funcționează fiabil.

Cu toate acestea, Interpretarea diagnostică a rezultatelor colorării trebuie efectuată de către profesioniști calificați și autorizați, luând în considerare anamneza pacientului, morfologia, utilizarea controalelor adecvate și teste de diagnostic suplimentare, dacă este cazul. Această metodă poate fi folosită suplimentar în diagnosticul uman.

Diagnostic

Diagnosticul trebuie stabilit doar de către personalul autorizat și calificat. Va fi utilizată nomenclatura în vigoare.

Această metodă poate fi folosită suplimentar în diagnosticul uman.

Testele ulterioare vor fi selectate și implementate conform metodelor recunoscute.

Seruri de control adecvate (ex. ISOSLIDE™ AFB, Cat. nr. 1.02560.0001) trebuie efectuate la fiecare aplicație, pentru a se evita rezultate incorecte.

Dacă rezultatul nu este concludent, se recomandă colorarea adițională a eșantioanelor pentru diagnosticări suplimentare la microscopul optic, de ex. cu kitul de colorare AFB-Color (Cat. Nr. 1.16450) sau AFB-Color modificat (Cat. Nr. 1.00497).

Depozitarea

Depozitați AFB-Fluor fără fenol - Kit de colorare pentru examinarea bacteriilor rezistente la acizi cu microscopie fluorescentă (colorarea cu auramină - rodamină) la +15 °C până la +25 °C.

Durata de depozitare

AFB-Fluor fără fenol - Kit de colorare pentru examinarea bacteriilor rezistente la acizi cu microscopie fluorescentă (colorarea cu auramină - rodamină) poate fi utilizată până la termenul de valabilitate menționat.

După prima deschidere a flaconului de picurare, conținutul poate fi utilizat până la termenul de valabilitate menționat, dacă este depozitat la +15 °C până la +25 °C.

Flacoanele Flacon de picurare trebuie păstrate în permanență bine închise.

Colorarea soluției de decolorare (reactiv 2) nu afectează procesul de colorare și diagnosticul.

Capacitatea

Pachetul este suficient pentru până la 60 - 65 de aplicații și chiar mai multe, în funcție de grosimea frotiului.

Instrucțiuni suplimentare

Exclusiv pentru uz profesional.

Pentru a evita erorile, aplicarea trebuie efectuată exclusiv de personal calificat.

Vor fi respectate recomandările naționale privind siguranța muncii și asigurarea calității.

Trebuie utilizate microscopae echipate conform standardelor.

Dacă este necesar, utilizați o centrifugă standard adecvată pentru laboratorul pentru diagnostic medical.

Protecția împotriva infecției

Vor fi luate măsuri active pentru protejarea împotriva infecției, conform recomandărilor laboratorului.

Instrucțiuni privind eliminarea

Ambalajul trebuie eliminat în conformitate cu reglementările locale.

Soluțiile utilizate și soluțiile expirate trebuie eliminate ca deșeuri speciale, în conformitate cu normele naționale. Informații privind eliminarea pot fi găsite sub opțiunea Legături Rapide „Hints for Disposal of Microscopy Products” („Indicii privind eliminarea produselor de microscopie”) la www.microscopy-products.com. În cadrul UE, în prezent se aplică REGULAMENTUL (CE) Nr 1272/2008 privind clasificarea, etichetarea și ambalarea substanțelor și a amestecurilor, de modificare și de abrogare a Directivelor 67/548/CEE și 1999/45/CE, precum și de modificare a Regulamentului (CE) nr. 1907/2006.

Reactivi auxiliari

Cat. nr. 1.00327	Acid clorhidric în etanol, pentru microscopie	1 l, 5 l
Cat. nr. 1.00496	Formaldehidă soluție tamponată 4%, pH 6,9 (soluție formalină aprox. 10%) pentru histologie	350 ml și 700 ml (în flacoane cu gât larg), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Cat. nr. 1.00497	AFB-Color modificat kit de colorare pentru detecție bacteriilor rezistente la acizi (AFB) prin metoda de colorare la cald	1 set
Cat. nr. 1.00579	DPX nou mediu de montare neapos pentru microscopie	500 ml
Cat. nr. 1.00869	Entellan™ nou mediu de montare pentru lamelă pentru microscopie	500 ml
Cat. nr. 1.02560	Lame de control ISOSLIDE™ AFB cu țesut de referință pentru detectarea bacteriilor rezistente la acizi în țesutul histologic	25 teste
Cat. nr. 1.03999	Formaldehidă soluție min. 37%, fără acid stabilizată cu aproximativ 10% metanol și carbonat de calciu pentru histologie	1 l, 2,5 l, 25 l
Cat. nr. 1.04699	Ulei de imersie pentru microscopie	Flacon de picurare de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Cat. nr. 1.07164	Parafină - pastile temperatura de solidificare ~ 56 - 58 °C pentru histologie	10 kg (4 x 2,5 kg)
Cat. nr. 1.07961	Entellan™ nou mediu de montare rapid pentru microscopie	100 ml, 500 ml, 1 l
Cat. nr. 1.08000	Sputofluol™ pentru microscopie	1 l
Cat. nr. 1.08298	Xilen (amestec de izomeri) pentru histologie	4 l
Cat. nr. 1.09016	Neo-Mount™ anhidru - mediu de montare pentru microscopie	Flacon de picurare de 100 ml, 500 ml
Cat. nr. 1.09843	Neo-Clear™ (substituit de xilen) pentru microscopie	5 l
Cat. nr. 1.11609	Histosec™ pastile punct de solidificare 56-58°C agent de incluziune pentru histologie	1 kg, 10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Cat. nr. 1.15161	Histosec™ pastile (fără DMSO) punct de solidificare 56-58°C agent de incluziune pentru histologie	10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Cat. nr. 1.16450	AFB-Color - kit de colorare pentru investigare microscopică bacteriilor rezistente la acizi (AFB) (colorare la rece)	1 set

Categoria de risc

Cat. nr. 1.01597.0001

Observați categoria de risc imprimată pe etichetă și informațiile oferite în fișa de informații de securitate.

Fișa de informații de securitate este disponibilă pe website și la cerere.

Componentele principale ale produsului

Cat. nr. 1.01597.0001		
Reactiv 1		
C.I. 41000	12,0 g/l	
C.I. 45170	6,0 g/l	
1 l = 1,117 kg		
Reactiv 2		
C ₃ H ₈ O	543,3 g/l	
HCl min. 37 %	15,7 g/l	
1 l = 0,878 kg		
Reactiv 3		
KMnO ₄	5,0 g/l	
1 l = 1,013 kg		

Observație generală

Dacă în timpul utilizării acestui dispozitiv sau ca urmare a utilizării acestuia, a avut loc un incident grav, vă rugăm să îl raportați producătorului și/sau reprezentantului său autorizat și autorității naționale.

Literatură

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Lichid și vapori foarte inflamabili.

H290: Poate fi corosiv pentru metale.

H319: Provoacă o iritare gravă a ochilor.

H336: Poate provoca somnolență sau amețeală.

H411: Toxic pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung.

P210: A se păstra departe de surse de căldură, suprafețe fierbinți, scântei, flăcări și alte surse de aprindere. Fumatul interzis.

P233: Păstrați recipientul închis etanș.

P234: A se păstra numai în ambalajul original.

P240: Legătură la pământ și conexiune echipotențială cu recipientul și cu echipamentul de recepție.

P273: Evitați dispersarea în mediu.

P305 + P351 + P338: ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți.

Reactiv 1:

H226: Lichid și vapori inflamabili.

H319: Provoacă o iritare gravă a ochilor.

Reactiv 2:

H225: Lichid și vapori foarte inflamabili.

H290: Poate fi corosiv pentru metale.

H319: Provoacă o iritare gravă a ochilor.

H336: Poate provoca somnolență sau amețeală.

Reactiv 3:

H411: Toxic pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung.

Istoric revizuire

Versiune	Comentariu privind modificarea
2024-Jul-19	Versiunea inițială cu introducerea istoricului revizuirilor



A se consulta
instrucțiunile de utilizare



Producător



Număr articol



Număr lot



Atenție, a se consulta
documentele însoțitoare



A se folosi până în
data de AAAA-LL-ZZ



Temperatura
limită

Status: 2024-Jul-19

The Life Science Business aparținând Merck operează ca MilliporeSigma în SUA și Canada.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany și / sau afiliații săi. Toate drepturile rezervate. Merck și Sigma-Aldrich sunt mărci comerciale ale Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Toate celelalte mărci comerciale sunt proprietatea deținătorilor respectivi. Informații detaliate despre mărci comerciale sunt disponibile prin resurse disponibile public.



Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.sigmaaldrich.com

MERCK

1.01597.0001 **REF**

Mikroskopi

AFB-Fluor phenolfri

farvningskit til undersøgelse af syrefaste bakterier med fluorescensmikroskopi (auramin-rhodaminfarvning)

Kun til professionel brug

Medicinske anordning til *in vitro*-diagnose

Beregnet formål

Dette "AFB-Fluor phenolfri - farvningskit til undersøgelse af syrefaste bakterier med fluorescensmikroskopi (auramin-rhodaminfarvning)" anvendes til humanmedicinsk cellediagnose og er beregnet til bakteriologisk, cytologisk og histologisk undersøgelse af prøvemateriale fra mennesker. Det er et klar-til-brug farvningskit, som når det bruges sammen med andre produkter til *in vitro*-diagnose fra vores sortiment laver bakterielle målstrukturer (syrefaste bakterier (AFB)) ved fiksering, indstøbning, farvning, kontrastfarvning, montering i bakteriologiske, cytologiske og histologiske prøvematerialer, eksempelvis udstrygninger af berigede bakteriekulturer eller histologiske snit af f.eks. lunger, der kan evalueres til diagnoseformål.

Den afgørende egenskab ved AFB-Fluor phenolfri farvnings sæt er tilstedeværelsen af fluorescerende farver i farvningsopløsningen. Dette muliggør en hurtig og sikker identifikation af de syrefaste bakterier under fluorescensmikroskopet. Derudover er farvningsopløsningen fremstillet uden potentielt farligt fenol, hvilket forbedrer brugerens sikkerhed.

Dette farvnings sæt leveres brugsklar i praktiske pipetteflasker og indeholder alle de reagenser, der kræves for at farve syrefaste bakterier i smear-prøver og histologiske vævsprøver.

Ufarvede strukturer har en relativ lav kontrast og er ekstremt vanskelige at skelne under lysmikroskopet. De dannede billeder med farveopløsninger hjælper autoriseret og kvalificerede undersøgere med bedre at definere formen og strukturen i sådanne tilfælde. Der skal udføres yderligere tests iht. anerkendte og gyldige metoder for at fastlægge en definitiv diagnose.

Princip

Den klassiske Ziehl-Neelsen-metode bestemmes med den høj andel voks og lipider i cellevæggen, eftersom syrefaste bakterier kun optager farvningsstoffer meget langsomt. For at fremskynde absorptionen af fuchsinfarvestoffet og dermed dannelsen af mycolat-fuchsin-komplekset i cellevæggen opvarmes karbolfuchsinopløsningen, der påføres præparatet, normalt, indtil den danner damp.

Når syrefaste bakterier har absorberet fuchsinfarvestoffet, er det næsten umuligt at affarve dem, også selvom de bliver behandlet grundigt med en affarvningsopløsning såsom saltsyre i ethanol. Af denne grund betegnes syrefaste bakterier som syre- og alkoholfaste i forbindelse med farvning. Når der anvendes AFB-Fluor phenolfri farvnings sæt gør brugen af de fluorescerende farver auramin og rhodamin i AFB-Fluor phenolfri farvningsopløsning opvarmningstrinet unødvendigt. Disse farver lægger sig på cellevæggen i syrefaste bakterier og bliver gule eller røde mod en sort baggrund afhængigt af mikroskopfilteret.

Ved forbehandling af prøverne med Sputofluor™ opløses bakterierne fra det klæbrige spyt og celled materiale, der omgiver dem.

Prøvemateriale

Udstrygninger af bakteriologisk materiale, som er blevet lufttørret og forbehandlet med Sputofluor™ såsom sputum, udstrygninger fra fin nåls-aspirations-biopsi (FNAB), skylninger, aftryk, effusioner, pus, eksudater, flydende og faste kulturer

Snit af formalinfikseret væv af human oprindelse i paraffin (3 - 4 µm tykke paraffinsnit)

Reagenser

Varenr. 1.01597.0001 AFB-Fluor phenolfri farvningskit til undersøgelse af syrefaste bakterier med fluorescensmikroskopi (auramin-rhodaminfarvning)

Pakkens komponenter:

Farvesættet indeholder

Reagens 1:	Auramin-rhodamin-opløsning	200 ml
Reagens 2:	Affarvningsopløsning	2 x 200 ml
Reagens 3:	Modfarvningsopløsning (KMnO ₄)	200 ml

Også påkrævet:

Varenr. 1.08000	Sputofluor™ til mikroskopi	1 l
-----------------	----------------------------	-----

Forberedelse af prøverne

Prøveudtagningen skal udføres af faguddannet personale.

Alle prøver skal behandles ved hjælp af den nyeste teknologi.

Alle prøver skal forsynes med tydelige etiketter.

Der skal anvendes egnede instrumenter til prøveudtagning og forberedelse af prøverne. Følg producentens anvisninger med henblik på anvendelse/brug.

Når der anvendes tilhørende hjælpereagenser, skal man følge de tilhørende brugsanvisninger.

Sputum

Disse syrefaste bakterier bør forbehandles med Sputofluor™ for at opløse dem fra mucus og cellestrukturer. I forbindelse med denne proces opløser det aktive indholdsstof hypoklorit det organiske materiale ved oxidering og frigiver forsigtigt syrefaste bakterier med henblik på videre behandling.

Forberedelse af reagenserne: Fremstilling af Sputofluor™-opløsning 15 % Til fremstilling af ca. 100 ml opløsningsblanding:

Sputofluor™	15 ml
Destilleret vand	85 ml

Forberedelse af prøvemateriale i centrifugeglas:	
Prøve	1 del (min. 2 ml)
Sputofluor™-opløsning (15 % i destilleret vand)	3 dele
Rystes grundigt	10 min.
Centrifugeres ved 3000 - 4800 omdr./min.	20 min.
Dekanter supernatanten Forbered udstrygninger af bundfaldet Lufttørres	

Punktater, udskylning, bundfald

Efter der er truffet passende berigelsesforanstaltninger, udstryges prøvematerialet på objektglasset og lufttørres.

Histologiske prøver

AFB-Fluor phenolfri kan anvendes til farvning af histologiske snit.

Deparaffiner de snittene på traditionel vis, og rehydrer dem i en faldende alkoholrække.

Fiksering af smear-prøver

Prøverne fikseres over en bunsenbrænder (2 - 3 gange, undgå at opvarme dem for meget).

Prøverne kan også fikseres ved opvarmning på 100 - 110 °C i et tørreskab eller på en varmeplade i 20 min.

For høje temperaturer eller for lang tids opvarmning kan resultere i forringelse af farveresultatet.

Forberedelse af reagenserne

Reagenserne i AFB-Fluor phenolfri - farvningskit til undersøgelse af syrefaste bakterier med fluorescensmikroskopi (auramin-rhodaminfarvning) er klar til brug. Fortynding af opløsningerne er ikke nødvendigt og resulterer i forringelse af farveresultatet og opløsningernes stabilitet.

Takket være dens højde viskositet skal den fenolfrie auramin-rhodamin-farvningsopløsning (reagens 1) rystes kraftigt før brug.

Procedure

Farvning af smear-prøver

Farvning på farveracket

Objektglas med fikseret udstrygning		
Reagens 1 (auramin-rhodamin-opløsning)	påfør drypvist, skal tildækkes fuldstændigt, og foretag farvningen	15 min.
Vaskes med postevand	skyl omhyggeligt	30 sek.
Reagens 2 (affarvningsopløsning)	påfør drypvist, skal tildækkes fuldstændigt og gives tid til at reagere	1 min.
Vaskes med postevand	skyl omhyggeligt	30 sek.
Reagens 3 (modfarvningsopløsning)	påfør drypvist, skal tildækkes fuldstændigt, og foretag farvningen	5 min.
Vaskes med postevand	skyl omhyggeligt	30 sek.
Skal lufttørre		

Tildækning med ikke-vandige monteringsmedier (f.eks. Neo-Mount™, Entellan™ ny eller DPX ny) og et dækglas anbefales med henblik på opbevaring af smear-prøver i flere måneder. Til dette formål skal de farvede prøver tørres meget omhyggeligt.

Brugen af immersionsolie anbefales til analyse af farvede objektglas med en mikroskopforstørrelse på >40x.

Farvning af histologiske prøver

Farvning på farveracket

Deparaffiner de histologiske snit på traditionel vis, og rehydrer dem i en faldende alkoholrække.

Farveopløsninger påføres dråbevist på objektglasset og bør helt dække paraffinsnittet.

De anførte tider skal overholdes for at sikre et optimalt resultat af farvningen.

Snit med histologisk væv	
Destilleret vand	spülen
Reagens 1 (auramin-rhodamin-opløsning)	15 min.
Vaskes med postevand	30 sek.
Reagens 2 (affarvningsopløsning)	1 min.
Vaskes med postevand	30 sek.
Reagens 3 (modfarvningsopløsning)	5 min.
Vaskes med postevand	30 sek.
Ethanol 70 %	1 min.
Ethanol 70 %	1 min.
Ethanol 96 %	1 min.
Ethanol 96 %	1 min.
Ethanol 100 %	1 min.
Ethanol 100 %	1 min.
Xylen eller Neo-Clear™	5 min.
Xylen eller Neo-Clear™	5 min.
Monter Neo-Mount™ på de Neo-Clear™-vædede objektglas eller monter f.eks. Entellan™ ny på de xylenvædede objektglas, og sæt dækglas på.	

Efter dehydrering (stigende alkoholrække) og klaring med xylen eller Neo-Clear™, kan de histologiske prøver monteres med vandfri monteringsmidler (f.eks. Neo-Mount™, Entellan™ ny eller DPX ny) og et dækglas og kan derefter opbevares.

Resultat

Syrefaste bakterier (i fluorescensmikroskopet)	rød-orange (rhodamin) eller gul-grøn (auramin) - afhængigt af kombinationen af de anvendte filtre
Baggrund	mørk til sort

Farvning til optisk mikroskopi og fluorescensmikroskopi

Den fluorescerende farvning med brug af AFB-Fluor phenolfri farvnings-sæt er også perfekt egnet til farvning af syrefaste bakterier for diagnose med optisk mikroskopi, f.eks. ved brug af AFB-Color farvningsssæt (varenr. 1.16450) eller AFB-Color modificeret (varenr. 1.00497).

De ikke-monterede prøver farvet med AFB-Fluor phenolfri farvningsssæt kan anvendes direkte til diagnostiske formål. Efter en forsigtig fjernelse af alt immersionsolie, der kan være blevet anvendt, kan man efterfølgende farve prøverne yderligere med AFB-Color farvningsssættet eller AFB-Color modificeret.

I prøven, der behandles på denne måde, vises de syrefaste bakterier magenta-rødt mod en lysegrøn (AFB-Color) eller lyseblå (AFB-Color modifice-ret) baggrund under det optiske mikroskop.

Evaluering

Et positivt resultat betyder ”syrefaste bakterier til stede”, og et negativt resultat betyder ”ingen syrefaste bakterier til stede”. Et positivt resultat betyder ikke, at det er muligt med en taksonomisk klassifikation med mikroskop. Hvis der påvises syrefaste bakterier, skal der udføres flere undersøgelser på et specialiseret laboratorium. Bakteriernes vitalitet (aktiv, inaktiv) kan heller ikke bestemmes.

Hvis resultatet ikke er tydeligt, anbefales det at farve prøverne yderligere til den optiske mikroskopiske diagnose, f.eks. med AFB-Color farvningsssættet (kat.nr. 1.16450) eller AFB-Color modificeret (kat.nr. 1.00497).

Fejlfinding

Fiksering af smear-prøver

Tilstrækkelig varmefiksering ved hjælp af en bunsenbrænder eller i et varmeskab er vigtigt med henblik på at forhindre prøvernes infektionspotentialer og yderligere spredning af bakterierne.

Ingen farvning af syrefaste bakterier

Det kritiske trin i denne farvningsproces er affarvningstrinet, som kan påvirkes af prøveudstrygnings tykkelse. Derudover har en frisk opløsning af saltsyre i ethanol meget reaktiv, hvilket betyder, at resultatet skal evalueres med omhu. De inkuberingstider, der er anført i denne protokol, skal overholdes nøje under affarvningstrinnet, da det i modsat fald kan medføre falske negative resultater.

For kraftig baggrundsfarvning

I tilfælde af, at baggrunden er farvet for kraftigt på de optiske mikroskop-billede (mørkeblå), bør reagens 1 (auramin-rhodamin-opløsning) blandes bedre og affarves bedre derefter. Eftersom farveopløsningen har en høj viskositet, anbefales det, at ryste glasset under affarvningstrinet med reagens 2 (affarvningsopløsning).

Tekniske bemærkninger

Det anvendte mikroskop skal leve op til kravene på et laboratorie til medicinsk diagnose.

Anbefalet filterkombination til fluorescensmikroskopi:

Exciteringsfilter	490 - 570 nm
Farveseparator	525 og 635 nm
Emissionsfilter	505 - 600 nm

Ved brug af automatiske farvesystemer skal brugervejledningen fra leverandøren af systemet og softwaren følges.

Fjern overskydende immersionsolie forud for arkivering.

Analytiske ydeevnekarakteristika

”AFB-Fluor phenolfri - farvningskit” farver og visualiserer derved biologiske strukturer, som beskrevet i kapitlet ”Resultat” i denne brugsanvisning. Dette produkt må kun anvendes af autoriserede og kvalificerede personer, hvilket bl.a. inkluderer forberedelse af prøve og reagens, prøvehåndtering, bearbejdning af vævsprøver, afgørelser angående egnede kontroller med mere.

Produktets analytiske ydeevne bekræftes ved test af hvert produktionsparti.

For de følgende farver blev den analytiske ydeevne bekræftet med henblik på specificitet, sensitivitet og repeterbarhed for produktet med en rate på 100 %:

	Inter-undersøgelse specificitet	Inter-undersøgelse sensitivitet	Intra-undersøgelse specificitet	Intra-undersøgelse sensitivitet
Histologisk farvning				
Syrefaste bakterier (i fluorescensmikroskopet)	14/14	14/14	6/6	6/6
Baggrund	14/14	14/14	6/6	6/6
Udstrygninger-farvning				
Syrefaste bakterier (i fluorescensmikroskopet)	14/14	14/14	6/6	6/6
Baggrund	14/14	14/14	6/6	6/6

Analytiske ydeevneresultater

Data fra intra- (udført på samme parti) og inter-undersøgelse (udført på forskellige partier) oplister antallet af korrekt farvede strukturer i forhold til antallet af udførte undersøgelser.

Kliniske ydeevnekarakteristika

Desuden er den kliniske ydeevne for dette produkt blevet dokumenteret i flere videnskabelige publikationer.

AFB-Fluor phenolfri - farvningskit er blevet anvendt med vellykket resultat i kliniske miljøer i årtier med et højt antal anvendelser.

Den kliniske ydeevne for AFB-Fluor phenolfri - farvningskit er isæt blevet konstateret ved at fastlægge dets følsomhed og specificitet samt dets PPV og NPV i en intern undersøgelse:

	Auramin-rhodaminfarvning
Sensitivitet	14/14
Specificitet	15/15

Sensitivitet: 14 prøver ud af 14: 100 %

Specificitet: 15 prøver ud af 15: 100 %

Positiv prognoseværdi (PPV): 100 %

Negativ prognoseværdi (NPV): 100 %

Resultaterne af denne ydeevnevurdering bekræfter, at produktet er egnet til den beregnede brug og har en pålidelig ydeevne.

Den diagnostiske tolkning af farvningsresultaterne skal dog udføres af kvalificerede og autoriserede eksperter med henblik på patientens anamnese, morfologi, brugen af passende kontroller og yderligere diagnostiske tests, såfremt relevant. Denne metode kan anvendes som supplement inden for human diagnostik.

Diagnostik

Diagnoser må udelukkende stilles af autoriseret og kvalificeret personale. Der skal anvendes gyldige nomenklaturer.

Denne metode kan anvendes som supplement inden for human diagnostik. Yderligere test skal udvælges og udføres i henhold til anerkendte metoder.

Egnede kontroller (f.eks. ISOSLIDE™ AFB, varenr 1.02560.0001) skal udføres ved hver anvendelse for at undgå forkerte resultater.

Hvis resultatet ikke er tydeligt, anbefales det at farve prøverne yderligere til den optiske mikroskopiske diagnose, f.eks. med AFB-Color farvningssættet (kat.nr. 1.16450) eller AFB-Color modificeret (kat.nr. 1.00497).

Opbevaring

AFB-Fluor phenolfri - farvningskit til undersøgelse af syrefaste bakterier med fluorescensmikroskopi (auramin-rhodaminfarvning) skal opbevares ved +15 °C til +25 °C.

Holdbarhed

AFB-Fluor phenolfri - farvningskit til undersøgelse af syrefaste bakterier med fluorescensmikroskopi (auramin-rhodaminfarvning) kan bruges indtil den anførte udløbsdato.

Efter åbning af pipetteflasken kan indholdet bruges indtil den anførte udløbsdato, hvis flasken opbevares ved +15 °C til +25 °C.

Pipetteflaskerne skal altid være forsvarligt lukkede.

En farvning af affarvningsopløsningen (reagens 2) påvirker ikke farvningsprocesserne og diagnosen.

Kapacitet

Pakken er tilstrækkelig til op til 60 - 65 anvendelser, udbyttet kan være endnu større afhængigt af tykkelsen for den pågældende smears.

Yderligere anvisninger

Kun til professionel brug.

For at undgå fejl må produktet kun anvendes af faguddannet personale. Nationale bestemmelser vedrørende arbejdssikkerhed og kvalitetssikring skal overholdes.

Der skal anvendes mikroskoper, der udstyret i henhold til de gældende standarder.

Brug om nødvendigt en standardcentrifuge, der egner sig til brug på et laboratorie i forbindelse med medicinsk diagnostik.

Beskyttelse mod infektioner

Der skal træffes effektive foranstaltninger til beskyttelse mod infektioner i henhold til laboratoriets retningslinjer.

Bortskaffelse

Emballagen skal bortskaffes i overensstemmelse med de gældende bestemmelser for bortskaffelse.

Brugte opløsninger og opløsninger, hvor holdbarheden er udløbet, skal bortskaffes som særligt affald i overensstemmelse med de lokale bestemmelser. Oplysninger om bortskaffelse kan findes under linket "Hints for Disposal of Microscopy Products" (Tip til bortskaffelse af produkter til mikroskopi) under www.microscopy-products.com. I EU skal den gældende FORORDNING (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 overholdes.

Øvrige reagenser

Varenr. 1.00327	Saltsyre i ethanol til mikroskopi	1 l, 5 l
Varenr. 1.00496	Formaldehydropopløsning 4 %, bufferet, pH 6,9 (ca. 10 % formalinopløsning) til histologi	350 ml og 700 ml (i flaske med bred hals), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Varenr. 1.00497	AFB-Color modificeret kit til mikroskopiundersøgelse af syrefaste bakterier, AFB (varm farvning)	1 set
Varenr. 1.00579	DPX ny vandfrit indstøbningsmiddel til mikroskopi	500 ml
Varenr. 1.00869	Entellan™ ny til coverslipper til mikroskopi	500 ml
Varenr. 1.02560	ISOSLIDE™ AFB kontrolglas med referencevæv til påvisning af syrefaste bakterier i histologisk væv	25 test
Varenr. 1.03999	Formaldehydropopløsning min. 37% syrefri, stabiliseret med ca. 10% methanol og calciumcarbonat til histologi	1 l, 2,5 l, 25 l
Varenr. 1.04699	Immersionsolie til mikroskopi	100-ml pipette-flaske, 100 ml, 500 ml
Varenr. 1.07164	Paraffin-pastiller størkningspkt. ca. 56-58°C til histologie	10 kg (4 x 2,5 kg)
Varenr. 1.07961	Entellan™ ny hurtigindstøbningsmiddel til mikroskopi	100 ml, 500 ml, 1 l
Varenr. 1.08000	Sputofluo™ til mikroskopi	1 l
Varenr. 1.08298	Xylen (isomerisk blanding) til histologi	4 l
Varenr. 1.09016	Neo-Mount™ vandfrit indstøbningsmiddel til mikroskopi	100-ml pipette-flaske, 500 ml
Varenr. 1.09843	Neo-Clear™ (xylenerstatning) til mikroskopi	5 l
Varenr. 1.11609	Histosec™-pastiller størkningspunkt 56-58°C indstøbningsmiddel til histologi	1 kg, 10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Varenr. 1.15161	Histosec™-pastiller (uden DMSO) størkningspunkt 56-58°C indstøbningsmiddel til histologie	10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Varenr. 1.16450	AFB-Color farvningskit til mikroskopisk undersøgelse af syrefaste bakterier (AFB) (kold farvning)	1 set

Fareklassificering

Varenr. 1.01597.0001

Vær opmærksom på den fareklassificering, der er trykt på etiketten, og oplysningerne i sikkerhedsdatabladet.

Sikkerhedsdatabladet fås på hjemmesiden og ved forespørgsel.

Produktets hovedkomponenter

Varenr. 1.01597.0001		
Reagens 1		
Farvenideks 41000	12,0 g/l	
Farvenideks 45170	6,0 g/l	
1 l =	1,117 kg	
Reagens 2		
C ₃ H ₈ O	543,3 g/l	
HCl min. 37 %	15,7 g/l	
1 l =	0,878 kg	
Reagens 3		
KMnO ₄	5,0 g/l	
1 l =	1,013 kg	

Generel bemærkning

Hvis der under brugen af dette apparat eller som følge af dets brug opstår en alvorlig hændelse, skal dette meddeles producenten og/eller dennes autoriserede repræsentant og den nationale myndighed.

Litteratur

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Meget brandfarlig væske og damp.

H290: Kan ætse metaller.

H319: Forårsager alvorlig øjenirritation.

H336: Kan forårsage sløvhed eller svimmelhed.

H411: Giftig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger.

P210: Holdes væk fra varme, varme overflader, gnister, åben ild og andre antændelseskilder. Rygning forbudt.

P233: Hold beholderen tæt lukket.

P234: Opbevares kun i originalemballagen.

P240: Beholder og modtageudstyr jordforbindes/potentialudlignes.

P273: Undgå udledning til miljøet.

P305 + P351 + P338: VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

Reagens 1:

H226: Brandfarlig væske og damp.

H319: Forårsager alvorlig øjenirritation.

Reagens 2:

H225: Meget brandfarlig væske og damp.

H290: Kan ætse metaller.

H319: Forårsager alvorlig øjenirritation.

H336: Kan forårsage sløvhed eller svimmelhed.

Reagens 3:

H411: Giftig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger.

Revisionshistorik

Version	Kommentar til modifikation
2024-Jul-19	Første version med introduktion af revisionshistorik



Se brugervejledningen



Producent



Varenummer



Partikode



Forsigtig: Se den medfølgende dokumentation



Skal bruges inden
ÅÅÅÅ-MM-DD



Tilladt
temperatur

Status: 2024-Jul-19

Life science-afdelingen hos Merck drives under navnet MilliporeSigma i US og Canada.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany og/eller dennes tilknyttede selskaber. Alle rettigheder forbeholdes. Merck og Sigma-Aldrich er varemærker tilhørende Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Alle andre varemærker tilhører deres respektive ejere. Detaljerede oplysninger om varemærker kan findes via de offentligt tilgængelige ressourcer.



Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.sigmaaldrich.com

MERCK

1.01597.0001 **REF**

Mikroskopiju

AFB-Fluor bez fenola

Komplet za bojenje za pregled acidorezistentnih bakterija fluorescentne mikroskopije (Auramine-Rhodamine bojenje)

Samo za profesionalnu uporabu

IVD

In vitro dijagnostički medicinski proizvod

CE

Namjena

Ovaj „AFB-Fluor bez fenola - Komplet za bojenje za pregled acidorezistentnih bakterija fluorescentne mikroskopije (Auramine-Rhodamine bojenje)” koristi se za dijagnozu ljudskih stanica te služi u bakteriološkim, citološkim i histološkim ispitivanjima materijala uzorka ljudskog podrijetla. Radi se o kompletu za bojenje pripremljenom za upotrebu zahvaljujući kojem je, kada se upotrebljava s drugim *in vitro* dijagnostičkim proizvodima iz naše ponude, moguće procijeniti bakterijske ciljne strukture (acidorezistentne bakterije (AFB)) i to fiksiranjem, uklapanjem, bojenjem, protuboženjem, poklapanjem u materijalima bakterioloških citoloških i histoloških uzoraka, primjerice razmaza obogaćenih bakterijskih kultura ili histološke sekcije npr. plućima, u dijagnostičke svrhe.

Komplet za bojenje AFB-Fluor bez fenola odlikuje se prisutnošću fluorescentnih boja u otopini za bojenje. To omogućuje brzu i sigurnu identifikaciju acidorezistentnih bakterija pod fluorescentnim mikroskopom. Uz to se otopina za bojenje priprema bez potencijalno opasnog fenola, čime se povećava sigurnost korisnika.

Komplet za bojenje dolazi spreman za uporabu u praktičnim bočicama s kapaljkom i sadržava sve reagensne potrebne za bojenje acidorezistentnih bakterija u uzorcima razmaza i histološkim uzorcima tkiva.

Neobojene strukture imaju relativno niski kontrast i iznimno ih je teško razlikovati pod svjetlosnim mikroskopom. Slike dobivene uz primjenu otopina za bojenje ovlaštenom i kvalificiranom ispitivaču pomažu da u takvim slučajevima bolje definira oblik i strukturu. Daljnja ispitivanja moraju se provesti prema priznatim, valjanim metodama da bi se postavila konačna dijagnoza.

Princip

Klasična metoda po Ziehlju i Neelsenu ovisi o visokim udjelu voska i lipida u staničnoj stijenci jer acidorezistentne bakterije vrlo sporo apsorbiraju boje za bojenje. Kako bi se ubrzala apsorpcija fuksin boje i time nastao kompleks mikolat-fuksin u staničnoj stijenci, otopina karbol fuksina koja se nanosi na pripravak normalno se zagrijava dok ne stvara paru.

Nakon što acidorezistentne bakterije apsorbiraju boju fuksin, gotovo je nemoguće da opet izgube boju, čak i kad se intenzivno tretiraju otopinom za uklanjanje boje kao što je npr. klorovodična kiselina u etanolu. Dakle, acidorezistentne bakterije se nazivaju otpornima na kiseline i alkohol kod bojenja. Pri uporabi kompleta za bojenje AFB-Fluor bez fenola zbog primjene fluorescentnih boja auramin i rodamin u otopini za bojenje AFB-Fluor bez fenola korak zagrijavanja nije potreban. Te se boje nakupljaju na staničnoj stijenci acidorezistentnih bakterija te se ovisno o filtru mikroskopa vide žuto ili crveno na crnoj pozadini.

Predobradom uzoraka proizvodom Sputofluor™ otapaju se bakterije iz okolnog viscidnog sputuma i staničnog materijala.

