

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Microscopy

Löffler's methylene blue solution

for microscopy

For professional use only

IVD

In vitro Diagnostic Medical Device



Intended purpose

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

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

Principle

The cell wall of acid-fast bacteria has a high proportion of wax and lipids and hence absorbs dyes only very slowly. The most efficient staining method is the hot staining according to Ziehl-Neelsen. In this method, carbolfuchsin solution is applied to the specimen and heated. This heating process accelerates the rate at which the fuchsin dye is absorbed and thus also that of the formation of the mycolate-fuchsin complex in the cell wall. Once the acid-fast bacteria have absorbed the fuchsin dye, it is virtually impossible to decolorize them again, even when they are intensively treated with a decolorizing solution such as e.g. hydrochloric acid in ethanol. Accordingly, acid-fast bacteria are termed as acid- and alcohol-fast for staining, and are stained red in the microscopic visualization. Correspondingly, all non-acid-fast microorganisms are counterstained with an appropriate dye. In this instruction for use methylene blue is used for counterstaining. Pretreatment of the specimens with Sputofluor™ dissolves the bacteria from the surrounding viscous sputum and cell material.

Sample material

Smears of bacteriological material that have been air-dried, heat-fixed, and pretreated with Sputofluor™ like sputum, smears from fine needle aspiration biopsies (FNAB), rinses, imprints, effusions, pus, exudates, liquid and solid cultures
Sections of formalin fixed, paraffin embedded tissue (3 - 4 µm thick paraffin sections)

Reagents

Cat. No. 1.01287
Löffler's methylene blue solution 100 ml, 500 ml, 2.5 l
for microscopy

Also required:

Cat. No. 1.09215 Ziehl-Neelsen carbolfuchsin solution 100 ml, 500 ml, 2.5 l
for microscopy
Cat. No. 1.08512 AFB-Color carbol fuchsin solution 500 ml, 2.5 l
for the microscopic investigation of acid-fast bacteria (AFB) (cold staining)
Cat. No. 1.00327 Hydrochloric acid in ethanol 1 l, 5 l
for microscopy
Cat. No. 1.08000 Sputofluor™ 1 l
for microscopy

Alternatively:

Instead of the combination of single reagents, the staining kit 1.00497.0001 can be used for smears:

Cat. No. 1.00497.0001

AFB-Color modified

Staining kit for the detection of acid-fast bacteria (AFB) by hot staining method

1 set

Sample preparation

The sampling must be performed by qualified personnel.

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

All samples must be clearly labeled.

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

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

Sputum

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

Reagent preparation: Preparation of Sputofluor™ solution 15%

For preparation of approx. 100 ml solution mix:

Sputofluor™	15 ml
Distilled water	85 ml

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

Punctates, lavages, sediments

After appropriate enrichment measures, smear sample material on the slide and allow to air-dry.

Histological sections

Löffler's methylene blue solution should be used to stain histological sections. Compact tissue has the tendency to overstain; for such tissues a dilution of Löffler's methylene blue solution is recommended (dilution: 1:10 (1+9) with distilled water).

Deparaffinize sections in the conventional manner and rehydrate in a descending alcohol series. Pretreatment with Sputofluor™ is not necessary for specimens fixed with formalin.

Fixation smear samples

Specimens are fixed over a Bunsen burner flame (2 - 3 times, taking care to avoid excessive heating).

The specimens can also be fixed by heating at 100 - 110 °C in a drying cabinet or on a heating plate for 20 min.

Excessive temperatures or prolonged heating may involve a deterioration of the staining performance.

Reagent preparation

The Löffler's methylene blue solution - for microscopy used for staining smears is ready-to-use, dilution of the solution is not necessary and merely produces a deterioration of the staining result and the stability. For histological sections, a dilution of Löffler's methylene blue solution is recommended (1+9 with distilled water).

Procedure

Staining of smear samples

Staining on the staining rack

The stated times should be adhered to in order to guarantee an optimal

staining result.

Slide with fixed smear		
Ziehl-Neelsen carbol-fuchsin solution	cover completely, carefully heat three times from below with the Bunsen burner until steam forms Do not allow the staining solution to boil!	stain for 5 min in total
Tap water	rinse until no further clouds of dye are produced	
Hydrochloric acid in ethanol	cover completely and leave to react	15 - 30 sec*
Tap water	rinse immediately	
Löffler's methylene blue solution	counterstaining, cover completely and leave to react	30 sec**
Tap water	rinse carefully	
Air-dry (e. g. over night or at 50°C in the drying cabinet)		

* depending on thickness of specimen

** or 1 min with diluted Löffler's methylene blue solution (dilution: 1:10 (1+9) with dist. water)

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

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

Staining of histological samples

Staining in the staining cell

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

The slides must be immersed and moved briefly about in the solutions, simple immersion alone yields inadequate staining results.

The slides should be allowed to drip off well after the individual staining steps as a measure to avoid any unnecessary cross-contamination of solutions.

Slide with histological tissue	
AFB-Color carbol fuchsin solution	30 min
Running tap water	45 sec
Hydrochloric acid in ethanol	15 sec
Running tap water	15 sec
Löffler's methylene blue solution*	5 min
Wash with tap water	10 sec
Ethanol 70%	1 min
Ethanol 70%	1 min
Ethanol 96%	1 min
Ethanol 96%	1 min
Ethanol 100%	1 min
Ethanol 100%	1 min
Xylene or Neo-Clear™	5 min
Xylene or Neo-Clear™	5 min
Mount the Neo-Clear™-wet slides with Neo-Mount™ or the xylene-wet slides with e. g. Entellan™ new and cover glass.	

* For the counterstaining of histological specimens a dilution of Löffler's methylene blue solution is recommended (dilution: 1:10 (1+9) with distilled water). This working solution can be used for up to 2 weeks.

Result

Acid-fast bacteria	red
Background	blue

Evaluation

A positive result means "acid-fast bacteria detected" and a negative result "acid-fast bacteria not detected". A positive result does not mean that a taxonomic classification by microscopy is possible. If acid-fast bacteria are detected, further analyses must be performed in specially equipped laboratories. The vitality (active, inactive) of the bacteria can also not be determined.

Trouble-shooting

Fixation of smear samples

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

No staining of acid-fast bacteria

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

Technical notes

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

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

Remove surplus immersion oil before filing.

Analytical performance characteristics

"Löffler's methylene blue solution" stains and thereby visualizes biological structures, as described in the "Result" chapter of this IFU. The use of the product is only to be carried out by authorized and qualified persons, this includes, among other things, sample and reagent preparation, sample handling, histoprocessing, decisions regarding suitable controls and more.

The analytical performance of the product is confirmed by testing each production batch. The successful participation in international interlaboratory tests on a regular basis provide an additional and unaffiliated confirmation of analytical specificity.

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

	Inter-assay Specificity	Inter-assay Sensitivity	Intra-assay Specificity	Intra-assay Sensitivity
Bacteriological staining				
Acid fast bacteria	20/20	20/20	7/7	7/7
Background	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Analytical performance results

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

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

Diagnostics

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

This method can be supplementarily used in human diagnostics. Further tests must be selected and implemented according to recognized methods.

Suitable controls should be conducted with each application in order to avoid an incorrect result.

Storage

Store the Löffler's methylene blue solution - for microscopy at +15 °C to +25 °C.

Shelf-life

The Löffler's methylene blue solution - for microscopy can be used until the stated expiry date.

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

The bottles must be kept tightly closed at all times.

Capacity

approx. 250 stainings / 500 ml

Additional instructions

For professional use only.

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

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

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

Protection against infection

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

Instructions for disposal

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

Used solutions and solutions that are past their shelf-life must be disposed of as special waste in accordance with local guidelines. Information on dis-

posal can be obtained under the Quick Link "Hints for Disposal of Microscopy Products" at www.microscopy-products.com. Within the EU the currently applicable REGULATION (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 applies.

Auxiliary reagents

Cat. No. 1.00327	Hydrochloric acid in ethanol for microscopy	1 l, 5 l
Cat. No. 1.00497	AFB-Color modified Staining kit for the detection of acid-fast bacteria (AFB) by hot staining method	1 set
Cat. No. 1.00579	DPX new non-aqueous mounting medium for microscopy	500 ml
Cat. No. 1.04699	Immersion oil for microscopy	100-ml dropping bottle, 100 ml, 500 ml
Cat. No. 1.07960	Entellan™ rapid mounting medium for microscopy	500 ml
Cat. No. 1.07961	Entellan™ new rapid mounting medium for microscopy	100 ml, 500 ml, 1 l
Cat. No. 1.08000	Sputofluo™ for microscopy	1 l
Cat. No. 1.08298	Xylene (isomeric mixture) for histology	4 l
Cat. No. 1.08512	AFB-Color carbol fuchsin solution for the microscopic investigation of acid-fast bacteria (AFB) (cold staining)	500 ml, 2.5 l
Cat. No. 1.09016	Neo-Mount™ anhydrous mounting medium for microscopy	100-ml dropping bottle, 500 ml
Cat. No. 1.09215	Ziehl-Neelsen carbofuchsin solution for microscopy	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Cat. No. 1.09843	Neo-Clear™ (xylene substitute) for microscopy	5 l

Hazard classification

Cat. No. 1.01287

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

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

Main components of the product

Cat. No. 1.01287

C.I. 52015	4.2 g/l
C ₇ H ₅ OH	190 g/l
pH	8.0 - 8.6
1 l =	0.97 kg

General remark

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

Literature

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Edition



H226: Flammable liquid and vapor.

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

P233: Keep container tightly closed.

P240: Ground and bond container and receiving equipment.

P241: Use explosion-proof electrical/ ventilating/ lighting/ equipment.

P242: Use non-sparking tools.

P243: Take action to prevent static discharges.

Revision History

Version	Modification Comment
2024-Jul-01	Initial version with the introduction of Revision History
2024-Jul-01 V.2	No change to the English translation



Consult instructions for use



Manufacturer



Catalog number



Batch code



Caution, consult accompanying documents



Use by YYYY-MM-DD



Temperature limitation

Status: 2024-Jul-01 V.2

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved. Merck and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly available resources.



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

MERCK

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroskopie

Löfflers Methylenblaulösung

für die Mikroskopie

Nur für professionelle Anwendung

IVD

In vitro Diagnostikum

CE

Zweckbestimmung

Die vorliegende „Löfflers Methylenblaulösung - 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 eine gebrauchsfertige Färbelösung, welche zusammen mit anderen *In vitro* Diagnostika aus unserem Portfolio Zielstrukturen (säurefeste Stäbchenbakterien (AFB)) mittels Fixieren, Anfärben, 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.

Ungefärbte Strukturen sind relativ kontrastarm und lassen sich kaum lichtmikroskopisch differenzieren. Durch die mit Hilfe der Färbelösungen erzeugten Bilder, kann die Form und Struktur durch einen autorisierten und qualifizierten Untersucher besser erkannt werden. Für eine abschließende Diagnostik sind weiterführende Tests nach anerkannten, validen Methoden durchzuführen.

Prinzip

Säurefeste Stäbchenbakterien haben einen hohen Wachs- und Lipidanteil in der Zellwand und nehmen daher Farbstoffe nur sehr langsam auf. Die effizienteste Färbemethode ist daher die Heißfärbung nach Ziehl-Neelsen. Dabei wird eine Karbolfuchsinlösung auf das Präparat aufgebracht und bis zur Dampfbildung erhitzt. Dieses Erhitzen beschleunigt die Aufnahme des Fuchsin-Farbstoffs und damit die Bildung des Mykolat-Fuchsin-Komplexes in der Zellwand.

Haben die säurefeste Stäbchenbakterien den Fuchsin-Farbstoff aufgenommen, ist ein Entfärben auch bei intensiver Behandlung mit Entfärbelösung, wie z. B. Salzsäure-Alkohol, praktisch unmöglich. Säurefeste Stäbchenbakterien werden deshalb als färberisch säure- und alkoholfest bezeichnet und erscheinen im mikroskopischen Präparat rot gefärbt. Alle nicht-säurefesten Mikroorganismen, werden entsprechend des Farbstoffs der Gegenfärbung angefärbt. In der vorliegenden Gebrauchsanweisung wird entsprechend mit Methylenblau gegengefärbt.

Durch eine Vorbehandlung der Präparate mit Sputofluor™, werden die Bakterien aus dem umgebenden, zähen Sputum und Zellmaterial gelöst.

Probenmaterial

Luftgetrocknete, hitzefixierte und Sputofluor™-vorbehandelte Ausstriche von bakteriologischem Material wie Sputum, Ausstriche von Feinnadel-Aspirations-Biopsien (FNAB), Spülflüssigkeiten, Imprinte, Ergüsse, Eiter, Exsudate, flüssige und feste Kulturen
Schnitte von Formalin fixiertem, Paraffin eingebettetem Gewebe (3 - 4 µm dicke Paraffinschnitte)

Reagenzien

Art. 1.01287
Löfflers Methylenblaulösung 100 ml, 500 ml, 2,5 l
für die Mikroskopie

Zusätzlich erforderlich:

Art. 1.09215 Ziehl-Neelsens Karbolfuchsinlösung 100 ml, 500 ml,
für die Mikroskopie 2,5 l
Art. 1.08512 AFB-Color Karbolfuchsinlösung 500 ml, 2,5 l
für die mikroskopische Untersuchung von
säurefesten Stäbchenbakterien (AFB) mittels
Kaltfärbung
Art. 1.00327 Salzsäure-Alkohol 1 l, 5 l
für die Mikroskopie
Art. 1.08000 Sputofluor™ für 1 l
die Mikroskopie

Alternativ:

Anstatt der Kombination von Einzelreagenzien kann das Färbeset 1.00497.0001 für Ausstriche verwendet werden:

Art. 1.00497.0001 1 set
AFB-Color modifiziert
Färbekit für den Nachweis von säurefesten Stäbchenbakterien (AFB) mittels Heißfärbung

Probenvorbereitung

Die Probenentnahme darf nur durch Fachpersonal erfolgen.

Alle Proben sind entsprechend dem Stand der Technik zu behandeln.

Alle Proben sind eindeutig zu kennzeichnen.

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

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

Sputum

Zur Freisetzung der säurefeste Stäbchenbakterien aus Schleim und Zellverbänden, sollte Sputum mit Sputofluor™ vorbehandelt werden. Der aktive Wirkstoff Hypochlorit löst dabei das organische Material oxidativ auf und setzt die säurefeste Stäbchenbakterien 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 Anreicherungs-schritten auf dem Objektträger austreichen und lufttrocknen lassen.

Histologische Schnitte

Löfflers Methylenblaulösung sollte für die Färbung histologischer Schnitte verwendet werden. Kompaktes Gewebe neigt zu Überfärbung, eine Verdünnung der Löfflers Methylenblaulösung wird empfohlen (Verdünnung: 1:10 (1+9) mit Aqua dest.).

Schnitte in gewohnter Weise entparaffinieren und in absteigender Alkoholreihe rehydratisieren. Bei formalinfixierten Proben entfällt die Sputofluor™-Vorbehandlung.

Fixierung der Ausstrichpräparate

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

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

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

Reagenz Vorbereitung

Die zur Färbung von Ausstrichen verwendete Löfflers Methylenblaulösung - für die Mikroskopie ist gebrauchsfertig, das Verdünnen der Lösung ist nicht notwendig, das Verdünnen der Lösung ist nicht notwendig, mindert das Färbeergebnis und die Haltbarkeit.

Für histologische Schnitte wird eine Verdünnung der Löfflers Methylenblaulösung von 1+9 mit Aqua dest. empfohlen.

Durchführung
Färbung von Ausstrichpräparaten

Färbung auf der Färbebank

Für ein optimales Färbeergebnis sollten die angegebenen Zeiten eingehalten werden.

Objektträger mit fixiertem Ausstrich		
Ziehl-Neelsen Karbolfuchsinlösung	vollständig bedecken, vorsichtig mit dem Bunsenbrenner 3 x von unten bis zur Dampf- bildung erhitzen Die Färbelösung darf nicht kochen!	insgesamt 5 min fär- ben
Leitungswasser	spülen bis keine Farbwolken mehr abgehen	
Salzsäure-Alkohol	vollständig bedecken und einwirken lassen	15 - 30 sec*
Leitungswasser	unverzüglich spülen	
Löfflers Methylen- blaulösung	Gegenfärbung, vollständig bedecken und einwirken lassen	30 sec**
Leitungswasser	sorgfältig spülen	
Lufttrocknen (z. B. über Nacht oder bei 50 °C im Trockenschrank)		

* in Abhängigkeit von der Dicke des Materials
**oder 1 min mit verdünnter Löfflers Methylenblaulösung
(Verdünnung: 1:10 (1+9) mit Aqua dest.)

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

Färbung von histologischen Präparaten

Färbung in der Färbeküvette

Histologische Präparate in typischer Weise entparaffinieren und in abstei-
gender Alkoholreihe rehydratisieren.
Die Objektträger müssen in die Lösungen eingetaucht und kurz bewegt
werden, einfaches Hineinstellen ergibt ungenügende Färbeergebnisse.
Die Objektträger sollten nach den einzelnen Färbeschritten gut abtropfen, so
kann eine unnötige Verschleppung von Lösungen vermieden werden.

Objektträger mit histologischem Gewebe	
AFB-Color Karbolfuchsinlösung	30 min
Fließendes Leitungswasser	45 sec
Salzsäure-Alkohol	15 sec
Fließendes Leitungswasser	15 sec
Löfflers Methylenblaulösung*	5 min
Waschen mit Leitungswasser	10 sec
Ethanol 70 %	1 min
Ethanol 70 %	1 min
Ethanol 96 %	1 min
Ethanol 96 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Xylol oder Neo-Clear™	5 min
Xylol oder Neo-Clear™	5 min
Eindecken der Neo-Clear™-feuchten Präparate mit Neo-Mount™ oder der Xylol-feuchten Präparate mit z. B. Entellan™ Neu und Deckglas.	

