

## Revisions

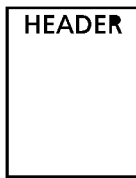
SO 0191-5

Rev from	Rev to	ECO #
2010/06	2011/03	5727-11

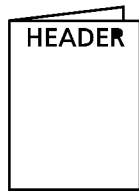
**Notes:**

1. BD Cat. Number Various
2. Blank (Sheet) Size : Length: 25.5"    Width: 22"  
 Number of Pages: 24    Number of Sheets: 1  
 Page Size: Length 8.5"    Width 5.5"    Final Folded Size: 4.25" x 5.5"
3. Style (see illustrations below): # 7

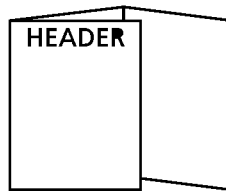
Accordion folds first, two horizontal parallel folds to form a size of 8 1/2" x 5 1/2", and then final horizontal fold to form a final size of 4 1/4" x 5 1/2" Showing English header.



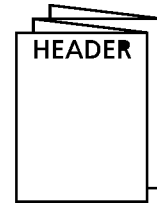
#1



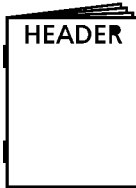
#2



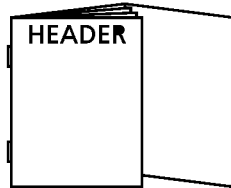
#3



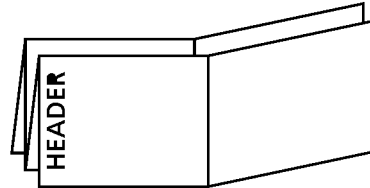
#4



#5



#6



#7

4. See Specification Control Number N/A for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides  Yes     No  
 No. of Colors: 1    PMS# Standard Black
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level

Label Design	Date	<small>COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION</small>	<b>Becton, Dickinson and Company</b> 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA	
Proofer	Date			
Checked By	Date			
Part Number: 8820201JAA		Category and Description Package Insert, TB Stain Kits and Reagents	Sheet: 1 of 25 <hr/> Scale: N/A	A

# BD TB Stain Kits and Reagents

English: pages 1 – 5 Italiano: pagine 14 – 17  
Français : pages 5 – 9 Español: páginas 18 – 21  
Deutsch: Seiten 10 – 13



8820201JAA  
2011/03

Pokyny vám poskytnie miestni zástupce spoločnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Um Anleitungen zu erhalten, wenden Sie sich bitte an Ihren BD-Kundendienst. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőjétől. / Contattare il rappresentante BD di zona per ottenere il foglietto illustrativo. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Instrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant för anvisningar. / **Свържете се с местния представител на BD за инструкции.** / Contactați reprezentantul dumneavoastră local BD pentru instrucțiuni. / Talimatlar için yerel BD temsilcilerinize danışın. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Для получения инструкций свяжитесь с местным представителем компании BD. / **Өзіңіздің жергілікті BD өкіліне жүгініп нұсқау алыңыз.** / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute.

TB Stain Kit K		1	<b>Cat. No. 212522</b>
TB Carbofuchsin KF	For staining mycobacteria by the Kinyoun (cold)	1 x 250 mL	
TB Decolorizer	acid-fast procedure.	1 x 250 mL	
TB Brilliant Green K		1 x 250 mL	
TB Stain Kit ZN		1	<b>212520</b>
TB Carbofuchsin ZN	For staining mycobacteria by the Ziehl-Neelsen	1 x 250 mL	
TB Decolorizer	(hot) acid-fast procedure.	1 x 250 mL	
TB Methylene Blue		1 x 250 mL	
TB Fluorescent Stain Kit M		1	<b>212519</b>
TB Auramine M	For staining mycobacteria by the Morse, Blair,	1 x 250 mL	
TB Decolorizer TM	Weiser and Sproat fluorescent procedure.	1 x 250 mL	
TB Potassium Permanganate		1 x 250 mL	
TB Fluorescent Stain Kit T		1	<b>212521</b>
TB Auramine-Rhodamine T	For staining mycobacteria by the Truant, Brett	1 x 250 mL	
TB Decolorizer TM	and Thomas fluorescent procedure.	1 x 250 mL	
TB Potassium Permanganate		1 x 250 mL	
TB Auramine M	For staining mycobacteria by the Morse, Blair,	4 x 250 mL	<b>212514</b>
	Weiser and Sproat fluorescent procedure.		
TB Auramine-Rhodamine T	For staining mycobacteria by the Truant, Brett	4 x 250 mL	<b>212515</b>
	and Thomas fluorescent procedure.		
TB Brilliant Green K	For staining mycobacteria by the Kinyoun (cold)	4 x 250 mL	<b>212523</b>
	and Ziehl-Neelsen (hot) acid-fast procedures.		
TB Carbofuchsin KF	For staining mycobacteria by the Kinyoun (cold)	4 x 250 mL	<b>212518</b>
	acid-fast procedure.		
TB Carbofuchsin ZN	For staining mycobacteria by the Ziehl-Neelsen	4 x 250 mL	<b>212511</b>
	(hot) acid-fast procedure.		
TB Decolorizer	For staining mycobacteria by the Kinyoun (cold)	4 x 250 mL	<b>212517</b>
	and Ziehl-Neelsen (hot) acid-fast procedures.		
TB Decolorizer TM	For staining mycobacteria by the Truant, Brett	4 x 250 mL	<b>212512</b>
	and Thomas and the Morse, Blair, Weiser and		
	Sproat fluorescent procedures.		
TB Methylene Blue	For staining mycobacteria by the Kinyoun (cold)	4 x 250 mL	<b>212516</b>
	and Ziehl-Neelsen (hot) acid-fast procedures.		
TB Potassium Permanganate	For staining mycobacteria by the Truant, Brett	4 x 250 mL	<b>212513</b>
	and Thomas and the Morse, Blair, Weiser and		
	Sproat fluorescent procedures.		

## INTENDED USE

TB Stain Kits are used to stain smears prepared from specimens and cultures suspected of containing mycobacteria for early presumptive diagnosis of mycobacterial infection and characterization of bacterial isolates.

## SUMMARY AND EXPLANATION

The microscopic staining technique is one of the earliest methods devised for detecting the tubercle bacillus and it remains a standard procedure.<sup>1</sup> The unique acid-fast characteristic of mycobacteria makes the staining technique valuable in early presumptive diagnosis as well as in providing information about the number of acid-fast bacilli present.

Fluorescent microscopy offers numerous advantages over classic methods for detecting mycobacteria because of its speed and simplicity, the ease of examining the slide and the reliability and superiority of the method.<sup>2</sup>

The TB Stain Kit K uses the Kinyoun (cold) acid-fast procedure.<sup>3</sup>

The TB Stain Kit ZN uses the Ziehl-Neelsen (hot) acid-fast procedure.<sup>4</sup>

The TB Fluorescent Stain Kit M uses the auramine O acid-fast fluorescent procedure.<sup>5</sup>

The TB Fluorescent Stain Kit T uses the auramine-rhodamine acid-fast fluorescent procedure described by Truant, Brett and Thomas.<sup>6</sup>

## PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

A major characteristic of mycobacteria is that they are "acid-fast," i.e., once stained with the aniline dye, basic fuchsin, they are difficult to decolorize, and retain the red color even when treated with a mixture of acid and alcohol.

In the Ziehl-Neelsen stain, methylene blue is the counterstain. In the Kinyoun stain, brilliant green provides the necessary contrast.

Fluorescent dyes possess the property of emitting visible radiation when stimulated by shorter wavelength ultra violet light, i.e., a mercury vapor lamp or a strong, blue appropriately filtered light source.<sup>7</sup>

Auramine O and rhodamine B are reported to bind to mycolic acids in the mycobacterial cell wall.<sup>8</sup> Unbound dye is removed by the acid-alcohol decolorizer solution. Potassium permanganate serves as a counterstain to suppress nonspecific background fluorescence.

## REAGENTS

Approximate Formula\* Per Liter

### TB Stain Kit K

#### TB Carbofuchsin KF

Basic Fuchsin	15.0 g
Phenol, USP	45.0 g
Isopropanol	200.0 mL
Ethanol	50.0 mL
Distilled Water	750.0 mL

#### TB Decolorizer

Hydrochloric Acid	30.0 mL
Ethanol/Methanol	970.0 mL

#### TB Brilliant Green K

Brilliant Green	2.0 g
Sodium Hydroxide	0.02 g
Distilled Water	1000.0 mL

### TB Stain Kit ZN

#### TB Carbofuchsin ZN

Basic Fuchsin	1.7 g
Phenol, USP	50.0 g
Isopropanol	95.0 mL
Distilled Water	905.0 mL

#### TB Decolorizer

Hydrochloric Acid	30.0 mL
Ethanol/Methanol	970.0 mL

#### TB Methylene Blue

Methylene Blue, USP	2.4 g
Ethanol/Methanol	300.0 mL
Distilled Water	700.0 mL

### TB Fluorescent Stain Kit M

#### TB Auramine M

Auramine O	2.0 g
Phenol, USP	4.0 g
Glycerine, USP	100.0 mL
Isopropanol	250.0 mL
Distilled Water	650.0 mL

#### TB Decolorizer TM

Hydrochloric Acid	5.0 mL
Isopropanol	700.0 mL
Distilled Water	300.0 mL

#### TB Potassium Permanganate

Potassium Permanganate	5.0 g
Distilled Water	1000.0 mL

### TB Fluorescent Stain Kit T

#### TB Auramine-Rhodamine T

Auramine O	12.0 g
Rhodamine B	6.0 g
Phenol, USP	80.0 g
Glycerine, USP	600.0 mL
Isopropanol	140.0 mL
Distilled Water	260.0 mL

#### TB Decolorizer TM

Hydrochloric Acid	5.0 mL
Isopropanol	700.0 mL
Distilled Water	300.0 mL

#### TB Potassium Permanganate

Potassium Permanganate	5.0 g
Distilled Water	1000.0 mL

\*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

## Warnings and Precautions:

For *in vitro* Diagnostic Use.

Pathogenic microorganisms, including hepatitis viruses and Human Immunodeficiency Virus, may be present in clinical specimens. "Standard Precautions"<sup>9-12</sup> and institutional guidelines should be followed in handling all items contaminated with blood and other body fluids.

Biosafety Level 2 practices and procedures, containment equipment and facilities are required for non-aerosol-producing manipulations of clinical specimens such as preparation of acid-fast smears. All aerosol-generating activities must be conducted in a Class I or II biological safety cabinet. Biosafety Level 3 practices, containment equipment and facilities are required for laboratory activities in the propagation and manipulation of cultures of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. Animal studies also require special procedures.<sup>11</sup>

These reagents are harmful or fatal if swallowed and can cause eye irritation or blindness. In the event of eye contact, flush thoroughly with an eye wash system or tap water for at least 15 min and seek medical advice. The dye solutions and decolorizer solution are highly flammable and vapors may be harmful; use away from open flame. Avoid contact with skin, eye or mucous membranes. Use all reagents in a well ventilated area, avoiding prolonged inhalation, skin contact and ingestion.