Uzorak

Razmazi bakterioloških materijala koji su osušeni zrakom i fiksirani toplinom te prethodno tretirani proizvodom Sputofluor™, poput sputuma, razmaza iz aspiracijskih biopsija tankom iglom (FNAB), ispiranja, otisaka, efuzija, gnoja, eksudata i kultura u tekućem i krutom stanju

Rezovi tkiva humanog porijekla fiksiranog u formalinu i uklopljenog u parafin (parafinski rezovi debljine 3 – 4 µm)

Reagensi

Kat. br. 1.01597.0001 AFB-Fluor bez fenola
Komplet za bojenje za pregled acidorezistentnih bakterija fluorescentne mikroskopije (Auramine-Rhodamine bojenje)

Komponente pakiranja:

Komplet za bojenje sadrži

Reagens 1:	Otopina auramina i rodamina	200 ml
Reagens 2:	Otopina za obezbojenje	2 x 200 ml
Reagens 3:	Otopina za protubojenje (KMnO ₄)	200 ml

Također potrebno:

Kat. br. 1.08000 Sputofluor™
za mikroskopiju

1 l

Priprema uzorka

Uzorkovanje mora provoditi kvalificirano osoblje.

Svi uzorci moraju se obraditi vrhunskom tehnologijom.

Svi uzorci moraju se jasno označiti.

Prilikom uzimanja uzoraka i njihove pripreme moraju se upotrebljavati prikladni instrumenti. Slijedite upute proizvođača za primjenu/upotrebu.

Kada upotrebljavate odgovarajuće pomoćne reagens, treba se pridržavati njihovih uputa za uporabu.

Sputum

Acidorezistentne bakterije treba prethodno tretirati proizvodom Sputofluor™ da bi se razdvojile od sluzi i staničnih struktura. U ovom postupku aktivni sastojak hipoklorit otapa organske tvari oksidacijom i lagano otpušta acidorezistentne bakterije tako da se mogu dalje obrađivati.

Priprema reagensa: Priprema Sputofluor™ otopine, 15 %

Za pripremu pribl. 100 ml otopine:

Sputofluor™	15 ml
Destilirana voda	85 ml

Priprema uzorka u epruvetama za centrifugiranje:	
Uzorak	1 dio (min. 2 ml)
Sputofluor™ otopina (15 % u destiliranoj vodi)	3 dijelova
Snažno protresti	10 min
Centrifugirati pri 3000 – 4800 o/min	20 min
Dekantirati supernatant Pripremiti razmaze sedimenta Osušiti na zraku	

Punktati, ispiranja, sedimenti

Nakon poduzimanja odgovarajućih mjera obogaćivanja, razmažite uzorak na stakalce i ostavite ga da se osuši na zraku.

Histološke sekcije

AFB-Fluor bez fenola može se upotrebljavati za bojenje histoloških rezova.

Uklonite parafin s sekcije na uobičajen način i rehidrirajte silaznim nizom alkohola.

Fiksacija uzoraka razmaka

Uzorci se fiksiraju iznad plamena Bunsenova plamenika (2 – 3 puta, vodeći računa da se izbjegne prekomjerno zagrijavanje).

Uzorci se mogu fiksirati zagrijavanjem na 100 – 110 °C u komori za sušenje ili na grijaćoj ploči u trajanju od 20 min.

Previsoke temperature ili duže zagrijavanje mogu dovesti do pogoršanja učinkovitosti bojenja.

Priprema reagensa

Reagensi AFB-Fluor bez fenola - Komplet za bojenje za pregled acidorezistentnih bakterija fluorescentne mikroskopije

(Auramine-Rhodamine bojenje) spremni su za uporabu, a razrjeđivanje otopina nije potrebno i samo pogoršava rezultate bojenja i njihovu stabilnost.

Zbog njezine visoke viskoznosti otopinu auramina i rodamina za bojenje bez fenola (reagens 1) potrebno je snažno protresti prije uporabe.

Postupak

Bojenje uzoraka razmaza

Bojenje na podlozi za bojenje

Stakalce s fiksiranim razmazom		
Reagens 1 (otopina auramina i rodamina)	nakapajte, u potpunosti pokrijte i obojite	15 min
Voda iz slavine	oprezno isperite	30 s
Reagens 2 (otopina za obezbojenje)	nakapajte, u potpunosti pokrijte i pričekajte reakciju	1 min
Voda iz slavine	oprezno isperite	30 s
Reagens 3 (otopina za protubojenje)	nakapajte, u potpunosti pokrijte i obojite	5 min
Voda iz slavine	oprezno isperite	30 s
Sušenje zrakom		

Pokrivanje s medijem za poklapanje bez vode (npr. Neo-Mount™, Novi Entellan™ ili Novi DPX) i stakleni pokrov preporučuju se za pohranu uzoraka razmaza na nekoliko mjeseci. Obojani uzorci moraju se u tu svrhu vrlo dobro osušiti.

Upotreba imerzijskog ulja preporučuje se za analizu obojanih stakalaca s pomoću mikroskopskog povećanja > 40x.

Bojenje histoloških uzoraka

Bojenje na podlozi za bojenje

Uklonite parafin s histoloških stakalaca na uobičajen način i rehidrirajte silaznim nizom alkohola.

Otopine za bojenje nanose se kap po kap na stakalce i trebaju potpuno prekriti parafinski rezovi.

Potrebno je pridržavati se navedenih vremena za optimalne rezultate bojenja.

Stakalce s histološkom tkivu	
Destilirana voda	sušenje
Reagens 1 (otopina auramina i rodamina)	15 min
Voda iz slavine	30 s
Reagens 2 (otopina za obezbojenje)	1 min
Voda iz slavine	30 s
Reagens 3 (otopina za protubojenje)	5 min
Voda iz slavine	30 s
Etanol 70 %	1 min
Etanol 70 %	1 min
Etanol 96 %	1 min
Etanol 96 %	1 min
Etanol 100 %	1 min
Etanol 100 %	1 min
Ksilen ili Neo-Clear™	5 min
Ksilen ili Neo-Clear™	5 min
Mokra stakalca s otopinom Neo-Clear™ poklopite otopinom Neo-Mount™ ili mokra stakalca s ksilenom npr. otopinom Novi Entellan™ i staklenim pokrovom.	

Nakon dehidracije (uzlazni niz alkohola) i čišćenja ksilenom ili otopinom Neo-Clear™, histološki uzorci mogu se pokriti agensom za poklapanje bez vode (npr. Neo-Mount™, Novi Entellan™ ili Novi DPX) i staklenim pokrovom te se zatim mogu pohraniti.

Rezultat

Acidorezistentne bakterije (pod fluorescentnim mikroskopom)	crveno-narančasta (rodamin) ili žuto-zelena (auramin) - ovisno o kombinaciji upotrijebljenih filtara
Pozadina	tamna do crna

Bojenje za optičko i fluorescentno mikroskopiranje

Fluorescentno bojenje uporabom kompleta za bojenje AFB-Fluor bez fenola također je izrazito prikladno za dodatno bojenje acidorezistentnih bakterija u svrhu dijagnostike optičkim mikroskopiranjem, npr. kompletom za bojenje AFB-Color (kat. br. 1.16450) ili AFB-Color modificirani (kat. br. 1.00497).

Uzorci bez podloge obojeni kompletom za bojenje AFB-Fluor bez fenola mogu se izravno upotrebljavati u dijagnostičke svrhe. Nakon toga, nakon pažljivog uklanjanja ulja koje se možda upotrebljavalo za uranjanje, uzorci se mogu dalje bojiti kompletom za bojenje AFB-Color ili AFB-Color modificirani. Ako se uzorak tretira na taj način, acidorezistentne bakterije su pod optičkim mikroskopom magenta-crvene boje na svjetlozelenoj pozadini (AFB-Color) ili svjetloplavoj (AFB-Color modificirani) pozadini.

Procjena

Pozitivan rezultat znači „prisutne acidorezistentne bakterije“, a negativan rezultat „acidorezistentne bakterije nisu prisutne“. Pozitivan rezultat ne znači da je moguća taksonomska klasifikacija mikroskopom. Ako se otkriju acidorezistentne bakterije, moraju se provesti dodatne analize u posebno opremljenim laboratorijima. Također, ne može se utvrditi ni vitalnost bakterija (aktivne, neaktivne).

Ako rezultat nije jasan, preporučuje se dodatno bojenje uzorka za daljnju dijagnostiku optičkim mikroskopiranjem, npr. kompletom za bojenje AFB-Color (kat. br. 1.16450) ili AFB-Color modificirani (kat. br. 1.00497).

Otklanjanje poteškoća

Fiksacija uzoraka razmaka

Neophodna je određena razina fiksiranja toplinom s pomoću Bunsenova plamenika da bi se spriječio zarazni potencijal uzorka i daljnje širenje bakterija.

Ne dolazi do bojenja acidorezistentne bakterije

Ključan korak tog postupka bojenja jest korak dekolorizacije, na koji može utjecati debljina razmaza uzorka. Uz to, svježea otopina klorovodične kiseline u etanolu vrlo je reaktivna, zbog čega se rezultat mora pažljivo procijeniti. U koraku uklanjanja boje treba se precizno pridržavati vremena inkubacije navedenih u ovom protokolu jer inače mogu uslijediti lažno negativni rezultati.

Prejako obojenje pozadine

Ako je pozadina prejako obojena na slici optičkog mikroskopa (tamnoplavo), potrebno je bolje umiješati reagens 1 (otopina auramina i rodamina) te ga bolje obezbojiti. Budući da je otopina za bojenje visokog viskoziteta, preporučuje se da pomičete predmetno stakalce prilikom koraka obezbojenja s reagensom 2 (otopina za obezbojenje).

Tehničke napomene

Upotrebljavani mikroskop mora zadovoljavati preduvjete medicinskog dijagnostičkog laboratorija.

Preporučena kombinacija filtara za fluorescentno mikroskopiranje:

Ekscitacijski filtar	490 - 570 nm
Separator boje	525 i 635 nm
Emisijski filtar	505 - 600 nm

Prilikom upotrebe automatske opreme za bojenje slijedite upute za uporabu dobavljača sustava i softvera.

Prije punjenja uklonite suvišno imerzijsko ulje.

Značajke analitičke učinkovitosti

„AFB-Fluor bez fenola - komplet za bojenje“ boji i tako omogućava vizualizaciju bioloških struktura, kao što je opisano u poglavlju „Rezultat“ u ovim uputama za uporabu. Ovaj proizvod smiju upotrebljavati samo ovlaštene i kvalificirane osobe. To se, između ostaloga, odnosi na pripremu uzoraka i reagensa, rukovanje uzorcima, histološku obradu, donošenje odluka o odgovarajućim kontrolama itd.

Analitička učinkovitost ovog proizvoda potvrđena je ispitivanjem svake proizvodne serije.

Za sljedeće je postupke bojenja potvrđena 100 %-tna analitička učinkovitost proizvoda u pogledu specifičnosti, osjetljivosti i ponovljivosti:

	Specifičnost među ispitivanjima	Osjetljivost među ispitivanjima	Specifičnost unutar ispitivanja	Osjetljivost unutar ispitivanja
Histološko bojenje				
Acidorezistentne bakterije (pod fluorescentnim mikroskopom)	14/14	14/14	6/6	6/6
Pozadina	14/14	14/14	6/6	6/6
Bojenje razmaza				
Acidorezistentne bakterije (pod fluorescentnim mikroskopom)	14/14	14/14	6/6	6/6
Pozadina	14/14	14/14	6/6	6/6

Rezultati analitičke učinkovitosti

Podaci dobiveni unutar ispitivanja (provedeno na istoj seriji) i među ispitivanjima (provedena na različitim serijama) pokazuju broj ispravno obojenih struktura s obzirom na broj provedenih ispitivanja.

Značajke kliničke učinkovitosti

Klinička učinkovitost ovog proizvoda također je uspješno dokazana u nekoliko znanstvenih radova.

AFB-Fluor bez fenola - komplet za bojenje desetljećima se uspješno upotrebljava u kliničkom okruženju za velik broj primjena.

Klinička učinkovitost AFB-Fluor bez fenola - komplet za bojenje posebno je određena utvrđivanjem njegove osjetljivosti i specifičnosti te PPV-a i NPV-a u internoj studiji:

	Auramine-Rhodamine bojenje
Osjetljivost	14/14
Specifičnost	15/15

Osjetljivost: 14 uzoraka od 14: 100 %
Specifičnost: 15 uzoraka od 15: 100 %
Pozitivna prediktivna vrijednost (PPV): 100 %
Negativna prediktivna vrijednost (NPV): 100 %

Rezultati ove procjene učinkovitosti potvrđuju da je proizvod prikladan za predviđenu uporabu i da pouzdano djeluje.

Međutim, kvalificirani i ovlaštteni stručnjaci moraju provesti dijagnostičko tumačenje rezultata bojenja, pri čemu prema potrebi trebaju uzeti u obzir pacijentovu anamnezu, morfologiju, primjenu odgovarajućih kontrola i dodatne dijagnostičke testove. Ova se metoda može koristiti kao dopuna u dijagnostici na ljudima.

Dijagnostika

Dijagnoze smije donositi jedino ovlašteno i kvalificirano osoblje. Potrebno je upotrebljavati valjanu nomenklaturu. Ova se metoda može koristiti kao dopuna u dijagnostici na ljudima. Potrebno je odabrati i implementirati dodatne testove sukladno prepoznatim metodama. Potrebno je provesti odgovarajuće kontrole (npr. ISOSLIDE™ AFB, kat. br. 1.02560.0001) prilikom svake primjene da bi se izbjegli neispravni rezultati. Ako rezultat nije jasan, preporučuje se dodatno bojenje uzorka za daljnju dijagnostiku optičkim mikroskopiranjem, npr. kompletom za bojenje AFB-Color (kat. br. 1.16450) ili AFB-Color modificirani (kat. br. 1.00497).

Skladištenje

Pohranite AFB-Fluor bez fenola - Komplet za bojenje za pregled acidorezistentnih bakterija fluorescentne mikroskopije (Auramine-Rhodamine bojenje) na +15 °C do +25 °C.

Rok uporabe

AFB-Fluor bez fenola - Komplet za bojenje za pregled acidorezistentnih bakterija fluorescentne mikroskopije (Auramine-Rhodamine bojenje) može se upotrebljavati do navedenog datuma trajanja. Nakon prvog otvaranja boce kapaljka, sadržaj se može upotrebljavati do navedenog roka uporabe ako je pohranjen na +15 °C do +25 °C. Boce kapaljka moraju biti čvrsto zatvorene u svakom trenutku. Obojenje otopine za obezbojenje (reagens 2) nema učinak na procese bojenja i dijagnostiku.

Kapacitet

Paket je dostatan za do 60 - 65 primjena, a možda čak i više ovisno o debljini razmaza.

Dodatne upute

Samo za profesionalnu uporabu. Da bi se izbjegle pogreške, primjenu smije provoditi samo kvalificirano osoblje. Potrebno je slijediti nacionalne smjernice za sigurnost na radu i osiguravanje kvalitete. Potrebno je upotrebljavati mikroskope opremljene sukladno standardu. Ako je to potrebno, upotrebljavajte standardnu centrifugu prikladnu za medicinski dijagnostički laboratorij.

Zaštita od infekcije

Potrebno je poduzeti učinkovite mjere za zaštitu od infekcije sukladno smjernicama laboratorija.

Upute za odlaganje

Pakiranje se mora odložiti sukladno trenutnim smjernicama za odlaganje. Korištene otopine i otopine kojima je istekao rok uporabe moraju se odložiti kao poseban otpad sukladno lokalnim smjernicama. Informacije o odlaganju možete dobiti na brzoj poveznici „Hints for Disposal of Microscopy Products” (Savjeti za odlaganju mikroskopskih proizvoda) na adresi www.microscopy-products.com. Unutar EU-a primjenjuje se trenutačno primjenjiva UREDBA (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EEZ i 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006.

Pomoćni reagensi

Kat. br. 1.00327	Kloridna kiselina u etanolu za mikroskopiju	1 l, 5 l
Kat. br. 1.00496	Otopina formaldehida 4 %, puferirana, pH 6,9 (oko 10 %-tna otopina formalina) za histologiju	350 ml i 700 ml (u boci širokog grla), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Kat. br. 1.00497	AFB-Color modificirani komplet za detekciju acidorezistentnih bakterije (AFB) vrućom metodom bojenja	1 set
Kat. br. 1.00579	Novi DPX nevodeni medij za poklapanje za mikroskopiju	500 ml
Kat. br. 1.00869	Novi Entellan™ za uređaj za pokrivanje preparata za mikroskopiju	500 ml
Kat. br. 1.02560	ISOSLIDE™ AFB kontrolna stakalca s referentnim tkivima za detekciju acidorezistentnih bakterije u histološkom tkivu	25 testova
Kat. br. 1.03999	Otopina formaldehida od min. 37 % bez kiseline stabilizirane s oko 10 % metanola i kalcijeva karbonata za histologiju	1 l, 2,5 l, 25 l
Kat. br. 1.04699	Imerzijsko ulje za mikroskopiju	Boca kapaljka od 100 ml, 100 ml, 500 ml

Kat. br. 1.07164	Parafin pastile točka skrućivanja od 56-58 °C agensa za uklapanje za histologiju	10 kg (4 x 2,5 kg)
Kat. br. 1.07961	Novi Entellan™ brzi medij za uklapanje za mikroskopiju	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. br. 1.08000	Sputofluo™ za mikroskopiju	1 l
Kat. br. 1.08298	Ksilen (izomerna smjesa) za histologiju	4 l
Kat. br. 1.09016	Neo-Mount™ bezvodni medij za poklapanje za mikroskopiju	Boca kapaljka od 100 ml, 500 ml
Kat. br. 1.09843	Neo-Clear™ (zamjena za ksilen) za mikroskopiju	5 l
Kat. br. 1.11609	Histosec™ pastile točke skrućivanja 56-58 °C, agens za uklapanje za histologiju	1 kg, 10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Kat. br. 1.15161	Histosec™ pastile (bez DMSO-a) točke skrućivanja 56-58 °C, agens za uklapanje za histologiju	10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Kat. br. 1.16450	AFB-Color set za bojenje za mikroskopsko istraživanje acidorezistentnih bakterije (AFB) (hladno bojenje)	1 set

Klasifikacija rizika

Kat. br. 1.01597.0001
Slijedite klasifikaciju rizika ispisanu na oznaci i informacije navedene na sigurnosno-tehničkom listu. Sigurnosno-tehnički list dostupan je na web-mjestu i na zahtjev.

Glavne komponente proizvoda

Kat. br. 1.01597.0001		
Reagens 1		
C.I. 41000		12,0 g/l
C.I. 45170		6,0 g/l
1 l =	1,117 kg	
Reagens 2		
C ₃ H ₈ O		543,3 g/l
HCl min. 37 %		15,7 g/l
1 l =	0,878 kg	
Reagens 3		
KMnO ₄		5,0 g/l
1 l =	1,013 kg	

Opća napomena

Ako se tijekom uporabe ovog uređaja ili zbog njegove uporabe dogodi ozbiljan štetni događaj, prijavite ga proizvođaču i/ili njegovom ovlaštenom zastupniku te nacionalnom nadležnom tijelu.

Književnost

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Lako zapaljiva tekućina i para.
H290: Može nagrizzati metale.
H319: Uzrokuje jako nadraživanje oka.
H336: Može izazvati pospanost ili vrtoglavicu.
H411: Otroavno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima.

P210: Čuvati odvojeno od topline, vrućih površina, iskri, otvorenih plamena i ostalih izvora paljenja. Ne pušiti.
P233: Čuvati u dobro zatvorenom spremniku.
P234: Čuvati samo u originalnom pakiranju.
P240: Uzemljiti i učvrstiti spremnik i opremu za prihvrat kemikalije.
P273: Izbjegavati ispuštanje u okoliš.

P305 + P351 + P338: U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ako ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispirati.

Reagens 1:

H226: Zapaljiva tekućina i para.

H319: Uzrokuje jako nadraživanje oka.

Reagens 2:

H225: Lako zapaljiva tekućina i para.

H290: Može nagrizzati metale.

H319: Uzrokuje jako nadraživanje oka.

H336: Može izazvati pospanost ili vrtoglavicu.

Reagens 3:

H411: Otroavno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima.

Povijest revizija

Verzija	Komentar o izmjeni
2024-Jul-19	Izvorna verzija s uvodom u povijest revizija



Pročitajte upute za uporabu



Proizvođač



Kataloški broj



Kod serije



Oprez, pročitajte popratnu dokumentaciju



Upotrijebite do GGGG-MM-DD



Ograničenje temperature

Status: 2024-Jul-19

The Life Science Business tvrtke Merck posluje kao MilliporeSigma u SAD-u i Kanadi.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany i/ili društva-kćeri tog društva. Sva prava pridržana. Merck i Sigma-Aldrich u jarkim bojama zaštitni su znakovi društva Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Svi drugi zaštitni znakovi pripadaju odgovarajućim vlasnicima. Detaljne informacije o zaštitnim znakovima dostupne su putem javno dostupnih resursa.



Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.sigmaaldrich.com

MERCK

1.01597.0001 **REF****Mikroskopia****AFB-Fluor, niezawierający fenolu**

zestaw do barwienia do badania bakterii kwasoopornych metodą mikroskopii fluorescencyjnej (barwienie auraminą i rodaminą)

Wyłącznie do użytku przez specjalistów**IVD**Urządzenia medyczne do diagnostyki *in vitro***Przeznaczenie**

„AFB-Fluor, niezawierający fenolu - zestaw do barwienia do badania bakterii kwasoopornych metodą mikroskopii fluorescencyjnej (barwienie auraminą i rodaminą)” jest stosowany w cytologicznej diagnostyce klinicznej do badania bakteriologicznego, cytologicznego i histologicznego materiału pobieranego od pacjentów. Ten zestaw do barwienia, w połączeniu z innymi produktami do diagnostyki *in vitro* z naszej oferty, umożliwia ocenę diagnostyczną bakteryjne i grzybicze struktur docelowych (bakterii kwasoopornych (AFB) poprzez utrwalanie, zatapianie, barwienie, barwienie kontrastowe, zamykanie) preparatów bakteriologicznych, cytologicznych i histologicznych przygotowanych z materiału pobranego od pacjentów, na przykład rozmazach materiału z hodowli prowadzonych na podłożach wzbogacająco-różnicujących lub skrawków histologicznych np. z płuco.

Decydującą cechą zestawu do barwienia AFB-Fluor, niezawierający fenolu jest obecność barwników fluorescencyjnych w roztworze barwiącym. Umożliwia to szybką i bezpieczną identyfikację bakterii kwasoopornych pod mikroskopem fluorescencyjnym. Ponadto roztwór barwiący jest przygotowany bez potencjalnie niebezpiecznego fenolu, co zwiększa bezpieczeństwo dla użytkownika.

Ten zestaw do barwienia jest dostarczany w postaci gotowej do użycia w praktycznych butelkach z zakraplaczem i zawiera wszystkie odczynniki wymagane do barwienia bakterii kwasoopornych w rozmazach i histologicznych próbkach tkanek.

Niezabarwione struktury mają stosunkowo niski kontrast i są niezwykle trudne do odróżnienia pod mikroskopem świetlnym. Obrazy utworzone z użyciem roztworów barwiących pomagają upoważnić i wykwalifikowanemu badaczowi lepiej zdefiniować formę i strukturę w takich przypadkach. Aby postawić ostateczną diagnozę, należy wykonać dalsze badania, stosując uznane i sprawdzone metody.

Zasada działania

Klasykzna metoda Ziehl-Neelsen jest zależna od wysokiej zawartości wosku i lipidów w ścianie komórkowej, ponieważ bakterie kwasooporne bardzo powoli wychwytyją barwniki. W celu przyspieszenia wchłaniania barwnika fuksyny, a tym samym tworzenia kompleksu mykolan-fuksyna w ścianie komórkowej, roztwór fuksyny karbolowej nakładany na preparat jest zwykle podgrzewany do momentu utworzenia pary.

Gdy bakterii kwasoopornych wchłonią fuksynę, ich ponowne odbarwienie jest niemal niemożliwe, nawet w przypadku intensywnego stosowania roztworu odbarwiającego takiego jak np. roztwór kwasu solnego w etanolu. Dlatego też bakterii kwasoopornych klasyfikuje się jako kwaso- i alkoholooorne dla celów barwienia.

W przypadku stosowania zestawu do barwienia AFB-Fluor, niezawierający fenolu, użycie barwników fluorescencyjnych – auraminy i rodaminy – w roztworze do barwienia AFB-Fluor, niezawierający fenolu sprawia, że etap ogrzewania nie jest konieczny. Barwniki te odkładają się na ścianie komórkowej bakterii kwasoopornych i, w zależności od filtra mikroskopowego, przyjmują barwę żółtą lub czerwoną na czarnym tle. Oczyszczenie próbek roztworem Sputofluor™ powoduje uwolnienie bakterii z otaczającej gęstej płwociny i materiału komórkowego.

Materiał próbek

Wysuszone na powietrzu, utrwalone przez podgrzewanie i poddane działaniu preparatu Sputofluor™ rozmazy materiału bakteriologicznego takiego jak płwocina, rozmazy z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, popłuczyny, odciski, wysięki, płyn przesiękowy, ropa i hodowle płynne lub stałe

Skrawki tkanek ludzkich utrwalone w formalinie, zatopione w parafinie (skrawki parafinowe o grubości 3-4 µm)

Odczynniki

Nr kat. 1.01597.0001 AFB-Fluor, niezawierający fenolu zestaw do barwienia do badania bakterii kwasoopornych metodą mikroskopii fluorescencyjnej (barwienie auraminą i rodaminą)

Zawartość opakowania:

Zestaw do barwienia zawiera

Odczynnik 1:	Roztwór auraminy-rodaminy	200 ml
Odczynnik 2:	Roztwór odbarwiający	2 x 200 ml
Odczynnik 3:	Roztwór do barwienia kontrastowego (KMnO ₄)	200 ml

Również wymagane:

Nr kat. 1.08000 Sputofluor™ do mikroskopii 1 l

Przygotowywanie próbek

Próbki muszą być przygotowywane przez wykwalifikowany personel.

Wszystkie próbki muszą być opracowywane z użyciem najnowocześniejszych technologii.

Wszystkie próbki należy wyraźnie oznaczać.

Do pobierania i przygotowywania próbek należy używać odpowiednich urządzeń i narzędzi. Należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta dotyczącymi zastosowania/użycia.

Podczas stosowania odpowiednich odczynników pomocniczych należy przestrzegać odpowiedniej instrukcji użytkowania.

Płwocina

Bakterii kwasoopornych należy wstępnie poddać działaniu preparatu Sputofluor™, aby uwolnić je ze śluzu i struktur komórkowych. W tym procesie składnik czynny – podchloryn – rozpuszcza materiał organiczny utleniający go i delikatnie uwalnia bakterii kwasoopornych, umożliwiając ich dalsze barwienie.

Przygotowywanie odczynnika: Przygotowywanie Sputofluor™, roztwór 15% W celu przygotowania ok. 100 ml roztworu, należy zmieszać:

Sputofluor™	15 ml
Woda destylowana	85 ml

Przygotowywanie próbek w probówkach wirowniczych.	
Próbka	1 część (min. 2 ml)
Sputofluor™ (roztwór 15% w wodzie destylowanej)	3 części
Energicznie wstrząsnąć.	10 min.
Odwirować przy 3000 - 4800 obr./min.	20 min.
Zdekantować supernatant. Przygotować rozmazy osadu. Wysuszyć na powietrzu	

Materiał z punkcji, popłuczyny, osady

Po odpowiednim wzbogaceniu należy wykonać rozmaz materiału na szkiełku podstawowym i pozostawić do wyschnięcia na powietrzu.

Skrawki histologiczne

AFB-Fluor, niezawierający fenolu może być stosowany do barwienia skrawków histologicznych.

Odparafinować skrawki w sposób konwencjonalny i uwodnić w malejącym szeregu alkoholowym.

Utrwalanie próbek rozmazu

Próbki są utrwalane nad płomieniem palnika Bunsena (2-3 razy – należy uważać, aby nie dopuścić do nadmiernego ogrzania).

Próbki można także utrwalić, ogrzewając je w temp. 100 - 110°C w suszarce lub na płytce grzejnej przez 20 min. ut.

Zbyt wysoka temperatura lub zbyt długie ogrzewanie może doprowadzić do pogorszenia wyników barwienia.

Przygotowywanie odczynników

Odczynniki wchodzące w skład AFB-Fluor, niezawierający fenolu - zestaw do barwienia do badania bakterii kwasoopornych metodą mikroskopii fluorescencyjnej (barwienie auraminą i rodaminą) są gotowe do użycia, ich rozcieńczanie nie jest wymagane i prowadzi do pogorszenia wyników barwienia i jego stabilności.

Ze względu na wysoką lepkość, bezfenolowy roztwór barwiący zawierający auramin.ę-rodamin.ę (odczynnik 1) należy energicznie wstrząsnąć przed użyciem.

Procedura

Barwienie próbek rozmazu

Barwienie na statywie do barwienia

Szkiełko z utrwalonym rozmazem		
Odczynnik 1 (roztwór auraminy-rodaminy)	nanosić kroplami, dokładnie przykryć i wybarwić	15 min.
Woda z kranu	ostrożnie spłukać	30 sek.
Odczynnik 2 (roztwór odbarwiający)	nanosić kroplami, dokładnie przykryć i pozostawić do wystąpienia odczynu	1 min.
Woda z kranu	ostrożnie spłukać	30 sek.
Odczynnik 3 (roztwór do barwienia kontrastowego)	nanosić kroplami, dokładnie przykryć i wybarwić	5 min.
Woda z kranu	ostrożnie spłukać	30 sek.
Osuszyć na powietrzu		

Na potrzeby przechowywania próbek rozmazu przez kilka miesięcy zalecane jest użycie bezwodnego odczynnika do zamykania preparatów (np. Neo-Mount™, Entellan™ nowy lub DPX nowy) i szkiełka nakrywkowego. W tym celu należy bardzo dokładnie osuszyć barwione preparaty.

Użycie olejku immersyjnego jest zalecane na potrzeby analizy barwionych preparatów przy powiększeniu mikroskopowym >40x.

Bojenie histoloških uzoraka

Barwienie na statywie do barwienia

Uklonite parafin s histoloških stakalaca na uobičajen način i rehidrirajte silaznim nizom alkohola.

Roztwory barwiące są наносzone kroplami na szkiełko podstawowe i powin-ny całkowicie pokryć skrawek parafinowy.

W celu zagwarantowania optymalnych rezultatów barwienia należy stoso-wać się do zalecanych czasów.

Stakalce s histološkom tkivu	
Woda destylowana	spłukać
Odczynnik 1 (roztwór auraminy-rodaminy)	15 min.
Woda z kranu	30 sek.
Odczynnik 2 (roztwór odbarwiający)	1 min.
Woda z kranu	30 sek.
Odczynnik 3 (roztwór do barwienia kontrastowego)	5 min.
Woda z kranu	30 sek.
Etanol 70 %	1 min.
Etanol 70 %	1 min.
Etanol 96 %	1 min.
Etanol 96 %	1 min.
Etanol 100 %	1 min.
Etanol 100 %	1 min.
Ksylan lub Neo-Clear™	5 min.
Ksylan lub Neo-Clear™	5 min.
Preparaty namoczone w roztworze Neo-Clear™ należy zamknąć, używając środka Neo-Mount™, a preparaty namoczone w ksylie- niu należy zamknąć, używając np. środka Entellan™ nowy i szkiełka nakrywkowego.	

Po odwodnieniu (w rosnaćym szeregu alkoholowym) i oczyszczeniu ksyle- nem lub roztworem Neo-Clear™ preparaty histologiczne można zamknąć za pomocą bezwodnych odczynników do zamykania (np. Neo-Mount™, Entellan™ nowy lub DPX nowy) i szkiełka nakrywkowego, a następnie prze- chowywać.

Wynik

Bakterii kwasooporne (pod mikroskopem fluorescencyjnym)	czerwono-pomarańczowy (rodamina) lub żółto-zielony (auramina) - w zależności od kombinacji użytych filtrów
Tło	ciemnego do czarnego

Barwienie dla mikroskopii optycznej i fluorescencyjnej

Barwienie fluorescencyjne przy użyciu zestawu do barwienia AFB-Fluor, nie- zawierający fenolu doskonale nadaje się również do dodatkowego barwienia bakterii kwasoopornych do diagnostyki za pomocą mikroskopii optycznej, np. przy użyciu zestawu do barwienia AFB-Color (nr kat. 1.16450) lub ze- stawu AFB-Color zmodyfikowany (nr kat. 1.00497).

Niezaklejone próbki wybarwione przy użyciu zestawu do barwienia AFB- -Fluor, niezawierający fenolu można wykorzystać bezpośrednio do celów diagnostycznych. Następnie, po starannym usunięciu oleju immersyjnego, jeśli został użyty, próbki mogą być dalej barwione za pomocą zestawu do barwienia AFB-Color lub zestawu AFB-Color zmodyfikowany.

W próbce przygotowanej w ten sposób pod mikroskopem optycznym bak- terie kwasooporne przyjmują barwę purpurowoczerwoną na jasnozielonym (AFB-Color) lub jasnoniebieskim (AFB-Color zmodyfikowany) tle.

Ocena

Wynik dodatni oznacza obecność bakterii kwasoopornych, a wynik ujemny – brak bakterii kwasoopornych. Wynik pozytywny nie oznacza, że możliwa jest klasyfikacja taksonomiczna pod mikroskopem. W przypadku wykrycia bakterii kwasoopornych należy przeprowadzić dalsze analizy w specjalnie wyposażonych laboratoriach. Nie można również ustalić żywotności bakterii (aktywne, nieaktywne).

Jeśli wynik nie jest jednoznaczny, zaleca się dodatkowe wybarwienie próbek w celu dalszej diagnostyki z wykorzystaniem mikroskopii optycznej, np. za pomocą zestawu do barwienia AFB-Color (nr kat. 1.16450) lub zestawu AFB-Color zmodyfikowany (nr kat. 1.00497).

Rozwiązywanie problemów

Utrwalanie próbek rozmazu

Odpowiedni stopień utrwalenia preparatów za pomocą palnika Bunsena lub suszarki ma zasadnicze znaczenie dla zapobiegania infekcjom i dalszemu namnażaniu się bakterii.

Brak wybarwienia bakterii kwasoopornych

Krytycznym etapem tego procesu barwienia jest etap odbarwiania, na który może mieć wpływ grubość rozmazu próbki. Ponadto świeży roztwór kwasu chlorowodorowego w etanolu jest wysoce reaktywny, co oznacza, że wynik należy oceniać ostrożnie. Należy ściśle przestrzegać podanych w niniejszej procedurze czasów inkubacji na etapie odbarwiania, gdyż w przeciwnym wypadku otrzymane wyniki mogą być fałszywie ujemne.

Zbyt silne wybarwienie tła

W przypadku gdy tło na obrazie uzyskanym pod mikroskopem optycznym jest zbyt mocno wybarwione (ciemnoniebieskie), odczynnik 1 (roztwór au- raminy-rodaminy) należy lepiej wymieszać, a następnie lepiej odbarwić. Po- nieważ roztwór barwiący jest bardzo lepki, zaleca się obracanie preparatem podczas etapu odbarwiania z użyciem odczynnika 2 (roztwór odbarwiający).