* Für die Gegenfärbung histologischer Präparate wird eine Verdünnung der
Löfflers Methylenblaulösung empfohlen (Verdünnung: 1:10 (1+9) mit
Aqua dest.). Diese Arbeitslösung ist bis zu 2 Wochen verwendbar.

Ergebnis

säurefeste Stäbchenbakterien	rot
Hintergrund	blau

Auswertung

Ein positiver Befund bedeutet „säurefeste Stäbchenbakterien vorhanden“,
und ein negativer Befund bedeutet „säurefeste Stäbchenbakterien nicht
vorhanden“. Aufgrund eines positiven Ergebnisses ist eine taxonomische
Klassifizierung mittels Mikroskopie nicht möglich. Werden säurefesten Stäb-
chenbakterien gefunden, müssen weitere Untersuchungen in Speziallabors
durchgeführt werden.
Die Vitalität (aktiv, inaktiv) der Bakterien kann ebenfalls nicht bestimmt
werden.

Fehlerfindung
Fixierung der Ausstrichpräparate

Eine ausreichende Hitzeexfixierung mit dem Bunsenbrenner oder in einem
Hitzeschrank ist wichtig, um das infektiöse Potential der Präparate und ein
Weiterwachsen der Bakterien zu verhindern.

Keine Färbung von säurefesten Stäbchenbakterien

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

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.
Überschüssiges Immersionsöl ist vor dem Archivieren zu entfernen.

Analytische Leistung

Die vorliegende „Löfflers Methylenblaulösung“ färbt und visualisiert dadurch
biologische Strukturen, wie in den Kapiteln „Ergebnis“ dieser Gebrauchs-
anweisung beschrieben. Die Anwendung des Produkts ist hierbei nur von
autorisierten und qualifizierten Personen durchzuführen, dies umfasst, unter
anderem, die Proben- und Reagenzvorbereitung, Probenbehandlung, Histo-
prozessing, die Entscheidung über geeignete Kontrollen und mehr.
Die analytische Leistung des Produkts wird durch die Testung jeder Produk-
tionscharge sichergestellt. Dazu belegen die erfolgreichen Teilnahmen an
internationalen Ringversuchen die analytische Spezifität regelmäßig.
Für die folgenden Färbungen wurden die analytische Leistung in Form von
Spezifität, Sensitivität und Wiederholbarkeit des Produkts mit einer Rate
von 100 % bestätigt:

	Inter-assay Spezifität	Inter-assay Sensitivität	Intra-assay Spezifität	Intra-assay Sensitivität
Bakteriologische Färbung				
säurefeste Stäb- chenbakterien	20/20	20/20	7/7	7/7
Hintergrund	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Analytische Leistungsparameter

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

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

Diagnostik

Diagnosen sind nur von autorisierten und qualifizierten Personen zu erstellen.
Gültige Nomenklaturen sind anzuwenden.
Diese Methode ist ergänzend in der Humandiagnostik anzuwenden.
Weiterführende Tests sind nach anerkannten Methoden auszuwählen und
durchzuführen.
Geeignete Kontrollen sollten bei jeder Anwendung mitgeführt werden, um ein
fehlerhaftes Ergebnis auszuschließen.

Lagerung

Löfflers Methylenblaulösung - für die Mikroskopie bei +15 °C bis +25 °C
lagern.

Haltbarkeit

Löfflers Methylenblaulösung - für die Mikroskopie kann bis zum angegebe-
nen Verfallsdatum verwendet werden.
Nach dem ersten Öffnen der Flasche bei +15 °C bis +25 °C aufbewahrt bis
zum Verfallsdatum verwendbar.
Die Flaschen sind stets gut geschlossen zu halten.

Kapazität

etwa 250 Färbungen / 500 ml

Gebrauchshinweise

Nur für professionelle Anwendung.
Um Fehler zu vermeiden, ist die Anwendung von Fachpersonal durchzufüh-
ren.
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 entspre-
chende Zentrifuge zu verwenden.

Infektionsschutz

Auf wirksamen Infektionsschutz entsprechend der Laborrichtlinien ist unbe-
dingt zu achten.

Entsorgungshinweise

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

Hilfsreagenzien

Art.	1.00327	Salzsäure-Alkohol für die Mikroskopie	1 l, 5 l
Art.	1.00497	AFB-Color modifiziert Färbekit für den Nachweis von säurefesten Stäbchenbakterien (AFB) mittels Heißfärbung	1 set
Art.	1.00579	DPX Neu wasserfreies Eindeckmittel für die Mikroskopie	500 ml
Art.	1.04699	Immersionsöl für die Mikroskopie	100-ml-Tropfflasche, 100 ml, 500 ml
Art.	1.07960	Entellan™ Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie	500 ml
Art.	1.07961	Entellan™ Neu Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie	100 ml, 500 ml, 1 l
Art.	1.08000	Sputofluol™ für die Mikroskopie	1 l
Art.	1.08298	Xylol (Isomerengemisch) für die Histologie	4 l
Art.	1.08512	AFB-Color Karbolfuchsinlösung für die mikroskopische Untersuchung von säurefesten Stäbchenbakterien (AFB) mittels Kaltfärbung	500 ml, 2,5 l
Art.	1.09016	Neo-Mount™ wasserfreies Eindeckmittel für die Mikroskopie	100-ml-Tropfflasche, 500 ml
Art.	1.09215	Ziehl-Neelsens Karbolfuchsinlösung für die Mikroskopie	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Art.	1.09843	Neo-Clear™ (Xylol-Ersatz) für die Mikroskopie	5 l

GefahrstoffEinstufung

Art. 1.01287
Die GefahrstoffEinstufung auf dem Etikett und die Angaben im Sicherheitsdatenblatt beachten.
Das Sicherheitsdatenblatt ist erhältlich im Internet und auf Anfrage.

Hauptbestandteile des Produkts

Art.	1.01287
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 - 8,6
1 l =	0,97 kg

Allgemeiner Hinweis

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

Literatur

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Flüssigkeit und Dampf entzündbar.

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

- P233: Behälter dicht verschlossen halten.
P240: Behälter und zu befüllende Anlage erden.
P241: Explosionsgeschützte elektrische/ Lüftungs-/ Beleuchtungsgeräte verwenden.
P242: Funkenarmes Werkzeug verwenden.
P243: Maßnahmen gegen elektrostatische Entladungen treffen.

Revisionshistorie

Version	Modifikationsanmerkung
2024-Jul-01	Erste Version mit der Einführung der Revisionshistorie
2024-Jul-01 V.2	Keine Änderung der Übersetzung in Deutsch



Gebrauchsanweisung beachten



Hersteller



Katalognummer



Chargen-code



Achtung, Begleitedokumentation beachten



Verwendbar bis JJJJ-MM-TT



Temperaturbegrenzung

Status: 2024-Jul-01 V.2

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Microscopie

Bleu de méthylène en solution selon Löffler

pour la microscopie

Réservé à une utilisation professionnelle

IVD

Dispositif médical de diagnostic *in vitro*



Objectif prévu

Le présent « Bleu de méthylène en solution selon Löffler - pour la microscopie » est utilisé pour le diagnostic cellulaire dans la médecine humaine et sert à l'examen bactériologique et histologique d'échantillons d'origine humaine. C'est une solution de coloration prête à l'emploi qui est utilisée conjointement avec d'autres diagnostics *in vitro* de notre portefeuille pour rendre des structures cibles analysables pour le diagnostic (bactéries acido-résistantes (AFB)) par fixation, coloration, contre-coloration, montage dans des épreuves bactériologiques et histologiques, telles que les frottis de cultures bactériennes d'enrichissement ou les coupes histologiques de poumon, p.ex.

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

Principe

Les bactéries acido-résistantes ont un taux élevé de cire et lipide dans la paroi cellulaire, elles n'absorbent donc les colorants que très lentement. De ce fait, la méthode de coloration la plus efficace est la coloration à chaud de Ziehl-Neelsen. On applique pour cela une solution de carbolfuchisine (fuchisine phéniquée) sur la préparation que l'on chauffe jusqu'à formation de vapeur. Ce réchauffement accélère l'absorption du colorant de la fuchisine et, de ce fait, la formation du complexe mycolate-fuchisine dans la paroi cellulaire.

Une fois que les bactéries acido-résistantes ont absorbé le colorant, elles le conservent et n'en rendent qu'une infime quantité, même lors d'un traitement avec des solutions de décoloration comme par ex. de l'éthanol contenant de l'acide chlorhydrique. On dit alors des bactéries acido-résistantes qu'elles présentent une acido-alcool-résistance tinctoriale. Elles prennent une coloration rouge dans la préparation microscopique tandis que tous les micro-organismes non acido-résistants prennent la coloration contraire. Dans le présent consigne d'utilisation la contre-coloration est effectuée au bleu de méthylène.

Grâce à un traitement préliminaire des préparations avec Sputofluol™ les bactéries se détachent du crachat visqueux et du matériel cellulaire environnant.

Matériel d'échantillons

Frottis de matériel bactériologique séchés à l'air, fixés par la chaleur et traités au préalable avec Sputofluol™ comme crachat, frottis de ponctions-biopsies à l'aiguille fine (BAAF), solutions de lavage, empreintes, liquides d'épanchement, pus, exsudats, cultures liquides et solides
Coupes de tissu fixé à la formaline et inclus en paraffine (coupes en paraffine de 3 - 4 µm d'épaisseur)

Réactifs

Art. 1.01287
Bleu de méthylène en solution selon Löffler 100 ml, 500 ml, 2,5 l
pour la microscopie

Nécessaire en plus :

Art. 1.09215 Fuchisine phéniquée en solution 100 ml, 500 ml,
pour la microscopie 2,5 l
Art. 1.08512 AFB-Color solution de carbolfuchisine 500 ml, 2,5 l
pour l'analyse microscopique de bactéries
acido-résistantes (AFB) par coloration à froid
Art. 1.00327 Acide chlorhydrique alcoolique 1 l, 5 l
pour la microscopie
Art. 1.08000 Sputofluol™ pour 1 l
la microscopie

En alternative :

Le kit de coloration 1.00497.0001 peut être utilisé à la place de la combinaison des réactifs individuelles pour les frottis :

Art. 1.00497.0001

AFB-Color modifié

1 set

Kit de coloration pour la mise en évidence de bactéries acido-résistantes (AFB) au moyen de la coloration à chaud

Préparation des échantillons

Le prélèvement d'échantillons doit être effectué par du personnel qualifié. Tous les échantillons doivent être traités conformément aux règles de l'art. Tous les échantillons doivent être clairement identifiés. Utiliser des instruments appropriés pour le prélèvement d'échantillons et la préparation, respecter les instructions du fabricant pour l'emploi / l'utilisation.

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

Crachats

Pour libérer les bactéries acido-résistantes des muqueuses et complexes cellulaires, le crachat devrait être traité au préalable avec Sputofluol™. L'actif hypochlorite dissout le matériel organique par oxydation et libère les bactéries acido-résistantes avec ménagement.

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

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

Sputofluol™	15 ml
Eau distillée	85 ml

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

Ponctions, lavages, sédiments

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

Coupes histologiques

Bleu de méthylène en solution selon Löffler devrait être utilisé pour la coloration de coupes histologiques. Notamment le tissu compact a tendance à prendre une coloration trop intense, nous conseillons une dilution de la solution au bleu de méthylène selon Löffler (dilution : 1:10 (1+9) à l'eau distillée).

Déparaffiner les coupes de la manière habituelle et les réhydrater par une série d'alcools à concentration décroissante. Le traitement préliminaire avec Sputofluol™ est superflu pour les échantillons fixés au formol.

Fixation des préparations de frottis

La fixation s'effectue sur la flamme d'un bec Bunsen (2 à 3 fois en évitant une trop grande chaleur).

Le matériel peut également être fixé en le mettant pour 20 minutes à 100 - 110 °C dans une armoire de séchage ou sur une plaque chauffante.

Si les températures sont trop élevées ou si le chauffage se prolonge, il faut s'attendre à une altération de la faculté de coloration.

Préparation du réactif

Bleu de méthylène en solution selon Löffler - pour la microscopie utilisé pour colorer de frottis est prête à l'emploi ; il n'est pas nécessaire de diluer la solution étant donné que cela réduit le résultat de coloration et la stabilité.

Pour les coupes histologiques, une dilution de 1+9 à l'eau distillée de la solution au bleu de méthylène selon Löffler est recommandée.

Mode opératoire

Coloration des préparations de frottis

Coloration sur le banc de coloration

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

Porte-objet avec frottis fixé		
Fuchsin phéniqué en solution selon Ziehl-Neelsen	recouvrir complètement, chauffer avec précaution au bec Bunsen 3 x par le bas jusqu'à la formation de vapeur La solution de coloration ne doit pas être portée à ébullition!	colorer 5 minutes au total
Eau du robinet	rincer jusqu'à ne plus voir aucun nuage de couleur	
Acide chlorhydrique alcoolique	recouvrir complètement et laisser agir	15 - 30 secondes*
Eau du robinet	rincer immédiatement	
Bleu de méthylène en solution selon Löffler	contre-coloration, recouvrir complè- tement et laisser agir	30 secondes**
Eau du robinet	rincer soigneusement	
Sécher à l'air (p. ex. pendant toute une nuit, ou à 50 °C dans l'armoire de séchage)		

* dépend de l'épaisseur du matériel
**ou 1 minute avec du Bleu de méthylène en solution selon Löffler dilué
(dilution : 1:10 (1+9) à l'eau distillée)

Si l'on souhaite stocker des préparations bacteriologiques pendant plusieurs
mois, il est conseillé de les recouvrir d'un produit de montage anhydre
(p.ex. Neo-Mount™, Entellan™, DPX néo ou Entellan™ néo) et d'une lamelle
couvre-objet. Les préparations colorées doivent être alors parfaitement
sèches.
Pour l'examen microscopique de préparations colorées avec un grossisse-
ment >40x, il est recommandé d'utiliser de l'huile d'immersion.

Coloration des préparations histologiques

Coloration dans la cuve de coloration

Déparaffiner les préparations histologiques de la manière habituelle et les
réhydrater par une série d'alcools à concentration décroissante.
Il est nécessaire de plonger et de déplacer à court les lames porte-objets
dans les solutions ; une simple introduction donne des résultats de coloration
insuffisants.
Les lames porte-objets doivent être égouttées conformément aux procédures
de coloration pour éviter tout transfert non nécessaire des solutions.

Porte-objet avec tissu histologique	
AFB-Color solution de carbofuchsine	30 minutes
Eau du robinet courante	45 secondes
Acide chlorhydrique alcoolique	15 secondes
Eau du robinet courante	15 secondes
Solution de bleu de méthylène*	5 minutes
Laver à l'eau du robinet courante	10 secondes
Ethanol 70 %	1 minute
Ethanol 70 %	1 minute
Ethanol 96 %	1 minute
Ethanol 96 %	1 minute
Ethanol 100 %	1 minute
Ethanol 100 %	1 minute
Xylène ou Neo-Clear™	5 minutes
Xylène ou Neo-Clear™	5 minutes
Monter les préparations humides de Neo-Clear™ avec le Neo-Mount™ ou les préparations humides de xylène avec p. ex. l'Entellan™ néo et couvre- objet.	

* Pour la contre-coloration de préparations histologiques, nous conseillons
une dilution de la solution au bleu de méthylène selon Löffler (dilution :
1:10 (1+9) à l'eau distillée). Cette solution de travail peut être utilisée
pendant 2 semaines.

Résultat

Bactéries acido-résistantes	rouge
Fond	bleu

Evaluation

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

Diagnostic d'erreurs

Fixation des préparations de frottis

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

Pas de coloration des bactéries acido-résistantes

L'opération critique lors de cette coloration est la décoloration, qui peut être
influencée par l'épaisseur du frottis.
De plus, une solution fraîche à l'acide chlorhydrique alcoolique est très réac-
tive. C'est pourquoi le résultat doit être analysé très soigneusement. Lors
de la décoloration, les temps indiqués ici doivent être respectés scrupuleu-
sement, faute de quoi on risque d'obtenir des résultats faux-négatifs.

Remarques techniques

Le microscope utilisé doit respecter les exigences d'un laboratoire de dia-
gnostics médicaux.
En cas d'utilisation d'un automate de coloration, se conformer aux instruc-
tions du fabricant de l'appareil et du logiciel.
Éliminer l'excédent d'huile pour immersions avant l'archivage.

Caractéristiques de performance analytique

« Bleu de méthylène en solution selon Löffler » colore et permet donc la
visualisation de structures biologiques, comme décrit dans le chapitre «
Résultat » de ce mode d'emploi. Ce produit ne doit être utilisé que par des
personnes agréées et qualifiées, ce qui englobe notamment la préparation
des échantillons et des réactifs, la manipulation des échantillons, le trai-
tement histologique (histoprocessing), la prise de décisions en matière de
contrôles appropriés et autres.
La performance analytique du produit est confirmée via l'analyse de chaque
lot de production. La participation réussie à des tests interlaboratoires inter-
nationaux réguliers est une confirmation supplémentaire et indépendante
de la spécificité analytique.
Pour les colorants suivants, la performance analytique a été confirmée au
niveau des spécificité, sensibilité et répétabilité du produit avec un taux de
100 % :

	Spécificité inter-essai	Spécificité inter-essai	Spécificité intra-essai	Spécificité intra-essai
Coloration bactériologique				
Bactéries acido- résistantes	20/20	20/20	7/7	7/7
Fond	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Résultats de la performance analytique

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

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

Diagnostic

Les diagnostics doivent être exclusivement effectués par des personnes
autorisées et qualifiées.
Les nomenclatures en vigueur doivent être utilisées.
Cette méthode doit être appliquée dans le diagnostic humain à titre com-
plémentaire.
Des tests plus poussés seront choisis et réalisés selon des méthodes recon-
nues.
Chaque étape doit être effectuée sous contrôle, afin d'exclure toute possibi-
lité de résultat erroné.

