

1.01301.0050

Mikroskopie

Auramin O (C.I. 41000)

für die Mikroskopie

IVD

In Vitro Diagnostikum



für die Fluoreszenz-Tb-Färbung von Ausstrichen und Schnitten

Der vorliegende Farbstoff „Auramin O (C.I. 41000) - für die Mikroskopie“ wird für die human-medizinische Zelldiagnostik verwendet und dient der bakteriologischen und histologischen Untersuchung von Proben humanen Ursprungs. Es handelt sich um einen Trockenfarbstoff, welcher für die Herstellung einer Farbstofflösung verwendet wird, welche zusammen mit anderen In Vitro Diagnostika aus unserem Portfolio Zielstrukturen (z.B. säurefesten Mykobakterien, mittels Fxieren, ggf. Einbetten, Färben mit obiger Auramin O-Lösung, Gegenfärben, Eindecken) in bakteriologischem und histologischem Untersuchungsgut, wie z.B. Ausstrichen von Anreicherungs-Bakterienkulturen oder histologischen Schnitten von z.B. Lunge, für die Diagnostik auswertbar macht.

Prinzip

Mykobakterienfärbung nach Hagemann-Hermann durch unspezifische Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs an ein Substrat

Der Mechanismus der Fluoreszenzfärbung ist vergleichbar mit der klassischen Ziehl-Neelsen Färbung.

Mykobakterien haben einen hohen Wachs- und Lipidanteil in der Zellwand und nehmen daher Farbstoffe nur sehr langsam auf. Haben die Mykobakterien den Fuchsin-Farbstoff aufgenommen, ist ein Entfäben auch bei intensiver Behandlung mit Entfärbelösung, wie z.B. Salzsäure-Alkohol, praktisch unmöglich. Mykobakterien werden deshalb als färberisch säure- und alkoholfest bezeichnet.

Durch eine Vorbehandlung der Präparate mit Sputofluor®, werden die Bakterien aus dem umgebenden, zähen Sputum und Zellmaterial gelöst. Sputofluor® wirkt zudem auch desinfizierend, so dass Mikroorganismen abgetötet werden.

Probenmaterial

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

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

Reagenzien

Art. 1.01301.0050

Auramin O (C.I. 41000) 50 g

für die Mikroskopie

Color Index No.: 41000

Color Index Name: Basic yellow 2

Zusätzlich erforderlich:			
Art.	100206	Phenol	250 g, 1 kg
		zur Analyse ACS,Reag. Ph Eur	
Art.	100327	Salzsäure-Alkohol	1 l, 5 l
		für die Mikroskopie	
Art.	101287	Löfflers Methylenblaulösung	100 ml, 500 ml,
		für die Mikroskopie	
			2,5 l
Art.	105082	Kaliumpermanganat	250 g, 1 kg
		zur Analyse EMSURE® ACS,Reag. Ph Eur	

Probenvorbereitung

Die Probenentnahme darf nur durch Fachpersonal erfolgen.

Sputum

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

Reagenz Vorbereitung: Herstellung von Sputofluor®-Lösung 15 %

Zur Herstellung von etwa 100 ml Lösung werden zusammengegeben:

Sputofluor®	15 ml
Aqua dest.	85 ml

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

Punktate, Lavagen, Sedimente

Proben nach geeigneten Anreicherungsschritten auf dem Objektträger ausstreichen und lufttrocknen lassen.

Histologische Schnitte

Auramin O (C.I. 41000) kann für die Färbung histologischer Schnitte verwendet werden.

Schnitte in gewohnter Weise entparaffinieren und in absteigender Alkoholreihe rehydratisieren. Bei Formalin fixierten Proben entfällt die Sputofluor®-Vorbehandlung.

Fixierung

Die Fixierung wird über der Bunsenbrennerflamme (2 - 3 mal unter Vermeidung zu starker Hitzeeinwirkung) durchgeführt.

Das Material kann auch 20 min bei 100 - 110°C in einem Trockenschrank oder auf einer Wärmeplatte fixiert werden.

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

Alle Proben sind entsprechend dem Stand der Technik zu behandeln.

Alle Proben sind eindeutig zu kennzeichnen.

Geeignete Instrumente sind zur Probenentnahme und bei der Präparation zu verwenden, die Anweisungen des Herstellers für die Anwendung / den Gebrauch sind zu befolgen.