Uwagi techniczne

Używany mikroskop powinien spełniać wymogi laboratorium diagnostyki medycznej.

Zalecane kombinacje filtrów dla mikroskopii fluorescencyjnej:

Filtr wzbudzenia	490 - 570 nm
Separator kolorów	525 i 635 nm
Filtr emisji	505 - 600 nm

Podczas korzystania z automatycznych systemów barwiących należy postępować zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta systemu i oprogramowania.

Przed przystąpieniem do przechowywania należy usunąć nadmiar olejku immersyjnego.

Parametry wydajności analitycznej

„AFB-Fluor, niezawierający fenolu - zestaw do barwienia” wybarwia i tym samym wizualizuje struktury biologiczne, jak opisano w rozdziale „Wynik” niniejszej Instrukcji obsługi (IFU). Produkt może być używany wyłącznie przez osoby upoważnione i wykwalifikowane. Dotyczy to między innymi przygotowania próbek i odczynników, postępowania z próbkami, obróbki histologicznej, decyzji dotyczących odpowiednich kontroli i innych.

Wydajność analityczna produktu jest potwierdzana poprzez testowanie każdej partii produkcyjnej.

Dla poniższych barwników, w zakresie paramterów analitycznych wymienionych poniżej, potwierdzono, że wskaźnik swoistości, czułości i powtarzalności produktu wynosi 100%:

	Swoistość międzyse-ryjna	Czułość międzyse-ryjna	Swoistość wewnątrz-seryjna	Czułość wewnątrz-seryjna
Barwienie histologiczne				
Bakterii kwasooporne (pod mikroskopem fluorescencyjnym)	14/14	14/14	6/6	6/6
Tło	14/14	14/14	6/6	6/6
Barwienie rozmazów krwi				
Bakterii kwasooporne (pod mikroskopem fluorescencyjnym)	14/14	14/14	6/6	6/6
Tło	14/14	14/14	6/6	6/6

Wyniki analityczne

Dane wewnątrz- (wykonane na tej samej serii) i międzyseryjne (wykonane na różnych seriach) przedstawiają wiele prawidłowo wybarwionych struktur w stosunku do liczby wykonanych testów.

Parametry wydajności klinicznej

Ponadto wydajność kliniczna tego produktu została z powodzeniem potwierdzona w wielu publikacjach naukowych.

AFB-Fluor, niezawierający fenolu - zestaw do barwienia jest z powodze-niem wykorzystywany w wielu zastosowaniach w warunkach klinicznych od kiludziesięciu lat.

Wydajność kliniczna AFB-Fluor, niezawierający fenolu - zestaw do barwienia w szczególności została określona poprzez ustalenie jego czułości i swoistości oraz PPV i NPV w badaniu wewnętrzym:

	Barwienie auraminą i rodaminą
Czułość	14/14
Swoistość	15/15

Czułość: 14 z 14 próbek: 100%
Swoistość: 15 z 15 próbek: 100%
Wartość predykcyjna dodatnia (PPV): 100%
Warrtość predykcyjna ujemna (NPV): 100%

Wyniki niniejszej Oceny Wydajności potwierdzają, że produkt jest odpo-wiedni do zamierzonego zastosowania i działa niezawodnie.

Interpretacja diagnostyczna wyników barwienia powinna być jednak przeprowadzona przez wykwalifikowanych i upoważnionych specjalistów, z uwzględnieniem wywiadu z pacjentem, morfologii, zastosowania odpowied-nich kontroli oraz dodatkowych badań diagnostycznych, jeśli jest to wskaza-ne. Metodę tą można dodatkowo stosować w diagnostyce ludzkiej.

Diagnostyka

Diagnozy może stawiać wyłącznie odpowiednio upoważniony i wykwalifikowany personel.
Należy stosować obowiązujące nazewnictwo.
Metodę tą można dodatkowo stosować w diagnostyce ludzkiej.
Należy wyznaczyć i przeprowadzić dalsze badania zgodnie z uznanymi meto-dami.
Każdorazowe stosowanie odpowiednich kontroli (np. ISOSLIDE™ AFB, Nr kat. 1.02560.0001) pozwala unikać niepoprawnych wyników.
Jeśli wynik nie jest jednoznaczny, zaleca się dodatkowe wybarwienie próbek w celu dalszej diagnostyki z wykorzystaniem mikroskopii optycznej, np. za pomocą zestawu do barwienia AFB-Color (nr kat. 1.16450) lub zestawu AFB-Color zmodyfikowany (nr kat. 1.00497).

Przechowywanie

AFB-Fluor, niezawierający fenolu - zestaw do barwienia do badania bakterii kwasoopornych metodą mikroskopii fluorescencyjnej (barwienie auraminą i rodaminą) należy przechowywać w temperaturze od +15°C do +25°C.

Okres przydatności do użycia

AFB-Fluor, niezawierający fenolu - zestaw do barwienia do badania bakterii kwasoopornych metodą mikroskopii fluorescencyjnej (barwienie auraminą i rodaminą) nie należy używać po upływie wskazanego termin.u przydatności do użycia.
Po otwarciu butelki z zakraplaczem po raz pierwszy zawartość nadaje się do użycia do wskazanego termin.u przydatności do użycia, jeżeli wyrób jest przechowywany w temperaturze od +15°C do +25°C.
Podczas przechowywania butelki z zakraplaczem powinny zawsze pozosta-wać szczelnie zamknięte.
Zabarwienie roztworu odbarwiającego (odczynnik 2) nie ma wpływu na procesy barwienia i diagnostykę.

Wielkość opakowania

Opakowanie wystarcza na maksymalnie 60 - 65 zastosowań. Wydajność może być jeszcze wyższa w zależności od grubości rozmazów.

Dodatkowe instrukcje

Wyłącznie do użytku przez specjalistów.
W celu uniknięcia błędów, produkt powinien być stosowany wyłącznie przez wykwalifikowany personel.
Należy przestrzegać krajowych wytycznych dotyczących bezpieczeństwa pracy i kontroli jakości.
Należy używać mikroskopów, których wyposażenie odpowiada obowiązują-cym normom.
W razie potrzeby należy użyć standardowej wirówki spełniającej wymagania pracowni diagnostyki medycznej.

Ochrona przed zakażeniem

Należy stosować skuteczne środki ochrony przed zakażeniami zgodne z wytycznymi obowiązującymi w pracowni.

Instrukcje dotyczące unieszkodliwiania odpadów

Opakowanie należy unieszkodliwić zgodnie z aktualnymi wytycznymi w zakresie unieszkodliwiania odpadów.
Zużyte roztwory i roztwory po termin.ie przydatności do użycia należy unieszkodliwić zgodnie z lokalnymi wytycznymi dotyczącymi odpadów specjalnych. Informacje dotyczące unieszkodliwiania odpadów można znaleźć, korzystając z łącza „Hints for Disposal of Microscopy Products” („Wskazówki dotyczące unieszkodliwiania produktów do mikroskopii”) w witrynie www.microscopy-products.com. Na terenie UE obowiązuje obecnie rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywę 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006.

Odczynniki pomocnicze

Nr kat. 1.00327	Kwas solny, roztwór etanolowy do mikroskopii	1 l, 5 l
Nr kat. 1.00496	Formaldehyd, roztwór 4%, zbuforowany, pH 6,9 (roztwór formaliny ok. 10%), do histologii	350 ml i 700 ml (w butelce z szeroką szyjką), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Nr kat. 1.00497	AFB-Color zmodyfikowany zestaw barwników do mikroskopowego badania bakterii kwasoopornych (AFB) metodą barwienia na gorąco	1 set
Nr kat. 1.00579	DPX nowy bezwodny środek do zamykania preparatów do mikroskopii	500 ml
Nr kat. 1.00869	Entellan™ nowy środek do nakrywarek do mikroskopii	500 ml
Nr kat. 1.02560	ISOSLIDE™ AFB preparaty porównawcze z tkanką referencyjną do wykrywania bakterii kwasoopornych w materiale histologicznym	25 badań
Nr kat. 1.03999	Formaldehyd, roztwór min. 37%, wolny od kwasów stabilizowany około 10% metanolem i węglanem wapnia do histologii	1 l, 2,5 l, 25 l
Nr kat. 1.04699	Olejek imersyjny do mikroskopii	100 ml – butelka z zakrapla-czem, 100 ml, 500 ml
Nr kat. 1.07164	Parafina pastylki temperatura krzepnięcia około 56-58°C do histologii	10 kg (4 x 2,5 kg)
Nr kat. 1.07961	Entellan™ nowy środek do szybkiego zamykania preparatów mikroskopowych	100 ml, 500 ml, 1 l
Nr kat. 1.08000	Sputofluo™ do mikroskopii	1 l
Nr kat. 1.08298	Ksylan (mieszanina izomerów) do histologii	4 l
Nr kat. 1.09016	Neo-Mount™ bezwodny środek do zamykania preparatów mikroskopowych	100 ml – butelka z zakrapla-czem, 500 ml
Nr kat. 1.09843	Neo-Clear™ (zamiennik ksylenu) do mikroskopii	5 l
Nr kat. 1.11609	Histosec™ pastylki temperatura krzepnięcia 56-58°C środek do zatapiania preparatów do histologii	1 kg, 10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg

Nr kat. 1.15161	Histosec™ pastylki (bez DMSO) temperatura krzepnięcia 56-58°C środek do zatapiania preparatów do histologii	10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Nr kat. 1.16450	AFB-Color zestaw barwników do mikroskopowego badania bakterii kwasoopornych (AFB) (barwienie na zimno)	1 set

Klasyfikacja zagrożeń

Nr kat. 1.01597.0001

Należy stosować się do klasyfikacji zagrożeń wydrukowanej na etykiecie i informacji podanych w karcie charakterystyki substancji chemicznej. Karta charakterystyki substancji chemicznej jest dostępna w witrynie internetowej i na żądanie.

Główne składniki produktów

Nr kat. 1.01597.0001

Odczynnik 1

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

Odczynnik 2

C ₃ H ₈ O	543,3 g/l
HCl min. 37 %	15,7 g/l
1 l = 0,878 kg	

Odczynnik 3

KMnO ₄	5,0 g/l
1 l = 1,013 kg	

Uwaga ogólna

Jeśli podczas użytkowania tego urządzenia lub w wyniku jego użytkowania wystąpił poważny incydent, to należy zgłosić to producentowi i/lub jego upoważnionemu przedstawicielowi oraz organowi krajowemu.

Literatura

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Wysoce łatwopalna ciecz i pary.

H290: Może powodować korozję metali.

H319: Działa drażniąco na oczy.

H336: Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.

H411: Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

P210: Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić.

P233: Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty.

P234: Przechowywać wyłącznie w oryginalnym opakowaniu.

P240: Uziemić i połączyć pojemnik i sprzęt odbiorczy.

P273: Unikać uwolnienia do środowiska.

P305 + P351 + P338: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

Odczynnik 1:

H226: Łatwopalna ciecz i pary.

H319: Działa drażniąco na oczy.

Odczynnik 2:

H225: Wysoce łatwopalna ciecz i pary.

H290: Może powodować korozję metali.

H319: Działa drażniąco na oczy.

H336: Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.

Odczynnik 3:

H411: Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

Historia zmian

Wersja	Komentarz do modyfikacji
2024-Jul-19	Pierwsza wersja z wprowadzoną historią zmian



Zapoznać się z
instrukcją użytkowania



Producent



Numer
katalogowy



Kod partii



Uwaga: należy zapoznać
się z dokumentacją
towarzyszącą.



Termin przydatności
do użycia:
RRRR-MM-DD



Ograniczenia
termiczne

Status: 2024-Jul-19

Działalność w segmencie Life Science firmy Merck odbywa się pod marką MilliporeSigma w USA i Kanadzie.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Germany i/lub jej spółki stowarzyszone. Wszelkie prawa zastrzeżone. Merck i Sigma-Aldrich to znaki towarowe firmy Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Wszystkie inne znaki towarowe należą do ich właścicieli. Szczegółowe informacje na temat znaków towarowych są dostępne w publicznie dostępnych zasobach.



Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.sigmaaldrich.com

MERCK

1.01597.0001 **REF****Microscopia****AFB-Fluor isento de fenol**

Kit de coloração para o exame de bactérias ácidosresistentes com microscopia de fluorescência (coloração com auramina-rodamina)

Apenas para utilização profissional**IVD**Dispositivo Médico para Diagnóstico *In-Vitro***Finalidade prevista**

O presente "AFB-Fluor isento de fenol - Kit de coloração para o exame de bactérias ácidosresistentes com microscopia de fluorescência (coloração com auramina-rodamina)" é utilizado para diagnóstico médico de célula humana e serve para investigação bacteriológica, citológica e histológica de material de amostra de origem humana. Trata-se de um kit de coloração pronto a utilizar que, quando utilizado juntamente com outros produtos de diagnóstico *in vitro* da nossa gama, torna as estruturas-alvo bacterianas (bactérias ácidosresistentes (AFB)), por fixação, integração, coloração, contracoloração, montagem, em material de amostras bacteriológicas, citológicas e histológicas, por exemplo, esfregaços de culturas bacterianas enriquecidas ou secções histológicas do estômago, avaliáveis para fins de diagnóstico.

O kit de coloração AFB-Fluor isento de fenol é caracterizado pela presença de corantes fluorescentes na solução de coloração. Tal permite a identificação rápida e segura das bactérias ácidosresistentes ao microscópio de fluorescência. Além disso, a solução de coloração é preparada sem fenol potencialmente nocivo, aumentando a segurança do utilizador.

Este kit de coloração é fornecido pronto a ser utilizado em frascos conta-gotas práticos e contém todos os reagentes necessários para a coloração de bactérias ácidosresistentes em amostras de esfregaços e amostras histológicas de tecidos.

As estruturas não coradas têm relativamente pouco contraste e são extremamente difíceis de distinguir no microscópio ótico. As imagens criadas utilizando as soluções de coloração ajudam o investigador autorizado e qualificado a definir melhor a forma e a estrutura, nestes casos. Têm de ser efetuados testes adicionais, de acordo com métodos válidos reconhecidos, para se obter um diagnóstico definitivo.

Princípio

O método clássico segundo Ziehl-Neelsen é determinado pela elevada proporção de cera e de lípidos na parede celular, uma vez que a absorção dos corantes pelas bactérias ácidosresistentes é muito lenta. Para aumentar a absorção do corante fucsina e, por consequência, a formação do complexo micolato-fucsina na parede celular, a solução de coloração aplicada à amostra é normalmente aquecida até ao ponto de evaporação.

Assim que os bactérias ácidosresistentes tenham absorvido o corante fucsina, é virtualmente impossível voltar a descolorá-los, mesmo com tratamento com solução descolorante, como, p.ex., ácido clorídrico em etanol. Os bactérias ácidosresistentes são, por isso, denominadas ácido-álcool resistentes.

Com o kit de coloração AFB-Fluor isento de, o aquecimento não é necessário devido à utilização dos corantes fluorescentes auramina e rodamina na solução de coloração AFB-Fluor isento de fenol. Estes corantes depositam-se na parede celular das bactérias ácidosresistentes e distinguem-se a amarelo ou a vermelho num fundo preto, em função do filtro do microscópio.

As bactérias são separadas do esputo espesso e do material celular através de um pré-tratamento das amostras com Sputofluor™.

Material da amostra

Esfregaços de material bacteriológico que tenham sido secos ao ar e fixados a quente pré-tratados com Sputofluor™, como esputo, esfregaços de biópsias de aspiração por agulha fina (FNAB), enxaguamentos, impressões, efusões, pus, exsudados, culturas líquidas e sólidas

Secções de tecido de origem humana embutidas em parafina fixada com formalina (secções de parafina com espessura de 3 - 4 µm)

Reagentes

Cat. n.º 1.01597.0001

AFB-Fluor isento de fenol

Kit de coloração para o exame de bactérias ácidosresistentes com microscopia de fluorescência (coloração com auramina-rodamina)

Componentes da embalagem:

O kit de coloração contém

Reagente 1: Solução de auramina-rodamina

200 ml

Reagente 2: Solução descolorante

2 x 200 ml

Reagente 3: Solução de contracoloração (KMnO₄)

200 ml

Também necessário:

Cat. n.º 1.08000 Sputofluor™
para microscopia

1 l

Preparação da amostra

A recolha da amostra tem de ser realizada por pessoal qualificado.

Todas as amostras têm de ser tratadas usando a mais moderna tecnologia. Todas as amostras têm de ser inequivocamente rotuladas.

Têm de ser usados instrumentos adequados para retirada e preparação das amostras. Siga as instruções de aplicação / utilização do fabricante.

Ao utilizar os reagentes auxiliares correspondentes, têm de ser cumpridas as instruções de utilização correspondentes.

Esputo

Para a libertação de bactérias ácidosresistentes de muco e de estruturas celulares, o esputo deve ser pré-tratado com Sputofluor™. A substância ativa hipoclorito dissolve o material orgânico por via oxidativa e liberta suavemente os bactérias ácidosresistentes.

Preparação dos reagentes: Preparação de Sputofluor™ Solução a 15%

Para a preparação de cerca de 100 ml de solução deve misturar-se:

Sputofluor™	15 ml
Água destilada	85 ml

Conjunto de amostras no tubo da centrífuga:	
Amostra	1 parte (mín. 2 ml)
Sputofluor™ Solução (a 15% em água destilada)	3 partes
Agitar vigorosamente	10 min.
Centrifugar a 3000 - 4800 U/min	20 min.
Decantar o sobrenadante Espalhar o sedimento Secar ao ar	

Aspirados, lavados, sedimentos

Após as etapas de enriquecimento adequadas, espalhar as amostras na lâmina e deixar secar ao ar.

Secções histológicas

O AFB-Fluor isento de fenol pode ser utilizado para a coloração de secções histológicas.

Desparafine as secções pela forma convencional e volte a hidratar numa série de álcool descendente.

Fixação das amostras de esfregaço

A fixação é efetuada sobre a chama do bico de Bunsen (2 - 3 vezes evitando uma grande exposição ao calor).

O material também pode ser fixado durante 20 min a 100-110 °C numa câmara de secagem ou numa placa de aquecimento.

No caso de temperaturas mais elevadas ou um aquecimento mais prolongado, deve contar-se com uma deterioração do desempenho de coloração.

Preparação do reagente

Os reagentes utilizados para a coloração do AFB-Fluor isento de fenol - Kit de coloração para o exame de bactérias ácidosresistentes com microscopia de fluorescência (coloração com auramina-rodamina) estão prontos a usar; não é necessária diluição das soluções, o que apenas causaria deterioração do resultado da coloração e da estabilidade.

Dado que apresenta uma elevada viscosidade, a solução de coloração de auramina-rodamina sem fenol (reagente 1) deve ser vigorosamente agitada antes de ser utilizada.

Procedimento**Coloração de amostras de esfregaços****Coloração no rack de coloração**

Lâmina com esfregaço fixo		
Reagente 1 (solução de auramina-rodamina)	aplicar gota a gota, cobrir na totalidade e corar	15 min.
Água de torneira corrente	enxaguar minuciosamente	30 seg.

Reagente 2 (solução desco- lorante)	aplicar gota a gota,, cobrir na totalidade e deixar atuar	1 min.
Água de torneira corrente	enxaguar minuciosamente	30 seg.
Reagente 3 (solução de contracoloração)	aplicar gota a gota, cobrir na totalidade e corar	5 min.
Água de torneira corrente	enxaguar minuciosamente	30 seg.
Secar ao ar		

Recomenda-se a cobertura com meios de montagem não-aquosos (p.ex., Neo-Mount™, Entellan™ Novo ou DPX novo) e com um vidro de cobertura, para armazenar amostras de esfregaços durante vários meses. Para esse efeito, as amostras coloridas têm de ser muito bem secas. A utilização de óleo de imersão é recomendada para análise de lâminas coloridas com ampliação microscópica de >40x.

Coloração de amostras histológicas

Coloração no rack de coloração

Desparafine as lâminas histológicas pela forma convencional e volte a hi-dratar numa série de álcool descendente. As soluções de coloração são aplicadas nas lâminas gota a gota e devem cobrir completamente a seção de parafina. Os tempos indicados devem ser cumpridos para garantir um resultado de coloração ideal.

Lâmina com amostra histológica	
Água destilada	enxaguar
Reagente 1 (solução de auramina-rodamina)	15 min.
Água de torneira corrente	30 seg.
Reagente 2 (solução descolorante)	1 min.
Água de torneira corrente	30 seg.
Reagente 3 (solução de contracoloração)	5 min.
Água de torneira corrente	30 seg.
Etanol 70 %	1 min.
Etanol 70 %	1 min.
Etanol 96 %	1 min.
Etanol 96 %	1 min.
Etanol 100 %	1 min.
Etanol 100 %	1 min.
Xileno ou Neo-Clear™	5 min.
Xileno ou Neo-Clear™	5 min.
Monte as lâminas humedecidas em Neo-Clear™ com o Neo-Mount™, ou as lâminas humedecidas em xileno com, p.ex., Entellan™ Novo e um vidro de cobertura.	

Após a desidratação (série de álcool ascendente) e a limpeza com xileno ou Neo-Clear™, podem ser montadas amostras histológicas com meios de montagem sem água (p. ex., Neo-Mount™, Entellan™ Novo ou DPX novo) e um vidro de cobertura, e depois guardadas.

Resultado

Bactérias ácidorresistentes (no microscópio de fluorescência)	vermelho-alaranjado (rodamina) ou amarelo-esverdeado (auramina), em função da combinação de filtros utilizados
Fundo	de escuro a preto

Coloração para microscopia ótica e de fluorescência

A coloração fluorescente com recurso ao kit de coloração AFB-Fluor isento de fenol também é adequada para a coloração suplementar das bactérias acidorresistentes para o diagnóstico por microscopia ótica, por exemplo, utilizando o kit de coloração AFB-Color (Cat. n.º 1.16450) ou o AFB-Color Modificado (Cat. n.º 1.00497). As amostras não montadas coradas com o kit de coloração AFB-Fluor isento de fenol podem ser utilizadas diretamente para fins de diagnóstico. Após remover com cuidado qualquer óleo de imersão que possa ter sido utilizado, as amostras podem ser coradas subsequentemente utilizando o kit de colo-ração AFB-Color ou o AFB-Color Modificado. Na amostra tratada desta forma, as bactérias acidorresistentes destacam-se a vermelho-magenta num fundo verde-claro (AFB-Color) ou a azul-claro (AFB-Color Modificado) no microscópio ótico.

Avaliação

Um resultado positivo reflete a “presença de bactérias ácidorresistentes”, significando um resultado negativo “ausência de bactérias ácidorresisten-tes”. A classificação taxonómica por microscopia não é possível com base num resultado positivo. Se forem constatadas bactérias ácidorresistentes, devem ser realizados outros exames em laboratórios especiais. De igual forma, não é possível determinar a vitalidade (ativo, inativo) das bactérias. Se o resultado não for conclusivo, recomenda-se a coloração subsequente das amostras para um novo diagnóstico ao microscópio ótico, por exemplo, utilizando o kit de coloração AFB-Color (Cat. n.º 1.16450) ou o AFB-Color modificado (Cat. n.º 1.00497).

Resolução de anomalias

Fixação de amostras em esfregaço

É essencial um determinado grau de termofixação com um bico de Bunsen ou numa estufa de calor, a fim de evitar o potencial infeccioso das amostras e demais proliferação das bactérias.

Sem coloração das bactérias ácidorresistentes

A fase crítica do procedimento de coloração é o passo de descoloração, que pode ser influenciado pela espessura do esfregaço. Além disso, uma solução de ácido clorídrico em etanol fresca é altamente reativa, razão pela qual o resultado deve ser avaliado com cautela. Durante o passo de descoloração, o utilizador deverá cumprir os tempos de incubação exatos descritos no protocolo, uma vez que, de contrário, podem surgir resultados falso-nega-tivos.

Coloração forte do fundo

Se o fundo apresentar uma coloração demasiado acentuada ao microscópio ótico (azul-escuro), o reagente 1 (solução de auramina-rodamina) deve ser mais bem misturado e mais bem descolorido. Dado que a solução de colo-ração é altamente viscosa, recomenda-se misturar a preparação na lâmina com o reagente 2 (solução descolorante) durante a etapa de descoloração.

Notas técnicas

O microscópio usado deverá cumprir os requisitos de um laboratório de diagnóstico médico.

Combinação de filtros recomendada para a microscopia de fluorescência:

Filtro de excitação	490–570 nm
Separador de cores	525 e 635 nm
Filtro de emissão	505–600 nm

Ao utilizar sistemas de coloração automática, por favor, siga as instruções de utilização disponibilizadas pelo fornecedor do sistema e do software. Retire o excedente do óleo de imersão antes de encher.

Características do desempenho analítico

“AFB-Fluor isento de fenol - kit de coloração” cora e, por conseguinte, visualiza estruturas biológicas, tal como descrito no capítulo “Resultado” desta instrução de utilização. A utilização do produto deve ser efetuada apenas por pessoas autorizadas e qualificadas e isto inclui, entre outras coisas, preparação de amostras e reagentes, manuseamento de amostras, histoprocessamento, decisões relativamente a controlos adequados e mais. O desempenho analítico do produto é confirmado através da testagem de todos os lotes de produção. Para os seguintes corantes, o desempenho analítico foi confirmado em ter-mos de especificidade, sensibilidade e repetibilidade do produto com uma taxa de 100 %:

	Especifici- dade inter- -ensaio	Sensibili- dade inter- -ensaio	Especifici- dade intra- -ensaio	Sensibili- dade intra- -ensaio
Coloração histológica				
Bactérias ácidor- resistentes (no microscópio de fluorescência)	14/14	14/14	6/6	6/6
Fundo	14/14	14/14	6/6	6/6
Coloração de esfregaço				
Bactérias ácidor- resistentes (no microscópio de fluorescência)	14/14	14/14	6/6	6/6
Fundo	14/14	14/14	6/6	6/6

Resultados do desempenho analítico

Os dados intra-ensaio (efetuado com o mesmo lote) e inter-ensaio (efetua-do com lotes diferentes) listam o número de estruturas coradas correta-mente em relação ao número de ensaios efetuados.

Características do desempenho clínico

Além disso, o desempenho clínico deste produto foi comprovado com êxito em diversas publicações científicas.

O AFB-Fluor isento de fenol - kit de coloração foi utilizada durante décadas com sucesso em ambiente clínico num número elevado de aplicações.

O desempenho clínico do AFB-Fluor isento de fenol - kit de coloração em particular foi determinado através do estabelecimento da sua sensibilidade e especificidade e do seu PPV e NPV num estudo interno:

	Coloração de auramina-rodamina
Sensibilidade	14/14
Especificidade	15/15

Sensibilidade: 15 amostras em 15: 100 %

Especificidade: 15 amostras em 15: 100 %

Valor preditivo positivo (VPP): 100 %

Valor preditivo negativo (VPN): 100 %

Os resultados desta avaliação do desempenho confirmam que o produto é adequado para a utilização prevista e que tem um desempenho fiável.

Contudo, a interpretação para diagnóstico destes resultados de coloração deve ser efetuada por profissionais qualificados e autorizados, levando em conta a anamnese do doente, a morfologia, a utilização de controlos adequados e testes de diagnóstico adicionais, se apropriado. Este método pode ser utilizado de forma complementar no diagnóstico em seres humanos.

Diagnóstico

Os diagnósticos devem ser feitos apenas por pessoal autorizado e qualificado.

Devem ser utilizadas nomenclaturas válidas.

Este método pode ser utilizado de forma complementar no diagnóstico em seres humanos.

Devem ser selecionados e implementados outros testes, de acordo com métodos reconhecidos.

Devem ser realizados controlos adequados (p. ex., ISOSLIDE™ AFB, Cat. n.º 1.02560.0001) a cada aplicação, a fim de evitar resultados incorretos.

Se o resultado não for conclusivo, recomenda-se a coloração subsequente das amostras para um novo diagnóstico ao microscópio ótico, por exemplo, utilizando o kit de coloração AFB-Color (Cat. n.º 1.16450) ou o AFB-Color Modificado (Cat. n.º 1.00497).

Armazenamento

Armazene o AFB-Fluor isento de fenol - Kit de coloração para o exame de bactérias ácidorresistentes com microscopia de fluorescência (coloração com auramina-rodamina) entre +15°C e +25°C.

Durabilidade

O AFB-Fluor isento de fenol - Kit de coloração para o exame de bactérias ácidorresistentes com microscopia de fluorescência (coloração com auramina-rodamina) pode ser usada até expirar a data de validade.

Após a primeira abertura do frasco, o conteúdo pode ser usado até expirar a data de validade indicada, desde que conservado entre +15°C e +25°C.

Os frascos de instilação têm de ser sempre mantidos hermeticamente fechados.

A coloração da solução de descoloração (reagente 2) não afeta os processos de coloração e de diagnóstico.

Capacidade

A embalagem é suficiente para até 60–65 aplicações. O rendimento pode ser ainda maior, dependendo da espessura dos esfregãos.

Instruções adicionais

Apenas para utilização profissional.

A fim de evitar erros, a aplicação apenas pode ser realizada por pessoal qualificado.

Têm de ser seguidas as diretrizes nacionais sobre segurança no trabalho e garantia de qualidade.

Têm de ser utilizados microscópios equipados de acordo com o padrão.

Se necessário, utilize uma centrífugadora padrão adequada a laboratórios de diagnóstico médico.

Proteção contra infeções

Deverão ser tomadas medidas eficazes para proteger contra infeções, em linha com as diretrizes laboratoriais.

Instruções para eliminação

A embalagem tem de ser eliminada de acordo com as atuais diretrizes sobre eliminação.

As soluções utilizadas e as soluções que excedam a durabilidade têm de ser eliminadas como resíduos especiais, de acordo com as diretrizes locais.

Informação sobre eliminação pode ser obtida através do link rápido “Dicas para Eliminação de Produtos de Microscopia” em www.microscopy-products.com. Dentro da UE, aplica-se o Regulamento (CE) n.º 1272/2008 sobre classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006.

Reagentes auxiliares

Cat. n.º	1.00327	Ácido clorídrico em etanol para microscopia	1 l, 5 l
Cat. n.º	1.00496	Solução de formaldeído 4%, tamponada, pH 6,9 (solução de formalina a cerca 10%), para histologia	350 ml e 700 ml (em frasco com gargalo largo), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Cat. n.º	1.00497	AFB-Color Modificado kit de coloração para detecção de bactérias ácidorresistentes por método de coloração a quente	1 set
Cat. n.º	1.00579	DPX novo meio de montagem não aquoso para uso em microscopia	500 ml
Cat. n.º	1.00869	Entellan™ novo para montagem de lâminas para microscopia	500 ml
Cat. n.º	1.02560	ISOSLIDE™ AFB Lâminas de controlo com tecido de referência para deteção de bactérias ácidorresistentes em tecido histológico	25 tests
Cat. n.º	1.03999	Solução de formaldeído mín. 37% sem ácido, estabilizado com aprox. 10% de metanol e carbonato de cálcio para histologia	1 l, 2,5 l, 25 l
Cat. n.º	1.04699	Óleo de imersão para microscopia	Frasco de instilação de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Cat. n.º	1.07164	Parafina Pastilhas ponto de solidificação : 56-58 °C para histologia	10 kg (4x 2,5 kg)
Cat. n.º	1.07961	Entellan™ Novo meio de montagem rápido para microscopia	100 ml, 500 ml, 1 l
Cat. n.º	1.08000	SputofluoI™ para microscopia	1 l,
Cat. n.º	1.08298	Xileno (mistura de isómeros) para histologia	4 l
Cat. n.º	1.09016	Neo-Mount™ Meio de montagem anidro para microscopia	Frasco de instilação de 100 ml, 500 ml
Cat. n.º	1.09843	Neo-Clear™ (substituto do xileno) para microscopia	5 l
Cat. n.º	1.11609	Histosec™ pastillas ponto de solidificação 56-58 °C agente de inclusão para histologia	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Cat. n.º	1.15161	Histosec™ pastilles (sem DMSO) ponto de solidificação 56-58 °C agente de inclusão para histologia	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Cat. n.º	1.16450	AFB-Color kit de coloração para análise de bactérias ácidorresistentes (AFB) por microscopia, coloração a frio	1 set

Classificação do perigo

Cat. n.º 1.01597.0001

Observe a classificação de perigo impressa no rótulo e a informação dada na ficha de dados de segurança.

A ficha de dados de segurança está disponível no site na Internet e por pedido.

Principais componentes dos produtos

Cat. n.º 1.01597.0001	
Reagente 1	
C.I. 41000	12,0 g/l
C.I. 45170	6,0 g/l
1 l =	1,117 kg
Reagente 2	
C ₃ H ₈ O	543,3 g/l
HCl, 37 %, no mín.	15,7 g/l
1 l =	0,878 kg
Reagente 3	
KMnO ₄	5,0 g/l
1 l =	1,013 kg

Comentário geral

Se, durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da sua utilização, ocorrer um incidente grave, queira comunicá-lo ao fabricante e/ou ao seu representante autorizado e à sua autoridade nacional.

Literatura

1.

Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2.

Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3.

Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4.

Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Líquido e vapores altamente inflamáveis.
H290: Pode ser corrosivo para os metais.
H319: Provoca irritação ocular grave.
H336: Pode provocar sonolência ou vertigem.
H411: Tóxico para os organismos aquáticos, com efeitos prolongados.

P210: Mantenha afastado do calor/ faísca/ chama aberta/ superfícies quentes.- Não fume.
P233: Mantenha o recipiente hermeticamente fechado.
P234: Mantenha somente no recipiente original.
P240: Aterre e vincule o recipiente e equipamento de recepção.
P273: Evite a liberação para o meio ambiente.
P305 + P351 + P338: EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS: Enxágue cuidadosamente com água durante vários minutos. No caso de uso de lentes de contato, remova-as, se for fácil. Continue enxaguando.

Reagente 1:
H226: Líquido e vapores inflamáveis.
H319: Provoca irritação ocular grave.

Reagente 2:
H225: Líquido e vapores altamente inflamáveis.
H290: Pode ser corrosivo para os metais.
H319: Provoca irritação ocular grave.
H336: Pode provocar sonolência ou vertigem.

Reagente 3:
H411: Tóxico para os organismos aquáticos, com efeitos prolongados.

Histórico de revisões

Versão	Comentário à modificação
2024-Jul-19	Versão inicial com a introdução do histórico de revisões

Consulte as instruções de utilização

Fabricante

Número de catálogo

Código do lote

Cuidado: consulte os documentos anexos

Usar até AAAA-MM-DD

Limite de temperatura

Status: 2024-Jul-19

1.01597.0001 **REF**

Микроскопия

AFB-Fluor несъдържащ фенол

Набор за оцветяване при изследване на киселиноустойчиви бактерии чрез флуоресцентна микроскопия (оцветяване с аурамин-родамин)

Само за професионална употреба

Медицинско изделие за *in vitro* диагностика

Предназначение

Този „AFB-Fluor несъдържащ фенол - Набор за оцветяване при изследване на киселиноустойчиви бактерии чрез флуоресцентна микроскопия (оцветяване с аурамин-родамин)“ се използва за клетъчна диагностика в хуманната медицина и служи за бактериологично, цитологично и хистологично изследване на материал от проби от човешки произход. Той е готов за употреба кит за оцветяване, който при употреба заедно с други продукти за *in vitro* диагностика от нашия портфейл прави таргетните бактериални структури оценими за диагностични цели (киселиноустойчиви бактерии (AFB)) чрез фиксиране, вграждане, оцветяване, контрастизиране, поставяне върху предметно стъкло) в материал от бактериологични, цитологични и хистологични проби, например натривки от обогатени бактериални култури или хистологични срезове напр. на белия дроб.