**TB Carbofuchsin ZN:** Toxic in contact with skin and if swallowed. Causes burns. Keep container tightly closed. Avoid contact with skin and eyes. Wear suitable protective clothing.

**TB Decolorizer TM:** Causes burns. Keep container tightly closed and in a well ventilated place. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.

**TB Potassium Permanganate:** Irritating to eyes, respiratory system and skin. Keep container tightly closed. Avoid contact with skin and eyes. Wear suitable protective clothing.

**TB Auramine M:** Flammable. Irritating to eyes, respiratory system and skin. After contact with skin, wash immediately with plenty of water. Keep container tightly closed. Keep away from sources of ignition - No Smoking. Wear suitable protective clothing.

**TB Auramine-Rhodamine T:** Flammable. Toxic in contact with skin and if swallowed. Causes burns. Possible risks of irreversible effects. Keep container tightly closed. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.

**TB Decolorizer:** Harmful by inhalation and if swallowed. Keep container tightly closed and in a well ventilated place. Keep away from sources of ignition - No smoking. Wear suitable protective clothing.

**TB Methylene Blue:** Harmful by inhalation and if swallowed. Irritating to eyes, respiratory system and skin. Possible risks of irreversible effects. Keep container tightly closed. Keep away from sources of ignition - No Smoking. Wear suitable protective clothing and gloves.

**TB Carbofuchsin KF:** Harmful in contact with skin and if swallowed. Irritating to eyes and skin. Possible risks of irreversible effects. Keep container tightly closed. Keep away from sources of ignition - No Smoking. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing and gloves.

**Storage:** Store TB Stain Kits and Reagents at 15 - 30°C. Reagents that have been removed from the packing carton should be stored in the dark. The expiration date applies to the product in its intact container when stored as directed.

## SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Apply a thin smear of the specimen directly on a clean microscope slide. Sputum (direct specimen or concentrated sputum), spinal or other body fluid (catheterized urine), homogenized tissue and impression slides are satisfactory specimens for smears.<sup>1</sup>

Allow smear to dry.

Fix the smear to the slide by passing the slide through a low flame 2 - 3 times, avoiding excessive heat, or use an electric slide warmer at 65 to 75°C for at least 2 h.<sup>13</sup>

## PROCEDURE

**Materials Provided\*:** TB Stain Kit K, TB Stain Kit ZN, TB Quick Stain Kit, TB Fluorescent Stain Kit M, TB Fluorescent Stain Kit T.

*\*Individual reagents available separately.*

**Materials Required But Not Provided:** Microscope slides - new or cleaned in acid dichromate solution, staining rack, filter paper and microscope with oil immersion lens or fluorescent microscope.

## Test Procedure

### KINYOUN STAIN

TB Stain Kit K

#### Instructions:

1. Place slides on a staining rack and flood with TB Carbofuchsin KF for 4 min. Do not heat.
2. Wash gently in running water.
3. Decolorize with TB Decolorizer for 3 - 5 s.
4. Wash gently in running water.
5. Counterstain with either TB Brilliant Green K or TB Methylene Blue (available separately) for 30 s.
6. Wash gently in running water.
7. Air dry. If using TB Methylene Blue, dry over gentle heat.

## ZIEHL-NEELSEN STAIN

### TB Stain Kit ZN

#### Instructions:

1. Place slides on a staining rack and place a piece of filter paper, larger than the size of the smear, on each slide. Flood with TB Carbofuchsin ZN. Heat gently to steaming and allow to steam for 5 min.
2. Remove the filter paper. Wash gently in running water.
3. Decolorize with TB Decolorizer with two changes of reagent for 1 - 2 min until no more red color appears in washing.
4. Wash gently in running water.
5. Counterstain with either TB Methylene Blue or TB Brilliant Green K for 30 s.
6. Wash gently in running water.
7. Dry over gentle heat.

## MORSE STAIN

### TB Fluorescent Stain Kit M

#### Instructions:

1. Place slides on a staining rack and flood with TB Auramine M for 15 min.
2. Wash gently in running water.
3. Decolorize with TB Decolorizer TM for 30 - 60 s.
4. Wash slides gently in running water.
5. Counterstain with TB Potassium Permanganate for 2 min.
6. Wash gently in running water.
7. Air dry.
8. Examine under a microscope fitted with filter sets as described by Chapin and Murray.<sup>14</sup>

## TRUANT STAIN

### TB Fluorescent Stain Kit T

#### Instructions:

1. Place slides on a staining rack and flood with TB Auramine-Rhodamine T that has been thoroughly shaken prior to use. Leave undisturbed for 20 - 25 min at room temperature.
2. Wash gently in running water.
3. Decolorize with TB Decolorizer TM for 2 - 3 min.
4. Wash gently in running water.
5. Counterstain with TB Potassium Permanganate for 4 - 5 min.
6. Wash gently in running water.
7. Blot lightly. Dry in air or very gently over a flame.
8. Examine under a microscope fitted as described by Truant et. al.,<sup>6</sup> or Chapin and Murray.<sup>14</sup>

**User Quality Control:** It is recommended that controls be run each day of use using BBL™ AFB Slide (Cat. No. 231391) or known acid-fast and nonacid-fast microorganisms.

Quality control requirements must be performed in accordance with applicable local, state and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures. It is recommended that the user refer to pertinent CLSI (formerly NCCLS) guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

Organism	Expected Results
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC™ 25177	Positive
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Negative

## LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

A positive staining reaction provides presumptive evidence of the presence of mycobacteria in the specimen. A negative staining reaction does not necessarily indicate that the specimen will be culturally negative for mycobacteria. For positive identification of mycobacteria, other methods must be employed (cultural, molecular, etc.).

## EXPECTED RESULTS AND PERFORMANCE CHARACTERISTICS<sup>1-8,14</sup>

	Acid-fast Bacilli	Nonacid-fast Bacilli
TB Stain Kit K	dark red to pink	green
TB Stain Kit ZN	dark pink to red	blue
<b>Mycobacteria</b>		
TB Fluorescent Stain Kit M	bright yellow-green fluorescence	
TB Fluorescent Stain Kit T	reddish-orange fluorescence	

## REFERENCES

1. Nolte, F.S. and B. Metchock. 1995. *Mycobacterium*, p. 400 – 436. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Towner and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. Towner, F.C., J.T. Crawford, R.E. Huebner, L.J. Geiter, C.R. Horsburgh, Jr., and R.C. Good. 1993. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J. Clin. Microbiol.* 31: 767 – 770.
3. Ebersole, L.L. 1994. Acid-fast stain procedures, p.3.5.1. – 3.5.11. In H.D. Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. Murray, R.G.E., R.N. Doetsch and C.F. Robinow. 1994. Determinative and cytological light microscopy, p. 21 – 41. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood and N.R. Krieg (ed.), Methods for general and molecular bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Heifets, L.B. and R.C. Good. 1994. Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis, p. 85 – 110. In B.R. Bloom (ed.), Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Truant, J.P., W.A. Brett and W. Thomas, Jr. 1962. Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. *Henry Ford Hosp. Med. Bull.* 10: 287 – 296.
7. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coord. ed. A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Baron, E.J. and S.M. Finegold. 1990. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 8<sup>th</sup> ed. The C.V. Mosby Company, Baltimore, MD.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
10. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 17: 53-80.
11. U.S. Department of Health and Human Services. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 5th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
12. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). *Official Journal L262*, 17/10/2000, p. 0021-0045.
13. Kent, P.T. and G.P. Kubica, 1985. Public Health Mycobacteriology. A guide for the level III laboratory, p. 58, U.S. Dept. of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta Ga.
14. Chapin, K.C. and P.R. Murray. 1999. Stains, p. 1674 – 1686. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Towner and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

# BD Troussets et réactifs de coloration pour TB

Français

TB Stain Kit K		1	N° cat. 212522
TB Carbofuchsin KF	Pour la coloration des mycobactéries par la	1 x 250 mL	
TB Decolorizer	méthode acido-résistante de Kinyoun (à froid).	1 x 250 mL	
TB Brilliant Green K		1 x 250 mL	
TB Stain Kit ZN		1	212520
TB Carbofuchsin ZN	Pour la coloration des mycobactéries par la	1 x 250 mL	
TB Decolorizer	méthode acido-résistante de Ziehl-Neelsen	1 x 250 mL	
TB Methylene Blue	(à chaud).	1 x 250 mL	
TB Fluorescent Stain Kit M		1	212519
TB Auramine M	Pour la coloration des mycobactéries par la	1 x 250 mL	
TB Decolorizer TM	méthode fluorescente de Morse, Blair,	1 x 250 mL	
TB Potassium Permanganate	Weiser et Sproat.	1 x 250 mL	
TB Fluorescent Stain Kit T		1	212521
TB Auramine-Rhodamine T	Pour la coloration des mycobactéries par la	1 x 250 mL	
TB Decolorizer TM	méthode fluorescente de Truant, Brett et	1 x 250 mL	
TB Potassium Permanganate	Thomas.	1 x 250 mL	
TB Auramine M	Pour la coloration des mycobactéries par la	4 x 250 mL	212514
	méthode fluorescente de Morse, Blair,		
	Weiser et Sproat.		
TB Auramine-Rhodamine T	Pour la coloration des mycobactéries par la	4 x 250 mL	212515
	méthode fluorescente de Truant, Brett et		
	Thomas.		
TB Brilliant Green K	Pour la coloration des mycobactéries par les	4 x 250 mL	212523
	méthodes acido-résistantes de Kinyoun		
	(à froid) et Ziehl-Neelsen (à chaud).		
TB Carbofuchsin KF	Pour la coloration des mycobactéries par la	4 x 250 mL	212518
	méthode acido-résistante de Kinyoun (à froid).		

TB Carbofuchsin ZN	Pour la coloration des mycobactéries par la méthode acido-résistante de Ziehl-Neelsen (à chaud).	4 x 250 mL	212511
TB Decolorizer	Pour la coloration des mycobactéries par les méthodes acido-résistantes de Kinyoun (à froid) et Ziehl-Neelsen (à chaud).	4 x 250 mL	212517
TB Decolorizer TM	Pour la coloration des mycobactéries par les méthodes fluorescentes de Truant, Brett et Thomas, et de Morse, Blair, Weiser et Sproat.	4 x 250 mL	212512
TB Methylene Blue	Pour la coloration des mycobactéries par les méthodes acido-résistantes de Kinyoun (à froid) et Ziehl-Neelsen (à chaud).	4 x 250 mL	212516
TB Potassium Permanganate	Pour la coloration des mycobactéries par les méthodes fluorescentes de Truant, Brett et Thomas, et de Morse, Blair, Weiser et Sproat.	4 x 250 mL	212513

## APPLICATION

Les trousses de coloration pour TB s'utilisent pour colorer des frottis préparés à partir d'échantillons cliniques et de cultures présumés contenir des mycobactéries afin de porter un diagnostic présomptif précoce d'infection mycobactérienne et caractériser les isolats bactériens.

