



**F.A.S.T.[™] AFB-Ausstrichkit mit Aufschlusslösung
(400 Stck.)**

Handbuch

Form 416, Rev. B
Stand 18.1.2012

F.A.S.T.™ AFB-Ausstrichkit mit Aufschlusslösung (400 Stck.)

Verwendungszweck

Zum Einsatz beim Aufschließen/Dekontaminieren und Präparieren von Atemwegproben oder -kulturen des Patienten zum anschließenden Nachweis oder zur Charakterisierung von säurefesten Organismen.

Übersicht und Grundsätze

Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO), von der seit 1990 Inzidenzdaten aufgezeichnet werden, ist die Anzahl der Tuberkulosefälle seit mindestens diesem Zeitpunkt am Steigen.¹ Die frühe und korrekte Erkennung der Tuberkulose ist ein wichtiger Faktor für eine effektive Behandlung und Eindämmung der Krankheit. Die häufigste Methode zum Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* ist die mikroskopische Untersuchung eines Sputumausstrichs.¹ Dies lässt sowohl eine Verdachtsdiagnose als auch eine Größenbestimmung der Mykobakterienbelastung zu.

Säurefeste Organismen wie *Mycobacterium tuberculosis* können mit Anilinfarben gefärbt werden und widerstehen der Verfärbung durch Säure und Alkohol. Wenn der Behandlung eine Gegenfärbung folgt, werden die säurefesten Organismen damit im Kontrast zu anderen Organismen und Verunreinigungen gefärbt, die nur die Gegenfärbung behalten haben. Die klassischen Färbemethoden für die säurefeste Mikroskopie erzeugen jedoch einen Ausstrich, der mitunter nur schwierig und langsam auszulesen ist. Die Färbemittel Auramin O und Auramin-Rhodamin wurden erfolgreich bei der Fluoreszenzmikroskopie von Mykobakterien eingesetzt. Es liegen widersprüchliche Berichte über den Färbemechanismus vor, darunter die Bindung von Auramin O an die Zellwand der Mykobakterien² und die Bindung des Färbemittels mit „dem Großteil bzw. dem gesamten“ Auramin O, das mit der Nukleinsäure der Mykobakterien verbunden ist.³ Es wurde jedoch gezeigt, dass die Färbung mit Auramin O bei der Identifizierung von säurefesten Bakterien sensibler ist als lichtmikroskopische Methoden.⁴ Die höhere Sensibilität ist größtenteils auf den hohen Kontrast zurückzuführen, den die fluoreszenten Färbemittel den säurefesten Organismen verleihen, die grün vor einem dunklen Hintergrund erscheinen. Diese Kontraststeigerung ermöglicht den Einsatz von Objektiven mit größeren Sichtfeldern, wodurch sich die Gesamtuntersuchungszeit verringert.

Die Referenzmethode für die TBC-Diagnose ist eine Zellkultur, die oft im Zusammenhang mit einer Ausstrichmikroskopie oder nach Nachweise einer positiven Ausstrichprobe durchgeführt wird. Die Präparation einer Sputumprobe für die Zellkultur erfordert sowohl einen Aufschluss zur Reduzierung der Probeviskosität als auch eine Dekontamination zur Reduzierung der lebensfähigen normalen Flora. Zum Aufschließen und Dekontaminieren wird oft die NALC-NaOH-Methode verwendet. Hier fungiert NALC (N-acetyl-L-cystein) als Mukolytikum, indem es die Verbindungen zwischen den einzelnen Mucinmolekülen aufschließt. NaOH (Natriumhydroxid) deaktiviert die normale Flora und säurefesten Organismen. Bei kontrolliertem Kontakt (Zeit und Konzentration) tötet es jedoch die normale Flora ab, während die säurefesten Organismen lebensfähig bleiben. Nach der Aufschließung, Dekontamination und anschließenden Konzentration kann die resultierende Probe für eine Zellkultur und zur Ausstrichmikroskopie verwendet werden.