Reagenz Vorbereitung

verflüssigtes Phenol

Zur Herstellung werden zusammengegeben:

Phenol	10 Teile
bei gelinder Wärme auf dem Wasserbad schmelzen	
Aqua dest.	1 Teil
zugeben und mischen	

Phenol-Auramin O-Lösung

Zur Herstellung von etwa 1 l Lösung werden zusammengegeben:

Auramin O (C.I. 41000)	1 g
Aqua dest.	1 l
lösen	
verflüssigtes Phenol	50 g
zugeben, mischen und ggf. filtrieren	

Die frisch hergestellte Farbstofflösung ist vor Gebrauch zu filtrieren.

Kaliumpermanganat-Lösung 0,1 %

Zur Herstellung von etwa 1 l Lösung werden zusammengegeben:

Kaliumpermanganat	1 g
Aqua dest.	1 l
lösen	

Durchführung

Färbung auf der Färbebank

Für ein optimales Färbeergebnis sollten die angegebenen Zeiten eingehalten werden.

Objektträger mit fixiertem Ausstrich oder histologischem Präparat		
Phenol-Auramin O-Lösung	überschichten der Präparate, Präparate aufkochen und einwirken lassen, Lösung abschütten und Färbung wiederholen	jeweils 5 min einwirken lassen
Leitungswasser	sorgfältig spülen	
Salzsäure-Alkohol	differenzieren bis zur Entfärbung	15 - 20 sec
Leitungswasser	spülen	
Ggf. Gegenfärbung:		
Kaliumpermanganat-Lösung 0,1 %	eintauchen	5 sec
Leitungswasser	spülen	
Löfflers Methylenblaulösung	eintauchen	1 sec
Leitungswasser	spülen	
Lufttrocknen (z.B. über Nacht oder bei 50 °C im Trockenschrank)*		

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

Für die Lagerung von bakteriologischen Präparaten über mehrere Monate, wird das Eindecken mit nicht-wässrigen Eindeckmitteln (z.B. Neo-Mount®, Entellan®, DPX Neu oder Entellan® Neu) und Deckglas empfohlen. Die gefärbten Präparate müssen dafür sehr gut getrocknet werden. Ohne Eindecken ist die Färbung etwa 3 Tage, mit Immersionsöl bedeckt nur einige Stunden stabil.
Für die Analyse von gefärbten Präparaten mit einer mikroskopischen Vergrößerung >40x wird die Verwendung von Immersionsöl empfohlen.

Ergebnis

Mykobakterien	goldgelb fluoreszierend
Hintergrund	dunkelviolett

Auswertung

Ein positiver Befund bedeutet „säurefeste Stäbchen vorhanden“, und ein negativer Befund bedeutet „säurefeste Stäbchen nicht vorhanden“. Es kann nicht unterschieden werden, ob es sich um *Mykobakterium tuberculosis* oder eine andere Gattung Mykobakterium handelt. Die Vitalität (aktiv, inaktiv) der Bakterien kann ebenfalls nicht bestimmt werden.
Werden Mykobakterien gefunden, sollten weitere Untersuchungen in Speziallabors durchgeführt werden.

Fehlerfindung

Fixierung

Eine ausreichende Hitzefixierung mit dem Bunsenbrenner oder in einem Hitzeschrank ist wichtig, um das infektiöse Potential der Präparate und ein Weiterwachsen der Bakterien zu verhindern.
Bei höheren Temperaturen oder längerer Erhitzung muss mit einer Verschlechterung der Färbeleistung gerechnet werden.

Keine Färbung von Mykobakterien

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

Technische Hinweise

Das verwendete Mikroskop sollte den Anforderungen eines medizinisch-diagnostischen Labors entsprechen.
Werden Färbeautomaten verwendet, sind die Bedienungsanweisungen des Geräte- und Softwareherstellers zu beachten.
Die frisch hergestellte Farbstofflösung ist vor Gebrauch zu filtrieren.
Überschüssiges Immersionsöl ist vor dem Archivieren zu entfernen.

Diagnostik

Diagnosen sind nur von autorisierten und geschulten Personen zu erstellen.
Gültige Nomenklaturen sind anzuwenden.
Weiterführende Tests sind nach anerkannten Methoden auszuwählen und durchzuführen.
Geeignete Kontrollen sollten bei jeder Anwendung mitgeführt werden, um ein fehlerhaftes Ergebnis auszuschließen.