## RESUME ET EXPLICATION

La technique de coloration microscopique a été l'une des premières méthodes conçues pour détecter le bacille tuberculeux et demeure une méthode de référence.<sup>1</sup> La caractéristique acido-résistante propre aux mycobactéries rend la technique de coloration utile au diagnostic présomptif précoce et permet d'évaluer le nombre de bacilles acido-résistants présents.

Le microscope à fluorescence offre de nombreux avantages par rapport aux méthodes traditionnelles de détection des mycobactéries : vitesse et simplicité, facilité d'examen de la lame, et fiabilité et supériorité de la méthode.<sup>2</sup>

La trousse TB Stain Kit K utilise la méthode acido-résistante de Kinyoun (à froid).<sup>3</sup>

La trousse TB Stain Kit ZN utilise la méthode acido-résistante de Ziehl-Neelsen (à chaud).<sup>4</sup>

La trousse TB Fluorescent Stain Kit M utilise la méthode acido-résistante à fluorescence à l'auramine O.<sup>5</sup>

La trousse TB Fluorescent Stain Kit T utilise la méthode acido-résistante à fluorescence à l'auramine O décrite par Truant, Brett et Thomas.<sup>6</sup>

## PRINCIPES DE LA METHODE

L'une des caractéristiques principales des mycobactéries est leur « acido-résistance ». Une fois colorées avec un colorant à base d'aniline, la fuchsine basique, elles sont difficiles à décolorer et retiennent la coloration rouge, même quand elles sont traitées par un mélange d'acide et d'alcool.

Dans la coloration de Ziehl-Neelsen, le bleu de méthylène est le contre-colorant. Dans la coloration de Kinyoun, le vert brillant assure le contraste nécessaire.

Les colorants fluorescents ont la propriété d'émettre un rayonnement visible lorsqu'ils sont stimulés par un rayonnement ultraviolet produit par une lampe à vapeur de mercure ou une lumière bleue intense correctement filtrée.<sup>7</sup>

L'auramine O et la rhodamine B sont décrites comme se liant aux acides mycoliques de la paroi cellulaire mycobactérienne.<sup>8</sup> Le colorant non lié est éliminé par une solution décolorante d'alcool acide. Le permanganate de potassium sert de contre-colorant pour éliminer la fluorescence parasite non spécifique.

## REACTIFS

Formule approximative\* par litre

### TB Stain Kit K

<b>TB Carbofuchsin KF</b>	
Fuchsine basique .....	15,0 g
Phénol, USP .....	45,0 g
Isopropanol .....	200,0 mL
Éthanol .....	50,0 mL
Eau distillée .....	750,0 mL

### TB Decolorizer

Acide chlorhydrique .....	30,0 mL
Éthanol/méthanol .....	970,0 mL

### TB Brilliant Green K

Vert brillant .....	2,0 g
Soude .....	0,02 g
Eau distillée .....	1000,0 mL

### TB Stain Kit ZN

#### TB Carbofuchsin ZN

Fuchsine basique .....	1,7 g
Phénol, USP .....	50,0 g
Isopropanol .....	95,0 mL
Eau distillée .....	905,0 mL

### TB Decolorizer

Acide chlorhydrique .....	30,0 mL
Éthanol/méthanol .....	970,0 mL

### TB Methylene Blue

Bleu de méthylène, USP .....	2,4 g
Éthanol/méthanol .....	300,0 mL
Eau distillée .....	700,0 mL

### TB Fluorescent Stain Kit M

#### TB Auramine M

Auramine O .....	2,0 g
Phénol, USP .....	4,0 g
Glycérine, USP .....	100,0 mL
Isopropanol .....	250,0 mL
Eau distillée .....	650,0 mL

### TB Decolorizer TM

Acide chlorhydrique .....	5,0 mL
Isopropanol .....	700,0 mL
Eau distillée .....	300,0 mL

### TB Potassium Permanganate

Permanganate de potassium .....	5,0 g
Eau distillée .....	1000,0 mL

### TB Fluorescent Stain Kit T

#### TB Auramine-Rhodamine T

Auramine O .....	12,0 g
Rhodamine B .....	6,0 g
Phénol, USP .....	80,0 g
Glycérine, USP .....	600,0 mL
Isopropanol .....	140,0 mL
Eau distillée .....	260,0 mL

### TB Decolorizer TM

Acide chlorhydrique .....	5,0 mL
Isopropanol .....	700,0 mL
Eau distillée .....	300,0 mL

### TB Potassium Permanganate

Permanganate de potassium .....	5,0 g
Eau distillée .....	1000,0 mL

\*Ajustée et/ou complétée en fonction des critères de performances imposés.

## Avvertissements et précautions :

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine, sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les " Précautions standard "9-12 et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques.

Les manipulations non susceptibles de produire des aérosols d'échantillons cliniques, comme la préparation de frottis acido-résistants, nécessitent des pratiques et des méthodes de sécurité biologique de niveau 2, ainsi que les installations et le matériel de confinement correspondants. Toutes les manipulations susceptibles de produire des aérosols doivent être effectuées sous hotte biologique de sécurité de classe I ou II. Les activités de laboratoire impliquant la propagation et la manipulation de cultures de *M. tuberculosis* et *M. bovis* nécessitent des pratiques de sécurité biologique de niveau 3, ainsi que les installations et le matériel de confinement correspondants. Les études chez l'animal nécessitent également des procédures particulières<sup>11</sup>.

Ces réactifs sont nocifs ou mortels en cas d'ingestion et peuvent provoquer des irritations oculaires ou entraîner la cécité. En cas de projection dans les yeux, rincer soigneusement avec un laveur d'yeux ou sous l'eau courante pendant au moins 15 min et consulter un ophtalmologiste. Les solutions colorantes et décolorantes sont hautement inflammables et leurs vapeurs peuvent être dangereuses ; utiliser loin de toute flamme nue. Éviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses. Utiliser les réactifs dans un local bien ventilé. Éviter une inhalation prolongée et tout contact avec la peau. Ne pas ingérer.

**TB Carbofuchsin ZN** : toxique par contact avec la peau et par ingestion. Provoque des brûlures. Conserver le récipient bien fermé. Éviter le contact avec la peau et les yeux. Porter un vêtement de protection approprié.

**TB Decolorizer TM** : provoque des brûlures. Conserver le récipient bien fermé et dans un endroit bien ventilé. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.

**TB Potassium Permanganate** : irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Conserver le récipient bien fermé. Éviter le contact avec la peau et les yeux. Porter un vêtement de protection approprié.

**TB Auramine M** : inflammable. Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Éviter tout contact avec la peau ; laver immédiatement à grande eau. Conserver le récipient bien fermé. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles — Ne pas fumer. Porter un vêtement de protection approprié.

**TB Auramine-Rhodamine T** : inflammable. Toxique par contact avec la peau et par ingestion. Provoque des brûlures. Possibilité d'effets irréversibles. Conserver le récipient bien fermé. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.

**TB Decolorizer** : nocif par inhalation et par ingestion. Conserver le récipient bien fermé et dans un endroit bien ventilé. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles — Ne pas fumer. Porter un vêtement de protection approprié.

**TB Methylene Blue** : nocif par inhalation et par ingestion. Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. Possibilité d'effets irréversibles. Conserver le récipient bien fermé. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles — Ne pas fumer. Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

**TB Carbolfuchsin KF** : nocif par contact avec la peau et par ingestion. Irritant pour les yeux et la peau. Possibilité d'effets irréversibles. Conserver le récipient bien fermé. Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles — Ne pas fumer. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste. Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

**Conservation** : conserver les trousseaux et réactifs de coloration pour TB à une température comprise entre 15 et 30 °C. Les réactifs qui ont été sortis de leur carton d'emballage doivent être conservés à l'obscurité. La date de péremption s'applique au produit contenu dans son emballage intact et conservé conformément aux instructions.

#### **PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS**

Réaliser un fin frottis de l'échantillon directement sur une lame de microscope propre. Les expectorations (brutes ou concentrées), le liquide rachidien ou d'autres liquides organiques (urine recueillie par cathétérisme), les homogénats de tissus et les lames à empreinte sont des échantillons adéquats pour réaliser un frottis.<sup>1</sup>

Laisser sécher le frottis.

Fixer le frottis sur la lame en passant celle-ci 2 à 3 fois à la flamme à basse température, en évitant de surchauffer, ou utiliser une platine chauffante pour lames entre 65 et 75 °C pendant 2 h au moins<sup>13</sup>.

#### **METHODE**

**Matériaux fournis\*** : TB Stain Kit K, TB Stain Kit ZN, TB Quick Stain Kit, TB Fluorescent Stain Kit M, TB Fluorescent Stain Kit T.

*\*Réactifs individuels vendus séparément.*

**Matériaux requis, mais non fournis** : lames de microscope – neuves ou nettoyées dans une solution de dichromate acide, support de coloration, papier filtre et microscope avec objectif à immersion à huile ou microscope fluorescent.

#### **Mode Opérateur du Test**

##### **COLORATION DE KINYOUN**

TB Stain Kit K

##### **Instructions :**

1. Placer les lames sur un support de coloration et recouvrir de TB Carbolfuchsin KF pendant 4 min. Ne pas chauffer.
2. Laver délicatement sous l'eau courante.
3. Décolorer avec le TB Decolorizer pendant 3 à 5 s.
4. Laver délicatement sous l'eau courante.
5. Contre-colorer avec le TB Brilliant Green K ou le TB Methylene Blue (vendus séparément) pendant 30 sec.
6. Laver délicatement sous l'eau courante.
7. Sécher à l'air. Si du TB Methylene Blue est employé, faire sécher à chaleur douce.

##### **COLORATION DE ZIEHL-NEELSEN**

TB Stain Kit ZN

##### **Instructions :**

1. Placer les lames sur un support de coloration et déposer un morceau de papier filtre, plus grand que la surface du frottis, sur chaque lame. Recouvrir de TB Carbolfuchsin ZN. Chauffer doucement jusqu'à dégagement de vapeur et laisser s'évaporer pendant 5 min.
2. Retirer le papier filtre. Laver délicatement sous l'eau courante.
3. Décolorer pendant 1 à 2 min avec le TB Decolorizer en renouvelant le réactif à deux reprises dans cet intervalle jusqu'à disparition de la coloration rouge dans le lavage.
4. Laver délicatement sous l'eau courante.
5. Contre-colorer avec le TB Methylene Blue ou le TB Brilliant Green K pendant 30 s.
6. Laver délicatement sous l'eau courante.
7. Faire sécher à chaleur douce.