Stockage

Stocker le Bleu de méthylène en solution selon Löffler - pour la microscopie
entre +15 °C et +25 °C.

Stabilité

Le Bleu de méthylène en solution selon Löffler - pour la microscopie peut
être utilisé jusqu'à la date de péremption indiqué.
Après la première ouverture du flacon, conserver entre +15 °C et +25 °C
et utiliser jusqu'à la date de péremption.
Tenir les flacons toujours bien fermés.

Capacité

env. 250 colorations / 500 ml

Remarques sur l'utilisation

Réservé à une utilisation professionnelle.

Pour éviter les erreurs, l'application doit être effectuée par un personnel qua-
lifié.
Respecter les directives nationales relatives à la sécurité au travail et à
l'assurance de la qualité.
Utiliser des microscopes équipés conformément au standard.
En cas de besoin, utiliser une centrifugeuse conforme à la norme de labora-
toire et aux critères.

Protection contre les infections

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

Consignes d’élimination

Éliminer l’emballage conformément à la réglementation en vigueur. Les solutions usagées et les solutions dont la date de péremption est dépassée doivent être traitées comme des déchets dangereux, en respectant les directives locales relatives à l’élimination des déchets. Pour commander les instructions sur l’élimination des déchets, cliquer sur le Quick Link « Hints for Disposal of Microscopy Products » sur www.microscopy-products.com. Au sein de l’UE s’applique le règlement CE) n° 1272/2008 relatif à la classification, à l’étiquetage et à l’emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) N° 1907/2006.

Réactifs auxiliaires

Art. 1.00327	Acide chlorhydrique alcoolique pour la microscopie	1 l , 5 l
Art. 1.00497	AFB-Color modifié Kit de coloration pour la mise en évidence de bactéries acido-résistantes (AFB) au moyen de la coloration a chaud	1 set
Art. 1.00579	DPX néo produit de montage anhydre pour la microscopie	500 ml
Art. 1.04699	Huile pour immersions pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 1.07960	Entellan™ produit de montage rapide pour la microscopie	500 ml
Art. 1.07961	Entellan™ néo produit de montage rapide pour la microscopie	100 ml, 500 ml, 1 l
Art. 1.08000	Sputofluol™ pour la microscopie	1 l
Art. 1.08298	Xylène (mélange isomérique) pour l’histologie	4 l
Art. 1.08512	AFB-Color solution de carbofuchsine pour l’analyse microscopique de bactéries acido-résistantes (AFB) par coloration à froid	500 ml, 2,5 l
Art. 1.09016	Neo-Mount™ agent de montage anhydre pour la microscopie	flacon compte-gouttes de 100 ml, 500 ml
Art. 1.09215	Fuchsine phéniquée en solution selon Ziehl-Neelsen pour la microscopie	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Art. 1.09843	Neo-Clear™ (remplaçant du xylène) pour la microscopie	5 l

Classification des matières dangereuses

Art. 1.01287
Tenir compte de la classification des matières dangereuses indiquées sur l’étiquette et les indications de la fiche de données de sécurité. La fiche de données de sécurité est disponible sur le site web et sur demande.

Composants principaux du produit

Art. 1.01287	
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 - 8,6
1 l =	0,97 kg

Remarque générale

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

Littérature

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226 : Liquide et vapeurs inflammables.

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

P233 : Maintenir le récipient fermé de manière étanche.

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

P241 : Utiliser du matériel électrique/ de ventilation/ d’éclairage antidéflagrant.

P242 : Utiliser des outils ne produisant pas d’étincelles.

P243 : Prendre des mesures de précaution contre les décharges électrostatiques.

Historique des révisions

Version	Commentaire concernant les modification
2024-Jul-01	Version initiale avec l’introduction de l’historique des révisions
2024-Jul-01 V.2	Pas de changement dans la traduction en français

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

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne et/ou ses sociétés affiliées. Tous droits réservés. Merck et Sigma-Aldrich sont des marques de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne. Toutes les autres marques citées appartiennent à leurs propriétaires respectifs. Des informations détaillées sur les marques sont disponibles via des ressources accessibles au public.

Status: 2024-Jul-01 V.2

Respectez les consignes d’utilisation

Fabricant

N° catalogue

Code de lot

Attention : observez la documentation complémentaire

Utilisable jusqu’au AAAA-MM-JJ

Limitation de température

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Microscopía

Azul de metileno en solución según Löffler

para microscopía

Solamente para uso profesional

IVD

Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*

CE

Finalidad prevista

El presente "Azul de metileno en solución según Löffler - para microscopía" es utilizado para el diagnóstico celular en la medicina humana, se emplea en el examen bacteriológico e histológico de muestras de origen humano. Se trata de una solución de tinción lista para el uso que, junto con otros materiales de diagnóstico *in vitro* pertenecientes a nuestra cartera, hace evaluables determinadas para el diagnóstico estructuras de destino bacterianas (bacilos acidorresistentes (AFB)) mediante fijación, tinción, contratinción, montaje en material de examen bacteriológico e histológico, como pueden ser frotis de cultivos bacterianos de enriquecimiento o cortes histológicos p.ej. del pulmón.

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

Principio

Los bacilos acidorresistentes presentan una elevada proporción de cera y lípidos en la pared celular, por lo que absorben los colorantes sólo de forma muy lenta. Por consiguiente, el método más eficaz de tinción es la tinción en caliente según Ziehl-Neelsen. Este procedimiento consiste en aplicar al preparado una solución de carbolfucsina (fucsina fenicada) y calentarlo hasta que se forme vapor. Este calentamiento acelera la absorción del colorante de fucsina y al mismo tiempo la formación del complejo micolato-fucsina en la pared celular.

Una vez los bacilos acidorresistentes han absorbido el colorante, a penas lo ceden de nuevo a pesar de tratamiento intensivo con solución decolorante, como p.ej. ácido clorhídrico-alcohol. Los bacilos acidorresistentes son por ello denominados como de tinción sólida frente ácidos y alcohol y aparecen en el preparado microscópico teñidas de rojo, mientras que todos los microorganismos no resistentes a los ácidos se tiñen de acuerdo con la contratinción. En el presente instrucción de empleo se contratiñe de la forma correspondiente con azul de metileno.

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

Material de las muestras

Frotis de material bacteriológico secados al aire, termofijados y sometidos a un tratamiento previo con Sputofluor™ como esputos, frotis tomados de punciones aspirativas con aguja fina (PAAF/FNAB), soluciones de lavado, imprints, efusiones, pus, exsudados, cultivos líquidos y sólidos. Cortes de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (cortes de parafina de 3 - 4 µm de espesor)

Reactivos

Art. 1.01287
Azul de metileno en solución según Löffler 100 ml, 500 ml, 2,5 l
para microscopía

Necesario además:

Art. 1.09215 Fucsina fenicada en solución 100 ml, 500 ml,
según Ziehl-Neelsen 2,5 l
para microscopía

Art. 1.08512 AFB-Color carbolfucsina en solución 500 ml, 2,5 l
para examen microscópico de bacilos
acidorresistentes (AFB) (tinción en frío)

Art. 1.00327 Ácido clorhídrico-alcohol 1 l, 5 l
para microscopía

Art. 1.08000 Sputofluor™ 1 l
para microscopía

Alternativamente:

En lugar de la combinación de los reactivos sueltos puede utilizarse también el kit de tinción 1.00497.0001 para frotis:

Art. 1.00497.0001

AFB-Color modificado

1 set

Kit de tinción para la identificación de bacilos acidorresistentes (AFB) mediante tinción en caliente

Preparación de las muestras

La toma de muestra debe ser realizada por personal especializado.

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

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

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

Espeto

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

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

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

Sputofluor™	15 ml
Agua destilada	85 ml

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

Líquidos extraídos por punción, lavados, sedimentos

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

Cortes histológicos

Azul de metileno en solución según Löffler debe emplearse para la tinción de cortes histológicos. El tejido compacto tiende a la sobretinción, por lo que se recomienda una dilución de la solución de azul de metileno de Löffler (dilución: 1:10 (1+9) con agua destilada).

Desparafinar de forma habitual los cortes y rehidratar en serie descendente de alcohol. Para pruebas fijadas con formalina se suprime el tratamiento previo con Sputofluor™.

Fijación de preparados de frotis

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

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

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

Preparación del reactivo

El Azul de metileno en solución según Löffler - para microscopía utilizado para los procesos de tinción de frotis está listo para el uso, la dilución de la solución no es necesaria y empeora el resultado de la tinción así como la estabilidad.

Para los cortes histológicos se recomienda una dilución de la solución de azul de metileno de Löffler de 1+9 con agua destilada.

Técnica

Tinción de preparados de frotis

Tinción en el banco de tinción

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

Portaobjetos con frotis fijado		
Fucsina fenicada en solución según Ziehl-Neelsen	cubrir completamente, calentar 3 veces con cuidado por abajo sirviéndose del mechero de Bunsen hasta que se produzca vapor iLa solución de tinción no debe hervir!	teñir durante 5 minutos en total
Agua corriente	enjuagar hasta que ya no se desprendan nubes de color	
Ácido clorhídrico-alcohol	cubrir completamente y dejar actuar	15 - 30 segundos*
Agua corriente	enjuagar inmediatamente	
Azul de metileno en solución según Löffler	contratinción, cubrir completamente y dejar actuar	30 segundos**
Agua corriente	enjuagar cuidadosamente	
Secar al aire (p.ej. durante la noche o a 50°C en el armario de secado)		

* en dependencia del espesor del material
**o 1 minuto con Azul de metileno en solución según Löffler diluido (dilución: 1:10 (1+9) con agua destilada)

Para el almacenamiento de preparados bacteriológicos durante varios meses se recomienda el montaje con medios de montaje anhidros (p.ej. Neo-Mount™, Entellan™, DPX nuevo o Entellan™ Nuevo) y cubreobjetos. Para ello, los preparados han de ser secados con gran esmero.
Para el análisis de preparados teñidos con un aumento microscópico >40x se recomienda el uso de aceite de inmersión.

Tinción de preparados histológicos

Tinción en la cubeta de tinción

Desparafinar de forma habitual los preparados histológicos y rehidratar en serie descendente de alcohol.
Los portaobjetos han de ser inmersos y movidos breve en las soluciones, la simple introducción proporcionará resultados de tinción insuficientes.
Los portaobjetos deberían ser escurridos bien por goteo después de los diferentes pasos de tinción, de esta manera se podrá evitar el innecesario arrastre de soluciones.

Portaobjetos con tejido histológico	
AFB-Color carbofucsina en solución	30 minutos
Agua corriente del grifo	45 segundos
Ácido clorhídrico-alcohol	15 segundos
Agua corriente del grifo	15 segundos
Azul de metileno en solución según Löffler*	5 minutos
Lavar con agua del grifo	10 segundos
Etanol 70 %	1 minuto
Etanol 70 %	1 minuto
Etanol 96 %	1 minuto
Etanol 96 %	1 minuto
Etanol 100 %	1 minuto
Etanol 100 %	1 minuto
Xileno o Neo-Clear™	5 minutos
Xileno o Neo-Clear™	5 minutos
Montar con Neo-Mount™ los preparados humedecidos con Neo-Clear™, o los preparados humedecidos con xileno con p. ej. Entellan™ Nuevo y cubreobjetos.	

* Para la contratinción de preparados histológicos se recomienda la dilución de la solución de azul de metileno de Löffler (dilución: 1:10 (1+9) con agua destilada). Esta solución de trabajo puede emplearse durante hasta 2 semanas.

Resultado

Bacilos acidorresistentes	rojo
Fondo	azul

Evaluación

Un hallazgo positivo significa que “hay bacilos acidorresistentes”, y un hallazgo negativo significa que “no hay bacilos acidorresistentes”. Debido a un resultado positivo ya no es posible una clasificación taxonómica mediante la microscopia Si se encuentran bacilos acidorresistentes, deben efectuarse más pruebas en laboratorios especiales.
Tampoco se puede verificar la vitalidad de las bacterias (activas, inactivas).

Localización de errores
Fijación de preparados de frotis

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

Ninguna tinción de bacilos acidorresistentes

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

Notas técnicas

El microscopio usado debería corresponder a los requisitos de un laboratorio de diagnóstico médico.
Si se utilizan aparatos automáticos de tinción, deberán tenerse en cuenta las instrucciones de operación del fabricante, tanto del aparato como del software.
Eliminar el aceite de inmersión en exceso antes de archivar.

Características de rendimiento analítico

“Azul de metileno en solución según Löffler” tiñe y, por lo tanto, visualiza estructuras biológicas, como se describe en el capítulo “Resultado” de estas instrucciones de uso. Solo deben utilizar el producto personas autorizadas y cualificadas. Esta utilización incluye, entre otras actividades, la preparación de muestras y reactivos, la manipulación de muestras, el procesamiento histológico, las decisiones relativas a los controles adecuados, etc.
El rendimiento analítico del producto se confirma analizando cada lote de producción. La participación satisfactoria en análisis interlaboratorios internacionales periódicos proporciona una confirmación adicional e independiente de la especificidad analítica.
En el caso de las siguientes tinciones, se confirmó el rendimiento analítico en términos de especificidad, sensibilidad y repetibilidad del producto, con una tasa del 100 %:

	Especificidad inter-ensayos	Especificidad inter-ensayos	Especificidad intra-ensayos	Especificidad intra-ensayos
Tinción bacteriológica				
Bacilos acidorre-sistentes	20/20	20/20	7/7	7/7
Fondo	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Resultados de rendimiento analítico

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

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

Diagnóstico

Los diagnósticos deberán ser establecidos solamente por personas autorizadas y cualificadas.
Deberán emplearse terminologías vigentes.
Este método debe aplicarse complementariamente en el diagnóstico humano. Deberán elegirse y realizarse ensayos ulteriores según métodos reconocidos. Cada aplicación debería implicar controles adecuados para descartar resultados erróneos.

Almacenamiento

Guardar el Azul de metileno en solución según Löffler - para microscopía de +15 °C a +25 °C.

Estabilidad

El Azul de metileno en solución según Löffler - para microscopía se puede utilizar hasta la fecha de caducidad indicada.
Después de abrir el frasco por primera vez, el contenido almacenado entre +15 °C y +25 °C es utilizable hasta la fecha de caducidad indicada.
Los frascos deben mantenerse siempre bien cerrados.

Capacidad

aprox. 250 tinciones / 500 ml

Notas sobre el empleo

Solamente para uso profesional.
Para evitar errores, la aplicación debería ser realizada por personal especializado.
Deben cumplirse las directivas nacionales sobre seguridad en el trabajo y aseguramiento de la calidad.
Deben emplearse microscopios equipados de acuerdo con el estándar. Si es necesario, deberá utilizarse una centrifugadora que corresponda al estándar de laboratorios y a las exigencias.

Protección contra infecciones

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

Indicaciones para la eliminación de residuos

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

Reactivos auxiliares

Art. 1.00327	Ácido clorhídrico-alcohol para microscopía	1 l, 5 l
Art. 1.00497	AFB-Color modificado Kit de tinción para la identificación de bacilos acidorresistentes (AFB) mediante tinción en caliente	1 set
Art. 1.00579	DPX nuevo medio de montaje anhidro para microscopía	500 ml
Art. 1.04699	Aceite de inmersión para microscopía	frasco gotero de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 1.07960	Entellan™ medio de montaje rápido para microscopía	500 ml
Art. 1.07961	Entellan™ Nuevo medio de montaje rápido para microscopía	100 ml, 500 ml, 1 l
Art. 1.08000	Sputofluor™ para microscopía	1 l
Art. 1.08298	Xileno (mezcla de isómeros) para histología	4 l
Art. 1.08512	AFB-Color carbofucsina en solución para examen microscópico de bacilos acidorresistentes (AFB) (tinción en frío)	500 ml, 2,5 l
Art. 1.09016	Neo-Mount™ medio de montaje anhidro para microscopía	frasco gotero de 100 ml, 500 ml
Art. 1.09215	Fucsina fenicada en solución según Ziehl-Neelsen para microscopía	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Art. 1.09843	Neo-Clear™ (sustituto de xileno) para microscopía	5 l

Clasificación de sustancias peligrosas

Art. 1.01287

Tener en cuenta la clasificación de sustancias peligrosas en la etiqueta y las indicaciones en la ficha de datos de seguridad. La ficha de seguridad está disponible en el sitio web y a solicitud.

Componentes principales del producto

Art. 1.01287	
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₇ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 - 8,6
1 l =	0,97 kg

Aviso general

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

Literatura

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Líquidos y vapores inflamables.

P210: Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de

La división Life Science de Merck opera como MilliporeSigma en los Estados Unidos y en Canadá.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Alemania y/o sus filiales. Todos los derechos reservados. Merck y Sigma-Aldrich son marcas comerciales de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania. Todas las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios. Tiene a su disposición información detallada sobre las marcas comerciales a través de recursos accesibles al público.

ES

llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar.