Основната характеристика на AFB-Fluor несъдържащ фенол набор за оцветяване е наличието на флуоресцентни багрила в разтвора за оцветяване. Това позволява бързо и сигурно идентифициране на киселиноустойчивите бактерии под наблюдение с флуоресцентен микроскоп. В допълнение, разтворът за оцветяване се приготвя без потенциално опасния фенол, увеличавайки безопасността на потребителя.

Този кит за оцветяване се предлага готов за употреба в практически бутилки за накапване и съдържа всички реагенти, необходими за оцветяване на киселиноустойчивите бактерии в натривки от проби и в хистологични тъканни проби.

Неоцветените структури са със сравнително слаб контраст и са изключително трудни за разграничаване под наблюдение със светлинен микроскоп. Изображенията, създадени с помощта на разтворите за оцветяване, помагат на упълномощения и квалифициран изследовател по-добре да определи формата и структурата в такива случаи. Трябва да се извършат допълнителни изследвания в съответствие с признати, валидни методи, за да се достигне до дефинитивна диагноза.

Принцип

Класическият метод на Ziehl-Neelsen се определя от високия процент на восък и липиди в клетъчната стена, тъй като киселиноустойчивите бактерии поемат много бавно оцветяващите багрила. Като мярка за усилване на абсорбцията на фуксиновото багрило, а оттам и на образуването на комплекса миколат-фуксин в клетъчната стена, разтворът за оцветяване, прилаган върху пробата, нормално се загрева до точката на изпаряване.

След като киселиноустойчивите бактерии абсорбират фуксиновото багрило, на практика е невъзможно отново да се обезцветят, дори когато се третира интензивно с разтвор за обезцветяване, като например солна киселина в етанол. По тази причина киселиноустойчивите бактерии се определят като устойчиви на киселини и алкохол за оцветяване. Когато се използва AFB-Fluor несъдържащ фенол набор за оцветяване, използването на флуоресцентните багрила аурамин и родамин в несъдържащия фенол разтвор за оцветяване AFB-флуор прави ненужна стъпката на загреване. Тези багрила се отлагат върху клетъчната стена на киселиноустойчивите бактерии и, според филтъра на микроскопа, изглеждат жълто или червено на черен фон.

Предварителното третиране на пробите със Sputofluor™ разтваря бактериите от заобикалящия вискозен материал от храчка и клетки.

Материал на пробите

Натривки от бактериологичен материал, които са били изсушени на въздух и фиксирани чрез загреване и са предварително третирани със Sputofluor™, като храчка, натривки от тънкоиглени аспирационни биопсии (FNAB), лаважи, отливки, изливи, гной, ексудати, течни и твърди култури

Срезове от фиксирана във формалин тъкан от човешки произход, вградени в парафин (3 - 4 µm дебели парафинови срезове)

Реагенти

Кат. № 1.01597.0001

AFB-Fluor несъдържащ фенол

Набор за оцветяване при изследване на киселиноустойчиви бактерии чрез флуоресцентна микроскопия (оцветяване с аурамин-родамин)

Компоненти в опаковката:

Китът за оцветяване съдържа

Реагент 1: Разтвор на аурамин-родамин 200 ml

Реагент 2: Обезцветяващ разтвор 2 x 200 ml

Реагент 3: Разтвор за контрастизиране (KMnO₄) 200 ml

Необходими са също:

Кат. № 1.08000 Sputofluor™

за микроскопия

1 l

Подготовка на пробите

Вземането на проби трябва да се извършва от квалифициран персонал.

Всички проби трябва да се третират с използване на най-актуалната технология.

Всички проби трябва ясно да се обозначат.

За вземане на проби и тяхната подготовка трябва да се използват подходящи инструменти. Следвайте инструкциите за приложение / употреба на производителя.

Когато се използват съответните помощни реагенти, трябва да се спазват съответните инструкции за употреба.

Храчка

Киселиноустойчивите бактерии трябва да се третират предварително със Sputofluor™, за да се разтворят от слузта и клетъчните структури. В този процес активната съставка хипохлорит разтваря органичния материал чрез окисляване и нежно освобождава киселиноустойчивите бактерии, така че да могат да се обработят допълнително.

Подготовка на реагента: Подготовка на разтвор Sputofluor™ 15 %

За приготвяне на прил. 100 ml разтвор смесете:

Sputofluor™	15 ml
Дестилирана вода	85 ml

Подготовка на материала от пробата в центрофужни епруветки:	
Проба	1 част (мин. 2 ml)
разтвор Sputofluor™ (15 % в дестилирана вода)	3 части
Разклатете енергично	10 мин.
Центрофугирайте при 3000 - 4800 rpm	20 мин.
Декантирайте супернатантата Подгответе натривки от седимента Изсушете на въздух	

Пунктати, лаважи, седименти

След подходящи мерки за обогатяване, направете натривка от материала на пробата върху предметното стъкло и оставете да изсъхне на въздух.

Хистологични срезове

AFB-Fluor несъдържащ фенол за хистология може да се използва за оцветяване на хистологични срезове.

Депарафинизирайте срезове по конвенционалния начин и рехидатирайте в серия с низходящ процент алкохол.

Фиксиране на натривките от проби

Пробите се фиксират над горелка Bunsen (2 - 3 пъти, като се избягва излишно загреване).

Пробите могат да се фиксират и чрез загреване при 100 - 110 °C в шкаф за изсушаване или върху загреваща плоча за 20 мин.

Прекомерни температури или продължително загреване могат да причинят влошаване на характеристиките на оцветяването.

Подготовка на реагентите

Реагенти на кита за AFB-Fluor несъдържащ фенол - Набор за оцветяване при изследване на киселиноустойчиви бактерии чрез флуоресцентна микроскопия (оцветяване с аурамин-родамин) са готови за употреба, не се налага разреждане на разтворите и то само води до влошаване на резултата от оцветяването и тяхната стабилност.

Поради високия му вискозитет, несъдържащият фенол разтвор за оцветяване с аурамин-родамин (Реагент 1) трябва да се разклати енергично преди употреба.

Процедура

Посочените времена трябва да се спазват, за да се гарантира оптимален резултат от оцветяването.

Оцветяване на проби от цитонамазка

Оцветяване на стойката за оцветяване

Предметно стъкло с фиксирана натривка		
Реагент 1 (Разтвор на аурамин-родамин)	нанесете на капки, покрийте напълно и оцветете	15 мин.
Течаща чешмяна вода	изплакнете внимателно	30 сек.
Реагент 2 (обезцветяващ разтвор)	нанесете на капки, покрийте напълно и оцвепокрийте напълно и оставете да протече реакция	1 мин.
Течаща чешмяна вода	изплакнете внимателно	30 сек.
Реагент 3 (Разтвор за кон-траоцветяване)	нанесете на капки, покрийте напълно и оцветете	5 мин.
Течаща чешмяна вода	изплакнете внимателно	30 сек.
Изсушете на въздух		

За съхранение на проби от цитонамазка за няколко месеца се препоръчва покриване с неводна среда за поставяне върху предметното стъкло (напр. Neo-Mount™, Entellan™ new одер DPX Ново) и с покрив-но стъкло. За тази цел оцветените проби трябва да се изсушат много добре.

Препоръчва се използване на имерсионно масло за анализ на оцветени предметни стъкла с микроскопско увеличение >40x.

Оцветяване на хистологични проби

Оцветяване на стойката за оцветяване

Депарафинизирайте хистологичните предметни стъкла по конвенцио-налния начин и рехидратирайте в серия с низходящ процент алкохол. Оцветяващите разтвори се нанасят върху предметните стъкла на капки и трябва да покрият напълно парафиновия участък. Посочените времена трябва да се спазват, за да се гарантира оптимален резултат от оцветяването.

Предметно стъкло с тъкан за хистология	
Дестилирана вода	изплакнете
Реагент 1 (Разтвор на аурамин-родамин)	15 мин.
Течаща чешмяна вода	30 сек.
Реагент 2 (обезцветяващ разтвор)	1 мин.
Течаща чешмяна вода	30 сек.
Реагент 3 (Разтвор за контраоцветяване)	5 мин.
Течаща чешмяна вода	30 сек.
Етанол 70 %	1 мин.
Етанол 70 %	1 мин.
Етанол 96 %	1 мин.
Етанол 96 %	1 мин.
Етанол 100 %	1 мин.
Етанол 100 %	1 мин.
Ксилен или Neo-Clear™	5 мин.
Ксилен или Neo-Clear™	5 мин.
Поставете навлажнените с Neo-Clear™ предметни стъкла с Neo-Mount™ или навлажнените с ксилен предметни стъкла напр. с Entellan™ new и покрийте стъклото.	

След дехидратация (със серия с повишаващ се процент алкохол) и проясняване с ксилен или Neo-Clear™, цитологичните проби могат да се поставят върху предметни стъкла с безводни среди (напр. Neo-Mount™, Entellan™ new или DPX Ново) и с покривни стъкла и след това могат да се съхраняват.

Резултат

Киселинноустойчиви бактерии (под флуоресцентен микроскоп)	червено-оранжево (родамин) или жълто-зелено (аурамин) според използваната комби-нация от филтри
Фон	тъмен до черен

Оцветяване за оптична и флуоресцентна микроскопия

Флуоресцентното оцветяване с AFB-Fluor несъдържащ фенол набор за оцветяване е идеално и за допълнително оцветяване на киселинноу-стойчивите бактерии за диагностика чрез оптична микроскопия, напр. с използване на AFB-Color набор за оцветяване (Кат. № 1.16450) или AFB-Color модифициран (Кат. № 1.00497). Непоставените върху предметни стъкла проби, оцветени с AFB-Fluor не-съдържащ фенол набор за оцветяване, могат да се използват директно за диагностични цели. Впоследствие, след внимателно отстраняване на маслото за потапяне, което може да е било използвано, пробите могат да бъдат оцветени допълнително с AFB-Color набор за за оцветяване или AFB-Color модифициран. В проба, третирана по този начин, киселинноустойчивите бактерии изглеждат пурпурно-червени на светлозелен (AFB-Color) или светлосин (AFB-Color модифициран) фон под наблюдение с оптичен микроскоп.

Оценка

Положителен резултат означава „открити са киселинноустойчиви бак-терии“, а отрицателен резултат - „не са открити киселинноустойчиви бактерии“. Положителен резултат не означава, че е възможна таксо-номична класификация чрез микроскопия. Ако са открити киселинно-устойчиви бактерии, трябва да се извършат допълнителни анализи в специално оборудвани лаборатории. Виталността на бактериите (активни, неактивни) също не може да се определи. Ако резултатът не е убедителен, препоръчително е пробите да се оцве-тят допълнително за последваща диагностика с оптична микроскопия, напр. с AFB-Color набор за оцветяване (Кат. № 1.16450) или AFB-Color модифициран (Кат. № 1.00497).

Отстраняване на проблеми

Фиксиране на натривките от проби

Достатъчното фиксиране чрез загряване с помощта на горелка Bunsen или в загряващ шкаф е от основно значение за предотвратяване на инфекциозния потенциал на пробите и последващата пролиферация на бактериите.

Липса на оцветяване на киселинноустойчиви бактерии

Критичният етап на процедурата за оцветяване е стъпката за обезцве-тяване, която може да се повлияе от дебелината на натривката. В допълнение, пресният разтвор на солна киселина в етанол е високо реактивен, което означава, че резултатът трябва да се оценява внима-телно. Посочените в този протокол времена за инкубация трябва да се спазват точно в стъпката за обезцветяване, в противен случай могат да се получат фалшиво отрицателни резултати.

Твърде интензивно фоново оцветяване

В случай че фонът е твърде интензивно оцветен в оптичното микроскоп-ско изображение (тъмносин), Реагент 1 (разтвор с аурамин-родамин) трябва да се смеси по-добре и впоследствие да се обезцвети по-добре. Тъй като разтворът за оцветяване е с висок вискозитет, препоръчително е предметното стъкло да се завърти по време на стъпката за обезцветя-ване с Реагент 2 (разтвор за обезцветяване).

Технически забележки

Използваният микроскоп трябва да отговаря на изискванията на меди-цинска диагностична лаборатория. Препоръчителна комбинация от филтри за флуоресцентна микроскопия:

Възбуден филтър	490 - 570 nm
Цветен сепаратор	525 и 635 nm
Емисионен филтър	505 - 600 nm

Когато се използват автоматични системи за оцветяване, моля, следвай-те инструкциите за употреба, предоставени от доставчика на системата и софтуера. Преди напълване отстранете излишното имерсионно масло.

Аналитични работни характеристики

„AFB-Fluor несъдържащ фенол - набор за оцветяване“ оцветява и следо-вателно визуализира биологични структури, както е описано в главата „Резултат“ на настоящите инструкции за употреба. Продуктът трябва да се използва само от упълномощени и квалифицирани лица, това вклю-чва, освен другите неща, подготовка на пробите и реагентите, боравене с пробите, хистологична обработка, решения по отношение на подходя-щите контроли и други. Аналитичните характеристики на продукта са потвърдени чрез тестване на всяка производствена партида.

Аналитичните характеристики са потвърдени за следните оцветявания по отношение на специфичност, чувствителност и повтарямост на продукта на ниво 100 %:

	Специ- фичност между тестовете	Чувстви- телност между тестовете	Специ- фичност в рамките на теста	Чувстви- телност в рамките на теста
Хистологично оцветяване				
Киселиннoустой- чиви бактерии (под флуоресцен- тен микроскоп)	14/14	14/14	6/6	6/6
Фон	14/14	14/14	6/6	6/6
Оцветяване на натривка				
Киселиннoустой- чиви бактерии (под флуоресцен- тен микроскоп)	14/14	14/14	6/6	6/6
Фон	14/14	14/14	6/6	6/6

Аналитични работни резултати

Данните в рамките на теста (извършени върху една и съща партида) и между тестовете (извършени върху различни партиди) посочват броя правилно оцветени структури спрямо броя на извършените тестове.

Клинични работни характеристики

Освен това клиничните работни характеристики на този продукт са доказани успешно в многобройни научни публикации.

AFB-Fluor несъдържащ фенол - набор за оцветяване е използван ус-
пешно в клинична среда в продължение на десетилетия при голям брой приложения.

Клиничните характеристики на Набор за сребърно оцветяване по AFB-Fluor несъдържащ фенол - набор за оцветяване по-специално са определени чрез установяване на чувствителността и специфичността и неговите PPV и NPV му в собствено проучване:

	Оцветяване с аурамин-родамин
Чувствителност	14/14
Специфичност	15/15

Чувствителност: 14 от 14 проби: 100 %
Специфичност: 15 от 15 проби: 100 %
Положителна прогнозна стойност (PPV): 100 %
Отрицателна прогнозна стойност (NPV): 100 %

Резултатите на тази оценка на работните характеристики потвърждават че продуктът е подходящ за предназначението и функционира надежд-
но.

Въпреки това диагностичната интерпретация на резултатите от оцветя-
ването трябва да се извършва от квалифицирани и упълномощени спе-
циалисти, като се вземат предвид анамнезата на пациента, морфология-
та, използването на подходящи контроли и допълнителни диагностични
тестове, ако е подходящо. Този метод може да се използва допълнител-
но в диагностиката при хора.

Диагностика

Диагнозите следва да се поставят само от упълномощен и квалифици-
ран персонал.
Трябва да се използва валидна номенклатура.
Този метод може да се използва допълнително в диагностиката при
хора.
Трябва да се подберат и извършат допълнителни изследвания в съот-
ветствие с признати методи.
При всяко приложение трябва да се използват подходящи контроли
(напр. ISOSLIDE™ AFB, кат. № 1.02560.0001), за да се избегне неправи-
лен резултат.
Ако резултатът не е убедителен, препоръчително е пробите да се оцвет-
ят допълнително за последваща диагностика с оптична микроскопия,
напр. с AFB-Color набор за за оцветяване (Кат. № 1.16450) или AFB-
Color модифициран (Кат. № 1.00497).

Съхранение

Съхранявайте AFB-Fluor несъдържащ фенол - Набор за оцветяване при
изследване на киселиноустойчиви бактерии чрез флуоресцентна микро-
скопия (оцветяване с аурамин-родамин) при +15 °C до +25 °C.

Срок на годност

Разтвор по AFB-Fluor несъдържащ фенол - Набор за оцветяване при
изследване на киселиноустойчиви бактерии чрез флуоресцентна
микроскопия (оцветяване с аурамин-родамин) може да се използва до
посочената дата на срок на годност.
След първото отваряне на бутилката съдържанието може да се използва
до посочената дата на срок на годност, когато се съхранява при +15 °C
до +25 °C.

Бутилките за накапване трябва винаги да се съхраняват плътно затво-
рени.
Оцветяване на разтвора за обезцветяване (Реагент 2) няма ефект върху
процесите на оцветяване и диагностиката.

Капацитет

Опаковката е достатъчна за до 60 - 65 приложения, те може да са дори
по-голям брой, в зависимост от дебелината на натривките.

Допълнителни инструкции

Само за професионална употреба

За да се избегнат грешки приложението трябва да се извършва самоот
квалифициран персонал.
Трябва да се следват националните указания за осигуряване на безо-
пасност и качество при работа.
Трябва да се използват микроскопи със стандартно оборудване.
Ако е необходимо, използвайте стандартна центрофуга, подходяща за
медицинска диагностична лаборатория.

Защита от инфекция

Трябва да се вземат ефективни мерки за защита срещу инфекция в
съответствие с лабораторните указания.

Инструкции за изхвърляне

Опаковката трябва да се изхвърли в съответствие с актуалните указа-
ния за изхвърляне.
Използваните разтвори и разтворите с изтекъл срок на годност трябва
да се изхвърлят като специален отпадък в съответствие с местните ука-
зания. Информация за изхвърлянето може да се получи от бързия линк
„Съвети за изхвърляне на продукти за микроскопия“ от
www.microscopy-products.com. В рамките на ЕС е в сила приложимият
понастоящем РЕГЛАМЕНТ (ЕК) № 1272/2008 за класификация, обо-
значаване и опаковане на вещества и смеси, поправящ и заместващ
Директиви 67/548/ЕИО и 1999/45/ЕК, и поправящ Регламент (ЕК) №
1907/2006.

Спомагателни реагенти

Кат. №	1.00327	Солна киселина в етанол за микроскопия	1 l, 5 l
Кат. №	1.00496	Формалдеhid разтвор 4%, буферен, pH 6,9 (прибл. 10% разтвор на формалин) за хистология	350 ml и 700 ml (в бутилка с широк отвор), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Кат. №	1.00497	AFB-Color модифициран Набор за оцветяване за детекция на киселиноустойчиви бактерии (acid-fast bacteria, AFB) по метода на топло оцветяване	1 set
Кат. №	1.00579	DPX Ново неводна среда за заливка при микроскопия	500 ml
Кат. №	1.00869	Entellan™ new за покриване на микроскопски препарати за микроскопия	500 ml
Кат. №	1.02560	ISOSLIDE™ AFB Контролни слайдове с референтна тъкан за детекция на киселиноустойчиви бактерии в хисто	25 tests
Кат. №	1.03999	Формалдеhid разтвор мин. 37% без киселина стабилизирaн с около 10% метанол и калциев карбонат за хистология	1 l, 2,5 l, 25 l
Кат. №	1.04699	Имерсионно масло за микроскопия	100-ml бутилка за накапване, 100 ml, 500 ml
Кат. №	1.07164	Парафинови пастили точка на втвърдяване около 56 – 58 °C за хистология	10 kg (4x 2,5 kg)
Кат. №	1.07961	Entellan™ new бърз среда за заливка за микроскопия	100 ml, 500 ml, 1 l
Кат. №	1.08000	SputofluoI™ за микроскопия	1 l
Кат. №	1.08298	Ксилол (изомерна смес) за хистология	4 l
Кат. №	1.09016	Neo-Mount™ безводна среда за микроскопия	100-ml бутилка за накапване, 500 ml
Кат. №	1.09843	Neo-Clear™ (заместител на ксилол) за микроскопия	5 l
Кат. №	1.11609	Histosec™ пастили точка на втвърдяване 56 – 58 °C фиксатор за хистология	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Кат. №	1.15161	Histosec™ пастили (без DMSO) точка на втвърдяване 56 – 58 °C фиксатор за хистология	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Кат. №	1.16450	AFB-Color Набор за оцветяване за изследване под микроскоп на киселиноустойчиви бактерии (AFB) (студено оцветяване)	1 set

Класификация на рисковете

Кат. № 1.01597.0001

Моля, спазвайте класификацията на рисковете, отпечатана на етикета, и информацията, дадена в листа с данни за безопасност.

Листът с данни за безопасност може да се намери в уебсайта и при поискване.

Основни компоненти на продуктите

Кат. № 1.01597.0001

Реагент 1

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

Реагент 2

C₃H₈O 543,3 g/l
HCl мин. 37 % 15,7 g/l
1 l = 0,878 kg

Реагент 3

KMnO₄ 5,0 g/l
1 l = 1,013 kg

Обща забележка

Ако по време на използването на това изделие или в резултат на употребата му възникне сериозен инцидент, моля, съобщете за него на производителя и/или на неговия упълномощен представител и на Вашия национален орган.

Литература

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Силно запалими течност и пари.

H290: Може да бъде корозивно за металите.

H319: Предизвиква сериозно дразнене на очите.

H336: Може да предизвика сънливост или световъртеж.

H411: Токсичен за водните организми, с дълготраен ефект.

P210: Да се пази от топлина, нагорещени повърхности, искри, открит пламък и други източници на запалване. Тютюнопушенето е забранено.

P233: Съдът да се съхранява плътно затворен.

P234: Да се съхранява само в оригиналната опаковка.

P240: Заземяване и екипотенциална връзка на съда и приемателното устройство.

P273: Да се избягва изпускане в околната среда.

P305 + P351 + P338: ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължете с изплакването.

Реагент 1:

H226: Запалими течност и пари.

H319: Предизвиква сериозно дразнене на очите.

Реагент 2:

H225: Силно запалими течност и пари.

H290: Може да бъде корозивно за металите.

H319: Предизвиква сериозно дразнене на очите.

H336: Може да предизвика сънливост или световъртеж.

Реагент 3:

H411: Токсичен за водните организми, с дълготраен ефект.

Хронология на редакциите

Версия	Коментар за модификацията
2024-Jul-19	Първоначална версия с въвеждането на хронология на редакциите



Направете справка в инструкциите за употреба



Производител



Каталожен номер



Код на партида



Внимание, направете справка в придружаващите документи



Срок на годност ГГГГ-ММ-ДД



Ограничение за температура

Status: 2024-Jul-19

Лифе Сциенце подразделение на Merck функционира като MilliporeSigma в САЩ и Канада.

© 2024 Merck KGaA, Дармшат, Германия и/или техните филиали. Всички права запазени. Merck и Sigma-Aldrich са търговски марки на Merck KGaA, Дармшат, Германия. Всички други търговски марки са притежание на съответните им собственици. Подробна информация за търговските марки може да се намери в публично достъпните източници.



Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.sigmaaldrich.com

MERCK

1.01597.0001 **REF**

Mikroszkópia

AFB-Fluor fenolmentes

Festőkészlet savgyors baktériumok fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatához (Auramin-Rhodamine festés)

Csak professzionális használatra



In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz



Rendeltetés

Ez az "AFB-Fluor fenolmentes - Festőkészlet savgyors baktériumok fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatához (Auramin-Rhodamine festés)" embergőgyászati sejt diagnosztika használatos és célja humán eredetű mintaanyag bakteriológiai, citológiai és hisztológiai vizsgálata. Ez használatra kész színező készlet, amely termékínálatunk más *in vitro* diagnosztikai termékeivel együtt használva diagnosztikai célokra értékelhetővé teszi a bakteriális célstruktúrákat (pl. saválló baktériumok (AFB)), rögzítés, beágyazás, színezés, kontrasztszínezés, bakteriológiai, citológiai és hisztológiai mintaanyagokba például dúsított baktériumkultúrák keneteibe vagy pl. a tüdő hisztológiai metszeteibe.

Az AFB-Fluor fenolmentes festőkészlet meghatározó jellemzője a fluoreszcens festékek jelenléte a színező oldatban. Ez lehetővé teszi a saválló baktériumok gyors és biztos azonosítását fluoreszcens mikroszkóppal. Ezenkívül a színező oldat a potenciálisan veszélyes fenol nélkül készül, növelve a felhasználó biztonságát.

Ez a színező készlet használatra készen szállított, praktikus, csepegtetővel ellátott palackokban, és tartalmazza az összes reagenst, amely szükséges saválló baktériumok színezésére kenetmintákban és hisztológiai szövetmintákban.

Nem színezett struktúrák viszonylag alacsony kontrasztúak és fénymikroszkópban rendkívül nehezen megkülönböztethetőek. Ilyen esetekben a színező oldatokkal létrehozott képek segítik az engedélyezett és képzett vizsgálót az alak és a struktúrák jobb meghatározásában. További vizsgálatokat kell végezni elismert, érvényes módszerek szerint, definitív diagnózis felállítás céljából.

Elv

A klasszikus Ziehl-Neelsen-féle módszert a viasz és a lipidek magas sejtfalbeli aránya határozza meg, mivel a saválló baktériumok csak nagyon lassan veszik fel a színező oldatokat. A fukszin festék abszorpciójának és így módon a mikolat-fukszin komplex képződésének növelésére tett szokásos intézkedés a mintára alkalmazott színező oldat párolgási pontra hevítése. Ha a saválló baktériumok már abszorbeálták a fukszin festéket, virtuálisan lehetetlen azokat újra szinteleníteni, még szintelenítő oldattal (pl. sósavval etanolban) végzett intenzív kezeléssel sem. Ennek megfelelően a saválló baktériumokat színezési szempontból sav- és alkoholállóknak tekintik. Az AFB-Fluor fenolmentes festőkészlet használatakor az AFB-Fluor fenolmentes színező oldatban jelenlévő auramin és rodamin fluoreszcens festékek szükségtelenné teszik a hevítési lépést. Ezek a festékek lerakódnak a saválló baktériumok sejtfalában, és a mikroszkóp szűrőjétől függően sárga vagy piros színben jelennek meg fekete háttér előtt. A minták előkezelése Sputofluor™ szerrel leoldja a baktériumokat a környező ragadós köpetről és a sejttanyagról.

Mintaanyag

Levegőn szárított és hővel rögzített és Sputofluor™ anyaggal előkezelt bakteriológiai anyag (pl. köpet, finom tűvel leszívott biopsziák (FNAB), öblítések, lenyomatok, effúziók, genny, váladékok, folyékony és szilárd kultúrák) kenetei

Humán eredetű, formalinnal rögzített szövet metszetei, paraffinba ágyazva (3 - 4 µm vastag paraffinmetszetek)

Reagens

Kat. sz. 1.01597.0001
AFB-Fluor phenol-free
Staining kit for the examination of acid-fast bacteria with fluorescence microscopy (Auramin-Rhodamine staining)

A csomag összetevői:

A színező készlet az alábbiakat tartalmazza

Reagens 1: Auramin-rodamin oldat	200 ml
Reagens 2: Szintelenítő oldat	2 x 200 ml
Reagens 3: Kontrasztszínező oldat (KMnO ₄)	200 ml

Szintén szükséges:

Kat. sz. 1.08000 Sputofluor™ mikroszkópiához

Minta-előkészítés

A mintavételt kiképzett személyzetnek kell végrehajtani.

Minden mintát a legkorszerűbb technológiával kell kezelni.

Minden mintát világosan fel kell címkézni.

Megfelelő műszereket kell használni mintavételhez és előkészítéshez. Kövesse a gyártó utasításait az alkalmazásra / használatra vonatkozóan.

A megfelelő kisegítő reagentisek használatakor be kell tartani a megfelelő utasításokat.

Köpet

A saválló baktériumokat elő kell kezelni Sputofluor™ anyaggal, a köpetről, nyálkáról és sejtsztruktúrákról való leoldás céljából. Ebben a folyamatban a hipoklorit aktív összetevő leoldja a szerves anyagot oxidálással, és óvatosan kiszabadítja a saválló baktériumokat további feldolgozásra.

Reagens elkészítése: 15 %-os Sputofluor™ oldat készítése

Kb. 100 ml oldat elkészítéséhez keverje össze az alábbiakat:

Sputofluor™	15 ml
Distile su	85 ml

Mintaanyag elkészítése centrifugacsövekben:

Minta	1 rész (min. 2 ml)
Sputofluor™ oldat (15 % desztillált vízben)	3 rész
Rázza erősen	10 dk
Centrifugálja 3000 - 4800 rpm sebességgel	20 dk
Töltse át a felülírózt Készítsen kenetet az üledékből Szárítsa levegőn	

Punctatumok, mosatok, üledékek

Megfelelő dúsítási intézkedések után kenje a mintaanyagot a tárgylemezre és hagyja levegőn megszáradni.

Hisztológiai metszetek

A AFB-Fluor fenolmentes használható hisztológiai metszetek színezésére. Paraffinmentesítse a metszeteket a szokásos módon, majd rehidratálja csökkenő alkoholsorozattal.

Kenetminták rögzítése

A minták rögzítése Bunsen-égő lángja felett történik (2-3-szor, túlzott hevítés kerülendő).

A minták rögzíthetők szárítószekrényben is 100 - 110 °C-ra hevítéssel, vagy fűtőlapon 20 percig.

Túl magas hőmérsékletek vagy tartós hevítés a színezési teljesítmény romlását vonhatja maga után.

Reagens-előkészítés

A AFB-Fluor fenolmentes - Festőkészlet savgyors baktériumok fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatához (Auramin-Rhodamine festés) reagentisei használatra kész, az oldatok hígítása nem szükséges és az csak a színezési eredmény és a stabilitás rosszabbodását eredményezi.

Nagy viszkozitása miatt a fenolmentes auramin-rodamin színező oldatot (reagens 1) erősen fel kell rázni használat előtt.

Eljárás

Kenetminták festése

Színezés a színező állványon

Tárgylemez rögzített kenettel		
Reagens 1 (auramin-rodamin oldat)	alkalmazza cseppenként, fedje le teljesen és színezz	15 perc
Folyó csapvízben	öblítse gondosan	30 sec
Reagens 2 (szintelenítő oldat)	alkalmazza cseppenként, fedje le teljesen és hagyja reagálni	1 perc
Folyó csapvízben	öblítse gondosan	30 sec
Reagens 3 (kontrasztszínező oldat)	alkalmazza cseppenként, fedje le teljesen és színezz	5 perc
Folyó csapvízben	öblítse gondosan	30 sec
Levegőn szárítás		

Kenetminták több hónapos tárolása esetén ajánlott a lefedés nem víz-alapú felrakó közeggel (pl. Neo-Mount™, Entellan™ new vagy DPX új) és fedő üveglappal. Ennek céljából a színezett mintákat nagyon jól meg kell szárítani.

Immerziós olaj használata javasolt a színezett tárgylemezek elemzésére >40x mikroszkópos nagyítás mellett.

Hisztológiai minták festése

Színezés a színező állványo

Paraffinmentesítse a hisztológiai tárgylemezeket a szokásos módon, majd rehidratálja csökkenő alkoholsorozatban.

A festőoldatokat cseppenként kell felvinni a tárgylemezekre, és teljesen be kell fedniük a paraffinos részt.

A megadott időket be kell tartani az optimális színezési eredmény garantálása céljából.

Tárgylemez hisztológiai szövettel	
Desztillált víz	öblítse
Reagens 1 (auramin-rodamin oldat)	15 perc
Folyó csapvízben	30 sec
Reagens 2 (színtelenítő oldat)	1 sec
Folyó csapvízben	30 sec
Reagens 3 (kontrasztšínező oldat)	5 perc
Folyó csapvízben	30 sec
Etanol 70 %-os	1 perc
Etanol 70 %-os	1 perc
Etanol 96 %-os	1 perc
Etanol 96 %-os	1 perc
Etanol 100 %-os	1 perc
Etanol 100 %-os	1 perc
Xylene vagy Neo-Clear™	5 perc
Xylene vagy Neo-Clear™	5 perc
Rakja fel a Neo-Clear™ anyaggal nedvesített tárgylemezeket Neo-Mount™ használatával vagy a xilollal nedvesített tárgylemezeket pl. Entellan™ new használatával és fedje le üveglappal.	

Dehidratálás (növekvő alkoholsorozatok) és xilol vagy Neo-Clear™ használatával történt tisztítás után a hisztológiai tárgylemezek lefedhetők bármilyen nem vizes felrakó szerrel (pl. Neo-Mount™, Entellan™ new vagy DPX új) és fedőüveggel, majd tárolhatók.

Eredmény

Saválló baktériumok (a fluoreszcens mikroszkópban)	piros-narancs (rodamin) vagy sárga-zöld (auramin), a használt szűrők kombinációjától függően
Háttér	sötét színtől feketéig

Színezés optikai és fluoreszcens mikroszkópiához

Az AFB-Fluor fenolmentes festőkészlet használó fluoreszcens színezék ideálisan alkalmas a saválló baktériumok optikai mikroszkópos diagnózis céljából történő további színezésére is, pl. az AFB-Color festőkészlet (kat. sz. 1.16450) vagy az AFB-Color módosított (kat. sz. 1.00497) használatával.

Az AFB-Fluor fenolmentes színező készlettel színezett, nem felrakott minták közvetlenül használhatók diagnosztikai célokra. Ezt követően az esetlegesen használt immerziós olaj gondos eltávolítása után a minták tovább színezhetők az AFB-Color festőkészlet vagy az AFB-Color módosított használatával. Az ilyen módon kezelt mintában a saválló baktériumok magenta-vörös színben jelennek meg világoszöld (AFB-Color) vagy világoskék (AFB-Color módosított) háttér előtt az optikai mikroszkópban.

Értékelés

Pozitív eredmény jelentése: "saválló baktériumok észlelése történt" és a negatív eredmény jelentése: "saválló baktériumok nem észlelhetők". Pozitív eredmény nem jelenti azt, hogy lehetséges a taxonómiai besorolás mikroszkópos vizsgálattal. Ha saválló baktériumok észlelése történt, további elemzéseket kell végrehajtani speciálisan felszerelt laboratóriumokban. A baktériumok vitalitását (aktív, inaktív) sem lehet meghatározni.

Ha az eredmény nem meggyőző, ajánlott a minták további színezése további optikai mikroszkópos diagnózishoz, pl. az AFB-Color festőkészlet (kat. sz. 1.16450) vagy az AFB-Color módosított (kat. sz. 1.00497) használatával.

Hibaelhárítás

Kenetminták rögzítése

Megfelelő mértékű hőrógzítás (Bunsen-égő használatával vagy fűtőszekrényben) szükséges a minták fertőző potenciáljának és baktériumok szaporodásának megelőzéséhez.

Saválló baktériumok nincsenek színezve

A színezési eljárás kritikus szakasza a szintelenítési lépés, amit befolyásolhat a kenet vastagsága. Ráadásul a sósav friss oldata etanolban erősen reakcióképes, tehát az eredményt óvatosan kell értékelni. A szintelenítési lépés alatt a felhasználók be kell tartásuk a protokollban leírt inkubációs időket, egyébként hamis negatív eredményeket kaphatnak.