##### **COLORATION DE MORSE**

TB Fluorescent Stain Kit M

##### **Instructions :**

1. Placer les lames sur un support de coloration et recouvrir de TB Auramine M pendant 15 min.
2. Laver délicatement sous l'eau courante.
3. Décolorer avec le TB Decolorizer TM pendant 30 à 60 s.
4. Laver délicatement les lames sous l'eau courante.
5. Contre-colorer avec le TB Potassium Permanganate pendant 2 min.
6. Laver délicatement sous l'eau courante.
7. Laisser sécher à l'air.
8. Examiner au microscope équipé de jeux de filtres comme décrit par Chapin et Murray.<sup>14</sup>

## COLORATION DE TRUANT

### TB Fluorescent Stain Kit T

#### Instructions :

1. Placer les lames sur un support de coloration et recouvrir de TB Auramine-Rhodamine T vigoureusement agité au préalable. Laisser reposer pendant 20 à 25 min à température ambiante.
2. Laver délicatement sous l'eau courante.
3. Décolorer avec le TB Decolorizer TM pendant 2 à 3 min.
4. Laver délicatement sous l'eau courante.
5. Contre-colorer avec le TB Potassium Permanganate pendant 4 à 5 min.
6. Laver délicatement sous l'eau courante.
7. Buvarder légèrement. Sécher à l'air, ou très doucement au-dessus d'une flamme.
8. Examiner au microscope équipé de jeux de filtres comme décrit par Truant et. al.,<sup>6</sup> ou Chapin et Murray.<sup>14</sup>

**Contrôle de qualité par l'utilisateur :** Il est recommandé d'effectuer un contrôle de qualité tous les jours en utilisant la lame BBL AFB Slide (N° de cat. 231391) ou des microorganismes prouvés acido-résistants et non acido-résistants.

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations nationales et/ou internationales, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives CLSI (NCCLS précédemment) et la réglementation CLIA correspondantes pour obtenir des informations appropriées sur les modalités du contrôle de qualité.

Microorganisme	Résultats attendus
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	Positif
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Négatif

#### LIMITES DE LA PROCEDURE

Une réaction positive obtenue par coloration fournit une preuve par inférence de la présence de mycobactéries dans l'échantillon. Une réaction négative obtenue par coloration n'indique pas obligatoirement que l'échantillon sera négatif pour les mycobactéries s'il est cultivé. Pour l'identification positive des mycobactéries, utiliser d'autres méthodes (culture, moléculaire, etc.)

#### RESULTATS ATTENDUS ET CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES<sup>1-8,14</sup>

	Bacilles acido-résistants	Bacilles non acido-résistants
	TB Stain Kit K	rouge foncé à rose
TB Stain Kit ZN	rose foncé à rouge	bleu

Mycobactéries	
TB Fluorescent Stain Kit M	fluorescence intense jaune verte
TB Fluorescent Stain Kit T	fluorescence rouge orangée

**BIBLIOGRAPHIE :** voir la section "References" dans la notice en anglais.

TB Stain Kit K TB Carbofuchsin KF TB Decolorizer TB Brilliant Green K	Zur Färbung von Mykobakterien mit dem Kaltfärbeverfahren für säurefeste Bakterien nach Kinyoun.	1 1 x 250 mL 1 x 250 mL 1 x 250 mL	<b>Best.-Nr. 212522</b>
TB Stain Kit ZN TB Carbofuchsin ZN TB Decolorizer TB Methylene Blue	Zur Färbung von Mykobakterien mit dem Heißfärbeverfahren für säurefeste Bakterien nach Ziehl-Neelsen.	1 1 x 250 mL 1 x 250 mL 1 x 250 mL	<b>212520</b>
TB Fluorescent Stain Kit M TB Auramine M TB Decolorizer TM TB Potassium Permanganate	Zur Färbung von Mykobakterien mit dem Fluoreszenzverfahren nach Morse, Blair, Weiser und Sproat.	1 1 x 250 mL 1 x 250 mL 1 x 250 mL	<b>212519</b>
TB Fluorescent Stain Kit T TB Auramine-Rhodamine T TB Decolorizer TM TB Potassium Permanganate	Zur Färbung von Mykobakterien mit dem Fluoreszenzverfahren nach Truant, Brett und Thomas.	1 1 x 250 mL 1 x 250 mL 1 x 250 mL	<b>212521</b>
TB Auramine M	Zur Färbung von Mykobakterien mit dem Fluoreszenzverfahren nach Morse, Blair, Weiser und Sproat.	4 x 250 mL	<b>212514</b>
TB Auramine-Rhodamine T	Zur Färbung von Mykobakterien mit dem Fluoreszenzverfahren nach Truant, Brett und Thomas.	4 x 250 mL	<b>212515</b>
TB Brilliant Green K	Zur Färbung von Mykobakterien mit dem Kaltfärbeverfahren für säurefeste Bakterien nach Kinyoun und dem Heißfärbeverfahren nach Ziehl-Neelsen.	4 x 250 mL	<b>212523</b>
TB Carbofuchsin KF	Zur Färbung von Mykobakterien mit dem Kaltfärbeverfahren für säurefeste Bakterien nach Kinyoun.	4 x 250 mL	<b>212518</b>
TB Carbofuchsin ZN	Zur Färbung von Mykobakterien mit dem Heißfärbeverfahren für säurefeste Bakterien nach Ziehl-Neelsen.	4 x 250 mL	<b>212511</b>
TB Decolorizer	Zur Färbung von Mykobakterien mit dem Kaltfärbeverfahren für säurefeste Bakterien nach Kinyoun und dem Heißfärbeverfahren nach Ziehl-Neelsen.	4 x 250 mL	<b>212517</b>
TB Decolorizer TM	Zur Färbung von Mykobakterien mit dem Fluoreszenzverfahren nach Truant, Brett und Thomas sowie nach Morse, Blair, Weiser und Sproat.	4 x 250 mL	<b>212512</b>
TB Methylene Blue	Zur Färbung von Mykobakterien mit dem Kaltfärbeverfahren für säurefeste Bakterien nach Kinyoun und dem Heißfärbeverfahren für säurefeste Bakterien nach Ziehl-Neelsen.	4 x 250 mL	<b>212516</b>
TB Potassium Permanganate	Zur Färbung von Mykobakterien mit dem Fluoreszenzverfahren nach Truant, Brett und Thomas sowie nach Morse, Blair, Weiser und Sproat.	4 x 250 mL	<b>212513</b>

## VERWENDUNGSZWECK

TB-Färbekits dienen zur Färbung von vermutlich mykobakterienhaltigen Proben- und Kulturausstrichen zur präsumtiven Frühdiagnose einer Mykobakterieninfektion und Charakterisierung von Bakterienisolaten.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Das mikroskopische Färbeverfahren ist eines der ältesten Methoden für den Nachweis von Tuberkelbazillen und gilt nach wie vor als Standardverfahren.<sup>1</sup> Das Färbeverfahren ist aufgrund der charakteristischen Säurefestigkeit von Mykobakterien ein wertvolles Hilfsmittel für die präsumtive Frühdiagnose und liefert Informationen über die Anzahl der vorhandenen säurefesten Bakterien.

Die Fluoreszenzmikroskopie bietet zahlreiche Vorteile gegenüber klassischen Methoden zum Nachweis von Mykobakterien, da sie schnell und einfach durchzuführen ist, eine zuverlässige und überlegene Methode<sup>2</sup> darstellt und der Objektträger leicht zu untersuchen ist.

Das TB Stain Kit K ist für die Kaltfärbemethode für säurefeste Bakterien nach Kinyoun vorgesehen.<sup>3</sup>

Das TB Stain Kit ZN ist für die Heißfärbemethode für säurefeste Bakterien nach Ziehl-Neelsen vorgesehen.<sup>4</sup>

Das TB Fluorescent Stain Kit M ist für das Fluoreszenzverfahren für säurefeste Bakterien mit Auramin O vorgesehen.<sup>5</sup>  
 Das TB Fluorescent Stain Kit T ist für das Fluoreszenzverfahren für säurefeste Bakterien mit Auramin-Rhodamin nach Truant, Brett und Thomas vorgesehen.<sup>6</sup>

**VERFAHRENSPRINZIPIEN**

Eines der wichtigsten Merkmale von Mykobakterien ist ihre „Säurefestigkeit“, d. h. dass sie nach der Färbung mit basischem Fuchsin – einem Anilinfarbstoff – nur schwer zu entfärben sind und ihre rote Farbe selbst bei Behandlung mit einer Mischung aus Säure und Alkohol beibehalten.

Bei der Ziehl-Neelsen-Färbung wird Methylenblau als Gegenfärbereagenz verwendet. Bei der Kinyoun-Färbung wird der erforderliche Kontrast mit Brillantgrün erzielt.

Fluoreszenzfarbstoffe können bei Stimulation durch kurzwelliges Ultraviolettlicht (z. B. anhand einer Quecksilberdampf- lampe oder einer starken, ausreichend gefilterten blauen Lichtquelle) sichtbare Strahlung emittieren.<sup>7</sup>

Auramin O und Rhodamin B binden an Mycolsäuren in der Zellwand von Mykobakterien.<sup>8</sup> Ungebundener Farbstoff wird durch die Säure/Alkohol-Entfärbelösung entfernt. Kaliumpermanganat dient als Gegenfärbereagenz, um unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu unterdrücken.

**REAGENZIEN**

Ungefähre Zusammensetzung\* je 1 Liter

**TB Stain Kit K**

**TB Carbofuchsin KF**

Basisches Fuchsin	15,0 g
Phenol, USP	45,0 g
Isopropanol	200,0 mL
Ethanol	50,0 mL
Destilliertes Wasser	750,0 mL

**TB Decolorizer**

Salzsäure	30,0 mL
Ethanol/Methanol	970,0 mL

**TB Brilliant Green K**

Brillantgrün	2,0 g
Natriumhydroxid	0,02 g
Destilliertes Wasser	1000,0 mL

**TB Stain Kit ZN**

**TB Carbofuchsin ZN**

Basisches Fuchsin	1,7 g
Phenol, USP	50,0 g
Isopropanol	95,0 mL
Destilliertes Wasser	905,0 mL

**TB Decolorizer**

Salzsäure	30,0 mL
Ethanol/Methanol	970,0 mL

**TB Methylene Blue**

Methylenblau, USP	2,4 g
Ethanol/Methanol	300,0 mL
Destilliertes Wasser	700,0 mL

**TB Fluorescent Stain Kit M**

**TB Auramine M**

Auramin O	2,0 g
Phenol, USP	4,0 g
Glycerin, USP	100,0 mL
Isopropanol	250,0 mL
Destilliertes Wasser	650,0 mL

**TB Decolorizer TM**

Salzsäure	5,0 mL
Isopropanol	700,0 mL
Destilliertes Wasser	300,0 mL

**TB Potassium Permanganate**

Kaliumpermanganat	5,0 g
Destilliertes Wasser	1000,0 mL

**TB Fluorescent Stain Kit T**

**TB Auramine-Rhodamine T**

Auramin O	12,0 g
Rhodamin B	6,0 g
Phenol, USP	80,0 g
Glycerin, USP	600,0 mL
Isopropanol	140,0 mL
Destilliertes Wasser	260,0 mL

**TB Decolorizer TM**

Salzsäure	5,0 mL
Isopropanol	700,0 mL
Destilliertes Wasser	300,0 mL

**TB Potassium Permanganate**

Kaliumpermanganat	5,0 g
Destilliertes Wasser	1000,0 mL

\*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

**Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:**

*In-vitro*-Diagnostikum.

Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, z. B. Hepatitis-Viren und HIV enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die "Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen"<sup>9-12</sup> sowie die internen Richtlinien der Einrichtung zu beachten.