P233: Mantener el recipiente herméticamente cerrado.

P240: Toma de tierra y enlace equipotencial del recipiente y del equipo receptor.

P241: Utilizar material eléctrico/ de ventilación/ iluminación/ antideflagrante.

P242: No utilizar herramientas que produzcan chispas.

P243: Tomar medidas de precaución contra las descargas electrostáticas.

Historial de revisiones

Versión	Comentario de modificación
2024-Jul-01	Versión inicial con la introducción del Historial de revisiones
2024-Jul-01 V.2	Sin cambios en la traducción en español

Observe las instrucciones de uso

Fabricante

Número de catálogo

Código del lote

Atención, observar la documentación pertinente

Utilizable hasta AAAA-MM-DD

Delimitación de la temperatura

Status: 2024-Jul-01 V.2

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Microscopia

Blu di metilene soluzione sec. Löffler

per microscopia

Solo per uso professionale

IVD

Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*

CE

Scopo previsto

La presente „Blu di metilene soluzione sec. Löffler - per microscopia“ è utilizzata per la diagnostica cellulare nell'uomo e serve per l'esame batteriologico ed istologico di campioni di origine umana. È una soluzione di colorazione pronta all'uso che, congiuntamente ad altri prodotti diagnostici *in vitro* del nostro portafoglio, consente l'analisi diagnostica delle strutture bersaglio (batteri acido-resistenti (AFB)) mediante fissaggio, colorazione, controcolorazione, montaggio nei campioni batteriologici ed istologici, quali ad esempio strisci di colture batteriche arricchite o sezioni istologiche di polmoni.

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

Principio

A causa dell'elevata percentuale di cera e lipidi nella membrana cellulare, i batteri acido-resistenti assorbono i coloranti solo molto lentamente. Il metodo di colorazione più efficace risulta pertanto la colorazione a caldo secondo Ziehl-Neelsen. In questo tipo di colorazione una soluzione di carbolfucsina viene aggiunta al preparato e viene riscaldata fino ad emissione di vapori. Il riscaldamento accelera l'assorbimento della sostanza colorante fucsina e di conseguenza la formazione del complesso micolato-fucsina nella membrana cellulare.

Una volta che i batteri acido-resistenti hanno assorbito il colorante, lo cedono molto difficilmente, anche se sottoposti a trattamenti intensivi con soluzioni decoloranti come ad esempio l'acido cloridrico alcoolico. I batteri acido-resistenti sono dunque caratterizzati da resistenza all'acido e all'alcool e assumono una colorazione rossa nel preparato per l'analisi al microscopio, mentre i microrganismi non resistenti all'acido si colorano secondo la controcolorazione. Nel presente istruzione per l'uso, la controcolorazione viene eseguita con il blu di metilene.

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

Materiale d'esame

Strisci di materiale batteriologico essiccati all'aria, termofissati e pretrattati con Sputofluor™ quale espettorato, strisci ottenuti da agoaspirati (FNAB, Fine Needle Aspiration Biopsy = agobiopsia con ago sottile), lavaggi, impronte, effusioni, pus, essudati, colture liquide e solide. Sezioni incluse in paraffina e fissate in formalina (sezioni in paraffina con spessore di 3 - 4 µm).

Reattivi

Art. 1.01287
Blu di metilene soluzione sec. Löffler 100 ml, 500 ml, 2,5 l
per microscopia

Inoltre necessario:

Art. 1.09215 Ziehl-Neelsen carbolfucsina soluzione 100 ml, 500 ml,
per microscopia 2,5 l

Art. 1.08512 AFB-Color carbolfucsina soluzione 500 ml, 2,5 l
per l'esame microscopico dei batteri acido-resistenti (AFB) (colorazione a freddo)

Art. 1.00327 Acido cloridrico alcoolico
1 l, 5 l

per microscopia

Art. 1.08000 Sputofluor™ 1 l
per microscopia

In alternativa:

Al posto della combinazione dei reattivi singole può essere utilizzato anche il kit di colorazione 1.00497.0001 per strisci:

Art. 1.00497.0001

AFB-Color modificato

1 set

Kit di colorazione per la rilevazione di batteri acido-resistenti (AFB) mediante colorazione a caldo

Preparazione dei campioni

Il campionamento deve essere effettuato da personale specializzato.

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

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

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

Espettorato

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

Preparazione del reattivo: Preparazione della soluzione di Sputofluor™ 15 %
Per la preparazione di ca. 100 ml di soluzione si miscelano:

Sputofluor™	15 ml
Acqua distillata	85 ml

Preparazione del campione nella provetta da centrifuga:

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

Agoaspirati, lavaggi, sedimenti

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

Sezioni istologiche

Blu di metilene soluzione sec. Löffler deve essere utilizzata per la colorazione di sezioni istologiche. Il tessuto compatto tende alla sovracolorazione, si consiglia di diluire la soluzione blu di metilene secondo Löffler (diluizione 1:10 (1+9) con acqua distillata).

Sparaffinare e riportare le sezioni all'acqua attraverso una serie ascendente di alcoli come di consueto. Per i campioni fissati in formalina il pretrattamento con Sputofluor™ non è necessario.

Fissaggio degli strisci

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

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

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

Preparazione del reattivo

La Blu di metilene soluzione sec. Löffler - per microscopia utilizzata per la colorazione degli strisci è pronta all'uso, non è richiesta la diluizione della soluzione, poiché compromette la colorazione e ne riduce la stabilità.

Per le sezioni istologiche, si raccomanda di diluire la soluzione blu di metilene secondo Löffler di 1+9 con acqua distillata.

Esecuzione

Colorazione di strisci

Colorazione con rastrello di colorazione

Per ottenere un risultato ottimale si dovrebbero rispettare i tempi indicati.

Portaoggetti con striscio asciugato all’aria		
Ziehl-Neelsen carbol-fucsina soluzione	coprire completamente, riscaldare con cautela facendo passare per 3 volte sotto la fiamma del becco Bunsen fino ad emissione di vapori Non far bollire la soluzione colorante!	colorare per 5 minuti in totale
Acqua di rubinetto	sciacquare fino a quando non compaiono più nuvolette di colore	
Acido cloridrico alcolico	coprire completamente e lasciar agire	15 - 30 secondi*
Acqua di rubinetto	sciacquare immediatamente	
Blu di metilene soluzione sec. Löffler	contro-colorazione, coprire completamente e lasciar agire	30 secondi**
Acqua di rubinetto	sciacquare accuratamente	
Asciugare all’aria (ad es. per una notte o a 50°C nell’armadio di asciugatura)		

* a seconda dello spessore del materiale
**o 1 min con Blu di metilene soluzione sec. Löffler diluito (diluizione: 1:10 (1+9) con acqua distillata)

Per stoccare i preparati batteriologici per diversi mesi, si raccomanda il montaggio con un mezzo di montaggio anidro (ad es., Neo-Mount™, Entellan™, DPX Neo o Entellan™ Neo) e un vetrini coprioggetti. I preparati colorati devono essere ben essiccati.
Per l’analisi dei preparati colorati con ingrandimento al microscopio >40x, si consiglia di utilizzare olio di immersione.

Colorazione di preparati istologici

Colorazione nella cuvetta di colorazione

Sparaffinare e riportare le preparati istologici all’acqua attraverso una serie discendente di alcoli come di consueto.
I portaoggetti vanno immersi e fatti muovere breve nelle soluzioni; la semplice immersione non produce risultati soddisfacenti.
I portaoggetti vanno fatti sgocciolare accuratamente dopo le singole fasi della colorazione, in modo da evitare il trascinamento (carry-over) delle soluzioni.

Portaoggetti con tessuto istologico	
AFB-Color carbolfucsina soluzione	30 minuti
Acqua di rubinetto corrente	45 secondi
Acido cloridrico alcolico	15 secondi
Acqua di rubinetto corrente	15 secondi
Blu di metilene soluzione sec. Löffler*	5 minuti
Lavare con acqua di rubinetto	10 secondi
Etanolo 70 %	1 minuto
Etanolo 70 %	1 minuto
Etanolo 96 %	1 minuto
Etanolo 96 %	1 minuto
Etanolo 100 %	1 minuto
Etanolo 100 %	1 minuto
Xilene o Neo-Clear™	5 minuti
Xilene o Neo-Clear™	5 minuti
Montare i preparati inumiditi con Neo-Clear™ con Neo-Mount™ o i preparati inumiditi con xilene con ad es. Entellan™ Neo e coprioggetto.	

* Per la controcolorazione di preparati istologici si raccomanda di diluire la soluzione blu di metilene secondo Löffler (diluizione 1:10 (1+9) con acqua distillata). La presente soluzione di lavoro può essere utilizzata fino a 2 settimane.

Risultato

Batteri acido-resistenti	rosso
Sfondo	blu

Valutazione

In base al referto positivo “accertamento di batteri acido-resistenti” o negativo “non sono stati accertati batteri acido-resistenti”. Alla luce di un risultato positivo non è possibile eseguire la classificazione tassonomica al microscopio. Dopo aver trovato batteri acido-resistenti nel campione è necessario eseguire ulteriori analisi in un laboratorio specializzato. Non si può nemmeno determinare la vitalità dei batteri (attivi, inattivi).

Individuazione e soluzione di problemi
Fissaggio degli strisci

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

Nessuna colorazione dei batteri acido-resistenti

Il passo fondamentale di questa colorazione è la decolorazione che può essere influenzata dallo spessore dello striscio.
La soluzione fresca di acido cloridrico alcolico è inoltre molto reattiva e quindi è necessario valutare con attenzione il risultato. I tempi qui indicati per la decolorazione devono essere rigorosamente osservati, poiché in caso contrario si possono ottenere risultati falsi negativi.

Annotazioni tecnici

Il microscopio utilizzato deve soddisfare i requisiti previsti in un laboratorio medico diagnosticco.
In caso di colorazione automatizzata, attenersi alle istruzioni per l’uso del produttore dello strumento e del software.
Eliminare l’olio di immersione in eccesso prima dell’archiviazione.

Caratteristiche delle prestazioni analitiche

„Blu di metilene soluzione sec. Löffler” colora e pertanto permette di visualizzare strutture biologiche, come descritto nel capitolo „Risultato” di questa IFU. Il prodotto deve essere utilizzato solo da persone autorizzate e qualificate; ciò include, a titolo esemplificativo, la preparazione del campione e del reagente, la manipolazione del campione, l’istoprocessazione, le decisioni relative ai controlli adeguati, ecc.
Le prestazioni analitiche del prodotto sono confermate per mezzo di test su ciascun lotto di produzione. La fruttuosa partecipazione a test interlaboratorio internazionali su base regolare fornisce una conferma aggiuntiva e indipendente della specificità analitica.
Per le seguenti colorazioni, le prestazioni analitiche sono state confermate in termini di specificità, sensibilità e ripetibilità del prodotto con un tasso del 100 %:

	Specificità intersaggio	Specificità intersaggio	Specificità intrasaggio	Specificità intrasaggio
Colorazione batteriologica				
Batteri acido-resistenti	20/20	20/20	7/7	7/7
Sfondo	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Risultati delle prestazioni analitiche

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

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

Diagnostica

Le diagnosi vanno eseguite solo da personale autorizzato e qualificato. Devono essere utilizzate nomenclature valide.
La presente metodologia deve essere utilizzata quale strumento integrativo per la diagnostica umana.
Ulteriori test vanno scelti ed eseguiti secondo metodi riconosciuti. Per ogni applicazione devono essere eseguiti controlli appropriati, per escludere possibili risultati errati.

Conservazione

La Blu di metilene soluzione sec. Löffler - per microscopia va conservata ad una temperatura compresa tra +15 °C e +25 °C.

Stabilità

La Blu di metilene soluzione sec. Löffler - per microscopia può essere utilizzata fino alla data di scadenza indicata.
Una volta aperto il flacone, il contenuto si mantiene stabile fino alla data di scadenza indicata se conservato ad una temperatura compresa tra +15 °C e +25 °C.
Conservare sempre i flaconi ben chiusi.

Capacità

circa 250 colorazioni / 500 ml

Istruzioni per l’uso

Solo per uso professionale.
Per evitare errori, la applicazione deve essere eseguita da personale specializzato.
Vanno osservate le direttive nazionali in materia di sicurezza sul lavoro e di assicurazione di qualità.
Vanno utilizzati microscopi conformi agli standard vigenti.
All’occorrenza utilizzare una centrifuga che soddisfi gli standard di laboratorio ed i rispettivi requisiti.

Protezione contro le infezioni

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

Istruzioni per lo smaltimento

La confezione deve essere smaltita nel rispetto delle vigenti direttive in materia.
Le soluzioni usate e le soluzioni scadute vanno smaltite come rifiuti pericolosi, in conformità alle disposizioni locali vigenti in materia di smaltimento dei rifiuti. Per richiedere informazioni sullo smaltimento selezionare il

Quick link "Hints for Disposal of Microscopy Products" all'indirizzo www.microscopy-products.com. Nell'Unione europea trova applicazione il Regolamento (CE) n. 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006.

Reattivi ausiliari

Art. 1.00327	Acido cloridrico alcolico per microscopia	1 l, 5 l
Art. 1.00497	AFB-Color modificato Kit di colorazione per la rilevazione di batteri acido-resistenti (AFB) mediante colorazione a caldo	1 set
Art. 1.00579	DPX Neo mezzo di montaggio anidro per microscopia	500 ml
Art. 1.04699	Olio di immersione per microscopia	flacone contagocce di 100 ml, 100 ml, 500 ml
Art. 1.07960	Entellan™ mezzo di montaggio rapido per microscopia	500 ml
Art. 1.07961	Entellan™ Neo mezzo di montaggio rapido per microscopia	100 ml, 500 ml, 1 l
Art. 1.08000	Sputofluor™ per microscopia	1 l
Art. 1.08298	Xilene (miscela di isomeri) per istologia	4 l
Art. 1.08512	AFB-Color carbofucsina soluzione per l'esame microscopico dei batteri acido-resistenti (AFB) (colorazione a freddo)	500 ml, 2,5 l
Art. 1.09016	Neo-Mount™ mezzo di montaggio anidro per microscopia	flacone contagocce di 100 ml, 500 ml
Art. 1.09215	Ziehl-Neelsen carbofucsina soluzione per microscopia	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Art. 1.09843	Neo-Clear™ (sostituto xilolo) per microscopia	5 l

Classificazione di sostanze pericolose

Art. 1.01287

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

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

Componenti principali del prodotto

Art. 1.01287

C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 - 8,6
1 l =	0,97 kg

Indicazione generale

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

Letteratura

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Liquido e vapori infiammabili.

P210: Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.

P233: Tenere il recipiente ben chiuso.

P240: Mettere a terra e a massa il contenitore e il dispositivo ricevente.

P241: Utilizzare impianti elettrici/ di ventilazione/ d'illuminazione a prova di esplosione.

P242: Utilizzare utensili antiscintillamento.

P243: Fare in modo di prevenire le scariche elettrostatiche.

Cronologia delle revisioni

Versione	Commento relativo alla modifica
2024-Jul-01	Versione iniziale con l'introduzione della Cronologia delle revisioni
2024-Jul-01 V.2	Nessuna modifica alla traduzione italiana



Attenersi alle istruzioni per l'uso



Fabbricante



N. di catalogo



Codice del lotto



Attenzione, consultare la documentazione di accompagnamento



Data di scadenza
AAAA-MM-GG



Limiti di temperatura

Status: 2024-Jul-01 V.2

Negli USA e in Canada il comparto Life Science di Merck opera con il nome MilliporeSigma.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germania e/o sue affiliate. Tutti i diritti sono riservati. Merck e Sigma-Aldrich sono marchi di Merck KGaA, Darmstadt, Germania. Tutti gli altri marchi sono di proprietà dei legittimi detentori. Informazioni dettagliate sui marchi sono disponibili tramite risorse pubblicamente accessibili.



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

MERCK

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Μικροσκοπία

Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου κατά Löffler

για μικροσκοπία

Για επαγγελματική χρήση μόνο

IVD

In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν

CE

Προβλεπόμενος σκοπός

Το «Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου Löffler – για μικροσκοπία» χρησιμοποιείται για ιατρική κυτταρολογική διάγνωση στον άνθρωπο και εξυπηρετεί τον σκοπό της βακτηριολογικής και ιστολογικής διερεύνησης υλικού δείγματος ανθρώπινης προέλευσης. Πρόκειται για ένα έτοιμο για χρήση διάλυμα χρώσης που, όταν χρησιμοποιείται μαζί με άλλα *in vitro* διαγνωστικά προϊόντα από το χαρτοφυλάκιό μας, κάνει τις δομές στόχους (οξεάντοχα βακτήρια (AFB)) σε υλικά βακτηριολογικών και ιστολογικών δειγμάτων, όπως επιχρίσματα εμπλουτισμένων βακτηριακών καλλιιεργειών ή ιστολογικές τομές (π.χ. του πνεύμονα), αξιολογήσιμες για διαγνωστικούς σκοπούς, μέσω μονιμοποίησης, χρώσης, αντιχρώσης και στερέωσης.

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

Αρχή της μεθόδου

Το κυτταρικό τοίχωμα των οξεάντοχα βακτήρια έχει υψηλή αναλογία κεριού και λιπιδίων και επομένως απορροφά χρωστικές μόνο πολύ αργά. Η πιο αποτελεσματική μέθοδος χρώσης είναι η θερμή χρώση κατά Ziehl-Neelsen. Σε αυτή τη μέθοδο, το διάλυμα καρβοφουξίνης εφαρμόζεται στο δείγμα και θερμαίνεται. Αυτή η διαδικασία θέρμανσης επιταχύνει τον ρυθμό απορρόφησης της χρωστικής φουξίνης και επομένως του σχηματισμού του συμπλέγματος μυκοϊκού-φουξίνης στο κυτταρικό τοίχωμα.