Lagerung

Auramin O (C.I. 41000) - für die Mikroskopie bei +5 °C bis +30 °C lagern.

Haltbarkeit

Auramin O (C.I. 41000) - für die Mikroskopie kann bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.
Nach dem ersten Öffnen der Flasche bei +5 °C bis +30 °C aufbewahrt bis zum Verfallsdatum verwendbar.
Die Flaschen sind stets gut geschlossen zu halten.

Gebrauchshinweise

Nur für professionelle Anwendung.

Um Fehler zu vermeiden, ist die Anwendung von Fachpersonal durchzuführen. Nationale Richtlinien für Arbeitssicherheit und Qualitätssicherung sind zu befolgen. Entsprechend dem Standard ausgestattete Mikroskope sind zu verwenden. Bei Bedarf ist eine dem Laborstandard und den Anforderungen entsprechende Zentrifuge zu verwenden.

Infektionsschutz

Auf wirksamen Infektionsschutz entsprechend der Laborrichtlinien ist unbedingt zu achten.

Entsorgungshinweise

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

Hilfsreagenzien

Art.	100206	Phenol zur Analyse ACS,Reag. Ph Eur	250 g, 1 kg
Art.	100327	Salzsäure-Alkohol für die Mikroskopie	1 l, 5 l
Art.	100579	DPX Neu wasserfreies Eindeckmittel für die Mikroskopie	500 ml
Art.	101287	Löfflers Methylenblaulösung für die Mikroskopie	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Art.	104699	Immersionsöl für die Mikroskopie	100-ml-Tropfflasche, 100 ml, 500 ml
Art.	105082	Kaliumpermanganat zur Analyse EMSURE® ACS,Reag. Ph Eur	250 g, 1 kg
Art.	107960	Entellan® Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie	500 ml
Art.	107961	Entellan® Neu Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie	100 ml, 500 ml, 1 l
Art.	108000	Sputofluol® für die Mikrobiologie und Mikroskopie	1 l
Art.	108298	Xylol (Isomerenmischung) für die Histologie	4 l
Art.	109016	Neo-Mount® wasserfreies Eindeckmittel für die Mikroskopie	100-ml-Tropfflasche, 500 ml
Art.	109843	Neo-Clear® (Xylol-Ersatz) für die Mikroskopie	5 l

GefahrstoffEinstufung

Art. 1.01301.0050
Die GefahrstoffEinstufung auf dem Etikett und die Angaben im Sicherheitsdatenblatt beachten.
Das Sicherheitsdatenblatt ist erhältlich im Internet und auf Anfrage.

Hauptbestandteile des Produkts

Art.	1.01301.0050
C.I. 41000	
C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃	
M = 303,84 g/mol	
Trocknungsverlust	≤ 5 %

Weitere IVD-Produkte

Art. 105174	Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III für die Mikroskopie	500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 109093	Tb-Fluor Färbeset für die fluorenszenzmikroskopische Untersuchung von Mycobakterien	6x 500 ml
Art. 109204	Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung für die Mikroskopie	100 ml, 500 ml, 1 l, 2,5 l
Art. 109844	Eosin G-Lösung 0,5% wässrig für die Mikroskopie	1 l, 2,5 l
Art. 111609	Histosec® Pastillen Erstarrungspunkt 56-58°C Einbettungsmittel für die Histologie	1 kg, 10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art. 111885	Gram-color Färbeset für die Gram-Färbung	1 set
Art. 115161	Histosec® Pastillen (ohne DMSO) Erstarrungspunkt 56-58°C Einbettungsmittel für die Histologie	10 kg (4x 2,5 kg), 25 kg
Art. 116450	Tb-color Färbeset für die mikroskopische Untersuchung von Mykobakterien mittels Kaltfärbung	1 set

Literatur

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Theory and application of Microbiological Assay, Hewitt, W. and Vincent, S., 1989, Academic Press
4. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002



Consult instructions
for use



Manufacturer



Catalog number



Batch code



Caution, consult
accompanying documents



Use by
YYYY-MM-DD



Temperature
limitation

Status: 2017-08-15

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

EMD Millipore Corporation, 290 Concord Road, Billerica,
MA 01821, USA, Tel. +1-978-715-4321