Das Arbeiten mit klinischen Proben, bei denen (wie bei der Herstellung von säurefesten Ausstrichen) keine Aerosole entstehen, erfordert Laborpraktiken und Verfahren sowie Sicherheitsvorrichtungen der Biosicherheitsstufe 2. Alle Arbeiten, bei denen Aerosole entstehen, müssen in einer biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse I oder II durchgeführt werden. Für Laboraktivitäten zur Vermehrung und Handhabung von *M. tuberculosis*- und *M. bovis*-Kulturen sind Verfahren, Behälter und Einrichtungen der biologischen Sicherheitsstufe 3 einzusetzen. Tierstudien erfordern darüber hinaus ebenfalls besondere Verfahren.<sup>11</sup>

Diese Reagenzien sind bei Ingestion gesundheitsschädlich oder tödlich und können Augenreizungen oder Blindheit verursachen. Bei Kontakt mit den Augen mindestens 15 Min lang gründlich mit einem Augenwaschsystem oder Leitungswasser spülen und ärztliche Hilfe hinzuziehen. Die Färbelösungen und der Entfärber sind hochentzündlich und können gesundheitsschädliche Dämpfe abgeben. Nicht in der Nähe offener Flammen verwenden. Kontakt mit Haut, Augen oder Schleimhäuten vermeiden. Alle Reagenzien in einem gut belüfteten Bereich verwenden, längere Inhalation, Kontakt mit der Haut und Ingestion vermeiden.

**TB Carbofuchsin ZN:** Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken. Verursacht Verätzungen. Behälter dicht geschlossen halten. Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

**TB Decolorizer TM:** Verursacht Verätzungen. Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen.

**TB Potassium Permanganate:** Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut. Behälter dicht geschlossen halten. Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

**TB Auramine M:** Entzündlich. Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut. Falls es zu Hautkontakt kommt, sofort mit reichlich Wasser abwaschen. Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten — Nicht rauchen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

**TB Auramine-Rhodamine T:** Entzündlich. Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken. Verursacht Verätzungen. Möglichkeit irreversiblen Schadens. Behälter dicht geschlossen halten. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen.

**TB Decolorizer:** Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken. Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. Von Zündquellen fernhalten — Nicht rauchen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

**TB Methylene Blue:** Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken. Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut. Möglichkeit irreversiblen Schadens. Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten — Nicht rauchen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

**TB Carbofuchsin KF:** Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken. Reizt die Augen und die Haut. Möglichkeit irreversiblen Schadens. Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten — Nicht rauchen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

**Aufbewahrung:** TB-Färbekits und TB-Reagenzien bei 15 – 30 °C aufbewahren. Reagenzien, die aus dem Versandkarton entnommen wurden, sollte im Dunkeln aufbewahrt werden. Das angegebene Verfallsdatum gilt für das in der ungeöffneten Packung aufbewahrte Produkt bei Einhaltung der Lagervorschriften.

## ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Die Probe direkt auf einem sauberen Objektträger dünn ausstreichen. Sputum (direkte Probe oder konzentriertes Sputum), Liquor oder andere Körperflüssigkeiten (Katheterurin), homogenisiertes Gewebe und Abklatschpräparate sind geeignete Proben für Ausstriche.<sup>1</sup>

Den Ausstrich trocknen lassen.

Den Objektträger 2 bis 3 Mal durch eine schwache Flamme führen (Überhitzen vermeiden) oder mit Hilfe eines elektrischen Objektträger-Wärmegerät für mindestens 2 h bei 65-75°C auf dem Objektträger fixieren.<sup>13</sup>

## VERFAHREN

**Mitgelieferte Materialien\*:** TB Stain Kit K, TB Stain Kit ZN, TB Quick Stain Kit, TB Fluorescent Stain Kit M, TB Fluorescent Stain Kit T.

*\*Einzelne Reagenzien sind separat erhältlich.*

**Benötigte, jedoch nicht mitgelieferte Artikel:** Objektträger (neu oder in saurer Dichromat-Lösung gereinigt), Färbeständer, Filterpapier und Mikroskop mit Ölimmersionsobjektiv oder Fluoreszenz-Mikroskop.

## Testverfahren

### KINYOUN-FÄRBUNG

TB Stain Kit K

#### Anweisungen:

1. Objektträger in einen Färbeständer legen und 4 Min mit TB Carbofuchsin KF tränken. Nicht erhitzen.
2. Behutsam unter fließendem Wasser waschen.
3. Mit TB Decolorizer 3 bis 5 S entfärben.
4. Behutsam unter fließendem Wasser waschen.
5. Mit TB Brilliant Green K oder TB Methylene Blue (separat erhältlich) 30 S gegenfärben.
6. Behutsam unter fließendem Wasser waschen.
7. An der Luft trocknen lassen. Bei Verwendung von TB Methylene Blue über schwacher Hitze trocknen.

### ZIEHL-NEELSEN-FÄRBUNG

TB Stain Kit ZN

#### Anweisungen:

1. Objektträger in einen Färbeständer legen und ein Stück Filterpapier, größer als Ausstrichfläche, auf jeden Objektträger legen. Mit TB Carbofuchsin ZN tränken. Behutsam bis zum Dampfen erhitzen und 5 Min dampfen lassen.
2. Das Filterpapier abnehmen. Behutsam unter fließendem Wasser waschen.
3. Mit TB Decolorizer unter zweimaligem Wechseln des Reagenzes 1 bis 2 Min entfärben, bis die Waschflüssigkeit keine rote Farbe mehr enthält.
4. Behutsam unter fließendem Wasser waschen.
5. Mit TB Methylene Blue oder TB Brilliant Green K 30 S gegenfärben.
6. Behutsam unter fließendem Wasser waschen.
7. Über schwacher Hitze trocknen.

## MORSE-FÄRBUNG

TB Fluorescent Stain Kit M

### Anweisungen:

1. Objektträger in einen Färbeständer legen und 15 Min lang mit TB Auramine M tränken.
2. Behutsam unter fließendem Wasser waschen.
3. Mit TB Decolorizer TM 30 bis 60 S lang entfärben.
4. Objektträger behutsam unter fließendem Wasser waschen.
5. Mit TB Potassium Permanganate 2 Min lang gegenfärben.
6. Behutsam unter fließendem Wasser waschen.
7. An der Luft trocknen lassen.
8. Unter einem Mikroskop, das mit Filtern nach Chapin und Murray ausgestattet ist, untersuchen.<sup>14</sup>

## TRUANT-FÄRBUNG

TB Fluorescent Stain Kit T

### Anweisungen:

1. Objektträger in einen Färbeständer legen und mit gründlich geschütteltem TB Auramine-Rhodamine T tränken. Bei Raumtemperatur ungestört 20 bis 25 Min lang stehen lassen.
2. Behutsam unter fließendem Wasser waschen.
3. Mit TB Decolorizer TM 2 bis 3 Min lang entfärben.
4. Behutsam unter fließendem Wasser waschen.
5. Mit TB Potassium Permanganate 4 bis 5 Min lang gegenfärben.
6. Behutsam unter fließendem Wasser waschen.
7. Leicht abtupfen. An der Luft oder sehr behutsam über einer Flamme trocknen.
8. Unter einem Mikroskop, das mit Filtern nach Truant et. al.<sup>6</sup> oder Chapin und Murray ausgestattet ist, untersuchen.<sup>14</sup>

**Qualitätskontrolle durch den Anwender:** Es wird empfohlen, täglich Kontrollen wie den BBL AFB Slide (Best.-Nr. 231391) oder bekannt säurefeste und nichtsäurefeste Mikroorganismen mitzuführen.

Die Qualitätskontrollen müssen unter Einhaltung der örtlich, landesweit und/oder bundesweit geltenden Bestimmungen oder Auflagen der Akkreditierungsorganisationen sowie der Standard-Qualitätskontrollverfahren Ihres Labors erfolgen. Anwendern wird geraten, sich über geeignete Maßnahmen zur Qualitätskontrolle an die einschlägigen CLSI-Richtlinien (ehemals NCCLS) und CLIA-Vorschriften zu halten.

Organismus	Erwartete Ergebnisse
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	Positiv
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Negativ

## GRENZEN DES VERFAHRENS

Eine positive Färbereaktion liefert ausreichenden Beweis für die Anwesenheit von Mykobakterien in Proben. Eine negative Färbereaktion weist nicht unbedingt darauf hin, dass die Proben auch in der Kultur Mykobakterien negativ reagieren. Zur positiven Identifizierung auf Mykobakterien müssen andere Methoden (Kultur, molekular-biologisch usw.) angewendet werden.

## ERWARTETE ERGEBNISSE UND LEISTUNGSMERKMALE<sup>1-8,14</sup>

	Säurefeste Bakterien	Nicht säurefeste Bakterien
TB Stain Kit K	dunkelrot bis rosa	grün
TB Stain Kit ZN	dunkelrosa bis rot	blau
<b>Mykobakterien</b>		
TB Fluorescent Stain Kit M	starke gelb-grüne Fluoreszenz	
TB Fluorescent Stain Kit T	rötlich-orangenfarbene Fluoreszenz	

**LITERATURNACHWEIS:** S. "Reference" im englischen Text.

TB Stain Kit K		1	<b>N. di cat. 212522</b>
TB Carbofuchsin KF	Per la colorazione di micobatteri con la procedura acido-resistente Kinyoun (a freddo).	1 x 250 mL	
TB Decolorizer		1 x 250 mL	
TB Brilliant Green K		1 x 250 mL	
TB Stain Kit ZN		1	<b>212520</b>
TB Carbofuchsin ZN	Per la colorazione di micobatteri con la procedura acido-resistente Ziehl-Neelsen (a caldo).	1 x 250 mL	
TB Decolorizer		1 x 250 mL	
TB Methylene Blue		1 x 250 mL	
TB Fluorescent Stain Kit M		1	<b>212519</b>
TB Auramine M	Per la colorazione di micobatteri con la procedura in fluorescenza Morse, Blair, Weiser e Sproat.	1 x 250 mL	
TB Decolorizer TM		1 x 250 mL	
TB Potassium Permanganate		1 x 250 mL	
TB Fluorescent Stain Kit T		1	<b>212521</b>
TB Auramine-Rhodamine T	Per la colorazione di micobatteri con la procedura in fluorescenza Truant, Brett e Thomas.	1 x 250 mL	
TB Decolorizer TM		1 x 250 mL	
TB Potassium Permanganate		1 x 250 mL	
TB Auramine M	Per la colorazione di micobatteri con la procedura in fluorescenza Morse, Blair, Weiser e Sproat.	4 x 250 mL	<b>212514</b>
TB Auramine-Rhodamine T	Per la colorazione di micobatteri con la procedura in fluorescenza Truant, Brett e Thomas.	4 x 250 mL	<b>212515</b>
TB Brilliant Green K	Per la colorazione di micobatteri con le procedure acido-resistenti Kinyoun (a freddo) e Ziehl-Neelsen (a caldo).	4 x 250 mL	<b>212523</b>
TB Carbofuchsin KF	Per la colorazione di micobatteri con la procedura acido-resistente Kinyoun (a freddo).	4 x 250 mL	<b>212518</b>
TB Carbofuchsin ZN	Per la colorazione di micobatteri con la procedura acido-resistente Ziehl-Neelsen (a caldo).	4 x 250 mL	<b>212511</b>
TB Decolorizer	Per la colorazione di micobatteri con le procedure acido-resistenti Kinyoun (a freddo) e Ziehl-Neelsen (a caldo).	4 x 250 mL	<b>212517</b>
TB Decolorizer TM	Per la colorazione di micobatteri con le procedure in fluorescenza Truant, Brett e Thomas e Morse, Blair, Weiser e Sproat	4 x 250 mL	<b>212512</b>
TB Methylene Blue	Per la colorazione di micobatteri con le procedure acido-resistenti Kinyoun (a freddo) e Ziehl-Neelsen (a caldo).	4 x 250 mL	<b>212516</b>
TB Potassium Permanganate	Per la colorazione di micobatteri con le procedure in fluorescenza Truant, Brett e Thomas e Morse, Blair, Weiser e Sproat.	4 x 250 mL	<b>212513</b>

## USO PREVISTO

I Kit di colorazione per TB vengono usati per colorare strisci allestiti con campioni e colture presumibilmente contenenti micobatteri allo scopo di formulare una diagnosi presuntiva precoce di infezione micobatterica e caratterizzare gli isolati batterici.