Μόλις τα οξεάντοχα βακτήρια απορροφήσουν τη χρωστική φουξίνη, είναι ουσιαστικά αδύνατος ο αποχρωματισμός τους, ακόμα και εάν υποβληθούν σε εντατική επεξεργασία με ένα διάλυμα αποχρωματισμού, όπως υδροχλωρικό οξύ σε αιθανόλη. Αντιστοίχως, τα οξεάντοχα βακτήρια ορίζονται ως οξεάντοχα και αλκοολάντοχα για χρώση και χρώνονται κόκκινα στη μικροσκοπική απεικόνιση. Αντιστοίχως, όλοι οι μη οξεάντοχοι μικροοργανισμοί αντιχρώνονται με κατάλληλη χρωστική. Στις παρούσες οδηγίες λειτουργίας, η αντιχρώση γίνεται με κυανό του μεθυλενίου.

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

Υλικά δείγματος

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

Τομές μονιμοποιημένου σε φορμαλίνη, εγκλεισμένου σε παραφίνη ιστού (το-μές παραφίνης πάχους 3 - 4 μm)

Αντιδραστήρια

Αρ. καταλόγου Διάλυμα κυανού του 100 ml, 500 ml,
1.01287 μεθυλενίου κατά Löffler 2,5 l
για μικροσκοπία

Απαιτούνται επίσης:

Αρ. καταλόγου Διάλυμα καρβοφουξίνης Ziehl- 100 ml, 500 ml,
1.09215 Neelsen 2,5 l
για μικροσκοπία

Αρ. καταλόγου Διάλυμα AFB-Color καρβολικής 500 ml, 2,5 l
1.08512 φουξίνης
για τη μικροσκοπική ανίχνευση
οξεάντοχων βακτηρίων (AFB) (μέσω
ψυχρής χρώσης)

Αρ. καταλόγου Υδροχλωρικό οξύ σε αιθανόλη 1 l, 5 l
1.00327 για μικροσκοπία

Αρ. καταλόγου Sputofluor™ 1 l
1.08000 για μικροσκοπία

Εναλλακτικά:

Αντί για τον συνδυασμό μονών αντιδραστηρίων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το κιτ χρώσης 1.00497.0001 για επιχρίσματα:

Αρ. καταλόγου Κιτ τροποποιημένης χρώσης κατά 1 set
1.00497.0001 AFB-Color
για την ανίχνευση οξεάντοχων
βακτηρίων (AFB) με μέθοδο θερμής
χρώσης

Προετοιμασία δείγματος

Η δειγματοληψία πρέπει να πραγματοποιείται από έμπειρο προσωπικό.

Όλα τα δείγματα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία με χρήση προηγ-μένης τεχνολογίας.

Όλα τα δείγματα πρέπει να φέρουν σαφή σήμανση.

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

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

Πτύελα

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

Προετοιμασία αντιδραστηρίου: Προετοιμασία διαλύματος Sputofluor™ 15%

Για προετοιμασία περίπου 100 ml διαλύματος, αναμείξτε:

Sputofluor™	15 ml
Απεσταγμένο νερό	85 ml

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

Σπικτά, πλύσεις, ιζήματα

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

Ιστολογικές τομές

Το διάλυμα μπλε του μεθυλενίου κατά Löffler μπορεί να πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη χρώση ιστολογικών τομών. Ο συμπαγής ιστός συνηθίζει τη μη ειδική χρώση. Για τέτοιους ιστούς συνιστάται η χρήση αραιωμένου διαλύματος μπλε του μεθυλενίου κατά Löffler (αναλογία αραιώσεως: 1:10 (1+9) με αποσταγμένο νερό).

Κάντε αποπαραφίνωση στις τομές με συμβατικό τρόπο και επανενυδάτωση σε φθινόχωτα σειρά αλκοόλης. Η προεπεξεργασία με Sputofluor™ δεν είναι αναγκαία για δείγματα μονιμοποιημένα με φορμαλίνη.

Μονιμοποίηση δειγμάτων επιχρίσματος

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

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Το διάλυμα κυανού του μεθυλενίου Löffler – για μικροσκοπία που χρησι-μοποιείται για χρώση επιχρισμάτων είναι έτοιμο για χρήση. Η αραιώση αυτού του διαλύματος δεν είναι αναγκαία και προκαλεί μόνο αλλοίωση του αποτελέσματος χρώσης και μείωση της σταθερότητάς του. Για ιστολογικές τομές, συνιστάται η χρήση αραιωμένου διαλύματος μπλε του μεθυλενίου κατά Löffler (1+9 με αποσταγμένο νερό).

Διαδικασία

Χρώση δειγμάτων επιχρίσματος

Χρώση στον δειγματοφορέα χρώσης

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

Αντικειμενοφόρος πλάκα με μονιμοποιημένο επίχρισμα		
Διάλυμα καρβοφουξίνης Ziehl-Neelsen	Καλύπτε πλήρως, θερμάνετε προσεκτικά τρεις φορές από κάτω με τον καυστήρα Bunsen έως τη δημιουργία ατμού Μην αφήνετε το διάλυμα χρώσης να βράσει!	Χρώση για 5 λεπτά συνολικά
Νερό βρύσης	Εκπλύνετε έως ότου δεν παράγονται άλλα νέφη χρωστικής	
Υδροχλωρικό οξύ σε αιθανόλη	καλύπτε πλήρως και αφήστε να αντιδράσει	15 - 30 δευτ.*
Νερό βρύσης	Εκπλύνετε αμέσως	
Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου κατά Löffler	Αντιχρώση, καλύπτε πλήρως και αφήστε να δράσει	30 δευτ.**
Νερό βρύσης	εκπλύνετε προσεκτικά	
Στεγνώστε στον αέρα [π.χ. όλη τη νύχτα (8 ώρες) ή σε 50 °C στον θάλαμο ξήρανσης]		

- * ανάλογα με το πάχος του δείγματος
- ** ή 1 λεπτό με αραιωμένο διάλυμα κυανού του μεθυλενίου Löffler (Αραίωση: 1:10 (1+9) με απεσταγμένο νερό

Η κάλυψη με μη υδατικά μέσα στερέωσης (π.χ. Neo-Mount™, Entellan™, DPX νέο ή Entellan™ νέο) και μια καλυπτρίδα συνιστώνται για τη φύλαξη των βακτηριολογικών δειγμάτων για αρκετούς μήνες. Για τον σκοπό αυτό, τα χρωσθέντα δείγματα πρέπει να στεγνώνονται πολύ καλά. Η χρήση ελαίου εμβάπτισης συνιστάται για την ανάλυση πλακών που έχουν υποβληθεί σε χρώση με μεγέθυνση μικροσκοπίου >40x.

Χρώση ιστολογικών δειγμάτων

Χρώση στο κύτταρο χρώσης

Κάντε ιστολογικών δειγμάτων πλακών με συμβατικό τρόπο και επανενυδά-τωση σε φθίνουσα σειρά αλκοόλης. Οι πλάκες θα πρέπει να αφήνονται να σταλάξουν καλά μετά από τα μεμονωμένα βήματα χρώσης, ως μέτρο αποφυγής οποιασδήποτε άσκοπης διασταυρούμενης μόλυνσης διαλυμάτων. Οι αναγραφόμενοι χρόνοι θα πρέπει να τηρούνται για τη διασφάλιση ενός βέλτιστου αποτελέσματος χρώσης.

Αντικειμενοφόρος πλάκα με ιστικό δείγμα	
Διάλυμα AFB-Color καρβολικής φουξίνης	30 λεπτά
Τρεχούμενο νερό βρύσης	45 δευτ.
Υδροχλωρικό οξύ σε αιθανόλη	15 δευτ.
Τρεχούμενο νερό βρύσης	15 δευτ.
Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου κατά Löffler*	5 λεπτά
Πλύνετε με νερό βρύσης	10 δευτ.
Αιθανόλη 70%	1 λεπτό
Αιθανόλη 70%	1 λεπτό
Αιθανόλη 96%	1 λεπτό
Αιθανόλη 96%	1 λεπτό
Αιθανόλη 100%	1 λεπτό
Αιθανόλη 100%	1 λεπτό
Ξυλένιο ή Neo-Clear™	5 λεπτά
Ξυλένιο ή Neo-Clear™	5 λεπτά
Στερεώστε τις εφυγραμμένες με Neo-Clear™ πλάκες με Neo-Mount™ ή τις εφυγραμμένες με ξυλένιο πλάκες με π.χ. Entellan™ νέο και καλυπτρίδα.	

* Για την αντίχρωση ιστολογικών δειγμάτων συνιστάται η χρήση αραιωμένου διαλύματος μπλε του μεθυλενίου κατά Löffler (αναλογία αραιώσης: 1:10 (1+9) με αποσταγμένο νερό). Αυτό το διάλυμα χρώσης μπορεί να χρησι-μοποιηθεί για έως 2 εβδομάδες.

Αποτέλεσμα

Οξεάντοχα βακτήρια	κόκκινο
Υπόβαθρο	κυανούν

Αξιολόγηση

Ένα θετικό αποτέλεσμα σημαίνει “παρουσία οξεάντοχα βακτήρια”, ενώ ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει “απουσία οξεάντοχα βακτήρια”. Το θετικό αποτέλεσμα δεν σημαίνει ότι είναι δυνατή η ταξινόμηση μέσω μικροσκοπίας. Εάν ανιχνευθούν οξεάντοχα βακτήρια, πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπλέον αναλύσεις σε ειδικά εξοπλισμένα εργαστήρια. Η ζωτικότητα των βακτηρίων (ενεργά, ανενεργά) δεν μπορεί επίσης να προσ-διοριστεί.

Αντιμετώπιση προβλημάτων

Μονιμοποίηση δειγμάτων επιχρίσματος

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

Μη χρώση των οξεάντοχα βακτήρια

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

Τεχνικές σημειώσεις

Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιείται θα πρέπει να πληροί τις απαιτήσεις ενός ιατρικού διαγνωστικού εργαστηρίου. Όταν χρησιμοποιούνται συστήματα αυτόματης χρώσης, παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης που παρέχονται από τον προμηθευτή του συστήματος και του λογισμικού. Αφαιρέστε το επιπλέον έλαιο εμβάπτισης πριν από την αρχειοθέτηση.

Χαρακτηριστικά αναλυτικής απόδοσης

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

Η αναλυτική απόδοση του προϊόντος επιβεβαιώνεται με τον έλεγχο κάθε παρτίδας παραγωγής. Η επιτυχής συμμετοχή σε διεθνείς διεργαστηριακές δο-κιμές σε τακτική βάση παρέχει επιπρόσθετη και ανεξάρτητη επιβεβαίωση της αναλυτικής ειδικότητας.

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

	Ειδικότητα μεταξύ προσδιορι-σμών	Ευαισθησία μεταξύ προσδιορι-σμών	Ειδικότητα εντός του προσδιορι-σμού	Ευαισθησία εντός του προσδιορι-σμού
Βακτηριολογική χρώση				
Οξεάντοχα βακτήρια	20/20	20/20	7/7	7/7
Υπόβαθρο	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Αποτελέσματα αναλυτικής απόδοσης

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

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

Διάγνωση

Οι διαγνώσεις θα πρέπει να γίνονται μόνο από αρμόδιο και εξουσιοδοτημένο προσωπικό. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται έγκυρη ονοματολογία. Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά για τη διάγνωση στους ανθρώπους. Θα πρέπει να επιλεγούν και να εφαρμοστούν περισσότερες δοκιμασίες σύμφω-να με αναγνωρισμένες μεθόδους. Κατάλληλοι έλεγχοι θα πρέπει να διεξάγονται με κάθε εφαρμογή για την αποφυγή λανθασμένου αποτελέσματος.

Φύλαξη

Φυλάσσετε το Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου Löffler – για μικροσκοπία σε θερμοκρασία +15 °C έως +25 °C.

Διάρκεια ζωής

Το Διάλυμα κυανού του μεθυλενίου Löffler – για μικροσκοπία μπορεί να χρη-σιμοποιηθεί έως την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης. Μετά το πρώτο άνοιγμα της φιάλης, το περιεχόμενο μπορεί να χρησιμοποι-ηθεί έως και την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης όταν αποθηκεύεται σε θερμοκρασία +15 °C έως +25 °C. Οι φιάλες πρέπει να διατηρούνται ερμητικά κλειστές συνεχώς.

Ικανότητα

περίπου 250 χρώσεις / 500 ml

Πρόσθετες οδηγίες

Για επαγγελματική χρήση μόνο.

Για την αποφυγή σφαλμάτων, η εφαρμογή πρέπει να πραγματοποιείται μόνο από έμπειρο προσωπικό.

Θα πρέπει να ακολουθούνται οι εθνικές κατευθυντήριες γραμμές για την ασφάλεια στην εργασία και τη διασφάλιση ποιότητας. Πρέπει να χρησιμοποιούνται μικροσκόπια εξοπλισμένα σύμφωνα με τα πρότυπα. Εάν απαιτείται χρησιμοποιήστε μια πρότυπη φυγόκεντρο κατάλληλη για ιατρικό διαγνωστικό εργαστήριο.

Προστασία από λοίμωξη

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

Οδηγίες απόρριψης

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

Βοηθητικά αντιδραστήρια

Αρ. καταλόγου 1.00327	Υδροχλωρικό οξύ σε αιθανόλη για μικροσκοπία	1 l, 5 l
Αρ. καταλόγου 1.00497	Κιτ τροποποιημένης χρώσης κατά AFB-Color για την ανίχνευση οοξεάντοχων βακτηρίων (AFB) με μέθοδο θερμής χρώσης	1 set
Αρ. καταλόγου 1.00579	DPX νέο μη υδατικό μέσο στερέωσης για μικροσκοπία	500 ml
Αρ. καταλόγου 1.04699	Έλαιο εμβάπτισης για μικροσκοπία	Σταγονομετρική φιάλη 100 ml, 100 ml, 500 ml
Αρ. καταλόγου 1.07960	Entellan™ μέσο ταχείας στερέωσης για μικροσκοπία	500 ml
Αρ. καταλόγου 1.07961	Entellan™ νέο μέσο ταχείας στερέωσης για μικροσκοπία	100 ml, 500 ml, 1 l
Αρ. καταλόγου 1.08000	Sputofluor™ για μικροσκοπία	1 l
Αρ. καταλόγου 1.08298	Ξυλένιο (ισομερές μείγμα) για ιστολογία	4 l
Αρ. καταλόγου 1.08512	Διάλυμα AFB-Color καρβολικής φουξίνης για τη μικροσκοπική ανίχνευση οοξεάντοχων βακτηρίων (AFB) (μέσω ψυχρής χρώσης)	500 ml, 2,5 l
Αρ. καταλόγου 1.09016	Neo-Mount™ άνυδρο επικαλυπτικό μέσο για μικροσκοπία	Σταγονομετρική φιάλη 100 ml, 500 ml
Αρ. καταλόγου 1.09215	Διάλυμα καρβοφουξίνης Ziehl-Neelsen για μικροσκοπία	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Αρ. καταλόγου 1.09843	Neo-Clear™ (υποκατάστατο ξυλενίου) για μικροσκοπία	5 l

Ταξινόμηση κινδύνου

Αρ. καταλόγου 1.01287

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

Κύρια συστατικά των προϊόντων

Αρ. καταλόγου 1.01287

C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 - 8,6
1 l =	0,97 kg

Γενική παρατήρηση

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

Δογοτεχνία

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Edition



H226: Υγρό και ατμοί εύφλεκτα.

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

P233: Να διατηρείται ο περιέκτης ερμητικά κλειστός.

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

P241: Να χρησιμοποιείται αντεκρηκτικός εξοπλισμός ηλεκτρολογικός/εξαερισμού/ φωτιστικός.

P242: Να χρησιμοποιούνται μη σπινθηρογόνα εργαλεία.

P243: Λάβετε μέτρα για την αποτροπή ηλεκτροστατικών εκκενώσεων.

Ιστορικό αναθεώρησης

Έκδοση	Σχόλιο τροποποίησης
2024-Jul-01	Αρχική έκδοση με την εισαγωγή του ιστορικού αναθεώρησης
2024-Jul-01 V.2	Καμία αλλαγή στην ελληνική μετάφραση



Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης



Κατασκευαστής



Αριθμός καταλόγου



Κωδικός παρτίδας



Προσοχή, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα



Χρήση έως EEEE-MM-ΗΗ



Όρια θερμοκρασίας

Status: 2024-Jul-01 V.2

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

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germany και/ή οι συνδεδεμένες αυτής εταιρείες. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος. Το Merck και το Sigma-Aldrich είναι εμπορικά σήματα της Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Όλα τα άλλα εμπορικά σήματα αποτελούν ιδιοκτησία των αντίστοιχων κατόχων τους. Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τα εμπορικά σήματα είναι διαθέσιμες μέσω πόρων που διατίθενται δημοσίως.



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

www.sigmaaldrich.com

MERCK

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroskopi

Löfflers metylenblåttlösning

för mikroskopi

Endast för yrkesmässig användning

IVD

Medicinteknisk enhet för diagnostik *in vitro*

CE

Avsett syfte

"Löfflers metylenblåttlösning – för mikroskopi" används till humanmedicinsk celldiagnostik vid bakteriologisk och histologisk undersökning av provmaterial av mänskligt ursprung. Det är en bruksfärdig färgningslösning som, när den används tillsammans med andra produkter för *in vitro*-diagnostik från vår portfölj, gör målstrukturer (syrefasta bakterier (AFB)) genom fixering, färgning, motfärgning och montering i bakteriologiska och histologiska provmaterial, t.ex. utstryk av berikade bakteriekulturer eller histologiska snitt av t.ex. lunga – vilket gör dem utvärderingsbara i diagnostiskt syfte.