Das QBC F.A.S.T. AFB-Ausstrichkit mit Aufschlusslösung beinhaltet die Reagenzien und das Einwegzubehör, die zur Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie an TBC-Ausstrichen, einschließlich Aufschließen und Dekontaminieren der Probe, erforderlich sind. Die Komponenten sind so ausgelegt, dass sie ein vollständiges System bilden. Sie beinhalten das innovative, arbeitssparende F.A.S.T. Auramin O Färbekit und die SureFocus-Mikroskopobjektträger (zum Patent angemeldet). Das F.A.S.T. Auramin O Färbekit nutzt ein Schnellverfahren mit vier Schritten, das nur knapp über 2 Minuten dauert. Im Vergleich dazu sind für herkömmliche Auraminmethoden rund 15 bis 20 Minuten erforderlich. Die SureFocus-Mikroskopobjektträger erleichtern die Fluoreszenzmikroskopie durch die Bereitstellung von Fluoreszenzmarkern im gesamten Ausstrichbereich, die beim Einstellen und Aufrechterhalten der richtigen

Bildschärfe behilflich sind. Dadurch werden Belastung und Ermüdung des Bedieners vermindert und gute Ergebnisse gewährleistet.

Inhalt des Kits

Der Inhalt des Kits reicht zur Bearbeitung von rund 400 Proben:

400	Sterile Sputumpräparationsröhrchen
1200	Sterile Transferpipetten
432	SureFocus-Mikroskopobjektträger
120 ml	QBC <i>F.A.S.T.</i> Färbemittel Auramin O
120 ml	QBC <i>F.A.S.T.</i> Entfärber/Quencher
5	<i>F.A.S.T.</i> Objektträger zur Qualitätskontrolle
9	Sputumaufschlusslösung (75 ml)
4	Packungen Aufschlusspuffer
1	Produktbeilage zum Kit

Warn- und Vorsichtshinweise

Für den Einsatz bei *In-vitro*-Diagnosen.

Klinische Proben vom Menschen können Erreger von Infektionskrankheiten enthalten, wie z. B. Tuberkulose, Hepatitis, humane Immundefizienz (HIV). Bei der Handhabung klinischer Proben sind allgemeine Vorsichtshinweise und örtliche Vorschriften und Bestimmungen zu befolgen. Alle Aktivitäten, bei denen ein Aerosol der klinischen Proben entstehen könnte, müssen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt werden. Bei Aktivitäten, bei denen *Mycobacterium tuberculosis* gezüchtet werden, sind Sicherheitsverfahren und -praktiken der Stufe 3 anzuwenden.

Die Chemikalien in diesem Kit sind gesundheitsschädlich und können zu Verletzungen oder sogar zum Tod führen. Die Reagenzien enthalten starke Basen, die zu Verätzung führen können. Ein Kontakt mit Augen und Haut ist zu vermeiden. Bei Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen. Bei Verschlucken von Sputumaufschlusslösung Milch, Eiweiß oder viel Wasser reichen. Bei Augenkontakt oder Verschlucken sofort einen Arzt verständigen. Weitere Informationen über die Sicherheit und ordnungsgemäße Entsorgung entnehmen Sie dem Sicherheitsdatenblatt zum Kit.

Die Mikroskopie von Sputumausstrichen sowie die Verfahren zur Präparation und Verarbeitung von Proben dürfen nur von Personen ausgeführt werden, die in den entsprechenden Verfahren und in allgemeiner Laborpraxis geschult sind.

Gebrauchsanweisung

Zur Verwendung mit Atemwegproben des Patienten.

Die Sputumpräparationsröhrchen, sterilen Transferpipetten und SureFocus-Objektträger sind nur zum einmaligen Gebrauch bestimmt.