Túl erős háttérszínezés

Abban az esetben, ha a háttér túl erősen színezett az optikai mikroszkópos képen (sötétkék), az 1. reagenst (auramin-rodamin oldat) jobban meg kell keverni, és ezután jobban szinteleníteni. Mivel a színező oldat erősen vízkózus, javasolt a tárgylemez mozgatása a 2. reagenssel (színtelenítő oldat) történő szintelenítés alatt.

Műszaki megjegyzések

A használt mikroszkóp meg kell feleljen az orvosi diagnosztikai laboratórium követelményeinek.

Javasolt szűrőkombinációk fluoreszcens mikroszkópiához:

Gerjesztő szűrő	490 - 570 nm
Színválasztó	525 és 635 nm
Emissziós szűrő	505 - 600 nm

Kérjük, automatikus színezési rendszerek használata esetén kövesse a rendszer és a szoftver gyártójának utasításait.

Feltöltés előtt távolítsa el a többlet immerziós olajat.

Analitikai teljesítményjellemzők

"AFB-Fluor fenolmentes - festőkészlet" színezi és ezáltal láthatóvá teszi a biológiai struktúrákat, amint ismertettjük ezen Használati utasítás "Eredmény" c. fejezetében. Csak engedélyezett és kiképzett személyek hajthatják végre a termék használatát, többek között a minta- és reagens-előkészítését, a mintafeldolgozást, a hisztokezelést, és hozhatnak a megfelelő kontrollokra vonatkozó döntéseket és még sok mást.

A termék analitikai teljesítményét meg kell erősíteni minden termékfürdő ellenőrzésével.

Az alábbi színezékekre 100%-os arányban megerősítést nyert a termék anaitikai teljesítménye a specificitás, érzékenység és reprodukálhatóság vonatkozásában:

	Inter-assay specificitás	Inter-assay érzékenység	Intra-assay specificitás	Intra-assay érzékenység
Szövettani festés				
Saválló baktériumok (a fluoreszcens mikroszkópban)	14/14	14/14	6/6	6/6
Háttér	14/14	14/14	6/6	6/6
Kenet színezése				
Saválló baktériumok (a fluoreszcens mikroszkópban)	14/14	14/14	6/6	6/6
Háttér	14/14	14/14	6/6	6/6

Analitikai teljesítmény eredmények

Intra- (ugyanabban az adagban végrehajtva) és inter-assay (különböző adagokban végrehajtva) adatok megadják a helyesen színezett struktúrák számát a végrehajtott vizsgálatok számának arányában.

Klinikai teljesítményjellemzők

Továbbá, ezen termék klinikai teljesítményét sikeresen bizonyította sok tudományos publikáció.

A AFB-Fluor fenolmentes - festőkészlet évtizedek óta sikeresen használják klinikai környezetben nagyszámú alkalmazásban.

Különösképpen a AFB-Fluor fenolmentes - festőkészlet vonatkozóan egy ház-on belüli vizsgálatban megállapították az érzékenységet és a specificitást, valamint annak PPV és NPV a klinikai teljesítmény meghatározásához:

	Auramin-rodamin színezés
Érzékenység	14/14
Specificitás	15/15

Érzékenység: 14 minta 14 közül: 100 %

Specificitás: 15 minta 15 közül: 100 %

Pozitív prediktív érték (PPV): 100 %

Negatív prediktív érték (NPV): 100 %

Ezen teljesítményértékelés megerősíti, hogy a termék alkalmas a rendeltetés szerinti használatra és megbízhatóan teljesít.

A színezési eredmények diagnosztikai értelmezését azonban képzett és jóváhagyott szakemberek kell végezzék, figyelembe véve a beteg anamnézisé, a morfológiát, a megfelelő kontrollok használatát, valamint a további diagnosztikai tesztek, ha vannak ilyenek. Ez a módszer kiegészítésként használható a humán diagnosztikában.

Diagnosztika

Diagnózt csak engedélyezett és kiképzett személyzet készíthet.

Érvényes nomenklatúrákat kell használni.

Ez a módszer kiegészítésként használható a humán diagnosztikában.

További vizsgálatokat kell kiválasztani és bevezetni elismert módszerek szerint.

Megfelelő kontrollokat (pl. ISOSLIDE™ AFB, kat. sz. 1.02560.0001) kell végeznie minden alkalmazásnál, a helytelen eredmény elkerülése végett. Ha az eredmény nem meggyőző, ajánlott a minták további színezése további optikai mikroszkópos diagnózishoz, pl. az AFB-Color festőkészlet (kat. sz. 1.16450) vagy az AFB-Color módosított (kat. sz. 1.00497) használatával.

Tárolás

Tárolja a AFB-Fluor fenolmentes - Festőkészlet savgyors baktériumok fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatához (Auramin-Rhodamine festés) +15 °C - +25 °C-on.

Élettartam

A AFB-Fluor fenolmentes - Festőkészlet savgyors baktériumok fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatához (Auramin-Rhodamine festés) használható a megadott lejárati ideig.

A palack első felnyitása után a tartalom használható a megadott lejárati ideig, ha a tárolás +15 °C - +25 °C hőmérsékleten történt.

A csepegtető palackokat mindig szorosan lezárva kell tartani.

A szintelenítő oldat (reagens 2) színezése nincs hatással a színező eljárásokra és a diagnosztikára.

Kapacitás

A csomag elegendő 60 - 65 alkalmazásra, a kihozatal magasabb is lehet, a kenetek vastagságától függően.

További utasítások

Csak professzionális használatra.

Hibák elkerülése végett az alkalmazást csak kiképzett személyzet hajthatja végre.

A munka biztonságára és a minőségbiztosításra vonatkozó országos útmutatókat be kell tartani.

A szabványnak megfelelően felszerelt mikroszkópokat kötelező használni.

Ha szükséges, használjon orvosi diagnosztikai laboratóriumban alkalmazható, szokásos centrifugát.

Fertőzés elleni védelem

Hatékony intézkedéseket kell tenni a fertőzés elleni védelemre, a laboratóriumi útmutatókkal összhangban.

Megsemmisítési utasítások

A csomagot az aktuális megsemmisítési útmutatókkal összhangban kell megsemmisíteni.

A használt oldatokat, illetve a lejárt szavatossági idejű oldatokat speciális hulladékként kell megsemmisíteni, a helyi útmutatásokkal összhangban.

Megsemmisítésre vonatkozó információ kapható a www.microscopy-products.com oldalról, a "Hints for Disposal of Microscopy Products" (Ötletek mikroszkópiai termékek megsemmisítésére) gyors hivatkozás alatt. Az EU jelenleg érvényes, anyagok és keverékek osztályozására, címkézésére és csomagolására vonatkozó, 1272/2008. sz RENDELETE (EC) van érvényben, amely javítja és hatályon kívül helyezi a 67/548/EEC és 1999/45/EC direktívákat, és javítja az (EC) 1907/2006. sz rendeletet.

Kiegészítő reagensek

Kat. sz.	1.00327	Sósav, etanolban oldva mikroszkópiai célra	1 l, 5 l
Kat. sz.	1.00496	Formaldehid oldat, 4%-os, pufferolt, pH 6,9 (kb. 10%-os formalin oldat) hisztológiai célra	350 ml és 700 ml (széles nyakú palackban), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Kat. sz.	1.00497	AFB-Color módosított Festő kit savgyors baktériumok (AFB) mikroszkópiás vizsgálatához melegen festődő metodikával	1 set
Kat. sz.	1.00579	DPX új nem-vizes rögzítőszer mikroszkópiai célra	500 ml
Kat. sz.	1.00869	Entellan™ new, fedőlemezekhez mikroszkópiai célra	500 ml
Kat. sz.	1.02560	ISOSLIDE™ AFB kontroll lemezek referenciaszövettel savgyors baktériumok szövettani kimutatásához	25 tests
Kat. sz.	1.03999	Formaldehidoldat, min. 37%-os, savmentes kb. 10% metanollal és kalcium-karbonáttal stabilizálva, hisztológiai célra	1 l, 2,5 l, 25 l
Kat. sz.	1.04699	Immerziós olaj mikroszkópiai célra	100 ml-es csepegtető palackban, 100 ml, 500 ml

Kat. sz.	1.07164	Paraffin, pasztilla dermedéspont kb. 56-58°C, hisztológiai célra	10 kg (4x 2,5 kg)
Kat. sz.	1.07961	Entellan™ new gyorsfedőanyag a mikroszkópiához	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. sz.	1.08000	Sputofluo™ mikroszkópiához	1 l
Kat. sz.	1.08298	Xylene (isomerikus elegy) szövettani célokra	4 l
Kat. sz.	1.09016	Neo-Mount™ vízmentes fedőanyag mikroszkópiai célra	100 ml-es csepegtető palackban, 500 ml
Kat. sz.	1.09843	Neo-Clear™ (xilohelyettesítő) mikroszkópiai célra	5 l
Kat. sz.	1.11609	Histosec™ pasztilla dermedéspont 56-58°C, hisztológiai beágyazóanyag	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Kat. sz.	1.15161	Histosec™ pasztilla (DMSO nélkül) dermedéspont 56-58°C, hisztológiai beágyazóanyag	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Kat. sz.	1.16450	AFB-Color festőkészlet savgyors baktériumok (AFB) mikroszkópos vizsgálatához (hideg festés)	1 set

Veszélyminősítés

Kat. sz. 1.01597.0001

Kérjük, vegye figyelembe a címkére nyomtatott veszélyminősítést és a biztonsági adatlapon megadott információt.

A biztonsági adatlap megtalálható a webhelyen, illetve megkapható kérésre.

A termékek fő összetevői

Kat. sz. 1.01597.0001

Reagens 1	
C.I. 41000	12,0 g/l
C.I. 45170	6,0 g/l
1 l =	1,117 kg

Reagens 2	
C ₃ H ₈ O	543,3 g/l
HCl min. 37 %	15,7 g/l
1 l =	0,878 kg

Reagens 3	
KMnO ₄	5,0 g/l
1 l =	1,013 kg

Általános megjegyzés

Ha ezen eszköz használata során vagy használata eredményeképpen súlyos incidens történt, kérjük, jelentse a gyártónak és/vagy jóváhagyott képviselőnek, illetve az országos hatóságnak.

Irodalom

- Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
- Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
- Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
- Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Fokozottan tűzveszélyes folyadék és gőz.

H290: Fémekre korrozív hatású lehet.

H319: Súlyos szemirritációt okoz.

H336: Álmosságot vagy szédülést okozhat.

H411: Mérgező a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.

P210: Hőtől, forró felületektől, szikrától, nyílt lángtól és más gyújtóforrástól távol tartandó. Tilos a dohányzás.

P233: Az edény szorosan lezárva tartandó.

P234: Az eredeti csomagolásban tartandó.

P240: A tárolóedényt és a fogadóedényt le kell földelni és át kell kötni.

P273: Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását.

P305 + P351 + P338: SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.

Reagens 1:

H226: Tűzveszélyes folyadék és gőz.

H319: Súlyos szemirritációt okoz.

Reagens 2:

H225: Fokozottan tűzveszélyes folyadék és gőz.

H290: Fémekre korrozív hatású lehet.

H319: Súlyos szemirritációt okoz.

H336: Álomosságot vagy szédülést okozhat.

Reagent 3:

H411: Mérgező a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.

Felülvizsgálati előzmények

verzió	Módosítással kapcsolatos megjegyzé
2024-Jul-19	A Felülvizsgálati előzmények bevezetésével készült első változat



Nézze meg a
használati utasítást



Gyártó



Katalógus szám



Tételkód



Vigyázat, olvassa el a mel-
lékelt dokumentumokat



Lejáratí idő:
ÉÉÉÉ-HH-NN



Hőmérsék-
lethatár

Status: 2024-Jul-19

A Merck Life Science üzletága az USA-ban és Kanadában MilliporeSigma néven működik.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Németország és/vagy leányvállalatai. Minden jog fenntartva. Merck és Sigma-Aldrich a Merck KGaA, Darmstadt, Németország, védjegyei. Minden más védjegy megfelelő tulajdonosa birtokában van. A védjegyekre vonatkozó információ rendelkezésre áll nyilvánosan elérhető forrásokból.



Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.sigmaaldrich.com

MERCK

1.01597.0001 **REF**

Mikroskopija

AFB-Fluor fenolu nesaturošs

krāsošanas komplekts acidorezistentu baktēriju izmeklēšanai ar fluorescences mikroskopu (krāsošana ar auramīnu-rodamīnu)

Tikai profesionālai lietošanai

IVD *in vitro* diagnostikas medicīniska ierīce



Paredzētais pielietojums

Šo "AFB-Fluor fenolu nesaturošs - krāsošanas komplekts acidorezistentu baktēriju izmeklēšanai ar fluorescences mikroskopu (krāsošana ar auramīnu-rodamīnu)" izmanto cilvēka šūnu diagnostikā, lai veiktu cilvēka izcelsmes parauga materiāla bakterioloģisko, citoloģisko un histoloģisko izmeklēšanu. Tas ir lietošanai gatavs krāsošanas komplekts, kas kopā ar citiem mūsu piedāvātajiem *in vitro* diagnostikas izstrādājumiem nodrošina baktēriju mērķa struktūru izvērtēšanu diagnostiskos nolūkos (acidorezistentas baktērijas (AFB)), veicot fiksāciju, ieguldīšanu, krāsošanu, kontrastkrāsošanu, nostiprināšanu bakterioloģiskā, citoloģiskā un histoloģiskā parauga materiālam, piemēram, no bagātinātām bakteriālajām barotnēm iegūtām iztriepēm vai histoloģisko paraugu materiāliem, piemēram, plaušu audu histoloģiskajiem griezumiem.

AFB-Fluor fenolu nesaturošs krāsošanas komplekts būtiska raksturīgā iezīme ir fluorescējošo krāsvielu esamība krāsošanas šķīdumā. Tās ļauj ātri un droši identificēt acidorezistentās baktērijas fluorescences mikroskopā. Turklāt krāsošanas šķīdums nesatur iespējami bīstamo fenolu, tādējādi uzlabojot lietotāja drošību.

Krāsošanas komplekts tiek piegādāts gatavs lietošanai praktiskās pilināšanas pudelēs un satur visus reagentus, kas nepieciešami acidorezistentu baktēriju krāsošanai iztriepes paraugos un histoloģiskajos audu paraugos.

Nekrāsotām struktūrām ir relatīvi neliels kontrasts, un tās ir ārkārtīgi grūti atšķirt gaismas mikroskopā. Šādos gadījumos ar krāsošanas šķīdumiem iekrāsoti preparāti palīdz pilnvarotam un kvalificētam speciālistam labāk noteikt formu un struktūru. Lai noteiktu galīgo diagnozi, jāveic papildu izmeklējumi, izmantojot atzītas un validētas metodes.

Princips

Klasiskās krāsošanas metodes pēc Čila-Nilsena rezultātu nosaka lielais daudzums vasku un lipīdu baktēriju šūnas sienā, kura dēļ acidorezistentās baktērijas ļoti lēni absorbē krāsvielas. Lai uzlabotu fuksīna krāsvielas absorbciju un, līdz ar to, mikolāta-fuksīna kompleksa veidošanos šūnas sienā, paraugam uzklāto krāsošanas šķīdumu parasti karsē līdz iztvaikošanas punktam.

Tiklīdz acidorezistentās baktērijas ir absorbējušas fuksīna krāsvielu, tās praktiski nav iespējams atkrāsot, pat tad, ja tās intensīvi apstrādā ar atkrāsošanas šķīdumu, piemēram, sāļsskābi etilspirtā. Līdz ar to, acidorezistentās baktērijas sauc par „skābes un spirta izturīgām”.

AFB-Fluor fenolu nesaturošs krāsošanas komplekts krāsošanas šķīdumā tiek izmantotas fluorescējošās krāsvielas, auramīns un rodamīns un tāpēc karsēšanas darbība nav nepieciešama. Šīs krāsvielas uzkrājas acidorezistentu baktēriju šūnu sienā un atkarībā no izmantotā mikroskopa filtra ir redzamas dzeltenā vai sarkanā krāsā uz melna fona. Paraugu iepriekšēja apstrāde ar Sputofluo™ atbrīvo baktērijas no apkārtesošajām viskozajām krēpām un šūnu materiāla.

Parauga materiāls

Bakterioloģiskā materiāla iztriepes, kas nožāvētas ar gaisu un fiksētas ar karstumu un iepriekš apstrādātas ar Sputofluo™, piemēram, krēpas, iztriepes no tievās adatas aspirācijas biopsijām (TAAB), noskalojumi, nospiedumi, izsvīdumi, strutas, eksudāti, šķidrās un cietās barotnes

Cilvēka izcelsmes formālīnā fiksētu audu griezumumi, kas ieguldīti parafinā (3 – 4 µm biezi parafina griezumumi)

Reaģenti

Kat. nr. 1.01597.0001

AFB-Fluor fenolu nesaturošs

krāsošanas komplekts acidorezistentu baktēriju izmeklēšanai ar fluorescences mikroskopu (krāsošana ar auramīnu-rodamīnu)

Iepakojuma sastāvdaļas:

Krāsošanas komplektā iekļauts

Reaģents 1: Auramīna-rodamīna šķīdums

200 ml

Reaģents 2: Atkrāsošanas šķīdums

2 x 200 ml

Reaģents 3: Kontrastējošās krāsas šķīdums (KMnO₄)

200 ml

Papildus nepieciešams:

Kat. nr. 1.08000 Sputofluo™
mikroskopiskai izmeklēšanai

1 |

Parauga sagatavošana

Paraugs jāpaņem kvalificētam personālam.

Strādājot ar visiem paraugiem, jāizmanto modernākās tehnoloģijas.

Visi paraugi skaidri jāmarķē.

Paraugu paņemšanai un sagatavošanai jāizmanto piemēroti instrumenti.

Ievērojiet ražotāja norādījumus par pielietojumu/lietošanu.

Ja izmantojat atbilstošus papildu reagentus, jāievēro atbilstošā lietošanas instrukcija.

Krēpas

Acidorezistentās baktērijas iepriekš jāapstrādā ar Sputofluo™, lai tās atbrīvotu no gļotām un šūnu struktūrām. Šī procesa laikā aktīvā sastāvdaļa hipohlorīts ar oksidācijas palīdzību izšķīdina organisko materiālu un uzmanīgi atbrīvo acidorezistentās baktērijas, lai varētu turpināt to apstrādi.

Reaģentu sagatavošana: 15% Sputofluo™ šķīduma sagatavošana

Lai sagatavotu apm. 100 ml šķīduma, samaisiet šādas sastāvdaļas:

Sputofluo™	15 ml
Destilēts ūdens	85 ml

Parauga materiāla sagatavošana centrifūgas stobriņos:	
Paraugs	1 daļa (min. 2 ml)
Sputofluo™ šķīdums (15% destilētā ūdenī)	3 daļas
Enerģiski sakratiet	10 min
Centrifugējiet ar ātrumu 3000 – 4800 rpm	20 min
Nolejiet supernatantu Sagatavojiet no sedimenta iztriepes Nožāvējiet gaisā	

Punktāti, skalojumi, sedimenti

Pēc atbilstošiem bagātināšanas pasākumiem sagatavojiet no parauga materiāla iztriepi uz priekšmetstikliņa un ļaujiet tai gaisā nožūt.

Histoloģiskie griezumumi

AFB-Fluor fenolu nesaturošs var izmantot histoloģisko griezumumu krāsošanai. Deparafinizējiet griezumus, izmantojot standarta metodi, un rehidratējiet ar spirta atšķaidījumu sēriju dilstošā koncentrācijā.

Iztriepes paraugu fiksācija

Paraugu fiksāciju veic, karsējot virs Bunsena degļa (2 – 3 reizes, izvairoties no pārmērīgas karsēšanas).

Paraugus var fiksēt arī, 20 minūtes karsējot žāvēšanas skapī vai uz karsēšanas plates 100 – 110°C temperatūrā.

Pārmērīgi augsta temperatūra vai ilgstoša karsēšana var pasliktināt krāsošanas rezultātu.

Reaģentu sagatavošana

Krāsošanai izmantotā AFB-Fluor fenolu nesaturošs - krāsošanas komplekts acidorezistentu baktēriju izmeklēšanai ar fluorescences mikroskopu (krāsošana ar auramīnu-rodamīnu) reaģenti ir gatavi lietošanai, šķīdumu atšķaidīšana nav nepieciešama un tikai pasliktina krāsošanas rezultātu un krāsojuma stabilitāti.

Izteiktās viskozitātes dēļ fenolu nesaturošais auramīna-rodamīna krāsošanas šķīdums (reaģents 1) pirms lietošanas ir enerģiski jāsakrata.

Procedūra

Uztriepes paraugu krāsošana

Krāsošana uz krāsošanas statīv

Priekšmetstikliņš ar fiksētu iztriepi		
Reaģents 1 (auramīna-rodamīna šķīdums)	uzklājiet uzpilot, pilnībā pārklājiet un krāsojiet	15 min.
Tekošs krāna ūdens	rūpīgi noskalojiet	30 sek.
Reaģents 2 (atkrāsošanas šķīdums)	uzklājiet uzpilot, pilnībā pārklājiet un ļaujiet notikt reakcijai	1 min.
Tekošs krāna ūdens	rūpīgi noskalojiet	30 sek.
Reaģents 3 (kontrastējošās krāsas šķīdums)	uzklājiet uzpilot, pilnībā pārklājiet un krāsojiet	5 min.
Tekošs krāna ūdens	rūpīgi noskalojiet	30 sek.
Nožāvējiet gaisā		

Lai uztriepes paraugus uzglabātu vairākus mēnešus, ieteicams tos pārklāt ar ūdeni nesaturošu nostiprināšanas vidi (piem., Neo-Mount™, Entellan™ new vai DPX new) un segstikliņu. Šim nolūkam nokrāsotie priekš-metstikliņi ļoti labi jānožāvē.

Krāsoto priekšmetstikliņu analīzei ar mikroskopa palielinājumu > 40 x ietei-cams izmantot imersijas eļļu.

Histoloģisko paraugu krāsošana

Krāsošana uz krāsošanas statīv

Deparafinizējiet histoloģisko paraugu priekšmetstikliņus, izmantojot standarta metodi, un rehidratējiet ar spirta atšķaidījumu sēriju dilstošā koncentrācijā.

Krāsošanas šķīdumi tiek uzklāti uz priekšmetstikliņiem pa pilienam, un tiem pilnībā jānosedz parafīna daļa.

Lai nodrošinātu optimālu krāsošanas rezultātu, jāievēro norādītie laiki.

Priekšmetstikliņš ar histoloģijas paraugu	
Destilēts ūdens	noskalojiet
Reaģents 1 (auramīna-rodamīna šķīdums)	15 min.
Tekošs krāna ūdens	30 sek.
Reaģents 2 (atkrāsošanas šķīdums)	1 min.
Tekošs krāna ūdens	30 sek.
Reaģents 3 (kontrastējošās krāsas šķīdums)	5 min.
Tekošs krāna ūdens	30 sek.
70% Etanols	1 min.
70% Etanols	1 min.
96% Etanols	1 min.
96% Etanols	1 min.
100% Etanols	1 min.
100% Etanols	1 min.
Ksilēns vai Neo-Clear™	5 min.
Ksilēns vai Neo-Clear™	5 min.
Nostipriniet Neo-Clear™ samitrinātos priekšmetstikliņus ar Neo-Mount™ vai ksilēnā samitrinātos priekšmetsikliņus ar, piem., Entellan™ new un pārklājiet ar segstikliņu.	

Pēc dehidratācijas (spirta atšķaidījumu sērija augošā koncentrācijā) un dzidrināšanas ar ksilēnu vai Neo-Clear™ histoloģijas priekšmetstikliņus var pārklāt ar ūdeni nesaturošiem nostiprināšanas līdzekļiem (piem., Neo-Mount™, Entellan™ new vai DPX new), pārklāt ar segstikliņu un pēc tam uzglabāt.

Rezultāts

Acidorezistentās baktērijas (fluorescences mikroskopā)	sarkanīgi oranžas (rodamīns) vai dzeltenīgi zaļas (auramīns) atkarībā no izmantoto filtru kombinācijas
Fons	tumšs līdz melns

Krāsošana izmeklēšanai ar optisko un fluorescences mikroskopu

Fluorescējošās krāsvielas AFB-Fluor fenolu nesaturošs krāsošanas kom-plekts ir ideāli piemērotas arī acidorezistento baktēriju papildu krāsoša-nai, ja izmeklēšana tiek veikta ar optisko mikroskopu, piem., izmantojot AFB-Color krāsošanas komplekts (kat. nr. 1.16450) vai AFB-Color modificētais (kat. nr. 1.00497).

Izmeklējumam iespējams izmantot nenostiprinātus paraugus, kas krāsoti ar AFB-Fluor fenolu nesaturošs krāsošanas komplekts. Vēlāk pēc imersijas eļļas atlieku, ja tā ir izmantota, rūpīgas likvidēšanas paraugus var krāsot ar AFB-Color krāsošanas komplekts vai AFB-Color modificētais. Šādi apstrādātos paraugos acidorezistentās baktērijas optiskajā mikroskopā izskatās fuksīnsarkanas uz gaiši zaļa (AFB-Color) vai gaiši zila (AFB-Color modificētais) fona.

Novērtējums

Pozitīvs rezultāts nozīmē, ka „ir atklātas acidorezistentās baktērijas” un negatīvs rezultāts nozīmē, ka „nav atklātas acidorezistentās baktērijas”. Pozitīvs rezultāts nenozīmē, ka mikroskopiskajā izmeklēšanā iespējams noteikt taksonomisko klasifikāciju. Ja ir atklātas acidorezistentās baktēri-jas, turpmākās analīzes jāveic īpaši aprīkotās laboratorijās. Nav iespējams noteikt arī baktēriju dzīvotspēju (aktīva, neaktīva).

Ja rezultāts nav pārliecinošs, paraugiem ieteicams veikt papildu krāsošanu, lai izmeklēšanu turpinātu ar optisko mikroskopu, piem., izmantojot AFB-Co-lor krāsošanas komplekts (kat. nr. 1.16450) vai AFB-Color modificētais (kat. nr. 1.00497).

Traucējumu novēršana

Iztriepes paraugu fiksācija

Lai likvidētu paraugu infekciozitāti un novērstu turpmāku baktēriju vairo-šanos, ļoti svarīgi ir pietiekami ilgi fiksēt paraugu ar karstumu, izmantojot Bunsena degli vai karstuma skapi.

Acidorezistentu baktēriju nieekrāsošanā

Krāsošanas pēc kritiskais posms ir atkrāsošana, kuru var ietekmēt iztriepes biežums. Turklāt svaigs sāļsskābes šķīdums etilspirtā ir īpaši reaktīvs, kas nozīmē, ka rezultāts jāvērtē piesardzīgi. Atkrāsošanas darbības laikā precīzi jāievēro šajā protokolā norādītie inkubācijas laiki, pretējā gadījumā var iegūt viltus negatīvus rezultātus.

Pārāk izteikts fona krāsojums

Ja optiskā mikroskopa attēlā fons izskatās pārāk izteikti iekrāsots (tumši zils), reaģents 1 (auramīna-rodamīna šķīdums) ir labāk jāsamazina un pēc tam — labāk jāatkrāso. Tā kā krāsošanas šķīdums ir ļoti viskozs, atkrāsoša-nas darbības laikā ar reaģents 2 (atkrāsošanas šķīdums) priekšmetstikliņu ieteicams rotēt.

Tehniskas piezīmes

Izmantotajam mikroskopam jāatbilst medicīniskās diagnostiskās laboratori-jas prasībām.

Ieteicamā filtru kombinācija fluorescences mikroskopam:

Ierosināšanas filtrs	490 – 570 nm
Krāsu atdalītājs	525 un 635 nm
Emisijas filtrs	505 – 600 nm

Ja izmantojat automātiskās krāsošanas ierīces, ievērojiet iekārtu un prog-rammatūru piegādātāja lietošanas instrukcijas. Pirms uzpildīšanas notīriet imersijas eļļas atliekas.

Analītiskās veikspējas raksturojums

“AFB-Fluor fenolu nesaturošs - krāsošanas komplekts” nokrāso un tādējādi vizualizē bioloģiskās struktūras, kā aprakstīts šīs lietošanas instrukcijas nodaļā “Rezultāts”. Šo izstrādājumu drīkst lietot tikai pilnvarotas un kva-lificētas personas; lietošana ietver (bet ne tikai) paraugu un reaģentu sa-gatavošanu, rīkošanos ar paraugu, histoloģisko paraugu apstrādi, lēmumu pieņemšanu par piemērotu kontroļu uzmantošanu u.c.

Izstrādājuma analītiskā veikspēja ir apstiprināta, pārbaudot katru izstrādā-juma sēriju.

Turpmāk minētajām krāsvielām apstiprinātais izstrādājuma analītiskās veikspējas specifiskums, jutība un atkārtojamība ir 100%:

	Specifis-kums starp analīzes sērijām	Jutīgums starp analī-zes sērijām	Specifis-kums vienā analīzes sērijā	Jutīgums vienā ana-līzes sērijā
Histoloģiski krāsošana				
Acidorezistentās baktērijas (fluorescences mikroskopā)	14/14	14/14	6/6	6/6
Fons	14/14	14/14	6/6	6/6
Iztriepes krāsošana				
Acidorezistentās baktērijas (fluorescences mikroskopā)	14/14	14/14	6/6	6/6
Fons	14/14	14/14	6/6	6/6

Analītiskās veikspējas rezultāti

Datos, kas iegūti, analizējot vienu analīzes sēriju un dažādas analīzes sēri-jas, norādīts pareizi iekrāsoto struktūru skaits attiecībā pret veikto analīžu skaitu.

Klīniskās veikspējas raksturojums

Turklāt šī izstrādājuma klīniskā veikspēja ir veiksmīgi pierādīta daudzās zinātniskajās publikācijās.

AFB-Fluor fenolu nesaturošs - krāsošanas komplekts ir vairākas desmitga-des veiksmīgi un ļoti bieži izmantots klīniskajā vidē.

AFB-Fluor fenolu nesaturošs - krāsošanas komplekts klīniskā veikspēja tika izvērtēta, nosakot analīzes jutīgumu un specifiskumu un tā NPV un PPV uzņēmuma iekšējā pētījumā:

	Krāsošana ar auramīnu-rodamīnu
Jutīgums	14/14
Specifiskums	15/15

Jutīgums: 14 paraugi no 14: 100%
Specifiskums: 15 paraugi no 15: 100%
Pozitīvā prognostiskā vērtība (positive predictive value – PPV): 100%
Negatīvā prognostiskā vērtība (negative predictive value – NPV): 100%

Šie veikspējas novērtējuma rezultāti apstiprina, ka izstrādājums ir piemērots paredzētajam pielietojumam un tā darbība ir uzticama.

Krāsošanas rezultātu diagnostiskā interpretācija tomēr ir jāveic kvalificētiem un pilnvarotiem speciālistiem, ņemot vērā pacienta anamnēzi, morfoloģiju, atbilstošu kontroļu izmantošanu un papildu diagnostiskos izmeklējumus, ja nepieciešams. Šo metodi var izmantot kā papildmetodi diagnozes noteikšanai cilvēkiem.

Diagnostika

Diagnoze jānosaka tikai pilnvarotam un kvalificētam personālam. Jāizmanto apstiprināta terminoloģija. Šo metodi var izmantot kā papildmetodi diagnozes noteikšanai cilvēkiem. Jāizvēlas un jāveic papildu izmeklējumi, izmantojot atzītas metodes.

Katrā lietošanas reizē jāizmanto piemērotas kontroles (piem., ISOSLIDE™ AFB, kat. nr. 1.02560.0001), lai izvairītos no nepareiza rezultāta iegūšanas. Ja rezultāts nav pārliecinošs, paraugiem ieteicams veikt papildu krāsošanu, lai izmeklēšanu turpinātu ar optisko mikroskopu, piem., izmantojot AFB-Color krāsošanas komplekts (kat. nr. 1.16450) vai AFB-Color modificētais (kat. nr. 1.00497).

Uzglabāšana

AFB-Fluor fenolu nesaturošs - krāsošanas komplekts acidorezistento baktēriju izmeklēšanai ar fluorescences mikroskopu (krāsošana ar auramīnu-rodamīnu) uzglabājiet no +15°C līdz +25°C temperatūrā.

Derīguma termiņš

AFB-Fluor fenolu nesaturošs - krāsošanas komplekts acidorezistento baktēriju izmeklēšanai ar fluorescences mikroskopu (krāsošana ar auramīnu-rodamīnu) drīkst lietot līdz norādītajam derīguma termiņam.

Pēc pirmās pudeles atvēršanas tās saturu drīkst lietot līdz norādītajam derīguma termiņam, ja to uzglabā no +15°C līdz +25°C temperatūrā.

Pilinātāju pudeles vienmēr jāuzglabā cieši noslēgtas.

Atrkrāsošanas šķiduma (reaģents 2) krāsa neietekmē krāsošanas procesu un diagnozes noteikšanu.

Ietilpība

Iepakojuma saturs ir pietiekams līdz 60 – 65 lietošanas reizēm vai pat vairāk lietošanas reizēm atkarībā no iztriepju biezuma.

Papildu norādījumi

Tikai profesionālai lietošanai.

Lai izvairītos no kļūdām, lietot drīkst tikai kvalificēts personāls. Jāievēro valsts norādījumi par darba drošību un kvalitātes nodrošināšanu. Jālieto mikroskopi ar standartam atbilstošu aprīkojumu. Ja nepieciešams, izmantojiet standarta centrifūgu, kas piemērota medicīniskām diagnostiskām laboratorijām.

Aizsardzība pret infekcijām

Jāizmanto efektīvi pasākumi aizsardzībai pret infekcijām atbilstoši laboratorijas vadlīnijām.

Norādījumi par likvidēšanu

Iepakojums jālikvidē atbilstoši spēkā esošajām vadlīnijām par likvidēšanu. Izlietotie šķidumi un šķidumi, kuriem beidzies derīguma termiņš, jālikvidē kā speciālie atkritumi atbilstoši vietējām vadlīnijām. Informāciju par likvidēšanu skatiet tīmekļa vietnē www.microscopy-products.com, noklikšķinot uz ātrās saites „Hints for Disposal of Microscopy Products” (Ieteikumi mikroskopiskai izmeklēšanai izmantoto izstrādājumu likvidēšanai). ES šobrīd ir spēkā REGULA (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006.