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE

La tecnica di colorazione microscopica è una delle prime metodiche elaborate per la rilevazione del bacillo tubercolare e rimane tuttora una procedura standard.<sup>1</sup> Grazie all'esclusiva proprietà acido-resistente dei micobatteri, la tecnica di colorazione è estremamente preziosa nella diagnosi presuntiva precoce e come fonte di informazioni sul numero di bacilli acido-resistenti presenti.

A livello di rilevazione dei micobatteri, la microscopia in fluorescenza offre numerosi vantaggi rispetto alle metodiche tradizionali grazie alla sua velocità e semplicità, facilità di esame del vetrino nonché affidabilità e superiorità della metodica in sé.<sup>2</sup>

Il TB Stain Kit K utilizza la procedura acido-resistente Kinyoun (a freddo).<sup>3</sup>

Il TB Stain Kit ZN utilizza la procedura acido-resistente Ziehl-Neelsen (a caldo).<sup>4</sup>

Il TB Fluorescent Stain Kit M utilizza la procedura in fluorescenza acido-resistente con auramina-O.<sup>5</sup>

Il TB Fluorescent Stain Kit T utilizza la procedura in fluorescenza acido-resistente con auramina-rodamina descritta da Truant, Brett e Thomas.<sup>6</sup>

## PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Una delle caratteristiche fondamentali dei micobatteri è la proprietà di essere "acido-resistenti"; ciò significa che una volta colorati con anilina, fucsina basica, sono difficilmente decolorabili e conservano il colore rosso anche se trattati con una miscela di acido e alcol.

Nella colorazione Ziehl-Neelsen, la controcolorazione è costituita dal blu di metilene. Nella colorazione Kinyoun, il necessario contrasto è fornito dal verde brillante.

I coloranti in fluorescenza hanno la proprietà di emettere radiazioni visibili allorché stimolati da luce ultravioletta a inferiore lunghezza d'onda, vale a dire una lampada a vapore di mercurio o una fonte di forte luce blu, adeguatamente filtrata.<sup>7</sup>

È documentato che auramina-O e rodamina-B si legano agli acidi micolici nella parete cellulare dei micobatteri.<sup>8</sup> Il colorante non legato viene quindi rimosso dalla soluzione decolorante acido-alcol. Il permanganato di potassio funge da controcolorazione e sopprime la fluorescenza aspecifica di fondo.

## REAGENTI

Formula approssimata\* per un litro

### TB Stain Kit K

<b>TB Carbofuchsin KF</b>	
Fucsina basica	15,0 g
Fenolo, USP	45,0 g
Isopropanolo	200,0 mL
Etanolo	50,0 mL
Acqua distillata	750,0 mL

### TB Decolorizer

Acido cloridrico	30,0 mL
Etanolo/Metanolo	970,0 mL

### TB Brilliant Green K

Verde brillante	2,0 g
Iodossido di sodio	0,02 g
Acqua distillata	1000,0 mL

### TB Stain Kit ZN

<b>TB Carbofuchsin ZN</b>	
Fucsina basica	1,7 g
Fenolo, USP	50,0 g
Isopropanolo	95,0 mL
Acqua distillata	905,0 mL

### TB Decolorizer

Acido cloridrico	30,0 mL
Etanolo/Metanolo	970,0 mL

### TB Methylene Blue

Blu di metilene, USP	2,4 g
Etanolo/Metanolo	300,0 mL
Acqua distillata	700,0 mL

### TB Fluorescent Stain Kit M

<b>TB Auramine M</b>	
Auramina-O	2,0 g
Fenolo, USP	4,0 g
Glicerina, USP	100,0 mL
Isopropanolo	250,0 mL
Acqua distillata	650,0 mL

### TB Decolorizer TM

Acido cloridrico	5,0 mL
Isopropanolo	700,0 mL
Acqua distillata	300,0 mL

### TB Potassium Permanganate

Permanganato di potassio	5,0 g
Acqua distillata	1000,0 mL

### TB Fluorescent Stain Kit T

<b>TB Auramine-Rhodamine T</b>	
Auramina-O	12,0 g
Rodamina B	6,0 g
Fenolo, USP	80,0 g
Glicerina, USP	600,0 mL
Isopropanolo	140,0 mL
Acqua distillata	260,0 mL

### TB Decolorizer TM

Acido cloridrico	5,0 mL
Isopropanolo	700,0 mL
Acqua distillata	300,0 mL

### TB Potassium Permanganate

Permanganato di potassio	5,0 g
Acqua distillata	1000,0 mL

\*Compensata elo corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

## Avvertenze e precauzioni:

Per uso diagnostico *in vitro*.

I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e il virus dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle linee guida dell'istituto e alle "Precauzioni standard".<sup>9-12</sup>

Per le procedure di manipolazione su campioni clinici (es. preparazione di strisci acido-resistenti) che non comportano produzione di aerosol, si richiede l'impiego di apparecchiature e strutture di contenimento e l'adozione delle norme di sicurezza biologica di livello 2. Tutte le procedure che comportano la generazione di aerosol devono essere eseguite sotto cappa di sicurezza biologica di Classe I o II. Per le attività di laboratorio che comportano la propagazione e manipolazione di colture di *M. tuberculosis* e *M. bovis*, si richiede l'impiego di apparecchiature e strutture di contenimento e l'adozione delle norme di sicurezza biologica di livello 3. Anche gli studi su animali richiedono procedure speciali.<sup>11</sup>

Questi reagenti sono nocivi o fatali se ingeriti e possono causare irritazione agli occhi o cecità. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare abbondantemente usando un sistema di lavaggio oculare o acqua corrente per almeno 15 min e consultare un medico. Le soluzioni coloranti e la soluzione decolorante sono altamente infiammabili e i vapori possono essere nocivi; usare lontano da fiamme libere. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. Usare tutti i reagenti in locali ben ventilati, evitando inalazione protratta, contatto con la pelle e ingestione.

**TB Carbofuchsin ZN:** Tossico a contatto con la pelle e per ingestione. Provoca ustioni. Conservare il recipiente ben chiuso. Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Usare indumenti protettivi adatti.

**TB Decolorizer TM:** Provoca ustioni. Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico. Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia. In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico.

**TB Potassium Permanganate:** Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle. Conservare il recipiente ben chiuso. Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle. Usare indumenti protettivi adatti.

**TB Auramine M:** Infiammabile. Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle. In caso di contatto con la pelle lavare immediatamente e abbondantemente con acqua. Conservare il recipiente ben chiuso. Conservare lontano da fiamme e scintille — Non fumare. Usare indumenti protettivi adatti.

**TB Auramine-Rhodamine T:** Infiammabile. Tossico a contatto con la pelle e per ingestione. Provoca ustioni. Possibilità di effetti irreversibili. Conservare il recipiente ben chiuso. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico. Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia. In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico.

**TB Decolorizer:** Nocivo per inalazione e ingestione. Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato. Conservare lontano da fiamme e scintille — Non fumare. Usare indumenti protettivi adatti.

**TB Methylene Blue:** Nocivo per inalazione e ingestione. Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle. Possibilità di effetti irreversibili. Conservare il recipiente ben chiuso. Conservare lontano da fiamme e scintille — Non fumare. Usare indumenti protettivi e guanti adatti.

**TB Carbofuchsin KF:** Nocivo a contatto con la pelle e per ingestione. Irritante per gli occhi e la pelle. Possibilità di effetti irreversibili. Conservare il recipiente ben chiuso. Conservare lontano da fiamme e scintille — Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico. Usare indumenti protettivi e guanti adatti.

**Conservazione:** Conservare i kit di colorazione per TB e i reagenti a 15 – 30 °C. Una volta rimossi dalla confezione di cartone, i reagenti devono essere conservati al buio. La data di scadenza si riferisce al prodotto conservato come indicato nel contenitore intatto.

### PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Stendere uno strato sottile di campione direttamente su un vetrino pulito per microscopio. Espettorato (campione diretto o espettorato concentrato), fluido spinale o altri fluidi corporei (urina da catetere), tessuto omogeneizzato e vetrini per impronta sono campioni appropriati per gli strisci.<sup>1</sup>

Attendere che lo striscio si asciughi.

Fissare lo striscio sul vetrino passando quest'ultimo su fiamma bassa 2-3 volte, senza esporre a calore eccessivo, oppure usando uno scaldavetrino elettrico a 65-75 °C per almeno 2 h.<sup>13</sup>

### PROCEDURA

**Materiali forniti\*:** TB Stain Kit K, TB Stain Kit ZN, TB Quick Stain Kit, TB Fluorescent Stain Kit M, TB Fluorescent Stain Kit T.

*\*I singoli reagenti sono disponibili separatamente.*

**Materiali richiesti ma non forniti:** Vetrini per microscopio, nuovi o puliti in una soluzione di dicromato acido, rack per colorazione, carta filtro e microscopio con obiettivo a immersione in bagno d'olio o microscopio in fluorescenza.

### Procedura del test

#### COLORAZIONE KINYOUN

TB Stain Kit K

#### Istruzioni

1. Porre i vetrini su un rack per colorazione e irrorarli con TB Carbofuchsin KF per 4 min. Non riscaldare.
2. Lavare delicatamente in acqua corrente.
3. Decolorare con TB Decolorizer per 3 - 5 s.
4. Lavare delicatamente in acqua corrente.
5. Controcolorare con TB Brilliant Green K oppure con TB Methylene Blue (disponibili separatamente) per 30 s.
6. Lavare delicatamente in acqua corrente.
7. Asciugare all'aria. Se si usa TB Methylene Blue, asciugare su una fonte di leggero calore.

#### COLORAZIONE ZIEHL-NEELEN

TB Stain Kit ZN

#### Istruzioni

1. Porre i vetrini su un rack per la colorazione e collocare un pezzo di carta filtro, più grande dell'area dello striscio, su ogni vetrino. Irrorarli di TB Carbofuchsin ZN. Riscaldare lentamente fino a ottenere evaporazione e vaporizzare per 5 min.
2. Rimuovere la carta filtro. Lavare delicatamente in acqua corrente.
3. Decolorare con TB Decolorizer con due cambi di reagente per 1 - 2 min finché non compare più colore rosso durante il lavaggio.
4. Lavare delicatamente in acqua corrente.
5. Controcolorare con TB Methylene Blue oppure con TB Brilliant Green K per 30 s.
6. Lavare delicatamente in acqua corrente.
7. Asciugare su una fonte di leggero calore.