Phosphatpufferpräparation

1. Gießen Sie den pulverförmigen Inhalt eines Phosphatpufferpakets in einen Messkolben oder eine autoklavierbare Flasche mit einer Abstufung von 500 ml.
2. Fügen Sie 500 ml Wasser hinzu und mischen Sie die Lösung gründlich.
3. Wenn ein Messkolben verwendet wurde, gießen Sie den Inhalt in eine autoklavierbare Flasche.
4. Autoklavieren Sie den Puffer.

Aufschlussverfahren

1. Lockern Sie den Schraubdeckel der Kunststoffflasche mit Sputumaufschlusslösung vor der Verwendung (nicht abnehmen).
2. Drücken Sie auf die aufrechte Flasche, bis die Ampulle in der Flasche zerbricht.
3. Schließen Sie den Deckel und schütteln Sie die Flasche vorsichtig, um das NALC aufzulösen. Die Lösung darf nicht schäumen.
4. Fügen Sie einem aerosolfreien 50-ml-Zentrifugierröhrchen klinische Probe und NALC-Lösung in gleicher Menge hinzu.

5. Verschließen Sie das Zentrifugierröhrchen und mischen Sie die Probe, bis sie verflüssigt ist. Lassen Sie die Aufschlusslösung bei Raumtemperatur 15 Minuten lang reagieren. Eine längere Aufschlusszeit ist zu vermeiden, weil die Mykobakterien bei längerem Kontakt mit der Aufschlusslösung inaktiviert werden.
6. Fügen Sie sterilen Phosphatpuffer hinzu, bis Sie ein endgültiges Volumen von 50 ml erhalten, und verschließen Sie das Zentrifugierröhrchen erneut.
7. Zentrifugieren Sie die Probe 15 Minuten lang bei 2200 bis 3000 x g.
8. Gießen Sie den Überstand in einen geeigneten Behälter für biologische Gefahrstoffe ab.
9. Resuspendieren Sie den Satz in 1 bis 2 ml Phosphatpuffer. Die Probe muss nun einen pH-Wert von 6,8 haben.
10. Die Probe kann nun für Diagnostiktests und Zellkulturen verwendet werden.

Vorbereitung und Färbung von Proben:

Tragen Sie die Probe mittig auf dem SureFocus-Objektträger auf und streichen Sie sie gleichförmig über die gesamte Ellipsenfläche aus. Der Ausstrich muss dick genug sein, um zu gewährleisten, dass ausreichend Probematerial vorhanden ist. Die Linien des SureFocus-Objektträgers müssen jedoch durch die Probe noch sichtbar sein. Hitzefixieren Sie den Objektträger mit einem Brenner oder Objektträgerwärmer.

1. Hitzefixieren Sie den Objektträger mit dem Probeausstrich.
2. Bedecken Sie den Ausstrich mit *F.A.S.T.* Auramin O und lassen Sie das Färbemittel 1 Minute lang einwirken.
3. Spülen Sie den Ausstrich vorsichtig mit entionisiertem oder Leitungswasser ab und lassen Sie ihn abtropfen.
4. Bedecken Sie den Ausstrich mit *F.A.S.T.* Entfärber/Quencher und lassen Sie diesen 1 Minute lang einwirken.
5. Spülen Sie den Ausstrich vorsichtig mit entionisiertem oder Leitungswasser ab und lassen Sie ihn abtropfen. Trocknen Sie den Objektträger.
6. Untersuchen Sie den Objektträger mit dem QBC ParaLens oder einer anderen Fluoreszenzmikroskopvorrichtung.

Untersuchungsverfahren:

Untersuchen Sie den Objektträger mit dem QBC ParaLens oder einem anderen Gerät zur Fluoreszenzmikroskopie. Färben Sie die hitzefixierte Probe mit einem Auramin O-Verfahren, z. B. *F.A.S.T.* Auramin O. Hinweis: Es empfiehlt sich, jeder Charge gefärbter Objektträger eine positive und negative Kontrollprobe beizufügen, um die Integrität von Reagens und Instrument sowie die korrekte Durchführung zu gewährleisten.