Papildu reaģenti

Kat. nr.	1.00327	Sālsskābe etilspirtā mikroskopiskai izmeklēšanai	1 l, 5 l
Kat. sz.	1.00496	Formaldehid oldat, 4%-os, pufferolt, pH 6,9 (kb. 10%-os formalin oldat) hisztológiāi cēlra	350 ml és 700 ml (széles nyakú palackban), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Kat. nr.	1.00497	AFB-Color modificētais krāsošanas komplekts acidorezistento baktēriju (AFB) noteikšanai	1 set
Kat. nr.	1.00579	DPX new ūdeni nesaturoša nostiprināšanas vide mikroskopiskai izmeklēšanai	500 ml
Kat. nr.	1.00869	Entellan™ new segstikļiem mikroskopiskai izmeklēšanai	500 ml
Kat. nr.	1.02560	ISOSLIDE™ AFB kontroles priekšmetstikļiņus ar atsaucēs audiēm acidorezistento baktēriju noteikšanai histolóģiskajos paraugos	25 tests
Kat. sz.	1.03999	Formaldehidoldat, min. 37%-os, savmentes kb. 10% metanollal és kalcium-karbonáttal stabilizálva, hisztológiāi cēlra	1 l, 2,5 l, 25 l
Kat. nr.	1.04699	Imersijas eļļa mikroskopiskai izmeklēšanai	100 ml pilināšanas pudele, 100 ml, 500 ml

Kat. sz.	1.07164	Paraffin, pasztilla dermedéspont kb. 56-58°C, hisztológiāi cēlra	10 kg (4x 2,5 kg)
Kat. nr.	1.07961	Entellan™ new ātrās nostiprināšanas vide mikroskopiskai izmeklēšanai	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. nr.	1.08000	Sputofluo!™ mikroskopiskai izmeklēšanai	1 l
Kat. nr.	1.08298	Ksilēns (izomēru maisījums) histolóģiskai izmeklēšanai	4 l
Kat. nr.	1.09016	Neo-Mount™ ūdeni nesaturoša nostiprināšanas vide mikroskopiskai izmeklēšanai	100 ml pilināšanas pudele, 500 ml
Kat. nr.	1.09843	Neo-Clear™ (ksilēna aizvietotājs) mikroskopiskai izmeklēšanai	5 l
Kat. sz.	1.11609	Histosec™ pasztilla dermedéspont 56-58°C, hisztológiāi beāgyazóanyag	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Kat. sz.	1.15161	Histosec™ pasztilla (DMSO nélkül) dermedéspont 56-58°C, hisztológiāi beāgyazóanyag	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Kat. nr.	1.16450	AFB-Color krāsošanas komplekts acidorezistento baktēriju (AFB) mikroskopiskai izmeklēšanai (aukstā krāsošana)	1 set

Bīstamības klasifikācija

Kat. nr. 1.01597.0001

Lūdzu, ievērojiet marķējumā norādīto bīstamības klasifikāciju un drošības datu lapā sniegto informāciju. Drošības datu lapa ir pieejama tīmekļa vietnē un pēc pieprasījuma.

Galvenās izstrādājumus sastāvdaļas

Kat. nr. 1.01597.0001

Reaģents 1	
C.I. 41000	12,0 g/l
C.I. 45170	6,0 g/l
1 l = 1,117 kg	

Reaģents 2	
C ₃ H ₈ O	543,3 g/l
Min. 37% HCl	15,7 g/l
1 l = 0,878 kg	

Reaģents 3	
KMnO ₄	5,0 g/l
1 l = 1,013 kg	

Vispārēja piezīme

Ja šīs ierīces lietošanas laikā vai lietošanas rezultātā rodas nopietns negadījums, ziņojiet par to ražotājam un/vai tā pilnvarotajam pārstāvim, kā arī vietējai regulējošai iestādei.

Literatūra

- Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
- Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
- Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
- Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Viegli uzliesmojošs šķidrums un tvaiki.
H290: Var kodīgi iedarboties uz metāliem.
H319: Izraisa nopietnu acu kairinājumu.
H336: Var izraisīt miegainību vai reiboņus.
H411: Toksisks ūdens organismiem ar ilgstošām sekām.

P210: Sargāt no karstuma, karstām virsmām, dzirkstelēm, atklātas uguns un citiem aizdegšanās avotiem. Nesmēķēt.
P233: Tvertni stingri noslēgt.
P234: Turēt tikai oriģināliepakojumā.
P240: Tvertnes un saņēmējiekārtas iezemēt un savienot.
P273: Izvairīties no izplatīšanas apkārtējā vidē.
P305 + P351 + P338: SASKARĒ AR ACĪM: Uzmanīgi izskalo! ar ūdeni vairākas minūtes. Izņem kontaktlēcas, ja tās ir ievietotas un ja to var vienkārši izdarīt. Turpināt skalo!.

Reaģents 1:
H226: Uzliesmojošs šķidrums un tvaiki.
H319: Izraisa nopietnu acu kairinājumu.

Reaģents 2:
H225: Viegli uzliesmojošs šķidrums un tvaiki.
H290: Var kodīgi iedarboties uz metāliem.
H319: Izraisa nopietnu acu kairinājumu.
H336: Var izraisīt miegainību vai reibošus.

Reaģents 3:
H411: Toksisks ūdens organismiem ar ilgstošām sekām.

Pārskatījumu vēsture

Versija	Izmaiņu komentārs
2024-Jul-19	Sākotnējā versija ar pārskatījumu vēstures pievienošanu



Skatīt lietošanas instrukciju



Ražotājs



Kataloga numurs



Sērijas kods



Uzmanību! Skatīt pievienotos dokumentus



Izlietot līdz
GGGG-MM-DD



Temperatūras ierobežojums

Status: 2024-Jul-19

1.01597.0001 **REF**

Mikroskopija

AFB-Fluor dažymo rinkinys be fenolio,

skirtas tirti rūgštims atsparias bakterijas fluorescenciniu mikroskopu (Auramin-Rhodamine dažymas)

Tik profesionaliam naudojimui

IVD*In vitro* diagnostikos medicinos priemonė

Numatytoji paskirtis

Šis „AFB-Fluor dažymo rinkinys be fenolio, - skirtas tirti rūgštims atsparias bakterijas fluorescenciniu mikroskopu (Auramin-Rhodamine dažymas)“ naudojamas žmogaus ir medicininių ląstelių diagnostikai ir skirtas bakteriologiniam, citologiniam ir histologiniam žmogaus kilmės mėginio medžiagos tyrimui. Tai paruoštas naudoti dažymo rinkinys, kurį naudojant kartu su kitais *in vitro* diagnostikos produktais iš mūsų asortimento, tikslinės bakterijų struktūros gali būti vertinamos diagnostikos tikslais (rūgštims atsparios bakterijos (AFB)) fiksuojant, įterpiant, dažant, kontrastuojant, dengiant bakteriologinių, citologinių ir histologinių mėginių medžiagose, pavyzdžiui, praturtintų bakterijų kultūrų tepinėliuose arba histologiniuose pjūviuose, pvz., plaučių.

AFB-Fluor dažymo rinkinys be fenolio esminė savybė yra ta, kad dažymo tirpale yra fluorescencinių dažiklių. Tai leidžia greitai ir saugiai identifikuoti rūgštims atsparias bakterijas fluorescenciniu mikroskopu. Be to, dažomasis tirpalas ruošiamas nenaudojant potencialiai pavojingo fenolio, todėl padidėja naudotojo saugumas.

Šis dažymo rinkinys tiekiamas paruoštas naudoti praktiškuose lašinuose buteliukuose ir jame yra visi reagentai, reikalingi rūgštims atsparių bakterijų dažymui tepinėliuose ir histologiniuose audinių mėginiuose.

Nedažytos struktūros yra palyginti mažai kontrastingos ir jas labai sunku atskirti šviesiniu mikroskopu. Vaizdai, sukurti naudojant dažymo tirpalus, padeda įgaliotam ir kvalifikuotam tyrėjui tokiais atvejais geriau nustatyti formą ir struktūrą. Tam, kad būtų nustatyta galutinė diagnozė, reikia atlikti papildomus tyrimus taikant pripažintus ir galiojančius metodus.

Principas

Klasikinis Ziehl-Neelsen metodas paremtas tuo, kad ląstelės sienelėje yra daug vaško ir lipidų, o rūgštims atsparios bakterijos labai lėtai įsisavina dažomuosius preparatus. Siekiant padidinti fukso dažiklio absorbciją ir taip padidinti mikolato-fukso kompleksą susidarymą ląstelės sienelėje, dažomasis tirpalas, kuriuo dažomas mėginys, paprastai kaitinamas iki garavimo temperatūros.

Kai rūgštims atsparios bakterijos absorbuoja fukso dažiklį, jų spalvos panaikinti praktiškai neįmanoma, net jei jos intensyviai apdorojamos spalvos naikintojo tirpalu, pavyzdžiui, druskos rūgštimi etanolyje. Atitinkamai rūgštims atsparios bakterijos dažymo tikslais vadinamos rūgštims ir alkoholiui atspariomis bakterijomis.

Naudojant AFB-Fluor dažymo rinkinius be fenolio, AFB-Fluor dažymo be fenolio tirpale naudojant fluorescencinius dažus auraminą ir rodaminą, kaitinimo etapas nereikalingas. Šie dažai nusėda ant rūgštims atsparių bakterijų ląstelės sienelės, priklausomai nuo mikroskopo filtro, juodame fone atrodo geltoni arba raudoni.

Pirminis mėginių apdorojimas Sputofluor™ ištirpina bakterijas iš jas supančios klampio skreplių ir ląstelių medžiagos.

Mėginių medžiaga

Bakteriologinės medžiagos tepinėliai, išdžiovinti ore ir termiškai fiksuoti ir iš anksto apdoroti Sputofluor™, pavyzdžiui, skrepliai, plonos adatos aspiracinės biopsijos (FNAB) tepinėliai, plovimai, įspaudai, efuzijos, pūliai, eksudatai, skystos ir kietos kultūros

Formalinu fiksuoto žmogaus kilmės audinio pjūviai, įterpti į parafiną (3–4 µm storio parafino pjūviai)

Reagentai

Kat. Nr. 1.01597.0001

AFB-Fluor dažymo rinkinys be fenolio, skirtas tirti rūgštims atsparias bakterijas fluorescenciniu mikroskopu (Auramin-Rhodamine dažymas)

Pakuotės komponentai:

Dažymo rinkinio sudėtis

Reagentas 1: Auramino-rodamino tirpalas 200 ml
Reagentas 2: Spalvos šalinimo tirpalas 2 x 200 ml
Reagentas 3: Kontrastavimo tirpalas (KMnO₄) 200 ml

Taip pat reikalinga:

Kat. Nr. 1.08000 Sputofluor™ mikroskopijai

1 |

Mėginių paruošimas

Mėginius turi paimti kvalifikuoti darbuotojai.

Visi mėginiai turi būti apdorojami naudojant pažangiausias technologijas.

Visi mėginiai turi būti aiškiai sužymėti.

Mėginiams imti ir ruošti turi būti naudojami tinkami instrumentai. Laikykites gamintojo pateiktų taikymo ir naudojimo instrukcijų.

Naudojant atitinkamus pagalbinus reagentus, būtina laikytis atitinkamų naudojimo instrukcijų.

Skrepliai

Rūgštims atsparias bakterijas reikia iš pradžių apdoroti Sputofluor™, kad jos ištirtų iš gleivių ir ląstelių struktūrų. Šio proceso metu veikioji medžiaga hipochloritas oksidacijos būdu ištirpina organinę medžiagą ir iš lėto išlaisvina rūgštims atsparias bakterijas, kad jas būtų galima toliau apdoroti.

Reagento paruošimas: Sputofluor™ 15 % tirpalo paruošimas

Norėdami paruošti apie 100 ml tirpalo, sumaišykite:

Sputofluor™	15 ml
Distiliuotas vanduo	85 ml

Mėginio medžiagos paruošimas centrifugavimo mėgintuvėliuose:	
Mėginys	1 dalis (min. 2 ml)
Sputofluor™ tirpalas (15 % distiliuotame vandenyje)	3 dalys
Stipriai suplakite	10 min
Centrifuguokite 3000 - 4800 suk./min	20 min
Dekantuokite supernatantą Paruoškite nuosėdų tepinėlius Džiovinkite ore	

Punktatai, lavažai, nuosėdos

Panaudoję atitinkamas sodrinimo priemones, užtepkite mėginio medžiagą ant stiklelio ir leiskite išdžiūti ore.

Tepinėlių mėginių fiksavimas

Ėminiai fiksuojami virš Bunseno degiklio liepsnos (2–3 kartus, stengiantis išvengti per didelio kaitinimo).

Ėminius taip pat galima fiksuoti 20 min kaitinant džiovinimo spintoje arba ant kaitinimo plokštelės 100–110 °C temperatūroje.

Dėl per aukštos temperatūros arba ilgo kaitinimo gali pablogėti dažymo savybės.

Histologiniai pjūviai

AFB-Fluor dažymo rinkinys be fenolio gali būti naudojamas histologiniams pjūviams dažyti.

Deparafinuokite pjūvius įprastiniu būdu ir rehidratuokite mažėjančioje alkoholio serijoje.

Tepinėlių mėginių fiksavimas

Ėminiai fiksuojami virš Bunseno degiklio liepsnos (2–3 kartus, stengiantis išvengti per didelio kaitinimo).

Ėminius taip pat galima fiksuoti 20 min kaitinant džiovinimo spintoje arba ant kaitinimo plokštelės 100–110 °C temperatūroje.

Dėl per aukštos temperatūros arba ilgo kaitinimo gali pablogėti dažymo savybės.

Reagentų paruošimas

Dažymo reagentai iš AFB-Fluor dažymo rinkinys be fenolio, - skirtas tirti rūgštims atsparias bakterijas fluorescenciniu mikroskopu (Auramin-Rhodamine dažymas), yra paruošti naudoti, tirpalų skiesti nereikia, dėl to tik pablogėja dažymo rezultatas ir jų stabilumas.

Dėl didelio klampumo dažomąjį tirpalą be fenolio, kuriame nėra auramino ir rodamino (reagentas 1), prieš naudojimą reikia stipriai suplakti.

Procedūra

Tepinėlių mėginių dažymas

Dažymas ant dažymo stovo

Stiklelis su fiksuotu tepinėliu		
Reagentas 1 (auramino-rodamino tirpalas)	lašinkite po lašelį, visiškai uždenkite ir dažykite	15 min
Tekantis vanduo iš čiaupo	atidžiai skalaukite	30 sek

Reagentas 2 (spalvos šalinimo tirpalas)	lašinkite po lašelį, visiškai uždenkite ir palikite, kad vyktų reakcija	1 min
Tekantis vanduo iš čiaupo	atidžiai skalaukite	30 sek
Reagentas 3 (kontrastavimo tirpalas)	lašinkite po lašelį, visiškai uždenkite ir dažykite	5 min
Tekantis vanduo iš čiaupo	atidžiai skalaukite	30 sek
Džiovinkite ore		

Tepinėlių mėginių rekomenduojama uždengti ne vandenine dengimo terpe (pvz., Neo-Mount™, Entellan™ new arba DPX new) ir uždengti dengiamuoju stiklu, jei norite juos laikyti kelis mėnesius. Jei ketinate tai daryti, nudažytus ėminius reikia labai gerai išdžiovinti.

Analizuojant dažytus stiklelius, kurių mikroskopinis didinimas >40x, rekomenduojama naudoti imersinę alyvą.

Histologinių mėginių dažymas

Dažymas ant dažymo stovo

Deparafinuokite histologinius stiklelius įprastiniu būdu ir rehidratuokite mažėjančioje alkoholio serijoje.

Dažymo tirpalai lašinami ant stiklelių ir turi visiškai uždengti parafino sekciją

Norint užtikrinti optimalų dažymo rezultatą, reikia laikytis nurodyto laiko.

Stiklelis su histologiniu audiniu	
Distiliuotas vanduo	skalaukite
Reagentas 1 (auramino-rodaminio tirpalas)	15 min
Tekantis vanduo iš čiaupo	30 sek
Reagentas 2 (spalvos šalinimo tirpalas)	1 min
Tekantis vanduo iš čiaupo	30 sek
Reagentas 3 (kontrastavimo tirpalas)	5 min
Tekantis vanduo iš čiaupo	30 sek
Etanolis 70 %	1 min
Etanolis 70 %	1 min
Etanolis 96 %	1 min
Etanolis 96 %	1 min
Etanolis 100 %	1 min
Etanolis 100 %	1 min
Ksileno arba Neo-Clear™	5 min
Ksileno arba Neo-Clear™	5 min
Uždenkite Neo-Clear™ sudrėkintus stiklelius su Neo-Mount™ arba ksilenu sudrėkintus stiklelius su, pvz., Entellan™ new ir dengiamuoju stikleliu.	

Po dehidracijos (didėjančia alkoholio serija) ir nuskaidrinimo ksilenu arba Neo-Clear™, histologinius stiklelius galima dengti bevandenėmis dengimo medžiagomis (pvz., Neo-Mount™, Entellan™ new arba DPX new) ir dengiamuoju stikleliu, o po to padėti laikyti.

Rezultatas

Rūgštims atsparios bakterijos (fluorescencinė mikroskopija)	raudona-oranžinė (rodaminas) arba geltona-žalia (auraminas), priklausomai nuo naudojamų filtrų derinio
Fonas	nuo tamsaus iki juodo

Dažymas optinei ir fluorescencinei mikroskopijai

Fluorescencinis dažymas naudojant AFB-Fluor dažymo rinkinys be fenolio taip pat idealiai tinka papildomam rūgštims atsparių bakterijų dažymui diagnozuojant optiniu mikroskopu, pvz., naudojant AFB-Color dažymo rinkinys (Kat. Nr. 1.16450) arba AFB-Color modifikuotas (Kat. Nr. 1.00497).

Nepadengtus ėminius, nudažytus AFB-Fluor dažymo rinkinys be fenolio, galima tiesiogiai naudoti diagnostikos tikslais. Vėliau, kruopščiai pašalinus galimai naudotą panardinimo aliejų, ėminius galima toliau dažyti naudojant AFB-Color dažymo rinkinys arba AFB-Color modifikuotas.

Taip apdorotame ėminyje per optinį mikroskopą šviesiai žaliame (AFB-Color) arba šviesiai mėlyname (AFB-Color modifikuotas) fone rūgštims atsparios bakterijos atrodo purpurinės-raudonos spalvos.

Vertinimas

Teigiamas rezultatas reiškia „rūgštims atsparių bakterijų aptikta“, o neigiamas – „rūgštims atsparių bakterijų neaptikta“. Teigiamas rezultatas nereiškia, kad mikroskopuojant galima nustatyti taksonominę klasifikaciją. Jei aptinkama rūgštims atsparių bakterijų, tolesni tyrimai turi būti atliekami specialiai įrengtose laboratorijose.

Taip pat negalima nustatyti bakterijų gyvybingumo (aktyvios, neaktyvios). Jei rezultatas nėra įtikinamas, rekomenduojama ėminius papildomai nudažyti, kad būtų galima atlikti tolesnę optinę mikroskopinę diagnostiką, pvz., naudojant AFB-Color dažymo rinkinys (Kat. Nr. 1.16450) arba AFB-Color modifikuotas (Kat. Nr. 1.00497).

Trikčių šalinimas

Tepinėlių mėginių fiksavimas

Norint išvengti ėminių infekcinio potencialo ir tolesnio bakterijų dauginimosi, būtina juos pakankamai termiškai fiksuoti naudojant Bunseno degiklį arba kaitinimo spintoje.

Rūgštims atsparios bakterijos nenusidažo

Dažymo procedūros etapas yra spalvos šalinimo etapas, kuriam įtakos gali turėti tepinėlio storis.

Be to, šviežias druskos rūgšties tirpalas etanolyje yra labai reaktyvus, todėl rezultatą reikia vertinti atsargiai. Šiame protokole nurodytas inkubavimo laikas turi būti tiksliai išlaikytas spalvos naikinimo etape, nes priešingu atveju gali būti gauti klaidingai neigiami rezultatai.

Per stiprus fono nudažymas

Jei optiniame mikroskopiniame vaizde fonas yra per stipriai nudažytas (tamsiai mėlynas), reagentas 1 (auramino ir rodaminio tirpalą) reikia geriau sumaišyti ir vėliau geriau pašalinti spalvą. Kadangi dažomasis tirpalas yra labai klampus, rekomenduojama spalvos šalinimo etapo metu, kai naudojamas reagentas 2 (spalvos šalinimo tirpalas) pasukti stiklelį.

Techninės pastabos

Naudojamas mikroskopas turi atitikti medicininės diagnostikos laboratorijos reikalavimus.

Rekomenduojamas filtrų derinys fluorescencinei mikroskopijai:

Sužadinimo filtras	490–570 nm
Spalvos atskyrimo	525 ir 635 nm
Emisijos filtras	505–600 nm

Naudodami automatinės dažymo sistemas, laikykitės sistemos ir programinės įrangos tiekėjo pateiktų naudojimo instrukcijų.

Prieš pildami pašalinkite imersinės alyvos perteklių.

Analitinio veiksmingumo savybės

„AFB-Fluor dažymo rinkinys be fenolio“ nudažo ir taip vizualizuoja biologines struktūras, kaip aprašyta šios naudojimo instrukcijos skytyje „Rezultatai“. Gaminį gali naudoti tik įgalioti ir kvalifikuoti asmenys, įskaitant, be kita ko, mėginių ir reagentų ruošimą, mėginių tvarkymą, histologinį apdorojimą, sprendimus dėl tinkamų kontrolės priemonių ir kt.

Gaminio analitinis veiksmingumas patvirtinamas tiriant kiekvieną pagamintą partiją.

Toliau išvardytiems dažymo atvejams gaminio specifiškumo, jautrumo ir pakartojamumo analitinis veiksmingumas buvo patvirtintas 100 %:

	Tyrimų tarpusavio specifiškumas	Tyrimų tarpusavio jautrumas	Tyrimo vidinis specifiškumas	Tyrimo vidinis jautrumas
Histologinis dažymas				
Rūgštims atsparios bakterijos (fluorescencinė mikroskopija)	14/14	14/14	6/6	6/6
Fonas	14/14	14/14	6/6	6/6
Tepinėlių dažymas				
Rūgštims atsparios bakterijos (fluorescencinė mikroskopija)	14/14	14/14	6/6	6/6
Fonas	14/14	14/14	6/6	6/6

Analitinio veiksmingumo rezultatai

Duomenys apie teisingai nudažytų struktūrų skaičių, palyginti su atliktų tyrimų skaičiumi, pateikiami tyrimo viduje (su ta pačia partija) ir tarp tyrimų (su skirtingomis partijomis).

Klinikinio veiksmingumo savybės

Be to, šio gaminio klinikinis veiksmingumas sėkmingai įrodytas daugelyje mokslinių publikacijų.

AFB-Fluor dažymo rinkinys be fenolio ištisus dešimtmečius sėkmingai ir įvairiai naudojamas klinikinėje praktikoje.

Klinikinis AFB-Fluor dažymo rinkinys veiksmingumas buvo nustatytas atlikus vidinį tyrimą ir nustačius jo jautrumą ir specifiškumą bei jo NPV ir PPV nustatymą:

	Dažymas auraminu-rodaminu
Jautrumas	14/14
Specifiškumas	15/15

Jautrumas: 14 mėginių iš 14: 100 %
Specifiškumas: 15 mėginių iš 15: 100 %
Prognostinė teigiamo testo vertė (PPV): 100 %
Prognostinė neigiamo testo vertė (NPV): 100 %

Šio veiksmingumo vertinimo rezultatai patvirtina, kad gaminys yra tinkamas naudoti pagal paskirtį ir veikia patikimai.

Tačiau diagnostinę dažymo rezultatų interpretaciją turi atlikti kvalifikuoti ir įgalioti specialistai, atsižvelgdami į paciento anamnezę, morfologiją, tinkamą kontrolę ir, jei reikia, papildomus diagnostinius tyrimus. Šis metodas gali būti papildomai naudojamas žmonių diagnostikai.

Diagnostika

Diagnozę turi nustatyti tik įgalioti ir kvalifikuoti darbuotojai. Turi būti naudojamos tinkamos klasifikacijos. Šis metodas gali būti papildomai naudojamas žmonių diagnostikai. Papildomi tyrimai turi būti parenkami ir atliekami pagal pripažintus metodus. Kad būtų išvengta neteisingų rezultatų, kiekvieno naudojimo metu turėtų būti taikomi tinkami kontrolės metodai (pvz., ISOSLIDE™ AFB, Kat. Nr. 1.02560.0001). ei rezultatas nėra įtikinamas, rekomenduojama ėminius papildomai nudažyti, kad būtų galima atlikti tolesnę optinę mikroskopinę diagnostiką, pvz., naudojant AFB-Color dažymo rinkinys (Kat. Nr. 1.16450) arba AFB-Color modifikuotas (Kat. Nr. 1.00497).

Laikymas

Laikykite AFB-Fluor dažymo rinkinys be fenolio, - skirtas tirti rūgštims atsparias bakterijas fluorescenciniu mikroskopu (Auramin-Rhodamine dažymas) nuo +15 °C iki +25 °C temperatūroje.

Tinkamumo laikas

AFB-Fluor dažymo rinkinys be fenolio, - skirtas tirti rūgštims atsparias bakterijas fluorescenciniu mikroskopu (Auramin-Rhodamine dažymas) galima naudoti iki nurodyto tinkamumo naudoti termino pabaigos. Pirmą kartą atidarius buteliuką, laikant nuo +15 °C iki +25 °C temperatūroje, turinį galima naudoti iki nurodyto tinkamumo naudoti termino pabaigos. Lašinimo buteliukai visada turi būti sandariai uždaryti. Spalvos šalinimo tirpalo (reagentas 2) nuspalvinimas neturi įtakos dažymo procesams ir diagnostikai.

Išėiga

Pakuotės užtenka iki 60–65 panaudojimų. Išėiga gali būti dar didesnė, priklausomai nuo tepinėlių storio.

Papildomos instrukcijos

Tik profesionaliam naudojimui. Tam, kad būtų išvengta klaidų, naudoti turi tik kvalifikuotas personalas. Būtina laikytis nacionalinių darbo saugos ir kokybės užtikrinimo gairių. Turi būti naudojami pagal standartus įrengti mikroskopai. Jei reikia, naudokite standartinę centrifugą, tinkamą medicinos diagnostikos laboratorijai.

Apsauga nuo infekcijos

Reikia imtis veiksmingų priemonių apsisaugoti nuo infekcijos pagal laboratorijos rekomendacijas.

Šalinimo instrukcijos

Pakuotę reikia išmesti laikantis galiojančių šalinimo gairių. Panaudoti tirpalai ir tirpalai, kurių tinkamumo naudoti terminas pasibaigęs, turi būti šalinami kaip specialiosios atliekos pagal vietos gaires. Informacijos apie šalinimą galima rasti pasinaudojus greitąja nuoroda „Hints for Disposal of Microscopy Products“ adresu www.microscopy-products.com. ES taikomas šiuo metu galiojantis REGLAMENTAS (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis Direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006.

Pagalbiniai reagentai

Kat. Nr.	1.00327	Druskos rūgštis etanolyje mikroskopijai	1 l, 5 l
Kat. Nr.	1.00496	Formaldehido tirpalas 4 %, buferinis, pH 6,9 (maždaug 10 % formalino tirpalas) histologijai	350 ml ir 700 ml (buteliuke su plačiu kakleliu), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Kat. Nr.	1.00497	AFB-Color modifikuotas dažymo rinkinys rūgštims atsparių bakterijų (AFB) aptikimui karšto dažymo metodu	1 set
Kat. Nr.	1.00579	DPX new nevandeninė dengimo terpė mikroskopijai	500 ml
Kat. Nr.	1.00869	Entellan™ new dangteliui, skirtas mikroskopijai	500 ml
Kat. Nr.	1.02560	ISOSLIDE™ AFB kontrolinių stiklėlių su etaloniniu audiniu nustatant rūgštims atsparias bakterijas histologiniame audinyje	25 tests
Kat. Nr.	1.03999	Formaldehido tirpalas min. 37 %, be rūgšties, stabilizuotas su maždaug 10 % metanolio ir kalcio karbonato, skirtas histologijai	1 l, 2,5 l, 25 l
Kat. Nr.	1.04699	Imersinė alyva, skirta mikroskopijai	100 ml lašinimo buteliukas, 100 ml, 500 ml

Kat. Nr.	1.07164	Parafino pastilių kietėjimo temperatūra apie 56–58 °C histologiniams tyrimams	10 kg (4x 2,5 kg)
Kat. Nr.	1.07961	Entellan™ new greito dengimo terpė mikroskopijai	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. Nr.	1.08000	Sputofluol™ mikroskopijai	1 l
Kat. Nr.	1.08298	Ksilenas (izomerinis mišinys) histologijai	4 l
Kat. Nr.	1.09016	Neo-Mount™ bevandenė dengimo terpė mikroskopijai	100 ml lašinimo buteliukas, 500 ml
Kat. Nr.	1.09843	Neo-Clear™ (ksileno pakaitalas) mikroskopijai	5 l
Kat. Nr.	1.11609	Histosec™ pastilių, kietėjimo temperatūra 56–58 °C, įterpimo medžiaga histologijai	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Kat. Nr.	1.15161	Histosec™ pastilių (be DMSO), kietėjimo temperatūra 56–58 °C, įterpimo medžiaga histologijai	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Kat. Nr.	1.16450	AFB-Color dažymo rinkinys rūgštims atsparių bakterijų (AFB) mikroskopiniam tyrimui (šaltasis dažymas)	1 set

Pavojingumo klasifikacija

Kat. Nr. 1.01597.0001
Laikykites etiketėje išspausdintos pavojingumo klasifikacijos ir saugos duomenų lape pateiktos informacijos. Saugos duomenų lapą galima rasti svetainėje arba specialiai paprašyti.

Pagrindiniai gaminių komponentai

Kat. Nr. 1.01597.0001	
Reagentas 1	
C.I. 41000	12,0 g/l
C.I. 45170	6,0 g/l
1 l =	1,117 kg
Reagentas 2	
C ₃ H ₈ O	543,3 g/l
HCl min. 37 %	15,7 g/l
1 l =	0,878 kg
Reagentas 3	
KMnO ₄	5,0 g/l
1 l =	1,013 kg

Bendro pobūdžio pastaba

Jei naudojant šią priemonę arba dėl jos naudojimo įvyko rimtas incidentas, praneškite apie tai gamintojui ir (arba) jo įgaliotajam atstovui bei savo šalies kompetentingai institucijai.

Literatūra

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Labai degūs skystis ir garai.
H290: Gali ėsdinti metalus.
H319: Sukelia smarkų akių dirginimą.
H336: Gali sukelti mieguistumą arba galvos svaigimą.
H411: Toksiška vandens organizmams, sukelia ilgalaikius pakitimus.

P210: Laikyti atokiau nuo šilumos šaltinių, karštų paviršių, žiežirbų, atviros liepsnos ir kitų uždegimo šaltinių. Nerūkyti.
P233: Talpyklą laikyti sandariai uždarytą.
P234: Laikyti tik originalioje pakuotėje.
P240: Įžeminti ir įtvirtinti talpyklą ir priėmimo įrangą.
P273: Saugoti, kad nepatektų į aplinką.
P305 + P351 + P338: PATEKUS Į AKIS: atsargiai plauti vandeniu kelias minutes. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis.

Reagentas 1:
H226: Degūs skystis ir garai.
H319: Sukelia smarkų akių dirginimą.

Reagentas 2:
H225: Labai degūs skystis ir garai.
H290: Gali ėsdinti metalus.
H319: Sukelia smarkų akių dirginimą.
H336: Gali sukelti mieguistumą arba galvos svaigimą.

Reagentas 3:
H411: Toksiška vandens organizmams, sukelia ilgalaikius pakitimus.

Peržiūrų istorija

Versija	Pakeitimo komentaras
2024-Jul-19	Pradinė versija su peržiūrų istorijos įžanga



Žiūrėkite naudojimo instrukciją



Gamintojas



Katalogo numeris



Partijos kodas



Perspėjimas, susipažinkite su pridėtais dokumentais



Naudoti iki
MMMM-MM-DD



Temperatūros apribojimas

Status: 2024-Jul-19

„Merck“ Life Science verslas JAV ir Kanadoje veikia pavadinimu „MilliporeSigma“.

© 2024 „Merck KGaA“, Darmštatas, Vokietija ir (arba) jos filialai. Visos teisės saugomos. „Merck“ ir „Sigma-Aldrich“ yra „Merck KGaA“, Darmštatas, Vokietija, prekių ženklai. Visi kiti prekių ženklai yra jų atitinkamų savininkų nuosavybė. Išsamios informacijos apie prekių ženklus galima rasti viešai prieinamuose šaltiniuose.

1.01597.0001 **REF**

Mikroskopi

AFB-Fluor fenolfri

Farging kit for undersøkelse av syre-rask bakterier med fluorescens mikroskopi (Auramin-Rhodamine farging)

Kun til profesjonell bruk

Medisinsk enhet til *in vitro*-diagnostikk

Tiltenkt formål

Denne "AFB-Fluor fenolfri – Farging kit for undersøkelse av syre-rask bakterier med fluorescens mikroskopi (Auramin-Rhodamine farging)" brukes til medisinsk cellediagnostisering hos mennesker og bidrar til bakteriologisk, cytologisk og histologisk undersøkelse av prøvemateriale fra mennesker. Det er et bruksklart fargingssett som, når det brukes sammen med andre produkter til *in vitro*-diagnostikk fra vår portefølje, gjør at bakterielle målstrukturer kan evalueres til diagnostiske formål (syrefaste bakterier (AFB)) ved hjelp av fiksering, farging, kontrastfarging, montering i bakteriologiske og bakteriologiske, cytologiske og histologiske prøvematerialer, for eksempel utstryk av anrikede bakteriekulturer eller histologiske snitt fra f.eks. lungen.

Den viktigste egenskapen til AFB-fluor fenolfri farging kit er tilstedeværelsen av fluorescerende fargestoff i fargingsløsningen. Dette muliggjør rask og sikker identifisering av de syrefaste bakteriene under fluorescensmikroskopet. I tillegg tilberedes fargingsløsningen uten potensielt farlig fenol, noe som gir økt sikkerhet for brukeren.

Dette fargingssettet leveres klart til bruk i praktiske pipetteflasker og inneholder alle reagensene som kreves for farging av syrefaste bakterier i utstryk og i histologiske vevsprøver.

Ufargede strukturer har relativt lav kontrast og er ekstremt vanskelige å skjelne under lysmikroskopet. Bildene som opprettes ved bruk av fargingsløsningene hjelper den autoriserte og kvalifiserte forskeren med bedre å definere formen og strukturen i slike tilfeller. Ytterligere tester må utføres i samsvar med anerkjente, gyldige metoder for å oppnå en definitiv diagnose.

Prinsipp

Den klassiske Ziehl-Neelsen-metoden velges grunnet den høye andelen av voks og lipider i celleveggen, siden syrefaste bakterier kun tar opp fargestoffer veldig langsomt. Som et tiltak for å forbedre opptaket av fuksinfargestoff og dermed dannelsen av mykolat-/fuksinkomplekset i celleveggen, blir fargingsløsningen som påføres prøven normalt varmet opp til fordampingspunktet.

Når de syrefaste bakteriene har absorbert fuksinfargestoffet, er det så godt som umulig å avfarge dem igjen, selv når de behandles intensivt med en avfargingsløsning som f.eks. saltsyre i etanol. Syrefaste bakterier betegnes derfor som syre- og alkoholfaste for farging.

Ved bruk av AFB-fluor fenolfri farging kit gjør bruken av de fluorescerende fargestoffene auramin og rhodamin i AFB-fluor fenolfri fargingsløsning at oppvarmingstrinnet blir overflødig. Disse fargestoffene fester seg på celleveggen i de syrefaste bakteriene og vises i gult eller rødt mot en svart bakgrunn (avhengig av mikroskopfilteret). Forbehandling av prøvene med Sputofluo™ løser opp bakteriene fra det omgivende tykke sputum og cellematerialet.