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

Princip

Syrefasta bakterier cellvägg har en hög andel vax och lipider, och absorberar därför färgämnen mycket långsamt. Den mest effektiva färgningsmetoden är varmfärgning enligt Ziehl-Neelsen. Enligt den här metoden appliceras karbolfuksinlösningen på provet och värms upp. Uppvärmningsprocessen gör att hastigheten med vilken fuchsinfärgämnet absorberas accelereras, vilket därmed även bildandet av mykolat-fuksin-komplexet i cellväggen gör.

När syrefasta bakterier har absorberat fuchsinfärgämnet är det nästan omöjligt att avfärga dem igen, även om de intensivt behandlas med en avfärgande lösning som saltsyra i etanol. Följaktligen betecknas syrefasta bakterier som syra- och alkoholfasta när det gäller färgning, och färgas röda i den mikroskopiska visualiseringen. På motsvarande sätt avfärgas alla icke-syrefasta mikroorganismer med ett lämpligt färgämne. I den här bruksanvisningen är motfärgningen metylenblått. Förbehandling av prover med Sputofluo™ löser upp bakterierna från omgivande klabbigt slem och cellmaterial.

Provmaterial

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

Snitt av formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad (3 – 4 µm tjocka paraffin-snitt)

Reagens

Kat.nr 1.01287	Löfflers metylenblåttlösning för mikroskopi	100 ml, 500 ml, 2,5 l
----------------	---	-----------------------

Dessutom behövs:

Kat.nr 1.09215	Ziehl-Neelsen karbolfuksinlösning – för mikroskopi	100 ml, 500 ml, 2,5 l
----------------	--	-----------------------

Kat.nr 1.08512	AFB-Color karbolfuchsinslösning för mikroskopiundersökning av syrefasta bakterier (AFB) genom kallfärgning	500 ml, 2,5 l
----------------	--	---------------

Kat.nr. 1.00327	Saltsyra i etanol för mikroskopi	1 l, 5 l
-----------------	----------------------------------	----------

Kat.nr. 1.08000	Sputofluo™ för mikroskopi	1 l
-----------------	---------------------------	-----

Alternativt:

I stället för en kombination av enstaka reagens kan färgningssatsen 1.00497.0001 användas för utstryk:

Kat.nr 1.00497.0001	AFB-Color modifierat färgningskit för detektion av syrefasta bakterier (AFB) genom varmfärgning	1 set
------------------------	---	-------

Provberedning

Provtagningen måste utföras av kvalificerad personal.

Alla prover måste bearbetas med modern teknik.

Alla prover måste märkas tydligt.

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

Vid användning av respektive hjälpåreagenser måste respektive bruksanvisningar följas.

Sputum

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

Reagensberedning: Beredning av Sputofluo™-lösning 15%

För beredning av ca 100 ml lösningsblandning:

Sputofluo™	15 ml
Destillerat vatten	85 ml

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

Punktat, sköljningar, sediment

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

Histologiska snitt

Löfflers metylenblått-lösning ska användas till att färga in histologiska snitt. Kompakt vävnad har en tendens att färgas för mycket. För sådana vävnader rekommenderas en utspädning av Löfflers metylenblått (spädning 1:10 (1+9) med destillerat vatten).

Avparaffinera snitten på sedvanligt vis och rehydrera med alkohol i fallande koncentrationer. Förbehandling med Sputofluo™ behövs inte för prover som har fixerats med formalin.

Fixering av utstryksprover

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

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

Allt för höga temperaturer eller långvarig uppvärmning kan försämra färgningsprestandan.

Reagensberedning

Löfflers metylenblåttlösning för mikroskopi är bruksfärdig för att färga utstryk är klar att använda. Spädning av lösningen är inte nödvändig – det resulterar i ett försämrat färgningsresultat och en försämrad färgningsstabilitet.

För histologiska avsnitt rekommenderas en utspädning av Löfflers metylenblått (1+9 med destillerat vatten).

Förfarande

Färgning av utstryksprover

Färgning på färgningsställ

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

Objektglas med fixerat utstryk		
Ziehl-Neelsen karbolfuksinlösning	täck helt, värm försiktigt tre gånger underifrån med Bunsen-brännaren tills ånga bildas Färgningslösningen får inte koka!	färga i sammanlag 5 min.
Kranvatten	skölj tills det inte längre bildas några moln av färgämne	
Saltsyra i etanol	täck fullständigt och låt reagera	15 - 30 s*
Kranvatten	skölj omedelbart	
Löffler's metylenblåttlösning	Motfärgning, täck fullständigt och låt reagera	30 s**
Kranvatten	skölj noggrant	
Lufttorka (t.ex. över natten eller vid 50 °C i torkskåp)		

* beroende på provets tjocklek

** eller 1 min. med spädd Löfflers metylenblått-lösning (spädning: 1:10 (1 + 9) med destillerat vatten)

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

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

Färgning av histologiska prover

Färgning i färgkyvett

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

Objektglasen måste droppa av ordentligt efter de enskilda färgningsstegen, i syfte att undvika onödig korskontaminering av lösningar.

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

Objektglas med histologisk vävnad	
AFB-Color karbolfuchsinlösning	30 min.
Rinnande kranvatten	45 s
Saltsyra i etanol	15 s
Rinnande kranvatten	15 s
Löffler’s metylenblåttlösning*	5 min.
Tvätta med kranvatten	10 s
Etanol 70%	1 min.
Etanol 70%	1 min.
Etanol 96%	1 min.
Etanol 96%	1 min.
Etanol 100%	1 min.
Etanol 100%	1 min.
Xylen eller Neo-Clear™	5 min.
Xylen eller Neo-Clear™	5 min.
Montera de Neo-Clear™-våta objektglasen med Neo-Mount™ eller de xylen-våta objektglasen med t.ex. Entellan™ ny och täckglas.	

* För motfärgning av histologiska prover rekommenderas en utspädning av Löfflers metylenblått (spädning 1:10 (1+9) med destillerat vatten). Den här arbetslösningen kan användas i upp till två veckor.

Resultat

Syrefasta bakterier	röda
Bakgrund	blå

Utvärdering

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

Felsökning

Fixering av utstryksprover

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

Ingen färgning av syrefasta bakterier

De kritiska stegen i färgningsprocessen är avfärgningssteget, vilket kan påverkas av utstrykets tjocklek. Dessutom är en färsk lösning av saltsyra i etanol ytterst reaktiv, vilket

innebär att resultatet ska bedömas med försiktighet. Under avfärgningssteget ska inkubationstiderna som anges i det här protokollet följas exakt. Annars kan resultaten bli falskt negativa.

Tekniska anmärkningar

Mikroskopet som används ska uppfylla kraven för ett laboratorium för medicinsk diagnostik. Om ett automatiskt färgningssystem används ska du följa bruksanvisningen från leverantören av systemet och programvaran Ta bort överskott av immersionsolja före inmatningen.

Analytiska prestandaegenskaper

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

Produktens analytiska prestanda bekräftas genom att varje produktionssats testas. Regelbundet och framgångsrikt deltagande i internationella jämförande laboratorietester ger ytterligare och opartisk verifiering av analytisk specificitet.

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

	Specificitet mellan analyser	Känslighet mellan analyser	Specificitet inom en analys	Känslighet inom en analys
Bakteriologisk infärgning				
Syrefasta bakterier	20/20	20/20	7/7	7/7
Bakgrund	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Analytiska prestandaresultat

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

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

Diagnostik

Diagnoser ska ställas av behörig och kvalificerad personal. Giltiga nomenklaturer måste användas. Den här metoden kan användas som tillägg vid humandiagnostik. Ytterligare tester måste väljas och genomföras i enlighet med erkända metoder. Lämpliga kontroller ska genomföras med varje applicering för att undvika ett felaktigt resultat.

Förvaring

Förvara Löfflers metylenblåttlösning - för mikroskopi vid +15 °C till +25 °C

Hållbarhetstid

Löfflers metylenblåttlösning - för mikroskopi kan användas fram till angivet utgångsdatum.

När flaskan har öppnats för första gången kan innehållet användas fram till angivet utgångsdatum om den förvaras vid +15 °C till +25 °C.

Flaskorna måste alltid vara väl tillslutna.

Kapacitet

ungefär 250 färgningar/500 ml

Ytterligare instruktioner

Endast för yrkesmässig användning.

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

Skydd mot infektion

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

Instruktioner för avfallshantering

Paketet måste kasseras i enlighet med gällande riktlinjer för avfallshantering.

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

Hjälpreagens

Kat.nr 1.00327	Saltsyra i etanol för mikroskopi	1 l, 5 l
Kat.nr 1.00497	AFB-Color modifierat färgningskit för detektion av syrefasta bakterier (AFB) genom varmfärgning	1 set
Kat.nr 1.00579	DPX ny vattenfritt monteringsmedium för mikroskopi	500 ml
Kat.nr 1.04699	Immersionsolja för mikroskopi	100 ml droppflaska, 100 ml, 500 ml
Kat.nr 1.07960	Entellan™ snabbt monteringsmedium för mikroskopi	500 ml
Kat.nr 1.07961	Entellan™ ny snabbt monteringsmedium för mikroskopi	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat.nr 1.08000	Sputofluo™ för mikroskopi	1 l
Kat.nr 1.08298	Xylen (isomerblandning) för histologi	4 l
Kat.nr 1.08512	AFB-Color karbolfuchsinlösning för mikroskopiundersökning av syrefasta bakterier (AFB) genom kallfärgning	500 ml, 2,5 l
Kat.nr 1.09016	Neo-Mount™ vattenfritt monteringsmedel för mikroskopi	100 ml droppflaska, 500 ml
Kat.nr 1.09215	Ziehl-Neelsen karbolfuksinlösning – för mikroskopi	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat.nr 1.09843	Neo-Clear™ (xylensubstitut) för mikroskopi	5 l

Faroklassificering

Kat.nr. 1.01287

Observera faroklassificeringen på etiketten och uppgifterna i säkerhetsdatabladet.

Säkerhetsdatabladet finns på webbplatsen och går att få på begäran.

Produkternas huvudsakliga beståndsdelar

Kat.nr. 1.01287	
Färgindex 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 - 8,6
1 l =	0,97 kg

Generell anmärkning

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

Litteratur

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Brandfarlig vätska och ånga.

- P210: Får inte utsättas för värme, heta ytor, gnistor, öppen låga eller andra antändningskällor. Rökning förbjuden.
- P233: Behållaren ska vara väl tillsluten.
- P240: Jorda och potentialförbind behållare och mottagarutrustning.
- P241: Använd explosionssäker elektrisk/ ventilations-/ belysningsutrustning.
- P242: Använd verktyg som inte ger upphov till gnistor.
- P243: Vidta åtgärder mot statisk elektricitet.

Revisionshistorik

Version	Ändringskommentar
2024-Jul-01	Första version med införande av revisionshistorik
2024-Jul-01 V.2	Ingen ändring av den svenska översättningen



Se bruksanvisningen



Tillverkare



Katalognummer



Satskod



Försiktighet, se medföljande dokument



Används före
ÅÅÅÅ-MM-DD



Temperatur-
begränsning

Status: 2024-Jul-01 V.2

Life Science Business som tillhör Merck är verksamt som MilliporeSigma i US och Kanada.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germany och/eller dess dotterbolag. Med ensamrätt. Merck och Sigma-Aldrich är varumärken som tillhör Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Alla andra varumärken tillhör respektive ägare. Detaljer om varumärkena kan hittas i allmänt tillgängliga resurser.



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



1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroskopie

Roztok methylenové modři podle Löfflera

pro mikroskopii

Pouze pro profesionální použití

IVD

Zdravotnický prostředek pro diagnostiku *in vitro*



Zamýšlený účel

Tento „Roztok methylenové modři podle Löfflera – pro mikroskopii“ se používá k buněčné diagnostice v oblasti humánní medicíny a slouží k účelům bakteriologického a histologického vyšetření materiálu vzorků lidského původu. Jedná se o barvicí roztok k přímému použití, který v kombinaci s jinými výrobky pro diagnostiku *in vitro* z našeho portfolia umožňuje hodnotit cílové struktury (acidorezistentní bakterie (AFB)) prostřednictvím fixace, barvení, dobarvení, montování v materiálech bakteriologických a histologických vzorků, například v nátěrech tělních tekutin obohacených bakteriálních kultur nebo histologických řezech např. plic pro diagnostické účely.

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

Princip

Buněčná stěna acidorezistentní bakterie sestává z velké části z vosku a tuků a proto vstřebává barviva pouze velice pomalu. Nejúčinnější metodou barvení je horké barvení dle Ziehl-Neelsena. V této metodě se na vzorek nanese roztok karbolfuchsinu a následně se provede zahřátí. Tento proces zahřívání urychluje vstřebávání fuchsinového barviva a tím i vznik komplexu mykolát-fuchsin v buněčné stěně.

Jakmile acidorezistentní bakterie absorbují fuchsinové barvivo, je prakticky nemožné je znovu odbarvit, i po intenzivním ošetření odbarvujícím roztokem jako je např. kyselina chlorovodíková v ethanolu. acidorezistentní bakterie jsou proto označovány jako acidorezistentní a alkohol-rezistentní bakterie, a při mikroskopické vizualizaci se barví červeně. Všechny ostatní mikroorganismy, které nejsou acidorezistentní, se dobarví příslušným barvivem. V tomto návodu k použití se dobarvení provádí methylenovou modří.

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

Materiál vzorku

Volně zaschlé a teplem fixované nátěry bakteriologických materiálů předem ošetřené přípravkem Sputofluor™, jako jsou sputum, nátěry z aspirátu získaného biopsií tenkou jehlou (FNAB), výplachy, otisky, efuze, hnis, exudáty, tekuté nebo pevné kultury. Řezy formalinem fixované tkáně zalité do parafinu (3–4 µm tlusté parafinové řezy)

Činidla

Kat. č. 1.01287	Roztok methylenové modři podle Löfflera pro mikroskopii	100 ml, 500 ml, 2,5 l
-----------------	---	-----------------------

Další potřebné materiály:

Kat. č. 1.09215	Roztok karbolfuchsinu podle Ziehl-Neelsena pro mikroskopii	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat. č. 1.08512	AFB-Color roztok karbolfuchsinu pro mikroskopické vyšetření acidorezistentních bakterie (AFB) (barvení za studena)	500 ml, 2,5 l
Kat. č. 1.00327	Kyselina chlorovodíková v ethanolu pro mikroskopii	1 l, 5 l
Kat. č. 1.08000	Sputofluor™ pro mikroskopii	1 l

Alternativně:

Namísto kombinace samostatných činidel lze na nátěry použít barvicí soupravu 1.00497.0001:

Kat. č. 1.00497.0001	AFB-Color modifikovaná barvicí souprava pro detekci acidorezistentní bakterie (AFB) metodou horkého barvení	1 set
-------------------------	---	-------

Příprava vzorku

Odběr vzorku musí provést kvalifikovaný personál.

Se všemi vzorky je nutné nakládat za použití nejmodernější technologie.

Všechny vzorky musejí být jasné označené.

K odběru vzorků a jejich přípravě je nutné použít vhodné nástroje.

Dodržujte pokyny výrobce týkající se aplikace/použití.

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

Sputum

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

Příprava činidla: Příprava roztoku Sputofluor™ 15 %

Na přípravu přibližně 100 ml směsného roztoku:

Sputofluor™	15 ml
Destilovaná voda	85 ml

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

Punktáty, laváže a sedimenty

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

Histologické řezy

Roztok Löfflerovy methylenové modři by měl být používán k barvení histologických řezů. Kompaktní tkáň má sklon k nadměrnému obarvení. Na takovou tkáň doporučujeme používat ředěný roztok Löfflerovy methylenové modři (ředění 1:10 (1 díl + 9 dílů) destilovanou vodou).

Řezy deparafinizujte obvyklým způsobem a rehydratujte sestupnou alkoholovou řadou. Předběžné ošetření přípravkem Sputofluor™ není u vzorků fixovaných formalinem potřebné.

Fixace nátěrů vzorků

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

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

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

Příprava činidla

Löfflerův roztok methylenové modři – pro mikroskopii používaný k barvení nátěrů je určen k přímému použití; ředění roztoku není nutné a pouze vede ke zhoršení výsledného obarvení a jeho stability. Na histologické řezy se doporučuje používat ředěný roztok Löfflerovy methylenové modři (destilovanou vodou, 1 díl + 9 dílů).

Postup

Barvení nátěrů vzorků

Barvení v barvicím stojánku

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

Sklička s fixovaným nátěrem		
Roztok karbolfuchsinu podle Ziehl-Neelsena	zakryjte zcela, pečlivě 3krát zahřejte zespodu Bunsenovým kahanem, dokud se nezačne tvořit pára Barvicí roztok se nesmí přivádět do varu!	barvěte celkem 5 min
Vodovodní voda	oplachujte tak dlouho, dokud se nepřestanou uvolňovat další obláčky barviva	
Kyselina chlorovodíková v ethanolu	úplně pokryjte a nechejte reagovat	15–30 s*
Vodovodní voda	ihned opláchněte	
Löfflerův roztok methylenové modři	dobarvení, zcela zakryjte a nechte reagovat	30 s**
Vodovodní voda	pečlivě opláchněte	
Ponechejte volně uschnout (např. přes noc nebo v sušárně při 50 °C)		

* v závislosti na tloušťce vzorku
** nebo 1 min při použití zředěného Roztok methylenové modři podle Löfflera
(ředění: 1 : 10 (1+9) s destilovanou vodou)

V případě skladování bakteriologických vzorků po několik měsíců se doporu-
čuje překrytí nevodným montovacím médiem (např. Neo-Mount™, Entellan™, DPX nový nebo Entellan™ nový) a použití krycího sklička.
Pro tyto účely musejí být barvené vzorky velmi dobře vysušené.
Při analýze obarvených nátěrů pod mikroskopem při více než 40násobném zvětšení se doporučuje používat imerzní olej.