Untersuchung des Ausstrichs:

Legen Sie den gefärbten Objektträger auf den Objektstisch des Mikroskops und zentrieren Sie das Objektiv über dem Startkreis. Fokussieren Sie ein Objektiv mit niedriger Vergrößerung im Hellfeldmodus über dem Startkreis und gehen Sie schrittweise zum gewünschten Untersuchungsobjektiv über. Wechseln Sie in den Fluoreszenzmodus. Sie können das Mikroskop mit dem folgenden Verfahren auch im Fluoreszenzmodus fokussieren: Zentrieren Sie das Objektiv über dem Startkreis und stellen Sie den Objektstisch knapp oberhalb der Arbeitsdistanz des Objektivs ein. Blicken Sie bei eingeschalteter Fluoreszenzlichtquelle durch das Okular und stellen Sie das Feld mit der Feineinstellung scharf ein. (Tipp: Mit der Scharfstellung der Fluoreszenzlinie sollte das Sichtfeld leuchtend grün werden. Wenn das Feld dunkel bleibt, wurde die korrekte Fokusebene überschritten.) Gehen Sie zum Rand der Fluoreszenzlinie und stellen Sie die Schärfe erneut ein.

Beginnen Sie mit der Untersuchung des Ausstrichs am Startkreis und fahren Sie bis zum nächsten Marker fort. Mithilfe der Marker können die untersuchten Sichtfelder gezählt werden, wenn die Felder nacheinander bearbeitet werden (d. h. die Bewegung des Objektstischs ist durchgängig). Wenn der nächste Marker erreicht ist, prüfen Sie, ob das Bild noch scharf ist. Setzen Sie die Untersuchung fort, indem Sie von Marker zu Marker über die in Ihren Standardverfahren vorgegebene Anzahl von Feldern fortschreiten

(zurückgelegte Distanz bei kontinuierlicher Bewegung). Zeichnen Sie die Ergebnisse auf.

Untersuchung des Ausstrichs – Beispiel:

Abbildung 1

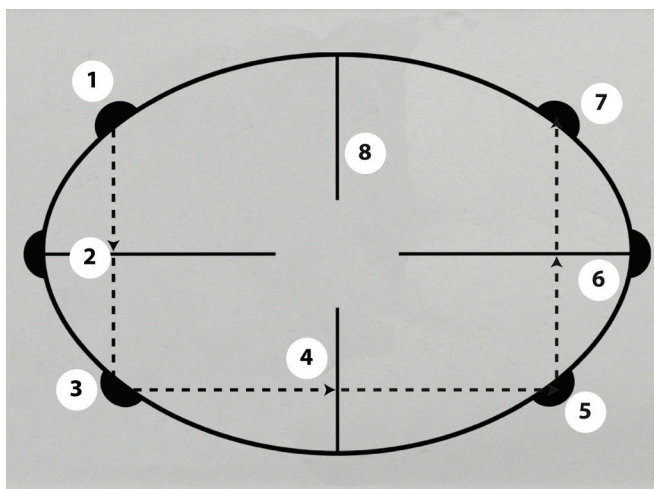


Abbildung 1 oben zeigt einen SureFocus-Objektträger mit einem vorgegebenen Untersuchungspfad. Für diesen Pfad stellen Sie das Gerät am Startkreis 1 scharf. Untersuchen Sie den Objektträger systematisch vertikal und arbeiten Sie sich dabei bis zum Startkreis 3 vor. Verwenden Sie bei der Fortbewegung von Sichtfeld zu Sichtfeld eine kontinuierliche Bewegung und springen Sie nicht von Feld zu Feld. Wenn Sie bei Linie 2 angekommen sind, überprüfen Sie die Fokussierung des Mikroskops. Fahren Sie vertikal bis zum Startkreis 3 fort und überprüfen Sie die Fokussierung des Mikroskops. Fahren Sie nun horizontal bis zur Linie 4 fort. Wenn Sie bei Linie 4 angekommen sind, überprüfen Sie die Fokussierung des Mikroskops. An diesem Punkt wurde die folgende Anzahl von Feldern untersucht, wenn die Sichtfelder durchgängig untersucht wurden:

Vergrößerung	Anzahl der untersuchten Felder
200x	26
400x	52
600x	78
1000x	130

Die folgende Tabelle zeigt die ungefähren Distanzen und Sichtfelder zwischen den Markern bei standardmäßigen Vergrößerungen:

Untersuchungspfad	Distanz (mm)	Sichtfelder		
		200x	400x	600x
1 bis 2; 2 bis 3; 5 bis 6; 6 bis 7	6,5	7	14	21
1 bis 8; 8 bis 7; 3 bis 4; 4 bis 5	11	12	24	36

Qualitätskontrolle:

Die Objektträger sind zur Diagnose der Patientenprobe mit Reagens zu färben. Zur Färbung von Kontrollobjektträgern ist dasselbe Verfahren wie zur Färbung der Probe zu verwenden. Die Laboranten müssen bei der Untersuchung der Patientenproben positive und negative Ausstriche untersuchen. Es ist eine regelmäßige Qualitätskontrolle unter Einhaltung der geltenden Vorschriften durchzuführen. Die Ergebnisse sind zu dokumentieren.

1. Färben Sie unter Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens den QBC F.A.S.T. Kontrollobjektträger und den Testobjektträger mit dem F.A.S.T. Auramin O Färbekit.

2. Achten Sie darauf, dass die Objektträger während des Verfahrens vollkommen getrennt bleiben, um eine Kreuzkontamination von Färbereagenzien zu vermeiden.
3. Untersuchen Sie den gefärbten Objektträger mit einem für das Färbemittel geeigneten Mikroskop und zeichnen Sie die Ergebnisse auf.

Erwartete Ergebnisse

Die QBC F.A.S.T. Sputumaufschlusslösung wird zum Aufschluss und zur Dekontamination klinischer Atemwegproben (Sputum oder Bronchialspülung) mit vermuteter Mykobakterieninfektion verwendet.

Wenn die Verfahren ordnungsgemäß befolgt werden, werden visköse Proben verflüssigt und Kontamination durch normale Flora wird reduziert oder entfernt.

Bei Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop, das mit einem blauen Anregungs- und einem grünen Emissionsfilter konfiguriert ist (z. B. Anregungsfilter: 435-480 nm, Emissionsfilter 510-600 nm), fluoreszieren die Markierungen auf dem SureFocus-Objektträger grün und stellen eine nützliche Fokussierungshilfe dar. Bei richtiger Schärfereinstellung fluoreszieren Mykobakterien (z. B. die in der positiven Kontrolle) und andere säurefeste Organismen grün vor einem dunklen Hintergrund. Alle anderen Organismen (z. B. die in der negativen Kontrolle) weisen die Hintergrundfärbemerkmale auf. Ein fluoreszierender Bazillus stellt eine Verdachtsidentifizierung eines *Mykobakteriums* dar.

Die Mykobakterien im positiven Bereich des Qualitätskontroll-objektträgers müssen hellgrün fluoreszieren. Die negative Kontrolle muss die Hintergrundfärbemerkmale aufweisen.

Wenn die erwarteten Ergebnisse nicht erzielt werden, untersuchen Sie die Ursache. Diese könnte bei den Reagenzien, beim Instrument oder beim Bediener liegen. Wenn eine Fehlfunktion der Kontrolle vermutet wird, verwenden Sie eine andere Methode zum Testen des Systems, z. B. eine (bekannt positive oder negative) Patientenprobe. Melden Sie Patientenergebnisse erst dann, wenn der Systemfehler behoben wurde.

Einschränkungen

Die Sputumpräparationsröhrchen und Transferpipetten werden steril geliefert. Wenn die Primärverpackung beschädigt oder aufgebrochen ist, ist das Produkt nicht zu verwenden.