Prøvemateriale

Utstryk av bakteriologisk materiale som er lufttørket og varmefiksert og forbehandles med Sputofluo™ som sputum, utstryk fra biopsi med fin nål-spirasjon (FNAB), skyllinger, avtrykk, effusjoner, puss, sårveske, væske og solide kulturer

Snitt av formalinfiksert vev fra mennesker, parafinnstøpt (3–4 µm tykke parafinsnitt)

Reagenser

Kat.nr. 1.01597.0001
AFB-Fluor phenol-free
Staining kit for the examination of acid-fast bacteria with fluorescence microscopy (Auramin-Rhodamine staining)

Komponenter i pakningen:

Fargingssettet inneholder

Reagens 1: Auramin-rhodaminløsning 200 ml
Reagens 2: Avfargingsløsning 2 x 200 ml
Reagens 3: Kontrastfargingsløsning (KMnO₄) 200 ml

Også påkrevet:

Kat.nr. 1.08000 Sputofluo™
for mikroskopi

Prøvetilberedning

Prøvetakingen skal utføres av kvalifisert personell.

Alle prøver skal behandles ved bruk av den nyeste teknologien.

Alle prøver skal merkes tydelig.

Egnede instrumenter skal brukes for å ta og tilberede prøver. Følg instruksjonene fra produsenten for applisering/bruk.

Ved bruk av de tilsvarende hjelpereagensene må den tilsvarende bruksanvisningen følges.

Sputum

De syrefaste bakteriene skal forbehandles med Sputofluo™ for å løse dem opp fra slim og cellestrukturer. I denne prosessen løser virkestoffet hypokloritt opp det organiske materialet ved hjelp av oksidering og frigjør varsomt de syrefaste bakteriene slik at de kan behandles ytterligere.

Tilberedning av reagens: Tilberedning av Sputofluo™-løsning 15 %

For tilberedning av ca. 100 ml løsningsblanding:

Sputofluo™	15 ml
Destillert vann	85 ml

Tilberedning av prøvemateriale i sentrifugerør:	
Prøve	1 del (min. 2 ml)
Sputofluo™-løsning (15 % i destillert vann)	3 deler
Rist kraftig	10 minutter
Sentrifuger ved 3000–4800 rpm	20 minutter
Hell av supernatant Tilbered utstryk av sedimentet Lufttørk	

Punktater, skyllinger, sedimenter

Etter egnede anrikningstiltak stryker du ut prøvematerialet på objektglasset og lar det lufttørke.

Histologiske snitt

AFB-Fluor fenolfri kan benyttes til å farge histologiske snitt. Avparafiniser snitt på normal måte og rehydrer i en serie med avtakende alkohollnivå.

Fiksering av utstryksprøver

Prøver fikseres over en bunsenbrennerflamme (2–3 ganger, sørg for å unngå overoppheting).

Prøvene kan også fikseres ved oppvarming ved 100–110 °C i et tørkeskap eller på en varmeplate i 20 minutter.

Høye temperaturer eller langvarig oppvarming kan medføre nedsatt fargingsytelse.

Tilberedning av reagens

Reagens i AFB-Fluor fenolfri – Farging kit for undersøkelse av syre-rask bakterier med fluorescens mikroskopi (Auramin-Rhodamine farging) brukt til farging er bruksklare. Fortynning av løsningene er ikke nødvendig, og vil bare medføre dårligere fargingsresultat og stabilitet.

Siden den fenolfrie auramin-rhodaminfargingsløsningen (reagens 1) er svært tyktflytende, må den ristes kraftig før bruk.

Prosedyre

Farging av utstryksprøver

Farging på fargingsstativet

Objektglass med fiksert utstryk		
Reagens 1 (auramin-rhodaminløsning)	påfør dråpevis, dekk helt og farg	15 minutter
Rennende vann fra springen	skyll grundig	30 sekunder
Reagens 2 (avfargingsløsning)	påfør dråpevis, dekk helt og la reaksjonen inntreffe	1 minutt
Rennende vann fra springen	skyll grundig	30 sekunder
Reagens 3 (kontrastfargingsløsning)	påfør dråpevis, dekk helt og farg	5 minutter
Rennende vann fra springen	skyll grundig	30 sekunder
Lufttørk		

Dekking med ikke-vannholdig monteringsmedium (f.eks. Neo-Mount™, Entellan™ ny eller DPX ny) og et dekkglass er anbefalt for lagring av utstryksprøver i flere måneder. Til dette formålet må de fargede prøvene tørkes svært godt.

Bruk av bløtleggingsolje er anbefalt for analysering av fargede objektglass med en mikroskopforstørrelse på > 40x.

Farging av histologiske prøver

Farging på fargingsstativet

Avparafiniser histologiske objektglass på normal måte og rehydrer i en serie med avtakende alkoholnivå.

Fargeløsningene påføres på objektglassene dråpevis og skal dekke parafin-delen helt.

De angitte tidene skal overholdes for å garantere et optimalt fargingsresul-tat.

Objektglass med histologisk vev	
Destillert vann	skyll
Reagens 1 (auramin-rhodaminløsning)	15 minutter
Rennende vann fra springen	30 sekunder
Reagens 2 (avfargingsløsning)	1 minutt
Rennende vann fra springen	30 sekunder
Reagens 3 (kontrastfargingsløsning)	5 minutter
Rennende vann fra springen	30 sekunder
Etanol 70 %	1 minutt
Etanol 70 %	1 minutt
Etanol 96 %	1 minutt
Etanol 96 %	1 minutt
Etanol 100 %	1 minutt
Etanol 100 %	1 minutt
Xylen eller Neo-Clear™	5 minutter
Xylen eller Neo-Clear™	5 minutter
Monter våte Neo-Clear™-objektglass med Neo-Mount™ eller våte xylen-objektglass med f.eks. Entellan™ ny og dekkglass.	

Etter dehydrering (serie med stigende alkoholnivå) og klaring med xylen eller Neo-Clear™, kan histologiske objektglass dekkas med ethvert ikke-vannholdig monteringsmedium (f.eks. Neo-Mount™, Entellan™ ny eller DPX ny) og et dekkglass, og kan deretter lagres.

Resultat

Syrefaste bakterier (i fluorescensmikroskopet)	rødoransje (rhodamin) eller gulgrønn (auramin) avhengig av den anvendte filterkombinasjonen
Bakgrunn	mørk til svart

Farging for optisk og fluorescensmikroskopi

Den fluorescente fargingen ved bruk av AFB-fluor fenolfri farging kit er også ideelt egnet for ytterligere farging av de syrefaste bakteriene for diagnosti-sering ved hjelp av optisk mikroskopi, f.eks. ved bruk av AFB-Color farging kit (kat.nr. 1.16450) eller AFB-Color modifisert (kat.nr. 1.00497).

De umonterte prøvene farget med AFB-fluor fenolfri farging kit kan brukes direkte til diagnostiske formål. Deretter, etter grundig fjerning av eventuell bløtleggingsolje, kan prøvene farges ytterligere med AFB-Color farging kit eller AFB-Color modifisert.

I prøven som behandles på denne måten kan de syrefaste bakteriene ha magentarød farge mot en lysegrønn (AFB-Color) eller lyseblå (AFB-Color modifisert) bakgrunn under det optiske mikroskopet.

Evaluerig

Et positivt resultat betyr ”syrefaste bakterier påvist” og et negativt resultat betyr ”syrefaste bakterier ikke påvist”. Et positivt resultat betyr ikke at en taksonomisk klassifisering av mikroskopi er mulig. Hvis syrefaste bakterier er påvist, må ytterligere analyser utføres i spesialutstyrte laboratorier. Bakterienes vitalitet (aktiv, inaktiv) kan heller ikke bestemmes.

Hvis resultatet ikke er utvetydig, anbefales det også å farge prøvene for ytterligere diagnostisering med optisk mikroskopi, f.eks. med AFB-Color farging kit (kat.nr. 1.16450) eller AFB-Color modifisert (kat.nr. 1.00497).

Feilsøking

Fiksering av utstryksprøver

En tilstrekkelig grad av varmekiksering ved bruk av en bunsenbrenner eller i et varmeskap er avgjørende for å forhindre infeksjonspotensiale i prøvene og ytterligere spredning av bakterier.

Ingen farging av de syrefaste bakteriene

Det avgjørende stadiet i fargingsprosedyren er avfargingstrinnet, som kan påvirkes av utstrykets tykkelse. I tillegg er en fersk saltsyreløsning i etanol svært reaktiv, hvilket betyr at resultatet skal evalueres med forsiktighet. Inkubasjonstidene som er angitt i denne protokollen skal overholdes nøyaktig i avfargingstrinnet, siden det ellers kan oppstå falskt negative resultater.

For sterk bakgrunnsfarging

Hvis bakgrunnen er for sterkt farget i det optiske mikroskopibildet (mør-keblått), skal reagens 1 (auramin-rhodaminløsning) blandes bedre og dermed avfarges bedre. Siden fargingsløsningen er svært tyktflytende, er det anbefalt å rotere objektglasset under avfargingstrinnet med reagens 2 (avfargingsløsning).

Tekniske merknader

Det anvendte mikroskopet skal oppfylle kravene til et medisinsk diagnostisk laboratorium.

Anbefalt filterkombinasjon for fluorescensmikroskopi:

Eksitasjonsfilter	490–570 nm
Fargeseparator	525 og 635 nm
Emisjonsfilter	505–600 nm

Ved bruk av automatiske fargingssystemer må du følge bruksanvisningen fra leverandøren av systemet og programvaren.

Fjern overflødig bløtleggingsolje før fylling.

Analytiske ytelsesegenskaper

”AFB-Fluor fenolfri – fargesett” farger og synliggjør dermed biologiske strukturer, som beskrevet i ”Resultat”-kapittel i denne bruksanvisningen. Produktet skal kun brukes av autoriserte og kvalifiserte personer, inkludert bl.a. tilberedning av prøver og reagenser, prøvehåndtering, histologisk pro-sessering, beslutninger om egnede kontroller osv.

Den analytiske ytelsen av produktet bekreftes ved å teste hvert produk-sjonsparti.

For følgende fargerigle ble analytisk ytelse bekreftet med tanke på produk-tets spesifisitet, sensitivitet og repeterbarhet med en et resultat på 100 %:

	Spesifisitet mellom analyser	Sensitivitet mellom analyser	Spesifisi-tet innen analyse	Sensitivi-tet innen analyse
Histologisk farging				
Syrefaste bakterier (i fluorescens-mikroskopet)	14/14	14/14	6/6	6/6
Bakgrunn	14/14	14/14	6/6	6/6
Utstryksfarging				
Syrefaste bakterier (i fluorescens-mikroskopet)	14/14	14/14	6/6	6/6
Bakgrunn	14/14	14/14	6/6	6/6

Analytiske ytelsesresultater

Data fra intraanalyser (utført på samme parti) og interanalyser (utført på forskjellige partier) lister opp antallet korrekt fargede strukturer sammen-lignet med antallet utførte analyser.

Kliniske ytelsesegenskaper

Videre er den kliniske ytelsen til dette produktet dokumentert i flere viten-skapelige publikasjoner.

Det AFB-Fluor fenolfri – fargesett har blitt brukt med suksess i det kliniske miljøet i flere tiår i mange ulike bruksområder.

Den kliniske ytelsen til den AFB-Fluor fenolfri – fargesett i særdeleshet ble bestemt ved å fastslå dens sensitivitet og spesifisitet og dens PPV og NPV i en intern studie:

	Auramin-rhodaminfarging
Sensitivitet	14/14
Spesifisitet	15/15

Sensitivitet: 14 av 14 prøver: 100 %

Spesifisitet: 15 av 15 prøver: 100 %

Positiv prediktiv verdi (PPV): 100 %

Negativ prediktiv verdi (NPV): 100 %

Resultatene av denne ytelsesevalueringen bekrefter at produktet er egnet for den tiltenkte bruken og har pålitelig ytelse.

Den diagnostiske tolkingen av fargingsresultatene skal imidlertid utføres av kvalifisert og autorisert personell med hensyn til pasientens anamnese, morfologi, bruk av tilstrekkelige kontroller og ytterligere diagnostiske tester, ved behov. Denne metoden kan brukes som et supplement i diagnostikk hos mennesker.

Diagnostikk

Diagnoser skal kun stilles av autorisert og kvalifisert personell. Gyldig terminologi må benyttes. Denne metoden kan brukes som et supplement i diagnostikk hos mennes-ker. Ytterligere tester må velges og implementeres i samsvar med anerkjente metoder.

Egnede kontroller (f.eks. ISOSLIDE™ AFB, kat.nr. 1.02560.0001) skal utføres med hver applisering for å unngå et feilaktig resultat. Hvis resultatet ikke er utvetydig, anbefales det også å farge prøvene for ytterligere diagnostisering med optisk mikroskopi, f.eks. med AFB-Color farging kit (kat.nr. 1.16450) eller AFB-Color modifisert (kat.nr. 1.00497).

Oppbevaring

Oppbevar AFB-Fluor fenolfri – Farging kit for undersøkelse av syre-rask bakterier med fluorescens mikroskopi (Auramin-Rhodamine farging) vev ved +15 °C til +25 °C.

Holdbarhet

AFB-Fluor fenolfri – Farging kit for undersøkelse av syre-rask bakterier med fluorescens mikroskopi (Auramin-Rhodamine farging) kan brukes frem til den angitte utløpsdatoen.

Etter anbrudd av flasken kan innholdet brukes frem til den angitte utløpsdatoen når det oppbevares ved +15 °C til +25 °C.

Pipette-flaskene må holdes godt lukket til enhver tid.

En farging av avfargingsløsningen (reagens 2) har ingen effekt på fargingsprosessene og diagnostikken.

Kapasitet

Pakningen inneholder nok til opptil 60–65 appliseringer, potensielt enda mer avhengig av tykkelsen av utstrykene.

Ytterligere instruksjoner

Kun til profesjonell bruk.

For å unngå feil må applisering kun utføres av kvalifisert personell. Nasjonale retningslinjer for arbeidssikkerhet og kvalitetssikring må følges. Mikroskopene som brukes må være utstyrt i samsvar med standarden. Ved behov må du bruke en standard sentrifuge som er egnet for et medisinsk diagnostisk laboratorium.

Beskyttelse mot infeksjon

Effektive tiltak må tas for å beskytte mot infeksjon i samsvar med laboratoriets retningslinjer.

Instruksjoner for kassering

Pakningen skal kasseres i samsvar med gjeldende retningslinjer for kassering.

Brukte løsninger og løsninger som har gått ut på dato må kasseres som spesialavfall i samsvar med lokale retningslinjer. Informasjon om kassering kan skaffes under hurtigkoblingen "Hints for Disposal of Microscopy Products" (Tips for kassering av mikroskopiprodukter) på www.microscopy-products.com. I EU gjelder den nåværende FORORDNING (EF) nr. 1272/2008 om klassifisering, merking og emballering av stoffer og blandinger, endring og avskaffing av direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og endring av forordning (EF) nr. 1907/2006.

Hjelpereagenser

Kat.nr.	1.00327	Saltsyre i etanol for mikroskopi	1 l, 5 l
Kat.nr.	1.00496	Formaldehydløsning 4 %, bufret, pH 6,9 (ca. 10 % formalinløsning), for histologi	350 ml og 700 ml (i flaske med bred hals), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Kat.nr.	1.00497	AFB-Color modifisert Fargingssett for påvisning av syre-rask bakterier (AFB) ved hot staining-metode	1 set
Kat.nr.	1.00579	DPX ny vannfritt monteringsmedium for mikroskopi	500 ml
Kat.nr.	1.00869	Entellan™ ny for cover slipper for mikroskopi	500 ml
Kat.nr.	1.02560	ISOSLIDE™ AFB Kontrollobjektglass med referansevev til påvisning av syre-raske bakterier i histologisk vev	25 tests
Kat.nr.	1.03999	Formaldehydløsning min. 37% syrefri stabilisert med ca 10% metanol og kalsiumkarbonat for histologi	1 l, 2,5 l, 25 l
Kat.nr.	1.04699	Immerjonsolje for mikroskopi	100 ml pipette-flaske, 100 ml, 500 ml
Kat.nr.	1.07164	Paraffin pastilles størkningspunkt ca 56-58°C for histologi	10 kg (4x 2,5 kg)
Kat.nr.	1.07961	Entellan™ ny hurtig monteringsmedium for mikroskopi	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat.nr.	1.08000	SputofluoI™ for mikroskopi	1 l
Kat.nr.	1.08298	Xylene (isomer blanding) for histologi	4 l
Kat.nr.	1.09016	Neo-Mount™ vannfritt monteringsmedium for mikroskopi	100 ml pipette-flaske, 500 ml
Kat.nr.	1.09843	Neo-Clear™ (xylensubstitutt) for mikroskopi	5 l

Kat.nr.	1.11609	Histosec™-pastiller størkningspunkt 56-58 °C, innkapslingsmiddel for histologi	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Kat.nr.	1.15161	Histosec™-pastiller (uten DMSO) størkningspunkt 56-58 °C, innkapslingsmiddel for histologi	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Kat.nr.	1.16450	AFB-Color farging kit for mikroskopisk undersøkelse av syre-rask bakterier (AFB) (kald farging)	1 set

Fareklassifikasjon

Kat.nr. 1.01597.0001

Overhold fareklassifikasjonen som er trykt på etiketten og informasjonen i sikkerhetsdatabladet.

Sikkerhetsdatabladet er tilgjengelig på nettstedet og på anmodning.

Hovedkomponenter i produktene

Kat.nr. 1.01597.0001

Reagens 1	
C.I. 41000	12,0 g/l
C.I. 45170	6,0 g/l
1 l =	1,117 kg

Reagens 2	
C ₃ H ₈ O	543,3 g/l
HCl min. 37 %	15,7 g/l
1 l =	0,878 kg

Reagens 3	
KMnO ₄	5,0 g/l
1 l =	1,013 kg

Generell merknad

Hvis en alvorlig hendelse oppstår under bruk av denne enheten eller som følge av denne bruken, må det rapporteres til produsenten og/eller dens autoriserte representant, samt til dine nasjonale myndigheter.

Litteratur

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Meget brannfarlig væske og damp.

H290: Kan være etsende for metaller.

H319: Gir alvorlig øyeirritasjon.

H336: Kan forårsake døsighet eller svimmelhet.

H411: Giftig, med langtidsvirkning, for liv i vann.

P210: Holdes vekk fra varme, varme overflater, gnister, åpen ild og andre antenningskilder. Røyking forbudt.

P233: Hold beholderen tett lukket.

P234: Oppbevares bare i originalemballasjen.

P240: Beholder og mottaksutstyr jordes/potensialutlignes.

P273: Unngå utslipp til miljøet.

P305 + P351 + P338: VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.

Reagens 1:

H226: Brannfarlig væske og damp.

H319: Gir alvorlig øyeirritasjon.

Reagens 2:

H225: Meget brannfarlig væske og damp.

H290: Kan være etsende for metaller.

H319: Gir alvorlig øyeirritasjon.

H336: Kan forårsake døsighet eller svimmelhet.

Reagens 3:

H411: Giftig, med langtidsvirkning, for liv i vann.

Revisjonshistorikk

Versjon	Endringskommentar
2024-Jul-19	Opprinnelig versjon med innføring av revisjonshistorikk



Se bruksanvisningen



Produsent



Katalognummer



Partikode



Forsiktig, se medfølgende dokumenter



Brukes innen DD.MM.ÅÅÅÅ



Temperaturbegrensning

Status: 2024-Jul-19

1.01597.0001 **REF****Mikroskopia****AFB-Fluor bez fenolu**

Súprava na farbenie na vyšetrenie kyslo rýchlych baktérií s fluorescenčnou mikroskopiou (farbenie auramin-rhodamínom)

Iba na profesionálne použitie**IVD**Diagnostická zdravotnícka pomôcka *in vitro***Určený účel**

Tento „AFB-Fluor bez fenolu - Súprava na farbenie na vyšetrenie kyslo rýchlych baktérií s fluorescenčnou mikroskopiou (farbenie auramin-rhodamínom)“ je určený na humánno-medicínsku bunkovú diagnostiku a slúži na bakteriologické, cytologické a histologické vyšetrenie vzoriek ľudského pôvodu. Ide o súpravu na farbenie pripravenú na použitie, ktorá pri použití spolu s ďalšími *in vitro* diagnostickými produktmi z nášho portfólia, umožňuje vyhodnocovať bakteriálne cieľové štruktúry pre diagnostické účely (acidorezistentné baktérie (AFB), fixáciou, vloženie, farbením, kontrastným farbením, uchytaním) v bakteriologických, cytologických a histologických vzorkách, napríklad v sterých obohatených bakteriálnych kultúrach alebo v histologických rezoch pľúc.

Rozhodujúcim znakom AFB-Fluor bez fenolu - Súprava na farbenie je prítomnosť fluorescenčných farbív vo farbiacom roztoku. Tým sa umožňuje rýchla a bezpečná identifikácia acidorezistentných baktérií pod fluorescenčným mikroskopom. Farbiaci roztok sa navyše pripravuje bez obsahu potenciálne nebezpečného fenolu, čo zvyšuje bezpečnosť pre používateľa.

Táto farbiaca súprava je dodávaná pripravená na použitie v praktických kvapkových fľašiach a obsahuje všetky reagenty potrebné na farbenie acidorezistentných baktérií v sterých a histologických vzorkách tkanív.

Nesfarbené štruktúry sú relatívne málo kontrastné a pod svetelným mikroskopom ich možno veľmi ťažko rozlíšiť. Snímky vytvorené použitím farbiacich roztokov pomáhajú autorizovanému a kvalifikovanému odborníkovi v týchto prípadoch lepšie definovať tvar a štruktúru. Na stanovenie konečnej diagnózy je potrebné vykonať ďalšie testy podľa uznaných a platných metód.

Princíp

Klasickou Ziehlovou-Neelsenovou metódou sa stanovuje vysoký podiel vosku a lipidov v bunkovej stene, pretože acidorezistentné baktérie len veľmi pomaly absorbujú farbivá. Aby sa zvýšila absorpcia fuchsínového farbiva, a tým aj tvorba mykolát-fuchsínového komplexu v bunkovej stene, farbiaci roztok nanosený na vzorku sa zvyčajne zahreje na teplotu odparovania.

Po tom, čo acidorezistentné baktérie absorbujú fuchsínové farbivo, je takmer nemožné ich znovu odfarbiť, a to ani po intenzívnom ošetrovaní použitím dekolorizačného roztoku, ako je napr. kyselina chlorovodíková v etanole. Z tohto dôvodu sa acidorezistentné baktérie označujú ako acidorezistentné a alkoholorezistentné na farbenie.

Pri použití AFB-Fluor bez fenolu - Súprava na farbenie sa vzhľadom na použitie fluorescenčných farbív auramínu a rhodamínu vo farbiacom roztoku bez fenolu AFB-Fluor krok zahrievania nevyžaduje. Tieto farbivá sa na bunkovej stene acidorezistentných baktérií usadzujú a podľa použitého filtra mikroskopu sa javia na čiernom pozadí ako žlté alebo červené. Predbežná úprava vzoriek pomocou produktu Sputofluor™ rozpustí baktérie z obklopujúceho viskózneho spúta a bunkového materiálu.

Materiál vzorky

Stery z bakteriologického materiálu vysušeného na vzduchu a fixovaného teplom a vopred pripraveného použitím produktu Sputofluor™, ako napríklad spútum, stery z tenkoihlových aspiračných biopsií (FNAB), výplachy, odtlačky, výpotky, hnis, exsudáty, tekuté a pevné kultivačné média

Rezy z formálnom fixovaného tkaniva ľudského pôvodu, zaliaté do parafínu (parafínové rezy s hrúbkou 3 - 4 µm)

Reagencie

Kat. č. 1.01597.0001

AFB-Fluor bez fenolu

Súprava na farbenie na vyšetrenie kyslo rýchlych baktérií s fluorescenčnou mikroskopiou (farbenie auramin-rhodamínom)

Komponenty balenia:

Obsah súpravy na farbenie

Reagencia 1: Auramin-rhodamínový roztok 200 ml
 Reagencia 2: Odfarbovací roztok 2 x 200 ml
 Reagencia 3: Roztok na kontrastné farbenie (KMnO₄) 200 ml

Tiež požadované:

Kat. č. 1.08000 Sputofluor™
 pre mikroskopiou

1 |

Príprava vzorky

Odber vzoriek musí robiť kvalifikovaný personál.

Všetky vzorky sa musia spracovávať použitím najmodernejšej technológie.

Všetky vzorky sa musia jasne označiť.

Pri odbere a príprave vzoriek sa musia používať vhodné prístroje. Pri aplikácii/používaní dodržujte pokyny výrobcu.

Pri používaní príslušných pomocných reagentov je potrebné dodržiavať príslušné návody na používanie.

Spútum

Acidorezistentné baktérie je potrebné vopred pripraviť použitím produktu Sputofluor™, aby sa rozpustil hlien a bunkové štruktúry. V tomto procese účinná zložka chlórnanu rozpúšťa oxidáciou organický materiál a postupne uvoľňuje acidorezistentné baktérie, aby ich bolo možné naďalej spracovávať.

Príprava reagentov: Príprava roztoku Sputofluor™ 15 %

Na prípravu približne 100 ml zmesi roztoku:

Sputofluor™	15 ml
Destilovaná voda	85 ml

Príprava materiálu na odber vzoriek v centrifugačných skúmavkách:	
Vzorka	1 diel (min. 2 ml)
Roztok Sputofluor™ (15 % v destilovanej vode)	3 diely
Silno pretrepte	10 min
Odstreďujte pri 3000 - 4800 otáčkach za minútu	20 min
Dekantujte supernatant Pripravte stery zo sedimentu Sušte na vzduchu	

Punkcie, laváže, sedimenty

Po vykonaní príslušných opatrení na obohatenie rozotrite materiál vzorky na podložné sklíčko a nechajte ho vysušiť na vzduchu.

Histologické rezy

AFB-Fluor bez fenolu je možné použiť na farbenie histologických rezov. Rezy deparafinujte bežným spôsobom a rehydratujte v zostupnej alkoholovej sérii.

Fixácia vzoriek sterov

Vzorky sa fixujú nad plameňom Bunsenovho horáka (2 - 3-krát, pričom treba dbať na to, aby sa príliš nezahrievali).

Vzorky možno fixovať aj zahrievaním pri teplote 100 - 110 °C v sušiackej komore alebo na ohrievacej platni po dobu 20 minút.

Príliš vysoké teploty alebo dlhodobé zahrievanie môžu zhoršiť účinnosť farbenia.

Príprava reagentov

Reagencie farbiacej súpravy AFB-Fluor bez fenolu - Súprava na farbenie na vyšetrenie kyslo rýchlych baktérií s fluorescenčnou mikroskopiou (farbenie auramin-rhodamínom) používané na farbenie sú pripravené na použitie, nie je potrebné riedenie roztokov, ktoré len zhoršuje výsledok farbenia a stabilitu.

Vzhľadom na vysokú viskozitu sa musí auramin-rhodamínový farbiaci roztok bez fenolu (reagencia 1) pred použitím intenzívne pretrepať.

Postup**Farbenie vzoriek sterov****Farbenie na farbiacom stojane**

Podložné sklíčko s fixovaným sterom		
Reagencia 1 (auramin-rhodamínový roztok)	aplikujte po kvapkách, úplne zakryte a zafarbte	15 min
Tečúca voda z vodovodu	starostlivo opláchnite	30 sek
Reagencia 2 (odfarbovací roztok)	aplikujte po kvapkách, úplne zakryte a nechajte reagovať	1 min
Tečúca voda z vodovodu	starostlivo opláchnite	30 sek

Reagencia 3 (roztok na kontrastné farbenie)	aplikujte po kvapkách	5 min
Tečúca voda z vodovodu	starostlivo opláchnite	30 sek
Sušte na vzduchu		

Pre skladovanie sterov vzoriek na dobu niekoľkých mesiacov sa odporúča vzorky zakryť bezvodým fixačným médiom (napr. Neo-Mount™, Entellan™ new alebo DPX new) a krycím sklíčkom. Pre tento účel je potrebné sfarbené vzorky dôkladne vysušiť.

Pri analýze sfarbených podložných sklíčok s mikroskopickým zväčšením > 40x sa odporúča používať imerzný olej.

Farbenie histologických vzoriek

Farbenie na farbiacom stojane

Histologické podložné sklíčka deparafinujte bežným spôsobom a rehydratujte v zostupnej alkoholovej sérii.

Farbiace roztoky sa nanášajú na sklíčka po kvapkách a mali by úplne pokryť parafrínovú časť.

Uvedené časy je potrebné dodržať, aby bol zaručený optimálny výsledok sfarbenia.

Sklíčko s histologickým tkanivom	
Destilovaná voda	opláchnite
Reagencia 1 (auramín-rhodamínový roztok)	15 min
Tečúca voda z vodovodu	30 sek
Reagencia 2 (odfarbovací roztok)	1 min
Tečúca voda z vodovodu	30 sek
Reagencia 3 (roztok na kontrastné farbenie)	5 min
Tečúca voda z vodovodu	30 sek
Etanol 70 %	1 min
Etanol 70 %	1 min
Etanol 96 %	1 min
Etanol 96 %	1 min
Etanol 100 %	1 min
Etanol 100 %	1 min
Xylene alebo Neo-Clear™	5 min
Xylene alebo Neo-Clear™	5 min
Vlhčená sklíčka Neo-Clear™ fixujte pomocou Neo-Mount™ alebo xylénové vlhčené sklíčka napr. pomocou Entellan™ new a krycím sklíčkom.	

Po dehydratácii (vzostupná alkoholová séria) a vyčistení pomocou xylénu alebo Neo-Clear™ je možné cytologické vzorky fixovať pomocou bezvodých fixačných prostriedkov (napr. Neo-Mount™, Entellan™ new alebo DPX new) a krycieho sklíčka a potom ich uskladniť.

Výsledok

Acidorezistentné baktérie (vo fluorescenčnom mikroskope)	červeno-oranžová (rhodamín) alebo žltá-zelená (auramín) podľa použitej kombinácie filtrov
Pozadie	tmavé až čierne

Farbenie pre optickú a fluorescenčnú mikroskopiu

Fluorescenčné farbenie použitím AFB-Fluor bez fenolu - Súprava na farbenie je ideálnou voľbou aj na dodatočné farbenie acidorezistentných baktérií na účely diagnostiky pomocou optickej mikroskopie, napr. pomocou AFB-Color, farbiaca súprava (kat. č. 1.16450) alebo AFB-Color, modifikovaný (kat. č. 1.00497).

Na diagnostické účely je možné priamo použiť nefixované vzorky farbené AFB-Fluor bez fenolu - Súprava na farbenie. Po opatrnom odstránení prípadného použitého imerzného oleja je možné vzorky ďalej farbiť pomocou AFB-Color, farbiaca súprava alebo AFB-Color, modifikovaný.

Vo vzorke ošetrenej týmto spôsobom sa acidorezistentné baktérie pod optickým mikroskopom zobrazia na svetlozelenom (AFB-Color) alebo svetlomodrom (AFB-Color, modifikovaný) pozadí purpurovo-červené.

Vyhodnotenie

Pozitívny výsledok znamená „detekované acidorezistentné baktérie“ a negatívny výsledok „nedetekované acidorezistentné baktérie“. Pozitívny výsledok neznamená, že je možná taxonomická klasifikácia pomocou mikroskopie. Ak sú detekované acidorezistentné baktérie, je potrebné vykonať ďalšie analýzy v špeciálne vybavených laboratóriách.

Vitalitu (aktívnu, neaktívnu) baktérií takisto nie je možné určiť.

Ak nie je výsledok jednoznačný, na stanovenie ďalšej opticko-mikroskopickej diagnostiky sa odporúča vzorky dodatočne zafarbiť, napr. pomocou AFB-Color, farbiaca súprava (kat. č. 1.16450) alebo AFB-Color, modifikovaný (kat. č. 1.00497).

Odstraňovanie problémov

Fixácia vzoriek sterov

Aby sa zabránilo infekčnému potenciálu vzoriek a ďalšiemu množeniu baktérii, je potrebný dostatočný stupeň tepelnej fixácie pomocou Bunsenovho horáka alebo v ohrievacej skrini.

Žiadne sfarbenie acidorezistentné baktérii

Kritickou fázou postupu farbenia je krok dekolorizácie, ktorý môže byť ovplyvnený hrúbkou steru.

Čerstvý roztok kyseliny chlorovodíkovej v etanole je navyše vysoko reaktívny, čo znamená, že by sa mal výsledok hodnotiť opatrne. Inkubačné doby uvedené v tomto protokole je potrebné v kroku odfarbovania presne dodržiavať, pretože v opačnom prípade môže dôjsť k falošne negatívnym výsledkom.

Príliš silné sfarbenie na pozadí

Ak je pozadie v optickej mikroskopickej snímke príliš silno sfarbené (tmavo-modré), je potrebné reagenciu 1 (auramín-rhodamínový roztok) lepšie premiešať a potom lepšie odfarbiť. Vzhľadom na to, že je farbiaci roztok veľmi viskózný, počas kroku odfarbovania sa odporúča krúžiť podložným sklíčkom s reagentiou 2 (odfarbovací roztok).

Technické poznámky

Použitý mikroskop musí spĺňať požiadavky lekárskeho diagnostického laboratória.

Odporúčaná kombinácia filtrov pre fluorescenčnú mikroskopiu:

Excitačný filter	490 - 570 nm
Separátor farieb	525 a 635 nm
Emisný filter	505 - 600 nm

Pri používaní automatických farbiacich systémov postupujte podľa návodu na používanie od dodávateľa systému a softvéru.

Pred plnením odstráňte prebytočný imerzný olej.

Analytické výkonnostné charakteristiky

„AFB-Fluor bez fenolu - farbiaca súprava“ vyfarbí a tým vizualizuje biologické štruktúry, ako je opísané v kapitole „Výsledok“ tohto návodu na používanie. Používanie tohto produktu môžu vykonávať len autorizované a kvalifikované osoby, čo medzi iným zahŕňa prípravu vzoriek a reagencií, manipuláciu so vzorkami, spracovanie histologických procesov, rozhodnutia týkajúce sa vhodných kontrol a podobne.

Analytická výkonnosť produktu sa potvrdzuje testovaním každej výrobnjej šarže.

U nasledujúcich sfarbení sa potvrdila analytická výkonnosť z hľadiska špecifity, citlivosti a opakovateľnosti produktu s percentuálnou hodnotou 100 %:

	Špecifita medzi testami	Citlivosť medzi testami	Špecifita v rámci testu	Citlivosť v rámci testu
Histologické farbenie				
Acidorezistentné baktérie (vo fluorescenčnom mikroskope)	14/14	14/14	6/6	6/6
Pozadie	14/14	14/14	6/6	6/6
Farbenie steru				
Acidorezistentné baktérie (vo fluorescenčnom mikroskope)	14/14	14/14	6/6	6/6
Pozadie	14/14	14/14	6/6	6/6

Výsledky analytickej výkonnosti

Údaje v rámci jedného testu (vykonané na tej istej šarži) a medzi testami (vykonané na rôznych šaržiach) udávajú počet správne sfarbených štruktúr v pomere k počtu vykonaných testov.

Klinické výkonnostné charakteristiky

Klinická účinnosť tohto produktu bola okrem toho úspešne preukázaná vo viacerých vedeckých publikáciách.