Barvení histologických vzorků

Barvení v barvicí komůrce

Histologická sklička zbavte obvyklým způsobem parafínu a rehydratujte je sestupnou alkoholovou řadou.
Sklička je třeba po jednotlivých krocích barvení nechat dobře okapat; tímto opatřením se zabrání jakékoli zbytečné zkřížené kontaminaci roztoků.
Uvedené časy by měly být dodrženy, aby byl zaručen optimální výsledek barvení.

Skličko s histologickou tkání	
AFB-Color roztok karbolfuchsinu	30 min
Tekoucí vodovodní voda	45 s
Kyselina chlorovodíková v ethanolu	15 s
Tekoucí vodovodní voda	15 s
Löfflerův roztok methylenové modři*	5 min
Omyjte vodou z vodovodu	10 s
Ethanol 70 %	1 min
Ethanol 70 %	1 min
Ethanol 96 %	1 min
Ethanol 96 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Xylen nebo Neo-Clear™	5 min
Xylen nebo Neo-Clear™	5 min
Vlhká sklička Neo-Clear™ montujte za použití přípravku Neo-Mount™, případně xylenová vlhká sklička např. za použití přípravku Entellan™ nový a krycího sklička.	

* Ke kontrastnímu barvení histologických vzorků se doporučuje používat ředěný roztok Löfflerovy methylenové modři (ředění 1:10 (1 díl + 9 dílů) destilovanou vodou). Připravený pracovní roztok lze používat až 2 týdny.

Výsledek

Acidorezistentní bakterie	červené
Pozadí	modré

Hodnocení

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

Odstraňování potíží

Fixace nátěrů vzorků

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

Absence obarvení acidorezistentní bakterie

Kritickým je v tomto procesu barvení krok odbarvení, který může být ovliv-
něn tloušťkou nátěru vzorku.
Čerstvý roztok kyseliny chlorovodíkové v ethanolu je navíc vysoce reaktivní,
proto je třeba výsledky hodnotit s obezřetností. Inkubační doby uvedené
v tomto protokolu v kroku odbarvení je nutné přesně dodržet. V opačném
případě můžete získat falešné negativní výsledky.

Technické poznámky

Použitý mikroskop by měl splňovat požadavky zdravotnické diagnostické
laboratoře.
Při používání automatizovaných barvicích systémů dodržujte prosím návod
k použití poskytnutý dodavatelem systému a softwaru.
Před uložením odstraňte přebytek imerzního oleje.

Analytické výkonnostní parametry

„Roztok methylenové modři podle Löfflera“ barví a tím vizualizuje biologické
struktury, jak je popsáno v kapitole „Výsledek“ tohoto návodu k použití.
Výrobek směji používat pouze oprávněné a kvalifikované osoby, což platí
mimo jiné pro přípravu vzorků a činidel, manipulaci se vzorky, zpracování
histogramů, rozhodnutí o vhodných kontrolách a další.

Analytické parametry výrobku jsou validovány testováním každé výrobní
šarže. Další nezávislé potvrzení analytické specifičnosti poskytuje pravidel-
ná úspěšná účast v mezinárodních testech mezi laboratořemi.

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

	Specifič- nost mezi testy	Senzitivita mezi testy	Specifič- nost v rámci testu	Senzitivita v rámci testu
Bakteriologické barvení				
Acidorezistentní bakterie	20/20	20/20	7/7	7/7
Pozadí	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Výsledky testování analytických výkonnostních parametrů

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

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

Diagnostika

Stanovení diagnóz může provádět pouze autorizovaní a kvalifikovaní
personál.
Je nutné používat platné nomenklatury.
Tuto metodu lze používat jako doplňkovou v diagnostice u lidí.
Další testy je nutné vybírat a používat na základě uznaných metod.
Pro zamezení nesprávným výsledkům by se u každé aplikace měly provádět
vhodné kontroly.

Skladování

Roztok methylenové modři podle Löfflera – pro mikroskopii se skladuje při
teplotě +15 °C až +25 °C.

Doba použitelnosti

Roztok methylenové modři podle Löfflera – pro mikroskopii lze používat až
do uplynutí uvedené doby použitelnosti.
Po prvním otevření lahvičky lze obsah používat až do uplynutí uvedené doby
použitelnosti, je-li skladován při teplotě +15 °C až +25 °C.
Lahvičky musejí být vždy těsně uzavřené.

Kapacita

cca. 250 barvení / 500 ml

Další pokyny

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

Ochrana před infekcí

Je nutno přijmout účinná opatření na ochranu před infekcí v souladu s labo-
ratorními směrnici.

Pokyny ohledně likvidace

Balení musí být zlikvidováno v souladu se stávajícími směrnici týkajícími
se likvidace.
Použité roztoky a roztoky po uplynutí doby použitelnosti je nutno likvidovat
jako zvláštní odpad v souladu s místními směrnici. Informace ohledně
likvidace lze získat pod rychlým odkazem „Hints for Disposal of Microsco-
py Products“ (Tipy pro likvidaci výrobků pro mikroskopii) na adrese www.

Pomocná činidla

Kat. č. 1.00327	Kyselina chlorovodíková v ethanolu pro mikroskopii	1 l, 5 l
Kat. č. 1.00497	AFB-Color modifikovaná barvicí souprava pro detekci acidorezistentních bakterie (AFB) metodou horkého barvení	1 set
Kat. č. 1.00579	DPX nový bezvodé montovací médium pro mikroskopii	500 ml
Kat. č. 1.04699	Imerzní olej pro mikroskopii	100 ml kapací lahvička, 100 ml, 500 ml
Kat. č. 1.07960	Entellan™ rychlé zalévací médium pro mikroskopii	500 ml
Kat. č. 1.07961	Entellan™ nový rychlé zalévací médium pro mikroskopii	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. č. 1.08000	Sputofluol™ pro mikroskopii	1 l
Kat. č. 1.08298	Xylen (isomerická směs) pro histologii	4 l
Kat. č. 1.08512	AFB-Color roztok karbolfuchsinu pro mikroskopické vyšetření acidorezistentních bakterie (AFB) (barvení za studena)	500 ml, 2,5 l
Kat. č. 1.09016	Neo-Mount™ bezvodé montovací médium pro mikroskopii	100 ml kapací lahvička, 500 ml
Kat. č. 1.09215	Roztok karbolfuchsinu podle Ziehl-Neelsena pro mikroskopii	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat. č. 1.09843	Neo-Clear™ (náhražka xylenu) pro mikroskopii	5 l

Klasifikace rizik

Kat. č. 1.01287
Řiďte se prosím klasifikacemi rizik vytisknutými na štítku a informacemi uvedenými v bezpečnostním listě.
Bezpečnostní list je dostupný na internetových stránkách a na požádání.

Hlavní složky výrobku

Kat. č. 1.01287	
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0-8,6
1 l =	0,97 kg

Obecná poznámka

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

Literaturu

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Hořlavá kapalina a páry.

P210: Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.
P233: Uchovávejte obal těsně uzavřený.

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

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germany, a/nebo její dceřiné a sesterské společnosti. Všechna práva vyhrazena. Merck a Sigma-Aldrich jsou ochranné známky společnosti Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Všechny ostatní ochranné známky jsou vlastnictvím příslušných vlastníků. Podrobné informace o ochranných známkách lze získat ve veřejně dostupných zdrojích.

P240: Uzemněte a upevněte obal a odběrové zařízení.
P241: Používejte elektrické/ ventilační/ osvětlovací zařízení do výbušného prostředí.
P242: Používejte nářadí z nejiskřícího kovu.
P243: Provedte opatření proti výbojům statické elektřiny.

Historie revizí

Verze	Komentář k úpravám
2024-Jul-01	Původní verze s přidanou tabulkou historie revizí
2024-Jul-01 V.2	Žádná změna v českém překladu

Viz návod k použití

Výrobce

Katalogové číslo

Kód šarže

Pozor, přečtěte si připojené dokumenty

Spotřebujte do RRRR-MM-DD

Teplotní omezení

Status: 2024-Jul-01 V.2

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Microscopie

Albastru de metilen - soluție Löffler

pentru microscopie

Exclusiv pentru uz profesional

IVD

Dispozitiv medical pentru diagnostic *in vitro*

CE

Scopul preconizat

Această „Albastru de metilen - soluție Löffler - pentru microscopie” este utilizată pentru diagnosticul celulelor medicale umane și servește scopului de investigație bacteriologică și histologică a eșantioanelor de probă de origine umană. Aceasta este o soluție de colorare gata de utilizare care, atunci când este utilizată împreună cu alte produse pentru diagnostic *in vitro* din portofoliul nostru, face posibilă evaluarea în scop de diagnostic a structurilor țintă (bacterii rezistente la acizi (AFB)) prin fixare, colorare, contracolorare, montare din eșantioanele de testat bacteriologice și histologice, de ex. frotiuri din culturi bacteriene îmbogățite sau secțiuni histologice din plămâni de ex.

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

Principiu de funcționare

Peretele celular al bacteriei rezistente la acizi are un procent ridicat de ceară și lipide și, din acest motiv, absoarbe coloranții foarte lent. Cea mai eficientă metodă de colorare este colorarea la cald conform metodei Ziehl-Neelsen. În această metodă, soluția de carbol-fucsină este aplicată specimenului și încălzită. Acest proces de încălzire accelerează rata la care colorantul de fucsină este absorbit și, prin urmare, și rata de formare a complexului acid micolic - fucsină în peretele celular.

După ce bacterii rezistente la acizi au absorbit colorantul fucsină, este practic imposibil să fie decolorate din nou, chiar dacă sunt tratate intensiv cu soluții de decolorare, cum ar fi acidul clorhidric din etanol. Prin urmare, bacterii rezistente la acizi sunt considerate rezistente la acizi și la alcool pentru colorare și sunt colorate roșu la vizualizarea microscopică. În mod corespunzător, toate microorganismele nerezistente la acizi sunt contracolorate cu un colorant adecvat. În instrucțiunile de funcționare curente, sunt contracolorate cu albastru de metilen.

Pretratarea specimenelor cu Sputofluol™ dizolvă bacteriile din sputa vâscoasă și materialul celular din jur.

Eșantion de probă

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

Secțiuni de țesut fixate în formalină, încastrate în parafină (secțiuni de parafină de 3 - 4 μm grosime)

Reactivi

Cat. nr. 1.01287	Albastru de metilen - soluție Löffler pentru microscopie	100 ml, 500 ml, 2,5 l
------------------	--	-----------------------

De asemenea, este necesar:

Cat. nr. 1.09215	Soluție Ziehl-Neelsen de carbol-fucsină pentru microscopie	100 ml, 500 ml, 2,5 l
------------------	--	-----------------------

Cat. nr. 1.08512	Soluție AFB-Color carbol fucsină pentru investigare microscopică a bacteriilor rezistente la acizi (AFB) (colorare la rece)	500 ml, 2,5 l
------------------	---	---------------

Cat. nr. 1.00327	Acid clorhidric în etanol, pentru microscopie	1 l, 5 l
------------------	---	----------

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

Alternativ:

În locul combinației de reactivi individuali, setul de colorare 1.00497.0001 poate fi utilizat pentru frotiuri:

Cat. nr. 1.00497.0001	AFB-Color modificat kit de colorare pentru detecție bacteriilor rezistente la acizi (AFB) prin metoda de colorare la cald	1 set
--------------------------	--	-------

Prepararea probelor

Prelevarea probelor trebuie efectuată de personal calificat.

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

Toate probele vor fi etichetate clar.

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

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

Sputa

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

Prepararea reactivului: Pregătirea soluției de Sputofluol™ 15%

Pentru prepararea a aprox. 100 ml soluție, amestecați:

Sputofluol™	15 ml
Apă distilată	85 ml

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

Puncții, spălături, sedimente

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

Secțiuni histologice

Albastru de metilen - soluție Löffler trebuie utilizată pentru a colora secțiunile histologice. Țesutul compact are o tendință de supracolorare; pentru astfel de țesuturi se recomandă o diluare a soluției de albastru de metilen Löffler (diluție: 1:10 (1 + 9) cu apă distilată).

Deparafinați secțiunile prin metoda convențională și rehidrați într-o serie descendentă de alcooli. Tratamentul prealabil cu Sputofluol™ nu este necesar pentru speciunile fixate cu formalină.

Fixarea probelor de frotiuri

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

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

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

Prepararea reactivului

Albastru de metilen - soluție Löffler - pentru microscopie folosită pentru colorare frotiurilor este gata de utilizare, diluarea soluției nu este necesară și mai degrabă provoacă o deteriorare a rezultatelor colorării și a stabilității lor.

Pentru secțiunile histologice, se recomandă o diluare a soluției de albastru de metilen Löffler (1+9 cu apă distilată).

Procedură

Colorarea probelor de frotiuri

Colorarea pe suportul de colorare

Trebuie respectate perioadele de timp specificate, pentru a garanta un

rezultat optim al colorării.

Lamă cu frotiu fixat		
Soluție Ziehl-Neelsen de carbol-fucsină	acoperiți complet, încălziți cu atenție de trei ori de dedesubt cu arzătorul Bunsen până când se formează aburi Nu lăsați soluția de colorare să fiarbă!	colorați timp de 5 min în total
Apă de la robinet	clătiți până când nu se mai produc efecte noi de culoare	
Acid clorhidric în etanol	acoperiți complet și lăsați să reacționeze	15 - 30 sec.*
Apă de la robinet	clătiți imediat	
Albastru de metilen - soluție Löffler	contracolorare, acoperiți complet și lăsați să reacționeze	30 sec.**
Apă de la robinet	clătiți cu atenție	
Uscăți la aer (de ex. peste noapte sau la 50 °C în camera de uscare)		

* în funcție de grosimea specimenului

**sau 1 min. cu Albastru de metilen - soluție Löffler diluată (diluție: 1:10 (1+9) cu apă distilată)

Acoperirea cu medii de montare ne-apoase (de ex. Neo-Mount™, Entellan™, DPX nou sau Entellan™ nou) este recomandată pentru depozitarea specimenelor bacteriologice pentru o perioadă de câteva luni. În acest scop, speci­menele colorate trebuie uscate foarte bine.
Utilizarea uleiului de imersie este recomandată pentru analiza lamelor colo­rate cu mărire microscopică >40x.

Colorarea probelor histologice

Colorarea în celula de colorare

Deparafinizați lamele histologice prin metoda convențională și rehidratați într-o serie descendentă de alcooluri.
Ca măsură de prevenire a contaminării încrucișate nedorite a soluțiilor, la­mele ar trebui lăsate să se scurgă bine după etapele de colorare individuală.
Trebuie respectate perioadele de timp specificate, pentru a garanta un rezultat optim al colorării.

Lamă cu cu țesut histologic	
Soluție AFB-Color carbol fucsină	30 min
Jet de apă de la robinet	45 sec.
Acid clorhidric în etanol	15 sec.
Jet de apă de la robinet	15 sec.
Albastru de metilen - soluție Löffler*	5 min
Spălați cu apă de la robinet	10 sec.
Etanol 70%	1 min
Etanol 70%	1 min
Etanol 96%	1 min
Etanol 96%	1 min
Etanol 100%	1 min
Etanol 100%	1 min
Xilen sau Neo-Clear™	5 min
Xilen sau Neo-Clear™	5 min
Montați lamele umezite cu Neo-Clear™cu Neo-Mount™ sau lamele umezite cu xilen cu de ex. Entellan™ nou și capac de sticlă.	

* Pentru contracolorarea eșantioanelor histologice, se recomandă diluarea soluției de albastru de metilen Löffler (diluție: 1:10 (1+9) cu apă distila­ță). Această soluție de lucru poate fi folosită până la 2 săptămâni.

Rezultat

Bacterii rezistente la acizi	roșu
Fundal	albastru

Evaluare

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

Depanarea

Fixarea probelor de frotiu

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

Nu există colorare a bacterii rezistente la acizi

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

Observații tehnice

Microscopul utilizat trebuie să corespundă cerințelor laboratorului pentru diagnostic medical.
Atunci când folosiți sisteme pentru colorare automată, respectați instrucți­unile de utilizare oferite de furnizorul sistemului și al software-ului.
Înlăturați excesul de ulei de imersie înainte de umplere.