## COLORAZIONE MORSE

### TB Fluorescent Stain Kit M

#### Istruzioni

1. Porre i vetrini su un rack per colorazione e irrorarli con TB Auramine M per 15 min.
2. Lavare delicatamente in acqua corrente.
3. Decolorare con TB Decolorizer TM per 30 - 60 s.
4. Lavare delicatamente i vetrini in acqua corrente.
5. Controcolorare con TB Potassium Permanganate per 2 min.
6. Lavare delicatamente in acqua corrente.
7. Asciugare all'aria.
8. Esaminare i vetrini usando un microscopio provvisto di set di filtri conforme a quanto descritto da Chapin e Murray.<sup>14</sup>

## COLORAZIONE TRUANT

### TB Fluorescent Stain Kit T

#### Istruzioni

1. Porre i vetrini su un rack per colorazione e irrorarli con TB Auramine-Rhodamine T, agitata con cura prima dell'uso. Lasciare riposare a temperatura ambiente per 15 - 30 min.
2. Lavare delicatamente in acqua corrente.
3. Decolorare con TB Decolorizer TM per 2 - 3 min.
4. Lavare delicatamente in acqua corrente.
5. Controcolorare con TB Potassium Permanganate per 4 - 5 min.
6. Lavare delicatamente in acqua corrente.
7. Tamponare delicatamente. Asciugare all'aria oppure su una fiamma molto debole.
8. Esaminare i vetrini usando un microscopio provvisto di set di filtri conforme a quanto descritto da Truant et. al.<sup>6</sup> o Chapin e Murray.<sup>14</sup>

**Controllo di qualità a cura dell'utente:** Si raccomanda di analizzare i controlli ogni giorno usando il vetrino BBL AFB Slide (n. cat. 231391) o ceppi noti di microrganismi acido-resistenti e non acido-resistenti.

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una corretta esecuzione delle procedure relative al controllo di qualità, si consiglia di consultare le linee guida CLSI (già NCCLS) e le norme CLIA in materia.

Organismo	Risultati attesi
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	Positivo
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Negativo

#### LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Una reazione positiva alla colorazione fornisce presunta evidenza della presenza di micobatteri nel campione. Una reazione negativa alla colorazione non indica necessariamente che il campione di coltura sia negativo per la presenza di micobatteri. Per l'identificazione dei micobatteri si devono impiegare altri metodi (colturale, molecolare, ecc.).

#### RISULTATI ATTESI E CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI<sup>1-8,14</sup>

	Bacilli acido-resistenti	Bacilli non acido-resistenti
TB Stain Kit K	rosso scuro - rosa	verde
TB Stain Kit ZN	rosa scuro - rosso	blu
Micobatteri		
TB Fluorescent Stain Kit M	fluorescenza giallo-verde brillante	
TB Fluorescent Stain Kit T	fluorescenza rossastro-arancione	

**BIBLIOGRAFIA:** Vedere "References" nel testo inglese.

TB Stain Kit K		1	N.º ref. 212522
TB Carbofuchsin KF	Para la tinción de micobacterias por el procedimiento de ácido-resistencia de Kinyoun (en frío).	1 x 250 mL	
TB Decolorizer		1 x 250 mL	
TB Brilliant Green K		1 x 250 mL	
TB Stain Kit ZN		1	212520
TB Carbofuchsin ZN	Para la tinción de micobacterias por el procedimiento de ácido-resistencia de Ziehl-Neelsen (en caliente).	1 x 250 mL	
TB Decolorizer		1 x 250 mL	
TB Methylene Blue		1 x 250 mL	
TB Fluorescent Stain Kit M		1	212519
TB Auramine M	Para la tinción de micobacterias por el procedimiento de fluorescencia de Morse, Blair, Weiser y Sproat.	1 x 250 mL	
TB Decolorizer TM		1 x 250 mL	
TB Potassium Permanganate		1 x 250 mL	
TB Fluorescent Stain Kit T		1	212521
TB Auramine-Rhodamine T	Para la tinción de micobacterias por el procedimiento de fluorescencia de Truant, Brett y Thomas.	1 x 250 mL	
TB Decolorizer TM		1 x 250 mL	
TB Potassium Permanganate		1 x 250 mL	
TB Auramine M	Para la tinción de micobacterias por el procedimiento de fluorescencia de Morse, Blair, Weiser y Sproat.	4 x 250 mL	212514
TB Auramine-Rhodamine T	Para la tinción de micobacterias por el procedimiento de fluorescencia de Truant, Brett y Thomas.	4 x 250 mL	212515
TB Brilliant Green K	Para la tinción de micobacterias por los procedimientos de ácido-resistencia de Kinyoun (en frío) y de Ziehl-Neelsen (en caliente).	4 x 250 mL	212523
TB Carbofuchsin KF	Para la tinción de micobacterias por el procedimiento de ácido-resistencia de Kinyoun (en frío).	4 x 250 mL	212518
TB Carbofuchsin ZN	Para la tinción de micobacterias por el procedimiento de ácido-resistencia de Ziehl-Neelsen (en caliente).	4 x 250 mL	212511
TB Decolorizer	Para la tinción de micobacterias por los procedimientos de ácido-resistencia de Kinyoun (en frío) y de Ziehl-Neelsen (en caliente).	4 x 250 mL	212517
TB Decolorizer TM	Para la tinción de micobacterias por los procedimientos de fluorescencia de Truant, Brett y Thomas y de Morse, Blair, Weiser y Sproat.	4 x 250 mL	212512
TB Methylene Blue	Para la tinción de micobacterias por los procedimientos de ácido-resistencia de Kinyoun (en frío) y de Ziehl-Neelsen (en caliente).	4 x 250 mL	212516
TB Potassium Permanganate	Para la tinción de micobacterias por los procedimientos de fluorescencia de Truant, Brett y Thomas y de Morse, Blair, Weiser y Sproat.	4 x 250 mL	212513

## USO PREVISTO

Los kits de tinción TB se utilizan para teñir frotis preparados a partir de muestras y cultivos que se sospecha que contienen micobacterias, para el diagnóstico de sospecha precoz de infección micobacteriana y la caracterización de aislados bacterianos.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La técnica de tinción microscópica es uno de los métodos más precoces diseñados para detectar el bacilo tuberculoso, y continúa siendo un procedimiento estándar<sup>1</sup>. La característica exclusiva de ácido-resistencia de las micobacterias hace que la técnica de tinción sea útil en el diagnóstico de sospecha precoz así como para proporcionar información sobre el número de bacilos ácido-resistentes presentes.

La microscopía fluorescente ofrece numerosas ventajas sobre los métodos clásicos para la detección de micobacterias debido a su velocidad y sencillez, a la facilidad para examinar el portaobjeto y a la fiabilidad y la superioridad del método.<sup>2</sup>

El kit TB Stain Kit K utiliza el procedimiento de ácido-resistencia de Kinyoun (en frío).<sup>3</sup>

El kit TB Stain Kit ZN utiliza el procedimiento de ácido-resistencia de Ziehl-Neelsen (en caliente).<sup>4</sup>

El kit TB Fluorescent Stain Kit M utiliza el procedimiento de fluorescencia y ácido-resistencia de la auramina o.<sup>5</sup>

El kit TB Fluorescent Stain Kit T utiliza el procedimiento de fluorescencia y ácido-resistencia de auramina-rodamina descrito por Truant, Brett and Thomas.<sup>6</sup>

## FUNDAMENTO DEL PROCEDIMIENTO

Una característica esencial de las micobacterias es que son "ácido-resistentes", es decir, que una vez teñidas con el colorante de anilina, fucsina básica, son difíciles de descolorar y conservan el color rojo aunque sean tratadas con una mezcla de ácido y alcohol.

En la tinción de Ziehl-Neelsen, el contracolorante es azul de metileno. En la tinción de Kinyoun, el verde brillante proporciona el contraste necesario.

Los colorantes fluorescentes poseen la propiedad de emitir radiación visible cuando son estimulados por la luz ultravioleta de longitud de onda más corta, como una lámpara de vapor de mercurio o una fuente de luz azul intensa debidamente filtrada.<sup>7</sup>

La auramina O y la rodamina B se unen a los ácidos micólicos de la pared celular micobacteriana.<sup>8</sup> El colorante libre es eliminado por la solución decolorante ácido-alcohólica. El permanganato potásico actúa como contracolorante para eliminar la fluorescencia de fondo inespecífica.

## REACTIVOS

Fórmula aproximada\* por litro

### TB Stain Kit K

#### TB Carbofuchsin KF

Fucsina básica	15,0 g
Fenol, USP	45,0 g
Isopropanol	200,0 mL
Etanol	50,0 mL
Agua destilada	750,0 mL

#### TB Decolorizer

Ácido clorhídrico	30,0 mL
Etanol/Metanol	970,0 mL

#### TB Brilliant Green K

Verde brillante	2,0 g
Hidróxido de sodio	0,02 g
Agua destilada	1000,0 mL

### TB Stain Kit ZN

#### TB Carbofuchsin ZN

Fucsina básica	1,7 g
Fenol, USP	50,0 g
Isopropanol	95,0 mL
Agua destilada	905,0 mL

#### TB Decolorizer

Ácido clorhídrico	30,0 mL
Etanol/Metanol	970,0 mL

#### TB Methylene Blue

Azul de metileno, USP	2,4 g
Etanol/Metanol	300,0 mL
Agua destilada	700,0 mL

### TB Fluorescent Stain Kit M

#### TB Auramine M

Auramina O	2,0 g
Fenol, USP	4,0 g
Glicerina, USP	100,0 mL
Isopropanol	250,0 mL
Agua destilada	650,0 mL

#### TB Decolorizer TM

Ácido clorhídrico	5,0 mL
Isopropanol	700,0 mL
Agua destilada	300,0 mL

#### TB Potassium Permanganate

Permanganato potásico	5,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

### TB Fluorescent Stain Kit T

#### TB Auramine-Rhodamine T

Auramina O	12,0 g
Rodamina B	6,0 g
Fenol, USP	80,0 g
Glicerina, USP	600,0 mL
Isopropanol	140,0 mL
Agua destilada	260,0 mL

#### TB Decolorizer TM

Ácido clorhídrico	5,0 mL
Isopropanol	700,0 mL
Agua destilada	300,0 mL

#### TB Potassium Permanganate

Permanganato potásico	5,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

\*Ajustada y/o enriquecida para satisfacer los criterios de rendimiento.

## Advertencias y precauciones:

Para uso diagnóstico *in vitro*.

En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales, deben seguirse las "Precauciones estándar"<sup>9-12</sup> y las directivas del centro.