Es gibt keine Methode zum Aufschluss und zur Dekontamination, die für alle klinischen Proben in allen Situationen geeignet ist. Wählen Sie deshalb das mildeste effektive Verfahren zur Reduzierung der Kontamination.

Bestimmte schnell wachsende Mykobakterien fluoreszieren bei dieser Färbung nicht. Für derartige Proben eine Ziehl-Neelsen-, Kinyoun- oder andere Färbemethode verwenden. Die Fluoreszenz von Ausstrichen lässt mit der Zeit nach und kann bei übermäßiger Hitze- oder Lichteinwirkung verblassen. Deshalb müssen gefärbte Proben sobald wie möglich untersucht werden.

Wenn von den Linien der SureFocus-Objektträger kein Fluoreszenzsignal erkennbar ist, dürfen die betreffenden Objektträger nicht für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden.

Während ein positives Ergebnis zwar das Vorhandensein von Mykobakterien belegt, ist eine Infektion auch bei einem negativen Resultat nicht auszuschließen. Deshalb müssen zur positiven Identifizierung andere Diagnosemethoden verwendet werden, z. B. eine Zellkultur oder PCR.

Wenn die SureFocus-Objektträger nicht fluoreszieren oder die Qualitätskontrollobjektträger wenig oder keine Fluoreszenzaufweisen, muss auch die ordnungsgemäße Funktion des Fluoreszenzmikroskopiesystems überprüft werden. Untersuchen Sie die Fehlerquelle, die u. a. beim Reagenz, Instrument oder Bediener liegen kann. Wenn eine Fehlfunktion der Kontrolle vermutet wird, verwenden Sie eine andere Methode zum Testen des Systems, z. B. eine (bekannt positive oder negative) Patientenprobe. Melden Sie Patientenergebnisse erst dann, wenn der Systemfehler behoben wurde.

Benötigte, jedoch nicht mitgelieferte Materialien

Das QBC F.A.S.T. AFB-Ausstrichkit ist zur Verwendung mit Fluoreszenz-mikroskopsystemen bestimmt, die Proben bei 425-480 nm anregen und Fluoreszenzlicht im Bereich von mindestens 510-600 nm übertragen

können. Des Weiteren werden die folgenden Artikel benötigt:

- Objektträgerwärmer oder Brenner
- Zentrifuge, die die Sputumpräparationsröhrchen bei 2200-3000 x g zentrifugieren kann
- Biosicherheitswerkbank zur Handhabung der Probe
- Personenschutzrüstung

Quellen

1. Weltgesundheitsorganisation. (2009) Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO Report 2009. WHO Press, Genf, Schweiz
2. Baron, E.J. and S.M. Tenover. (1990) Baily & Scott's Diagnostic Microbiology, 8. Ausgabe. The CV Mosby Company, Baltimore, Maryland.
3. Hanscheid, T. (2008) The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Coccidia*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.
4. Steingart K. R., *et al.* (2007) Fluorescence versus conventional for sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 6:570-81.
5. Essential Procedures for Clinical Microbiology. (1998) American Society of Microbiology. Washington, D.C.

Bestellinformationen

Art.-Nr.

QBC F.A.S.T. TBC-Ausstrichkit mit Aufschlusslösung	427408
QBC F.A.S.T. Zentrifuge (115 V, 60 Hz)	427412
QBC F.A.S.T. Zentrifuge (220 V, 50 Hz)	427413



QBC Diagnostics, Inc.
200 Shadylane Drive, Philipsburg PA, 16866
+1-814-692-7661, www.qbcdiagnostics.com



Emergo Europe
Molenstraat 15, 2513 BH Den Haag, Niederlande
Tel. : +31 (0) 70-345-8570, Fax : +31 (0) 70-346-7299



Hersteller



Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft



Haltbar bis



Artikelnummer



Medizinisches Gerät zur In-vitro-Diagnose



Temperaturbeschränkung



Chargennummer



Siehe Gebrauchsanweisung



Ätzend



Entzündlich



Nur zur einmaligen Verwendung