

VERWENDUNGSZWECK

Ziehl-Neelsen-Färbelösungen von Pro-Lab dienen dem Anfärben von Abstrichen von Proben, die möglicherweise Mykobakterien enthalten.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Mykobakterien besitzen spezielle Eigenschaften, aufgrund derer die Ziehl-Neelsen-Färbung zum Nachweis von Tuberkulosebazillen verwendet werden kann.

PRINZIP

Der Lipidgehalt der Zellwand säurefester Bakterien erschwert das Anfärben solcher Organismen. Bei der Ziehl-Neelsen-Färbung wird Phenol eingesetzt, welches dem Farbstoff ermöglicht, selbst nach Verwendung von Entfärbem die Zellwand zu durchdringen. Damit ein Organismus als säurefest bezeichnet werden kann, muss er gegenüber einer Entfärbung mit Säurealkohol resistent sein. Zur Hervorhebung des angefärbten Organismus wird eine Kontrastfärbung eingesetzt.

REAGENZIEN
Gebrauchsfertige Färbelösungen.

PL.7018	ZN-Carbofuchsin	500 ml
PL.7019	ZN-Carbofuchsin	1 Liter
PL.7020	ZN-Carbofuchsin	2 Liter
PL.7021	Kinyoun Carbofuchsin	500 ml
PL.7022	Kinyoun Carbofuchsin	1 Liter
PL.7024	ZN- & Kinyoun-CF-Differenzierungslösung	500 ml
PL.7025	ZN- & Kinyoun-CF-Differenzierungslösung	1 Liter
PL.7026	ZN- & Kinyoun-CF-Differenzierungslösung	2 Liter
PL.7027	Methylenblau	500 ml
PL.7028	Methylenblau	1 Liter
PL.7029	Methylenblau	2 Liter
PL.7030	Malachitgrün	500 ml
PL.7031	Malachitgrün	1 Liter
PL.7032	Malachitgrün	2 Liter
PL.7033	Auramin-Phenol	500 ml
PL.7034	Auramin-Phenol	1 Liter
PL.7035	Auramin-Phenol	2 Liter
PL.7036	Auramin-Differenzierungslösung	500 ml
PL.7037	Auramin-Differenzierungslösung	1 Liter
PL.7038	Auramin-Differenzierungslösung	2 Liter
PL.7059	Thiazinrot	500 ml
PL.7060	Thiazinrot	1 Liter

Konzentrate - Vor dem Gebrauch mit Aqua dest. auf 1 Liter verdünnen.

PL.8005	ZN-Carbofuchsin	100 ml
PL.8006	Methylenblau	100 ml
PL.8007	Malachitgrün	100 ml
PL.8008	Auramin-Phenol	100 ml
PL.8013	Kaliumpermanganat	100 ml

Konzentrierte Färbung - Vor der Verwendung mit destilliertem Wasser auf 4 Liter verdünnen.

PL.8005-4.0	ZN-Carbofuchsin	400 ml
PL.8006-4.0	Methylenblau	400 ml
PL.8007-4.0	Malachitgrün	400 ml
PL.8008-4.0	Auramin-Phenol	400 ml

PL.8013-4.0 Kaliumpermanganat 400 ml

Konzentrate - Vor dem Gebrauch mit Aqua dest. auf 5 Liter verdünnen.

PL.8005-5.0	ZN-Carbofuchsin	500 ml
PL.8006-5.0	Methylenblau	500 ml
PL.8007-5.0	Malachitgrün	500 ml
PL.8008-5.0	Auramin-Phenol	500 ml
PL.8013-5.0	Kaliumpermanganat	500 ml

Färbekits (gebrauchsfertig)

PL.8060/25 TB-Färbekit – 250 ml ZN-Carbofuchsin, 2 x 250 ml ZN-Differentiatorlösung, 250 ml Methylenblau.