AFB-Fluor bez fenolu - farbiaca súprava sa už celé desaťročia s úspechom používa v klinickom prostredí pri veľkom počte aplikácií.

Klinická účinnosť AFB-Fluor bez fenolu - farbiaca súprava sa určila najmä stanovením jeho citlivosti a špecifity a jeho NPV a PPV štúdie v rámci vlastného pracoviska:

	Auramín-rhodamínové farbenie
Citlivosť	14/14
Špecifita	15/15

Citlivosť: 14 vzoriek z 14: 100 %
Špecifita: 15 vzoriek z 15: 100 %
Pozitívna prediktívna hodnota (PPV): 100 %
Negatívna prediktívna hodnota (NPV): 100 %

Výsledky tohto hodnotenia výkonnosti potvrdzujú, že produkt je vhodný na zamýšľané použitie a spoľahlivo funguje.

Diagnostickú interpretáciu výsledkov sfarbenia však majú vykonať kvalifikovaní a autorizovaní odborníci s ohľadom na anamnézu pacienta, morfológiu, použitie adekvátnych kontrol a prípadné ďalšie diagnostické testy. Táto metóda sa môže doplnkovo použiť v oblasti humánnej diagnostiky.

Diagnostika

Diagnostiku môže vykonávať len autorizovaný a kvalifikovaný personál. Musí sa používať platné názvoslovie.

Táto metóda sa môže doplnkovo použiť v oblasti humánnej diagnostiky. Ďalšie testy je potrebné vybrať a vykonať podľa uznaných metód.

Pri každej aplikácii je potrebné vykonať vhodné kontroly (napr. ISOSLIDE™ AFB, kat. č. 1.02560.0001), aby sa zamedzilo nesprávnemu výsledku. Ak nie je výsledok jednoznačný, na stanovenie ďalšej opticko-mikroskopickkej diagnostiky sa odporúča vzorky dodatočne zafarbiť, napr. pomocou AFB-Color, farbiaca súprava (kat. č. 1.16450) alebo AFB-Color, modifikovaný (kat. č. 1.00497).

Skladovanie

AFB-Fluor bez fenolu - Súprava na farbenie na vyšetrenie kyslo rýchlych baktérií s fluorescenčnou mikroskopiou (farbenie auramin-rhodamínom) skladujte pri teplote +15 °C až +25 °C.

Doba použiteľnosti

AFB-Fluor bez fenolu - Súprava na farbenie na vyšetrenie kyslo rýchlych baktérií s fluorescenčnou mikroskopiou (farbenie auramin-rhodamínom) je možné používať až do uvedeného dátumu expirácie.

Po prvom otvorení fľaše je možné obsah používať až do uvedeného dátumu expirácie za predpokladu, že sa skladuje pri teplote +15 °C až +25 °C.

Fľaše na kvapkanie musia byť vždy tesne uzavreté.

Sfarbenie dekolorizačného roztoku (reagencia 2) nemá vplyv na procesy farbenia a diagnostiky.

Kapacita

Balenie vystačí na 60 - 65 aplikácií, pričom výťažnosť môže byť aj vyššia v závislosti od hrúbky sterov.

Ďalšie pokyny

Iba na profesionálne použitie.

Aby sa zamedzilo chybám, aplikáciu musí vykonávať iba kvalifikovaný personál.

Je potrebné dodržiavať národné smernice týkajúce sa bezpečnosti práce a zabezpečenia kvality.

Musia sa používať mikroskopy so zodpovedajúcim vybavením podľa normy. V prípade potreby použite štandardnú odstredivku určenú pre lekárske diagnostické laboratórium.

Ochrana pred infekciou

Na ochranu pred infekciou je potrebné prijať účinné opatrenia v súlade s laboratórnymi smernicami.

Pokyny týkajúce sa likvidácie

Obal musí byť zlikvidovaný v súlade s platnými pokynmi na likvidáciu. Použité roztoky a roztoky, ktorým uplynula doba použiteľnosti, sa musia likvidovať ako špeciálny odpad v súlade s miestnymi smernicami. Informácie o likvidácii možno získať pod odkazom „Hints for Disposal of Microscopy Products“ na webovej stránke www.microscopy-products.com. V rámci EÚ sa aktuálne uplatňuje nariadenie (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006.

Pomocné reagenty

Kat. č.	1.00327	Kyselina chlorovodíková v etanole pre mikroskopiou	1 l, 5 l
Kat. č.	1.00496	Formaldehyd, 4 % roztok, pufrovaný, pH 6,9 (asi 10 % formalínový roztok) pre histológiu	350 ml a 700 ml (vo fľaši so širokým hrdlom), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Kat. č.	1.00497	AFB-Color, modifikovaný farbiaca súprava na detekciu kyslo-rýchle baktérie (AFB) metódou farbenia za tepla	1 set
Kat. č.	1.00579	DPX new nevodné fixačné médium pre mikroskopiou	500 ml
Kat. č.	1.00869	Entellan™ new, kvapalné krycie sklíčko pre mikroskopiou	500 ml
Kat. č.	1.02560	ISOSLIDE™ AFB kontrolné sklíčka s referenčným tkanivom na detekciu acidorezistentných baktérií v histologickom tkaniv	25 tests
Kat. č.	1.03999	Formaldehyd, min. 37 % roztok, bez kyseliny stabilizovaný asi 10 % metanolu a uhličitany vápenatého, pre histológiu	1 l, 2,5 l, 25 l
Kat. č.	1.04699	Imerzný olej pre mikroskopiou	fľaša na kvapkanie s objemom 100 ml, 100 ml, 500 ml

Kat. č.	1.07164	Parafínové pastilky teplota tuhnutia asi 56 - 58°C, pre histológiu	10 kg (4x 2,5 kg)
Kat. č.	1.07961	Entellan™ new médium pre rýchlu fixáciu, pre mikroskopiou	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. č.	1.08000	SputofluoI™ pre mikroskopiou	1 l
Kat. č.	1.08298	Xylene (zmes izomérov) pre histológiu	4 l
Kat. č.	1.09016	Neo-Mount™ bezvodé fixačné médium pre mikroskopiou	fľaša na kvapkanie s objemom 100 ml, 500 ml
Kat. č.	1.09843	Neo-Clear™ (náhrada xylénu) pre mikroskopiou	5 l
Kat. č.	1.11609	Histosec™ pastilky bod tuhnutia 56 - 58°C, zalievacie činidlo pre histológiu	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Kat. č.	1.15161	Histosec™ pastilky (bez DMSO) teplota tuhnutia 56 - 58 °C, zalievacie médium pre histológiu	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Kat. č.	1.16450	AFB-Color, farbiaca súprava pre mikroskopické skúmanie kyseliny-rýchle baktérie (AFB) (studené farbenie)	1 set

Klasifikácia nebezpečenstva

Kat. č. 1.01597.0001

Dodržiavajte klasifikáciu nebezpečenstva vytlačenú na etikete a informácie uvedené v bezpečnostných listoch.

Bezpečnostný list je k dispozícii na webových stránkach a na vyžiadanie.

Hlavné komponenty produktov

Kat. č. 1.01597.0001

Reagencia 1	
C.I. 41000	12,0 g/l
C.I. 45170	6,0 g/l
1 l =	1,117 kg

Reagencia 2	
C ₃ H ₈ O	543,3 g/l
HCl min. 37 %	15,7 g/l
1 l =	0,878 kg

Reagencia 3	
KMnO ₄	5,0 g/l
1 l =	1,013 kg

Všeobecná poznámka

Ak sa počas používania tejto pomôcky alebo v dôsledku jej používania vyskytne závažný incident, nahláste ho výrobcovi a/alebo jeho autorizovanému zástupcovi a vášmu vnútroštatnému orgánu.

Literatúra

- Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
- Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
- Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
- Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Veľmi horľavá kvapalina a pary.

H290: Môže byť korozívna pre kovy.

H319: Spôsobuje vážne podráždenie očí.

H336: Môže spôsobiť ospalosť alebo závraty.

H411: Toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.

P210: Uchovávať mimo dosahu tepla, horúcich povrchov, iskier, otvoreného ohňa a iných zdrojov zapálenia. Nefajčiť.

P233: Nádobu uchovávať tesne uzavretú.

P234: Uchovávať iba v pôvodnom balení.

P240: Uzemnite a upevnite nádobu a plniace zariadenie.

P273: Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia.

P305 + P351 + P338: PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

Reagencia 1:

H226: Horľavá kvapalina a pary.

H319: Spôsobuje vážne podráždenie očí.

Reagencia 2:

H225: Veľmi horľavá kvapalina a pary.

H290: Môže byť korozívna pre kovy.

H319: Spôsobuje vážne podráždenie očí.

H336: Môže spôsobiť ospalosť alebo závraty.

Reagencia 3:

H411: Toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.

História revízií

Verzia	Poznámka k úprave
2024-Jul-19	Prvá verzia s uvedením časti História revízií



Prečítajte si návod
na používanie



Výrobca



Katalógové číslo



Kód šarže



Pozor, pozrite si sprievod-
nú dokumentáciu



Použitie do
RRRR-MM-DD



Teplotné ob-
medzenia

Status: 2024-Jul-19

Life Science spoločnosť Merck pôsobí v USA a Kanade pod názvom MilliporeSigma.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko a/alebo jej pobočky. Všetky práva vyhradené. Merck a Sigma-Aldrich sú ochranné známky spoločnosti Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko. Všetky ostatné ochranné známky sú majetkom príslušných vlastníkov. Detailné informácie o ochranných známkach sú k dispozícii z verejne dostupných zdrojov.



Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.sigmaldrich.com

MERCK

1.01597.0001 **REF**

Mikroskop

AFB-Fluor fenolsüz

Aside dirençli bakterilerin floresan mikroskopla incelenmesi için boyama kiti (Auramin-Rodamin boyama)

Yalnızca profesyonel kullanım içindir

IVD In vitro Tanısal Tıbbi Cihaz



Kullanım amacı

Bu "AFB-Fluor fenolsüz - Aside dirençli bakterilerin floresan mikroskopla incelenmesi için boyama kiti (Auramin-Rodamin boyama)", insanlarda tıbbi hücre tanımlamasında kullanılır ve insan kaynaklı numune materyalinin bakteriyolojik, sitolojik ve histolojik incelemesi amacıyla hizmet eder. Portföyümüzdeki diğer in vitro tanısal ürünlerle birlikte kullanıldığında, örn. zenginleştirilmiş bakteri kültürü yaymalarında olduğu veya akciğerin histolojik kesitleri gibi bakteriyolojik, sitolojik ve histolojik numune materyallerinde bakteriyel hedef yapıları tanısal amaçlar için değerlendirilebilir hale getiren (fiksasyon, gömme, boyama, karşıt boyama, kapatma yoluyla aside dirençli bakteriler (AFB)), kullanıma hazır bir boyama kitidir.

AFB-Fluor fenolsüz boyama kitinin belirleyici özelliği, boyama solüsyonunda floresan boyaların bulunmasıdır. Bu, floresan mikroskopu altında aside dirençli bakterilerin hızlı ve güvenli bir şekilde tanımlanmasını sağlar. Ek olarak, boyama solüsyonunun potansiyel tehlikeli fenol olmadan hazırlanması da kullanıcının güvenliğini artırır.

Bu boyama seti, pratik damlatma şişelerinde kullanıma hazır olarak sağlanır ve yayma numunelerinde ve histolojik doku numunelerinde aside dirençli bakterilerin boyanması için gereken tüm reaktifleri içerir.

Boyanmamış yapıların kontrastı görece düşüktür ve ışık mikroskopu altında ayırt edilmeleri son derece zordur. Boyama solüsyonlarının kullanılmasıyla oluşturulan görüntüler, yetkili ve kalifiye araştırmacının bu gibi durumlarda form ve yapıyı daha iyi tanımlamasına yardımcı olur. Kesin tanıya ulaşmak için bilinen ve geçerli yöntemlere uygun şekilde ileri testler yapılmalıdır.

Presep

Aside dirençli bakteriler boyaları çok yavaş aldığından, klasik Ziehl-Neelsen yöntemi, hücre duvarındaki mum ve lipidlerin yüksek oranıyla belirlenir. Fuksin boyasının absorpsiyonunu ve dolayısıyla hücre duvarında mikolat-fuksin kompleksinin oluşumunu artırmak için bir önlem olarak, numune uygulanan boyama solüsyonu normalde buharlaşma noktasına kadar ısıtılır.

Aside dirençli bakteriler fuksin boyasını bir kez emdikten sonra, etanol içinde hidroklorik asit gibi bir renk giderici solüsyonla yoğun bir şekilde işlem görseler bile, tekrar renklendirilmeleri neredeyse imkansızdır. Aside dirençli bakteriler, boyama için asit ve alkol dirençli olarak adlandırılır.

AFB-Fluor fenolsüz boyama kitini kullanırken, AFB-Fluor fenolsüz boyama solüsyonunda auramin ve rodamin floresan boyalarının kullanılması, ısıtma adımı ihtiyacını ortadan kaldırır. Bu boyalar aside dirençli bakterilerin hücre duvarında birikir ve mikroskop filtresine bağlı olarak siyah bir arka plana karşı sarı veya kırmızı olarak belirir.

Numunelerin Sputofluor™ ile ön işleme tabi tutulması bakterileri çevresindeki yapışkan sputum ve hücre materyalinden çözer.

Numune materyali

Havayla kurutulmuş ve ısıyla sabitlenmiş ve Sputofluor™ ile ön işlemden geçirilmiş bakteriyolojik materyal yaymaları; örn. balgam, ince iğne aspirasyon biyopsilerinden (İİAB) yayma, yıkama, baskı, efüzyon, pus, eksüda, sıvı ve katı kültürler.

İnsan kaynaklı, formalin fikse parafine gömülü doku kesitleri (3-4 µm kalınlığında parafin kesitleri)

Reaktifler

Kat. No. 1.01597.0001
AFB-Fluor phenol-free
Staining kit for the examination of acid-fast bacteria with fluorescence microscopy (Auramin-Rhodamine staining)

Paket içeriği:

Boyama kiti şunları içerir

Reaktif 1: Auramin-rodamin çözeltisi 200 ml
Reaktif 2: Dekolorize çözeltisi 2 x 200 ml
Reaktif 3: Karşıt boyama çözeltisi (KMnO₄) 200 ml

Ayrıca gerekenler:

Kat. No. 1.08000 Sputofluor™
mikroskop için

1 l

Numunelerin hazırlanması

Numuneler kalifiye personel tarafından alınmalıdır.

Tüm numuneler en son teknoloji kullanılarak işlem görmelidir.

Tüm numuneler açıkça etiketlenmelidir.

Numunelerin alınması ve hazırlanması için uygun aletler kullanılmalıdır.

Üreticinin uygulama/kullanım talimatlarını izleyin.

İlgili yardımcı reaktifleri kullanırken ilgili kullanım talimatlarına uyulmalıdır.

Sputum

Aside dirençli bakteriler, mukus ve hücre yapısından çözümlerini sağlamak için Sputofluor™ ile ön işleme tabi tutulmalıdır. Bu proseste, aktif bileşen hipoklorit, organik materyali oksidasyon yoluyla çözer ve daha fazla işlenebilmeleri için aside dirençli bakterileri nazikçe serbest bırakır.

Reaktif hazırlama: Sputofluor™ %15 solüsyonunun hazırlanması

Yaklaşık 200 ml solüsyon karışımının hazırlanması için:

Sputofluor™	15 ml
Distile su	85 ml

Santrifüj tüplerinde numune materyali hazırlama:	
Numune	1 parça (en az 2 ml)
Sputofluor™ solüsyonu (distile suda %15)	3 parça
Kuvvetle çalkalayın	10 dk
3000-4800 rpm'de santrifüjleyin	20 dk
Süpernatantı aktarın Sedimentin yaymalarını hazırlayın Hava ile kurutun	

Punktatlar, lavajlar, sedimentler

Uygun zenginleştirme önlemlerinden sonra, numune materyalini lam üzerine yayın ve havayla kurumasını bekleyin.

Histolojik kesitler

AFB-Fluor fenolsüz, histolojik kesitleri boyamak için kullanılır. Kesitler geleksel şekilde deparafinize edin ve azalan bir alkol serisinde rehidrate edin.

Yayma numunelerinin fiksasyonu

Numuneler bir Bunsen brülörünün alevi üzerinde fikse edilir (2-3 kez, aşırı ısıtmadan kaçınmaya dikkat ederek).

Numuneler ayrıca 100-110 °C'de bir kurutma kabininde veya bir ısıtma plağında 20 dakika ısıtılarak da sabitlenebilir.

Aşırı sıcaklıklar veya uzun süreli ısıtma, boyama performansının bozulmasına neden olabilir.

Reaktifin hazırlanması

AFB-Fluor fenolsüz - Aside dirençli bakterilerin floresan mikroskopla incelenmesi için boyama kiti (Auramin-Rodamin boyama) boyama için kullanılan reaktifleri kullanıma hazırdır, solüsyonların seyreltilmesi gereksizdir ve sadece boyama sonucunun ve stabilitenin bozulmasına neden olur.

Yüksek viskozitesi nedeniyle, fenolsüz auramin-rodamin boyama solüsyonu (Reaktif 1) kullanımdan önce kuvvetle çalkalanmalıdır.

Prosedür

Optimum bir boyama sonucunu garanti etmek için belirtilen sürelerle uyulmalıdır.

Yayma numunelerinin boyanması

Boyama rafında boyama

Sabitlenmiş yaymalı lam		
Reaktif 1 (auramin-rodamin çözeltisi)	damla halinde uygulayın, tümüyle kapatın ve boyayın	15 dk
Akan musluk suyu	dikkatle yıkayın	30 sn
Reaktif 2 (dekolorize çözeltisi)	damla halinde uygulayın, tümüyle kapatın ve tepki-meye bırakın	1 dk
Akan musluk suyu	dikkatle yıkayın	30 sn
Reaktif 3 (karşıt boyama çözeltisi)	damla halinde uygulayın, tümüyle kapatın ve boyayın	5 dk
Akan musluk suyu	dikkatle yıkayın	30 sn
Hava ile kurutun		

Yayma numunelerin birkaç ay süreyle saklanması için susuz montaj ortamı (örn. Neo-Mount™, Entellan™ new veya DPX yeni) ve bir lamel ile kapatma önerilir. Bunun için boyanan numuneler çok iyi kurutulmalıdır.

Mikroskopik büyütmeye > 40x olan boyalı lamaların analizi için daldırma yağı kullanılması önerilir.

Histolojik numunelerinin boyanması

Boyama rafında boyama

Histolojik lamaları geleneksel şekilde deparafinize edin ve azalan bir alkol serisinde rehidrate edin.

Boyama solüsyonları slaytlara damla damla uygulanır ve parafin bölümünü tamamen kaplamalıdır.

Optimum bir boyama sonucunu garanti etmek için belirtilen sürelerle uyulmalıdır.

Histolojik dokulu lam	
Distile su	yıkayın
Reaktif 1 (auramin-rodamin çözeltisi)	15 dk
Akan musluk suyu	30 sn
Reaktif 2 (dekolorize çözeltisi)	1 dk
Akan musluk suyu	30 sn
Reaktif 3 (karşıt boyama çözeltisi)	5 dk
Akan musluk suyu	30 sn
Etanol %70	1 dk
Etanol %70	1 dk
Etanol %96	1 dk
Etanol %96	1 dk
Etanol %100	1 dk
Etanol %100	1 dk
Ksilen veya Neo-Clear™	5 dk
Ksilen veya Neo-Clear™	5 dk
Neo-Clear™ ıslak lamaları Neo-Mount™ ile veya ksilen ıslak lamaları örn. Entellan™ new ve lamel ile kapatın.	

Dehidratasyondan (artan alkol serisi) ve ksilen veya Neo-Clear™ ile beraklaştırmadan sonra, sitolojik numuneler susuz montaj ajanlarıyla (örn. Neo-Mount™, Entellan™ new veya DPX yeni) ve lamel ile kapatılabilir ve ardından saklanabilir.

Sonuç

Aside dirençli bakteriler (floresan mikroskopunda)	kullanılan filtrelerin kombinasyonuna bağlı olarak kırmızı-turuncu (rodamin) veya sarı-yeşil (auramin) koyu ila siyah
Arka plan	

Optik ve floresan mikroskopisi için boyama

AFB-Fluor fenolsüz boyama kitini kullanan floresan boyama, örn. AFB-Color boyama kiti (Kat. No. 1.16450) veya AFB-Color modifiye (Kat. No. 1.00497) kullanılarak optik mikroskopi tanılmasında aside dirençli bakterilerin ilave boyanması için de idealdir.

AFB-Fluor fenolsüz boyama kiti ile boyanmış olan monte edilmemiş numuneler doğrudan tanınal amaçla kullanılabilir. Ardından, kullanılmış olabilecek daldırma yağını dikkatle çıkardıktan sonra, numuneler AFB-Color boyama kiti veya AFB-Color modifiye ile daha fazla boyanabilir. Bu şekilde muamele edilen numunede, aside dirençli bakteriler optik mikroskop altında açık yeşil (AFB-Color) veya açık mavi (AFB-Color modifiye) arka plana karşı macenta-kırmızı olarak görünür.

Değerlendirme

Pozitif sonuç "aside dirençli bakteri saptandı", negatif sonuç ise "aside dirençli bakteri saptanmadı" anlamına gelir. Olumlu bir sonuç, mikroskopi ile taksonomik bir sınıflandırmanın mümkün olduğu anlamına gelmez. Aside dirençli bakteriler saptanırsa özel donanımlı laboratuvarlarda daha ileri analizler yapılmalıdır.

Bakterilerin canlılığı da belirlenemez (aktif, inaktif).

Sonuç kesin değilse, daha ileri optik mikroskopi teşhisi için numunelerin ayrıca örn. AFB-Color boyama kiti (Kat. No. 1.16450) veya AFB-Color modifiye (Kat. No. 1.00497) ile boyanması önerilir.

Sorun giderme

Yayma numunelerinin fiksasyonu

Numunelerin bulaşıcı potansiyelini ve bakterilerin daha fazla çoğalmasını önlemek için bir Bunsen brülörü veya bir ısıtma kabini kullanılarak yeterli derecede ısı fiksasyonu şarttır.

Aside dirençli bakterilerin boyanması yok

Boyama prosedürünün kritik aşaması, yaymanın kalınlığından etkilenebilecek olan renk giderme aşamasıdır.

Ek olarak etanol içindeki taze bir hidroklorik asit solüsyonu yüksek düzeyde reaktif olduğundan sonucun dikkatle değerlendirilmesi gerekir. Renk giderme adımı sırasında bu protokolde belirtilen inküasyon sürelerine titizlikle uyulmalıdır, aksi takdirde yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir.

Çok güçlü arka plan boyaması

Optik mikroskopik görüntüde (koyu mavi) arka planın fazla güçlü boyanması durumunda, Reaktif 1 (auramin-rodamin çözeltisi) daha iyi karıştırılmalı ve ardından daha iyi renk giderilmelidir. Boyama solüsyonu oldukça viskoz olduğundan, renk giderme adımı sırasında lamin Reaktif 2 (dekolorize çözeltisi) ile döndürülmesi önerilir.

Teknik notlar

Kullanılan mikroskop, bir tıbbi tanı laboratuvarının gereksinimlerini karşılamalıdır.

Floresan mikroskopisi için önerilen filtre kombinasyonu:

Eksitasyon filtresi	490 - 570 nm
Renk separatörü	525 ve 635 nm
Emisyon filtresi	505 - 600 nm

Otomatik boyama sistemleri kullanırken lütfen sistem ve yazılım tedarikçisi tarafından verilen kullanım talimatlarına uyun.

Doldurmadan önce fazla daldırma yağını çıkarın.

Analitik performans karakteristikleri

"AFB-Fluor fenolsüz - boyama kiti", bu Kullanma Kılavuzunun "Sonuç" bölümünde açıklandığı gibi, biyolojik yapıları boyar ve görünür hale getirir. Ürünün kullanımı sadece yetkili ve kalifiye kişiler tarafından gerçekleştirilmelidir ve buna numune ve reaktif hazırlama, numune elleçleme, histolojik proses, uygun kontrollere ilişkin kararlar ve daha fazlası dahildir.

Ürünün analitik performansı, her bir üretim partisinin test edilmesiyle onaylanmıştır.

Şu boyalar için ürünün özgüllüğü, duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği açısından analitik performans %100 oranında doğrulandı:

	Testler Arası Özgüllük	Testler Arası Duyarlılık	Test İçi Özgüllük	Test İçi Duyarlılık
Histolojik boyama				
Aside dirençli bakteriler (floresan mikroskopunda)	14/14	14/14	6/6	6/6
Arka plan	14/14	14/14	6/6	6/6
Yayma boyama				
Aside dirençli bakteriler (floresan mikroskopunda)	14/14	14/14	6/6	6/6
Arka plan	14/14	14/14	6/6	6/6

Analitik performans sonuçları

Test içi (aynı parti üzerinde gerçekleştirilen) ve testler arası (farklı partiler üzerinde gerçekleştirilen) veriler, yapılan test sayısına göre doğru şekilde boyanmış yapıların sayısını listeler.

Klinik performans karakteristikleri

Ayrıca bu ürünün klinik performansı birçok bilimsel yayında başarıyla kanıtlanmıştır.

AFB-Fluor fenolsüz - boyama kiti klinik ortamlarda onlarca yıldır çok sayıda uygulamada başarıyla kullanılmaktadır.

Özellikle AFB-Fluor fenolsüz - boyama kiti klinik performansı, kurum içi bir çalışmada solüsyonun duyarlılığı ve özgüllüğü ve NPV ve PPV'si ölçülerek belirlendi:

	Auramin-Rodamin Boyama
Duyarlılık	14/14
Özgüllük	15/15

Duyarlılık: 14 numuneden 14'ü: %100

Özgüllük: 15 numuneden 15'i: %100

Pozitif tahmin değeri (PPV): %100

Negatif tahmin değeri (NPV): %100

Bu Performans Değerlendirmesinin sonuçları, ürünün amaçlanan kullanıma uygun olduğunu ve güvenilir şekilde çalıştığını doğrular.

Ancak boyama sonuçlarının tanınal yorumu, hasta anamnezi, morfolojisi, uygun kontrollerin kullanımı ve uygunsa ek tanı testleri dikkate alınarak kalifiye ve yetkili profesyoneller tarafından yapılmalıdır. Bu yöntem, insan teşhislerinde tamamlayıcı olarak kullanılabilir.

Tanılama

Tanılama sadece yetkili ve kalifiye personel tarafından yapılmalıdır.

Geçerli isimlendirmeler kullanılmalıdır.

Bu yöntem, insan teşhislerinde tamamlayıcı olarak kullanılabilir.

Daha ileri testler, tanınmış yöntemlere göre seçilmeli ve uygulanmalıdır.

Hatalı bir sonuçtan kaçınmak için her uygulamayla birlikte uygun kontrollere (örn. ISOSLIDE™ AFB, Kat. No. 1.02560.0001) gerçekleştirilmelidir.

Sonuç kesin değilse, daha ileri optik mikroskopi teşhisi için numunelerin ayrıca örn. AFB-Color boyama kiti (Kat. No. 1.16450) veya AFB-Color modifiye (Kat. No. 1.00497) ile boyanması önerilir.

Saklama

AFB-Fluor fenolsüz - Aside dirençli bakterilerin floresan mikroskopuyla incelenmesi için boyama kiti (Auramin-Rodamin boyama) +15 °C ila + 25 °C'de saklayın.

Raf ömrü

AFB-Fluor fenolsüz - Aside dirençli bakterilerin floresan mikroskopuyla incelenmesi için boyama kiti (Auramin-Rodamin boyama), belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.

Şişenin ilk açılışından sonra, içeriği +15 °C ile +25 °C arasında saklandığı-nda belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.

Damlalık şişeleri her zaman sıkıca kapalı durumda tutulmalıdır.

Karşıt boyama çözeltisi (reaktif 2) renklendirmesinin, boyama prosesleri ve tanılama üzerinde bir etkisi yoktur.

Kapasite

Paket 60-65 uygulamaya kadar yeterlidir. Yaymaların kalınlığına bağlı olarak verim daha da yüksek olabilir.

Diğer talimatlar

Yalnızca profesyonel kullanım içindir.

Hatalardan kaçınmak için uygulama sadece kalifiye personel tarafından yapılmalıdır.

İş güvenliği ve kalite güvencesi ile ilgili ulusal yönergelerle uyulmalıdır.

Standarda uygun şekilde donatılmış mikroskoplar kullanılmalıdır.

Gerekirse tıbbi tanı laboratuvarına uygun standart bir santrifüj kullanın.

Enfeksiyona karşı korunma

Laboratuvar yönergeleri doğrultusunda, enfeksiyona karşı korunmak için etkili önlemler alınmalıdır.

İmha talimatları

Paket, yürürlükteki imha yönergelerine uygun şekilde imha edilmelidir. Kullanılmış ve raf ömrü dolmuş olan solüsyonlar yerel yönergelerle uygun şekilde özel atık olarak atılmalıdır. İmha ile ilgili bilgiler, www.microscopy-products.com adresinde "Mikroskopi Ürünlerinin İmhasına İlişkin İpuçları" Hızlı Bağlantısı altında verilmiştir. AB içinde şu anda, mad-delerin ve karışımların sınıflandırılması, etiketlenmesi ve paketlenmesine ilişkin olarak, 67/548/EEC ve 1999/45/EC Yönergelerinin değiştirilmesi ve yürürlükten kaldırılması ve 1907/2006 Sayılı Yönetmeliğin (EC) değiştirilme-si ile, 1272/2008 Sayılı (AT) YÖNETMELİK geçerlidir.

Yardımcı reaktifler

Kat. No. 1.00327	Hidroklorik asit etanolde mikroskopi için	1 l, 5 l
Kat. No. 1.00496	Formaldehit çözeltisi %4 tamponlu, pH 6.9 (yakl. %10 Formalin çözeltisi), histoloji için	350 ml ve 700 ml (geniş bottle boyunlu şişede), 5 l, 10 l, 10 l Titripac®
Kat. No. 1.00497	AFB-Color modifiye Sıcak boyama yöntemiyle aside dirençli bakterilerin (AFB) saptanması için boyama kiti	1 set
Kat. No. 1.00579	DPX yeni susuz kapama ortamı mikroskopi için	500 ml
Kat. No. 1.00869	Entellan™ new lamel için mikroskopi için	500 ml
Kat. No. 1.02560	ISOSLIDE™ AFB Kontrol Lamaları histolojik dokuda aside dirençli bakterilerin saptanması için referans dokulu	25 tests
Kat. No. 1.03999	Formaldehit çözeltisi min. %37 asit içermez yaklaşık %10 metanol ve kalsiyum karbonat ile stabilize edilmiş histoloji için	1 l, 2,5 l, 25 l
Kat. No. 1.04699	İmmersiyon yağı mikroskopi için	100 ml'lik damlatma şişesi, 100 ml, 500 ml
Kat. No. 1.07164	Parafin pastillerikatılaşma noktası 56-58°C civarında histoloji için	10 kg (4x 2,5 kg)
Kat. No. 1.07961	Entellan™ new hızlı destek besiyeri mikroskopi için	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. No. 1.08000	SputofluoI™ mikroskopi için	1 l
Kat. No. 1.08298	Ksilen (izometrik karışım) histoloji için	4 l
Kat. No. 1.09016	Neo-Mount™ susuz destek besiyeri mikroskopi için	100 ml'lik damlatma şişesi, 500 ml
Kat. No. 1.09843	Neo-Clear™ (ksilen yedeği) mikroskopi için	5 l
Kat. No. 1.11609	Histosec™ pastilleri katılaşma noktası 56-58 °C histoloji için gömme ajanı	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg

Kat. No. 1.15161	Histosec™ pastilleri (DMSO'suz) katılaşma noktası 56-58 °C histoloji için gömme ajanı	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Kat. No. 1.16450	AFB-Color boyama kiti aside dirençli bakterilerin (AFB) mikroskopik incelemesi için (soğuk boyama)	1 set

Tehlike sınıflandırması

Kat. No. 1.01597.0001

Lütfen etikette yazılı olan tehlike sınıflandırmasına ve güvenlik bilgi formun-da verilen bilgilere uyun.

Güvenlik bilgi formu web sitesinde ve talep üzerine mevcuttur.

Ürünlerin ana bileşenleri

Kat. No. 1.01597.0001

Reaktif 1

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

Reaktif 2

C ₃ H ₈ O	543,3 g/l
HCl min. %37	15,7 g/l
1 l = 0,878 kg	

Reaktif 3

KMnO ₄	5,0 g/l
1 l = 1,013 kg	

Genel açıklama

Bu cihazın kullanımı sırasında veya kullanımının bir sonucu olarak ciddi bir olay meydana gelirse, lütfen bunu üreticiye ve/veya yetkili temsilcisine ve ulusal makama bildirin.

Literatür

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Routine Cytological Staining Techniques: Theoretical Background and Practice, Mathilde E. Boon, Johanna S. Drijver, 1986, Elsevier Science Publishing company



H225: Kolay alevlenir sıvı ve buhar.

H290: Metalleri aşındırabilir.

H319: Ciddi göz tahrişine yol açar.

H336: Rahavete veya baş dönmesine yol açabilir.

H411: Sucul ortamda uzun süre kalıcı, toksik etki.

P210: Isıdan, sıcak yüzeylerden, kıvılcımdan, açık alevden ve diğer tutuşma kaynaklarından uzak tutun. - Sigara içilmez.

P233: Kabi sıkıca kapalı tutun.

P234: Sadece orijinal ambalajında saklayın.

P240: Kabi ve alıcı ekipmanı toprağa oturtun ve bağlayın.

P273: Çevreye verilmesinden kaçının.

P305 + P351 + P338: GÖZLERDE İSE: birkaç dakika su ile dikkatlice durulayın. Kontakt lens varsa ve kolaysa çıkartın. Durulamaya devam edin.

Reaktif 1:

H226: Alevlenir sıvı ve buhar.

H319: Ciddi göz tahrişine yol açar.

Reaktif 2:

H225: Kolay alevlenir sıvı ve buhar.

H290: Metalleri aşındırabilir.

H319: Ciddi göz tahrişine yol açar.

H336: Rahavete veya baş dönmesine yol açabilir.

Reaktif 3:

H411: Sucul ortamda uzun süre kalıcı, toksik etki.

Revizyon Geçmişi

Sürüm	Değişiklik Yorumu
2024-Jul-19	Revizyon Geçmişi girişiyle birlikte ilk sürüm.



Kullanım talimatla-
rına başvurun



Üretici



Katalog numarası



Parti kodu



Dikkat, beraberindeki
belgelere bakın



Son kullanma ta-
rihi: YYYY-AA-GG



Sıcaklık
sınırlaması

Status: 2024-Jul-19

Merck'in Life Science bölümü, ABD ve Kanada'da MilliporeSigma olarak faaliyet göstermektedir.

© 2024 Merck KGaA, Darmstadt, Almanya ve/veya bağlı şirketleri. Tüm Hakları Saklıdır. Merck ve Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Almanya'nın ticari markalarıdır. Diğer tüm ticari markalar ilgili sahiplerine aittir. Ticari markalarla ilgili ayrıntılı bilgiler kamuoyuna açık kaynaklarda mevcuttur.



Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,
Tel. +49(0)6151 72-2440

www.sigmaaldrich.com

MERCK