Se requiere la utilización de prácticas y procedimientos de seguridad biológica de nivel 2 y equipo e instalaciones para contención cuando se manipulen muestras clínicas sin producir aerosoles, como en la preparación de frotis acidorresistentes. Todas las actividades que generen aerosoles deben llevarse a cabo en un gabinete de seguridad biológica de clase I o II. Se requiere la utilización de prácticas de seguridad biológica de nivel 3 y equipo e instalaciones para contención en las actividades de laboratorio que incluyan la propagación y manipulación de cultivos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Los estudios en animales también requieren la implementación de procedimientos especiales<sup>11</sup>.

Estos reactivos son nocivos o mortales en caso de ingestión y pueden causar irritación de los ojos o ceguera. En caso de contacto con los ojos, lávese a conciencia con un sistema de lavado ocular o con agua del grifo durante al menos 15 min y acúdase al médico. La soluciones colorantes y la solución decolorante son muy inflamables y los vapores producidos pueden ser nocivos, por lo que estas soluciones deben utilizarse lejos de llamas abiertas. Evítese el contacto con la piel, los ojos y las mucosas. Todos los reactivos deben utilizarse en un área bien ventilada, evitando una inhalación prolongada, el contacto con la piel y la ingestión.

**TB Carbofuchsin ZN:** Tóxico en contacto con la piel y por ingestión. Provoca quemaduras. Manténgase el recipiente bien cerrado. Evítese el contacto con los ojos y la piel. Úsese indumentaria protectora adecuada.

**TB Decolorizer TM:** Provoca quemaduras. Manténgase el recipiente bien cerrado y en lugar bien ventilado. En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. Úsese indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara. En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico.

**TB Potassium Permanganate:** Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. Manténgase el recipiente bien cerrado. Evítese el contacto con los ojos y la piel. Úsese indumentaria protectora adecuada.

**TB Auramine M:** Inflamable. Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. En caso de contacto con la piel, lávense inmediata y abundantemente con agua. Manténgase el recipiente bien cerrado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. Úsese indumentaria protectora adecuada.

**TB Auramine-Rhodamine T:** Inflamable. Tóxico en contacto con la piel y por ingestión. Provoca quemaduras. Posibilidad de efectos irreversibles. Manténgase el recipiente bien cerrado. En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. Úsese indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara. En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico.

**TB Decolorizer:** Nocivo por inhalación y por ingestión. Manténgase el recipiente bien cerrado y en lugar bien ventilado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. Úsese indumentaria protectora adecuada.

**TB Methylene Blue:** Nocivo por inhalación y por ingestión. Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. Posibilidad de efectos irreversibles. Manténgase el recipiente bien cerrado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. Úsese indumentaria y guantes de protección adecuados.

**TB Carbofuchsin KF:** Nocivo en contacto con la piel y por ingestión. Irrita los ojos y la piel. Posibilidad de efectos irreversibles. Manténgase el recipiente bien cerrado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. Úsese indumentaria y guantes de protección adecuados.

**Conservación:** los reactivos y los kits de tinción TB deben conservarse a una temperatura de 15 a 30 °C. Los reactivos que hayan sido extraídos de los envases de cartón deben conservarse protegidos de la luz. La fecha de caducidad se aplica al producto conservado en su envase intacto de la forma indicada.

## RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Aplique un frotis fino de la muestra directamente sobre un portaobjetos limpio. El esputo (muestra directa o esputo concentrado), el líquido cefalorraquídeo y otros líquidos corporales (orina por sondaje), los tejidos homogeneizados y los portaobjetos de impresión son muestras apropiadas para los frotis.<sup>1</sup>

Deje que se seque el frotis.

Fije el frotis al portaobjetos pasando éste a través de una llama baja 2-3 veces, evitando un calor excesivo, o utilice un calentador eléctrico de portaobjetos entre 65 y 75 °C durante 2 h como mínimo<sup>13</sup>.

## PROCEDIMIENTO

**Materiales suministrados\*:** TB Stain Kit K, TB Stain Kit ZN, TB Quick Stain Kit, TB Fluorescent Stain Kit M, TB Fluorescent Stain Kit T.

*\*Los diferentes reactivos pueden obtenerse por separado.*

**Materiales necesarios pero no suministrados:** portaobjetos (nuevos o limpiados en una solución de dicromato ácido), soporte para tinción, papel de filtro y microscopio con lente de inmersión en aceite o microscopio de fluorescencia.

## Procedimiento de análisis

### TINCIÓN DE KINYOUN

TB Stain Kit K

#### Instrucciones:

1. Coloque los portaobjetos en un soporte para tinción y sumérjalos en TB Carbofuchsin KF durante 4 min. No los caliente.
2. Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
3. Descolórelos con TB Decolorizer durante 3 a 5 s.
4. Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
5. Realice una contratinción con TB Brilliant Green K o TB Methylene Blue (disponibles por separado) durante 30 s.
6. Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
7. Séquelos al aire. Si utiliza TB Methylene Blue, séquelos con calor suave.

### TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN

TB Stain Kit ZN

#### Instrucciones:

1. Coloque los portaobjetos en un soporte para tinción y coloque un pedazo de papel de filtro, más grande que la superficie del frotis, sobre cada portaobjetos. Sumérjalos en TB Carbofuchsin ZN. Caliéntelos suavemente hasta la vaporización y déjelos al vapor durante 5 min.
2. Retire el papel de filtro. Lave suavemente los portaobjetos en agua del grifo.
3. Descolórelos con TB Decolorizer con dos cambios de reactivo durante 1 a 2 min hasta que deje de aparecer una coloración roja en el líquido de lavado.
4. Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
5. Realice una contratinción con TB Brilliant Green K durante 30 s.
6. Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.

- Séquelos con calor suave.

#### TINCIÓN DE MORSE

TB Fluorescent Stain Kit M

##### Instrucciones:

- Coloque los portaobjetos en un soporte para tinción y sumérgalos en TB Auramine M durante 15 min.
- Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
- Descolórelos con TB Decolorizer TM durante 30 a 60 s.
- Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
- Realice una contratinción con TB Potassium Permanganate durante 2 min.
- Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
- Séquelos al aire.
- Exáminelos con un microscopio dotado de juegos de filtros, tal como describen Chapin y Murray.<sup>14</sup>

#### TINCIÓN DE TRUANT

TB Fluorescent Stain Kit T

##### Instrucciones:

- Coloque los portaobjetos en un soporte para tinción y sumérgalos en TB Auramine-Rhodamine T, que debe haber sido agitado a conciencia antes de su uso. Deje reposar los portaobjetos durante 20 a 25 min a temperatura ambiente.
- Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
- Descolórelos con TB Decolorizer TM durante 2 a 3 min.
- Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
- Realice una contratinción con TB Potassium Permanganate durante 4 a 5 min.
- Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
- Séquelos ligeramente. Séquelos al aire o muy suavemente sobre una llama.
- Exáminelos con un microscopio dotado de juegos de filtros, tal como describen Truant y cols.<sup>6</sup> y Chapin y Murray.<sup>14</sup>

**Control de calidad del usuario:** Se recomienda efectuar controles cada día de uso mediante el portaobjetos BBL AFB Slide (Nº de cat. 231391) o con microorganismos acidorresistentes y no acidorresistentes conocidos.

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones pertinentes del CLSI (antes NCCLS) y la normativa de la CLIA para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

Microorganismo	Resultados previstos
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	Positivo
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Negativo


#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO


Una reacción de tinción positiva ofrece evidencia presuntiva de la presencia de micobacterias en la muestra. Una reacción de tinción negativa no indica necesariamente que la muestra sea negativa en cultivo para micobacterias. Para la identificación positiva de micobacterias hay que utilizar otros métodos (de cultivo, moleculares, etc.).

#### RESULTADOS PREVISTOS Y CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO<sup>1-8,14</sup>

	Bacilos ácido-resistentes	Bacilos no ácido-resistentes
	TB Stain Kit K	rojo oscuro a rosa
TB Stain Kit ZN	rosa oscuro a rojo	azul
Micobacterias		
TB Fluorescent Stain Kit M	fluorescencia amarilla intensa-verde	
TB Fluorescent Stain Kit T	fluorescencia rojiza-naranja	

**BIBLIOGRAFIA:** Ver "Referencias" en el texto en inglés.


 Manufacturer / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas / Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare / Производител / Producător / Üretici / Proizvođač / Производител / Аткарушы

 Use by / Spotføjte / do / Anvendes for / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes for / Stosować do / Utilizar em / Použite do / Usar antes de / Använd före / Исползовать до / A se utiliza până la / Son kullanna tarihi / Uпотřebiti do / Исползовать до / дейнє пайдаланура / Uпотřebiti do /  
YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /  
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) /  
ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutning af måned) /  
JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) /  
AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp) /  
VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) /  
AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) /  
JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) /  
EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /  
ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja) /  
AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) /  
MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mėnesio pabaiga) /  
ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av måneden) /  
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) /  
AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) /  
RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiacu) /  
aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /  
ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden) /  
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца) /  
AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii) /  
YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu) /  
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca) /  
ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца) /  
ЖЖЖЖ-АА-КК / ЖЖЖЖ-АА (АА = айдын соңы) /  
GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)

**REF** Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalógové číslo / Numero de catálogo / Каталоген номер / Număr de catalog / Katalog numarası / Kataloški broj / Номер по каталогу / Каталог нөмірі

**EC REP** Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Valituutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisierte EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Autoriseret representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Représentante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Représentante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Оторизран представител в EU / Représentant autorizat în Uniunea Europeană / Автура Топлулуғу Yetkili Temsilcisi / Овлашчен представитель в Европской zajednici / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Европа қауымдастығындағы уәкілетті екіл / Autorizirani predstavnik u EU

**IVD** In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostika meditsiiniparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietaisais / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicinska pomôcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik / Медицински уред за диагностика in vitro / Aparatură medicală de diagnosticare in vitro / In Vitro Diyagnostik Tibbi Cihaz / Medicinski uredjaj za in vitro dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики in vitro / Жасанды жағдайда жұргізілетін медициналық диагностика аспабы / Medicinska pomagala za In Vitro Dijagnostiku


 Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturlimit / Temperaturi piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturbereich / Οριο θερμοκρασίας / Hőmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrensning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenje toploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning / Температури ограничения / Limitare de temperatură / Sicaklık sınırlaması / Ograničenje temperature / Ограничение температуры / Температураны шектеу / Dozvoljena temperatura


**LOT** Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch code (Lot) / Chargennummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot / Lot Code / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-code (Serie) / Kod partii (seria) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti) / Код (Партида) / Număr lot (Lotul) / Partu Kod (Lot) / Kod serije / Код партии (лот) / Топтама коды / Lot (kod)

**i** Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lügeda kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen / Направте справка в инструкциите за употреба / Consultați instrucțiunile de utilizare / Kullanni Talimallari na бағурын / Pogledajte uputstvo za upotrebu / См. руководство по эксплуатации / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Koristi upute za upotrebu





 Becton, Dickinson and Company  
7 Loveton Circle  
Sparks, MD 21152 USA  
800-638-8663  
[www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds)

 Benex Limited  
Rineanna House  
Shannon Free Zone  
Shannon, County Clare, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.  
BD, BD Logo and BBL are trademarks of Becton, Dickinson and Company © 2011 BD.