PL.8061/25 TB-Färbekit – 250 ml ZN-Carbofuchsin, 2 x 250 ml ZN-Differentiatorlösung, 250 ml Malachitgrün.

Immersionöl (DBP-frei zur Gefahrenreduzierung)

PL.396 Immersionöl 50 ml

SICHERHEITSHINWEISE

- Die Ziehl-Neelsen-Färbelösungen von PRO-LAB dürfen ausschließlich für *in vitro*-Verfahren und nicht für heilende oder prophylaktische Zwecke eingesetzt werden.
- Während und nach der Verwendung sollten alle Materialien entsprechend den Richtlinien der guten Laborpraxis behandelt werden; außerdem muss stets beachtet werden, dass alle Testmaterialien bei Nichtbeachten dieser Richtlinien möglicherweise biogefährdend sind.
- Die Vorrichtung stellt keine größere Umweltgefährdung dar als die mit der Vorrichtung verwendeten klinischen Proben. Während des Umgangs mit dem Test und der Entsorgung der klinischen Proben sollten alle geltenden Sicherheitsvorschriften eingehalten werden, da es sich um infektiöses Material handeln könnte. Es besteht die Möglichkeit einer Einflussnahme auf die Umwelt, welche durch korrekte Handhabung und Entsorgung vermieden wird.

STABILITÄT UND LAGERUNG

Bei Raumtemperatur aufbewahren. Entfernt von entzündlichen Materialien aufbewahren. Nicht direktem Sonnenlicht aussetzen. Unter diesen Bedingungen sind die Reagenzien bis zu dem auf der Packung angegebenen Datum haltbar.

PROBENGEWINNUNG UND ANZÜCHTUNG

Entsprechend den Standardverfahren in der Mikrobiologie.

ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT GELIEFERTE MATERIALIEN

Saubere Objektträger aus Glas, sterile Impföse, Bunsenbrenner/Heißluft, Färbegestell, Leitungswasser, Immersionöl, Mikroskop, Blottingpapier oder Ähnliches.

VERFAHREN
Klassische Ziehl-Neelson Methode.

- Einen dünnen, gleichförmigen Abstrich präparieren und lufttrocknen.
- Wärmefixieren und abkühlen lassen.
- Den Objektträger mit ZN Carbol Fuchsin fluten und leicht erhitzen

(nicht kochen). 10 Minuten ruhen lassen und dabei nach 5 Minuten erneut erhitzen.

- Mit Wasser abspülen.
- Den Objektträger 10 Minuten mit dem Differentiator fluten und nach 5 Minuten den Differentiator wechseln.
- Mit Wasser abspülen.
- Den Objektträger mit Gegenfärbung fluten (Methylenblau oder Malachitgrün), eine Minute ruhen lassen.
- Gut mit Wasser abspülen, sanft trocken tupfen oder mit leichter Hitze trocknen.
- Mithilfe einer Ölimmersion unter dem Mikroskop betrachten.

Kinyoun Carbol Fuchsin Methode

- Einen dünnen, gleichförmigen Abstrich präparieren und lufttrocknen.
- Wärmefixieren und abkühlen lassen.
- Den Objektträger mit Kinyoun Carbol Fuchsin fluten 10 Minuten ruhen lassen.
- Mit Wasser abspülen.
- Den Objektträger 10 Minuten mit dem Differentiator fluten und nach 5 Minuten den Differentiator wechseln.
- Mit Wasser abspülen.
- Den Objektträger mit Gegenfärbung fluten (Methylenblau oder Malachitgrün), eine Minute ruhen lassen.
- Gut mit Wasser abspülen, sanft trocken tupfen oder mit leichter Hitze trocknen.
- Mithilfe einer Ölimmersion unter dem Mikroskop betrachten

Auramin-Phenol-Färbung

- Einen dünnen, gleichmäßigen Ausstrich der Probe herstellen und lufttrocknen lassen.
- Durch Hitze fixieren und abkühlen lassen.
- Den Objektträger in Auramin-Phenol tauchen und 10 Minuten stehen lassen.
- Mit Wasser abspülen.
- Den Objektträger 10 Minuten lang in Differenzierungslösung tauchen und die Differenzierungslösung nach 5 Minuten austauschen.
- Mit Wasser abspülen.
- Den Objektträger in Kaliumpermanganat oder Thiazinrot tauchen und 30 Sekunden stehen lassen.
- Gut mit Wasser abspülen, trocken tupfen oder zum Trocknen vorsichtig erwärmen.
- Im Mikroskop mit dem Ölimmersion-Fluoreszenzobjektiv auswerten.

QUALITÄTSKONTROLLE

Das Alter der Kulturen und der pH-Wert des Mediums, in dem die Bakterien angezüchtet werden, können deren Reaktion auf die Färbung wesentlich beeinflussen. Es sollten nur Kulturen verwendet werden, die höchstens 24 Stunden alt sind.

Empfohlene Kulturen für die Qualitätskontrolle:

- Mycobacterium tuberculosis* HR37 Rv NCTC 7416
- Streptomyces griseus* NCTC 7807

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE
Ziehl-Neelsen-Färbung:

Säurefeste Bakterien sind rot gefärbt, andere Organismen sind je nach verwendetem Kontrastfärbemittel blau oder grün gefärbt.



Kinyoun-Carbofuchsin-Färbung:

Säurefeste Bakterien sind rot gefärbt, andere Organismen sind je nach verwendetem Kontrastfärbemittel blau oder grün gefärbt.

Auramin-Phenol-Färbung:





Säurefeste Bakterien erscheinen als hell leuchtende Stäbchen vor einem dunklen Hintergrund.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Durch Anfärben von Zelltrümmern kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen.
2. Positive Färbereaktionen sind lediglich als vorbehaltlicher Nachweis des Vorhandenseins von *M. tuberculosis* in der Probe zu werten. Negative Ergebnisse bedeuten nicht unbedingt, dass die Probe auch in der Kultur negativ ist. Auch für den positiven Nachweis von *M. tuberculosis* empfehlen sich Anzuchtmethoden.
3. Organismen, bei denen es sich nicht um Mykobakterien handelt, so z.B. *Rhodococcus* spp., *Cryptosporidium* spp. und *Isopora* spp, können verschiedene Stufen von Säurefestigkeit aufweisen.
4. Ein zu starkes Entfärben säurefester Organismen tritt nur in Ausnahmefällen auf. Die Entfärbung kann daher gründlich durchgeführt werden.
5. Bei der Kontrastfärbung mit Kaliumpermanganat ist die Einhaltung der korrekten Zeitintervalle wichtig, da es sonst zu einer Abschwächung der Fluoreszenz der Bazillen kommt.
6. Die fertigen Objektträger sollten stets sofort ausgewertet oder im Dunkeln bei 2-8°C aufbewahrt werden, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden.

QUELLEN

1. Ziehl, F. 1882. Zur Färbung des Tuberkelbacillus. Dtsch. Med. Wochenschr. 8:451
2. Neelson, F. 1883. Ein Casuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose. Centrald. Med. Wiss. 21:497-501.
3. Kinyoun, J.J. 1915. A note on Uhlenhuth's method for sputum examination for tubercle bacilli. Am. J. Clin. Pathol. 46:472-4.
4. Manual of Clinical Microbiology. Lennette.
5. The Practice of Medical Microbiology. 12 Edition. V2. R. Cruickshank, J.P. Duguid, B.P. Marmion, R.H.A. Swain.

	= Hersteller
	= Medizinprodukt für die in vitro Diagnostik.
	= Temperaturbegrenzung
	= Beachten Sie die Gebrauchsanleitung

Bei diesen Anleitungen handelt es sich um eine Fachübersetzung der englischen Originalversion. Bei Unklarheiten oder offensichtlichen Abweichungen wenden Sie sich bitte an Pro-Lab.