Caracteristici de performanță analitică

„Albastru de metilen - soluție Löffler” colorează și, prin urmare, vizibilizează structurile biologice, așa cum este descris în capitolul „Rezultat” al acestei IDU. Produsul trebuie utilizat numai de către persoane autorizate și califi­cate, utilizarea incluzând, printre altele, pregătirea probelor și a reactivilor, manipularea probelor, histoprocесarea, deciziile privind controalele adecvate și multe altele.
Performanța analitică a produsului este confirmată prin testarea fiecărui lot de producție. Participarea cu succes la testele interlaboratoare internaționa­le în mod regulat oferă o confirmare suplimentară și neafiliată a specificității analitice.
Pentru următoarele colorări, performanța analitică a fost confirmată din punct de vedere al specificității, sensibilității și repetabilității produsului cu o rată de 100%:

	Specifi­citate inter-test	Senzitivi­tate inter-test	Specifi­citate intra-test	Senzitivi­tate intra-test
Colorație bacteriologică				
Bacterii rezistente la acizi	20/20	20/20	7/7	7/7
Fundal	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Rezultate de performanță analitică

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

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

Diagnostic

Diagnosticul trebuie stabilit doar de către personalul autorizat și calificat. Va fi utilizată nomenclatura în vigoare.
Această metodă poate fi folosită suplimentar în diagnosticul uman. Testele ulterioare vor fi selectate și implementate conform metodelor recu­noscute.
Trebuie efectuat un control adecvat al fiecărei aplicații pentru a se evita rezultate incorecte.

Depozitarea

Depozitați Albastru de metilen - soluție Löffler - pentru microscopie la +15 °C până la +25 °C.

Durata de depozitare

Albastru de metilen - soluție Löffler - pentru microscopie poate fi utilizată până la termenul de valabilitate menționat.
După prima deschidere a flaconului, conținutul poate fi utilizat până la termenul de valabilitate menționat, dacă este depozitat la +15 °C până la +25 °C.
Flacoanele trebuie păstrate în permanență bine închise.

Capacitatea

aprox. 250 de colorări/500 ml

Instrucțiuni suplimentare

Exclusiv pentru uz profesional.
Pentru a evita erorile, aplicarea trebuie efectuată exclusiv de personal calificat.
Vor fi respectate recomandările naționale privind siguranța muncii și asigu­rarea calității.
Trebuie utilizate microscopae echipate conform standardelor.
Dacă este necesar, utilizați o centrifugă standard adecvată pentru laborato­rul pentru diagnostic medical.

Protecția împotriva infecției

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

Instrucțiuni privind eliminarea

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

Reactivi auxiliari

Cat. nr. 1.00327	Acid clorhidric în etanol pentru microscopie	1 l, 5 l
Cat. nr. 1.00497	AFB-Color modificat kit de colorare pentru detecție bacteriilor rezistente la acizi (AFB) prin metoda de colorare la cald	1 set
Cat. nr. 1.00579	DPX nou mediu de montare neapós pentru microscopie	500 ml
Cat. nr. 1.04699	Ulei de imersie pentru microscopie	Flacon de picurare de 100 ml, 100 ml, 500 ml
Cat. nr. 1.07960	Entellan™ de montare rapid montare pentru microscopie	500 ml
Cat. nr. 1.07961	Entellan™ nou mediu de montare rapid pentru microscopie	100 ml, 500 ml, 1 l
Cat. nr. 1.08000	Sputofluol™ pentru microscopie	1 l
Cat. nr. 1.08298	Xilen (amestec de izomeri) pentru histologie	4 l
Cat. nr. 1.08512	Soluție AFB-Color carbol fucsină pentru investigare microscopică a bacteriilor rezistente la acizi (AFB) (colorare la rece)	500 ml, 2,5 l
Cat. nr. 1.09016	Neo-Mount™ anhidru - mediu de montare pentru microscopie	Flacon de picurare de 100 ml, 500 ml
Cat. nr. 1.09215	Soluție Ziehl-Neelsen de carbol-fucsină pentru microscopie	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Cat. nr. 1.09843	Neo-Clear™ (substitut de xilen) pentru microscopie	5 l

Categoria de risc

Cat. nr. 1.01287
Observați categoria de risc imprimată pe etichetă și informațiile oferite în fișa de informații de securitate. Fișa de informații de securitate este disponibilă pe website și la cerere.

Componentele principale ale produselor

Cat. nr. 1.01287	
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 - 8,6
1 l = 0,97 kg	

Observație generală

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

Literatură

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Lichid și vapori inflamabili.

- P210: A se păstra departe de surse de căldură, suprafețe fierbinți, scânteii, flăcări și alte surse de aprindere. Fumatul interzis.
- P233: Păstrați recipientul închis etanș.
- P240: Legătură la pământ și conexiune echipotentială cu recipientul și cu echipamentul de recepție.
- P241: Utilizați echipamente electrice/ de ventilare/ de iluminat antideflagrante.
- P242: Nu utilizați unelte care produc scânteii.
- P243: Luați măsuri de precauție împotriva descărcărilor electrostatice.

Istoric revizuire

Versiune	Comentariu privind modificarea
2024-Jul-01	Versiunea inițială cu introducerea istoricului revizuirilor
2024-Jul-01 V.2	Nicio modificare la traducerea din română



A se consulta instrucțiunile de utilizare



Producător



Număr articol



Număr lot



Atenție, a se consulta documentele însoțitoare



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



Temperatura limită

Status: 2024-Jul-01 V.2

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

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germany și / sau afiliații săi. Toate drepturile rezervate. Merck și Sigma-Aldrich sunt mărci comerciale ale Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Toate celelalte mărci comerciale sunt proprietatea deținătorilor respectivi. Informații detaliate despre mărci comerciale sunt disponibile prin resurse disponibile public.



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



1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroskopi

Löfflers methylenblåopløsning

til mikroskopi

Kun til professionel brug

IVD

Medicinske anordning til *in vitro*-diagnose

CE

Beregnet formål

Dette "Löfflers methylenblåopløsning - til mikroskopi" anvendes til hum-anmedicinsk cellediagnose og er beregnet til bakteriologisk og histologisk undersøgelse af prøvemateriale fra mennesker. Det er en klar-til-brug farveopløsning, som når den bruges til *in vitro*-diagnose sammen med andre produkter fra vores sortiment laver målstrukturer (syrefaste bakterier (AFB)) ved fiksering, farvning, kontrastfarvning, montering i bakteriologiske og histologiske prøvematerialer, eksempelvis bakteriekulturer eller histologiske snit af lungen, der kan evalueres til diagnoseformål.

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

Princip

Syrefaste bakterier cellevæg har en høj andel voks og lipider og absorberer derfor farvestoffer meget langsomt. Den mest effektive farvningsmetode er varm farvning i henhold til Ziehl-Neelsen. I forbindelse med denne metode påføres prøven karbolfuchsinopløsning og opvarmes. Denne opvarmning øger hastigheden af absorberingen af fuchsinfarvestoffet og dermed også af dannelsen af mycolat-fuchsin-komplekset i cellevæggen.

Når syrefaste bakterier har absorberet fuchsinfarvestoffet, er det næsten umuligt at affarve dem, også selvom de bliver behandlet grundigt med en affarvningsopløsning såsom saltsyre i ethanol. Af denne grund betegnes syrefaste bakterier som syre- og alkoholfaste i forbindelse med farvning, og de farves røde ved mikroskopisk visualisering. Derfor kontrastfarves alle ikke-syrefaste mikroorganismer med et passende farvestof. I denne brugsanvisning udføres kontrastfarvningen med methylenblåt.

Ved forbehandling af prøverne med Sputofluo™ opløses bakterierne fra det klæbrige spyt og cellemateriale, der omgiver dem.

Prøvemateriale

Udstrygninger af bakteriologisk materiale, som er blevet lufttørret og forbe-handlet med Sputofluo™ såsom sputum, udstrygninger fra finnåls-aspirations-biopsi (FNAB), skylninger, aftryk, effusioner, pus, ekssudater, flydende og faste kulturer
Snit af formalinfikseret og paraffinindstøbt væv (paraffinsnit med en tykkelse på 3 - 4 µm)

Reagenser

Varenr. 1.01287	Löfflers methylenblåopløsning til mikroskopi	100 ml, 500 ml, 2,5 l
-----------------	--	-----------------------

Også påkrævet:

Varenr. 1.09215	Ziehl-Neelsen-karbolfuchsinopløsning til mikroskopi	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Varenr. 1.08512	AFB-Color karbolfuchsinopløsning til mikroskopisk undersøgelse af syrefaste bakterier (AFB) (koldfarvning)	500 ml, 2,5 l
Varenr. 1.00327	Saltsyre i ethanol til mikroskopi	1 l, 5 l
Varenr. 1.08000	Sputofluo™ til mikroskopi	1 l

Alternativ:

Farvesættet 1.00497.0001 kan bruges i stedet for kombinationen af enkelte reagenser til smears:

Varenr. 1.00497.0001	AFB-Color modificeret kit til mikroskopisk undersøgelse af syrefaste bakterier, AFB (varm farvning)	1 set
-------------------------	---	-------

Forberedelse af prøverne

Prøveudtagningen skal udføres af faguddannet personale.

Alle prøver skal behandles ved hjælp af den nyeste teknologi.

Alle prøver skal forsynes med tydelige etiketter.

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

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

Sputum

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

Forberedelse af reagenserne: Fremstilling af Sputofluo®-opløsning 15 %

Til fremstilling af ca. 100 ml opløsningsblanding:

Sputofluo™	15 ml
Destilleret vand	85 ml

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

Punktater, udskylning, bundfald

Efter der er truffet passende berigelsesforanstaltninger, udstryges prøve-materialet på objektglasset og lufttørres.

Histologiske prøver

Löfflers methylenblåt-opløsning skal bruges til farvning af histologiske snit. Kompakt væv har en tendens til at blive overfarvet. I forbindelse med sådant væv anbefales en fortynding af Löfflers methylenblå-opløsning (fortynding: 1:10 (1+9) med destilleret vand). Deparaffiner snittene på traditionel vis, og rehydrer dem i en faldende alkoholrække. Forbehandling med Sputofluo™ er ikke påkrævet, hvis prøverne er fikseret med formalin.

Fiksering af smear-prøver

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

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

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

Forberedelse af reagenserne

Löfflers methylenblåopløsning - til mikroskopi er klar til brug af smearet. Fortynding af opløsningen er ikke nødvendigt og resulterer i forringelse af farveresultatet og opløsningens stabilitet. I forbindelse med histologiske snit, anbefales en fortynding af Löfflers methylenblå-opløsning (1+9 med destilleret vand).

Procedure

Farvning af smear-prøver

Farvning på farveracket

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

Objektglas med fikseret udstrygning		
Ziehl-Neelsen-carbolfuchsin-opløsning	Dækkes helt, opvarmes forsigtigt tre gange nedefra med en bunsen-brænder indtil der dannes damp Farveopløsningen må ikke koge!	farves i 5 min. i alt
Postevand	Skyl indtil der ikke dannes flere farveskyer	
Saltsyre i ethanol	Skal tildækkes fuldstændigt og gives tid til at reagere	15 - 30 sek.*
Postevand	Skyl omgående	
Löfflers methylenblå-opløsning	kontrastfarvning, skal tildækkes fuldstændigt og gives tid til at reagere	30 sek.**
Postevand	Skyl omhyggeligt	
Skal lufttørre (f.eks. natten over eller ved 50 °C i tørreskabet)		

* afhængigt af prøvens tykkelse

** eller 1 min. med fortyndet Löfflers methylenblåt-opløsning (fortyndelsesforhold: 1:10 (1+9) med destilleret vand)

Tildækning med ikke-vandige monteringsmedier (f.eks. Neo-Mount™, Entellan™, DPX ny eller Entellan™ ny) og et dækglas anbefales med henblik på opbevaring af bakteriologiske prøver i flere måneder. Til dette formål skal de farvede prøver tørres meget omhyggeligt.
Brugen af immersionsolie anbefales til analyse af farvede objektglas med en mikroskopforstørrelse på >40x.

Farvning af histologiske prøver

Farvning i farvningkuvetten

Deparaffiner de histologiske snit på traditionel vis, og rehydrer dem i en faldende alkoholrække.
Snittene skal dryppe godt af efter hvert farvetrin for at undgå unødvendig krydskontaminering af opløsningerne.
De anførte tider skal overholdes for at sikre et optimalt resultat af farvningen.

Objektglas med histologisk væv	
AFB-Color karbolfuchsinopløsning	30 min.
Rindende postevand	45 sek.
Saltsyre i ethanol	15 sek.
Rindende postevand	15 sek.
Löfflers methylenblå-opløsning*	5 min.
Vaskes med postevand	10 sek.
Ethanol 70 %	1 min.
Ethanol 70 %	1 min.
Ethanol 96 %	1 min.
Ethanol 96 %	1 min.
Ethanol 100 %	1 min.
Ethanol 100 %	1 min.
Xylen eller Neo-Clear™	5 min.
Xylen eller Neo-Clear™	5 min.
Monter Neo-Mount™ på de Neo-Clear™-vædede objektglas eller monter f.eks. Entellan™ ny og sæt dækglas på.	

* I forbindelse med modfarvning af histologiske prøver anbefales en fortynding af Löfflers methylenblå-opløsning (fortynding: 1:10 (1+9) med destilleret vand). Denne arbejdsopløsning kan anvendes i op til 2 uger.

Resultat

Syrefaste bakterier	rød
Baggrund	blå

Evaluerig

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

Fejlfinding

Fiksering af smear-prøver

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

Ingen farvning af syrefaste bakterier

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

Tekniske bemærkninger

Det anvendte mikroskop skal leve op til kravene på et laboratorium til medicinsk diagnose.
Ved brug af automatiske farvesystemer skal brugervejledningen fra leverandøren af systemet og softwaren følges.
Fjern overskydende immersionsolie forud for arkivering.

Analytiske ydeevnekarakteristika

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

Produktets analytiske ydeevne bekræftes ved test af hvert produktionsparti. Den vellykkede regelmæssige deltagelse i internationale interlaboratorieundersøgelser giver en ekstra og uafhængig bekræftelse af den analytiske specificitet.

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

	Inter-undersøgelse specificitet	Inter-undersøgelse sensitivitet	Intra-undersøgelse specificitet	Intra-undersøgelse sensitivitet
Bakteriologisk farvning				
Syrefaste bakterier	20/20	20/20	7/7	7/7
Baggrund	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Analytiske ydeevneresultater

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

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

Diagnostik

Diagnoser må udelukkende stilles af autoriseret og kvalificeret personale. Der skal anvendes gyldige nomenklaturer.
Denne metode kan anvendes som supplement inden for human diagnostik. Yderligere test skal udvælges og udføres i henhold til anerkendte metoder. Der skal udføres egnede kontroller ved hver anvendelse for at undgå forkerte resultater.

Opbevaring

Löfflers methylenblåopløsning - til mikroskopi skal opbevares ved +15 °C til +25 °C.

Holdbarhed

Löfflers methylenblåopløsning - til mikroskopi kan bruges indtil den anførte udløbsdato.

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

Flaskerne skal altid være forsvaret lukkede.

Kapacitet

ca. 250 farvninger/500 ml

Yderligere anvisninger

Kun til professionel brug.

For at undgå fejl må produktet kun anvendes af faguddannet personale. Nationale bestemmelser vedrørende arbejdsikkerhed og kvalitetssikring skal overholdes. Der skal anvendes mikroskoper, der udstyret i henhold til de gældende standarder. Brug om nødvendigt en standardcentrifuge, der egner sig til brug på et laboratorium i forbindelse med medicinsk diagnostik.

Beskyttelse mod infektioner

Der skal træffes effektive foranstaltninger til beskyttelse mod infektioner i henhold til laboratoriets retningslinjer.

Bortskaffelse

Emballagen skal bortskaffes i overensstemmelse med de gældende bestemmelser for bortskaffelse. Brugte opløsninger og opløsninger, hvor holdbarheden er udløbet, skal bortskaffes som særligt affald i overensstemmelse med de lokale bestemmelser. Oplysninger om bortskaffelse kan findes under linket "*Hints*

for Disposal of Microscopy Products" (Tip til bortskaffelse af produkter til mikroskopi) under www.microscopy-products.com. I EU skal den gældende FORORDNING (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 overholdes.

Øvrige reagenser

Varenr. 1.00327	Saltsyre i ethanol til mikroskopi	1 l, 5 l
Varenr. 1.00497	AFB-Color modificeret kit til mikroskopiundersøgelse af syrefaste bakterier, AFB (varm farvning)	1 set
Varenr. 1.00579	DPX ny vandfrit indstøbningsmiddel til mikroskopi	500 ml
Varenr. 1.04699	Immersionsolie til mikroskopi	100-ml pipette-flaske, 100 ml, 500 ml
Varenr. 1.07960	Entellan™ hurtigindstøbningsmiddel til mikroskopi	500 ml
Varenr. 1.07961	Entellan™ ny hurtigindstøbningsmiddel til mikroskopi	100 ml, 500 ml, 1 l
Varenr. 1.08000	Sputofluo™ til mikroskopi	1 l
Varenr. 1.08298	Xylen (isomerisk blanding) til histologi	4 l
Varenr. 1.08512	til mikroskopisk undersøgelse af syrefaste bakterier (AFB) (koldfarvning)	500 ml, 2,5 l
Varenr. 1.09016	Neo-Mount™ vandfri indstøbningsmiddel til mikroskopi	100-ml pipette-flaske, 500 ml
Varenr. 1.09215	Ziehl-Neelsen-karbofuchsinopløsning til mikroskopi	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Varenr. 1.09843	Neo-Clear™ (xylenerstatning) til mikroskopi	5 l

Fareklassificering

Varenr. 1.01287
Vær opmærksom på den fareklassificering, der er trykt på etiketten, og oplysningerne i sikkerhedsdatabladet. Sikkerhedsdatabladet fås på hjemmesiden og ved forespørgsel.

Produkternes hovedkomponenter

Varenr. 1.01287	
Farveindeks 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 - 8,6
1 l =	0,97 kg

Generel bemærkning

Hvis der under brugen af dette apparat eller som følge af dets brug opstår en alvorlig hændelse, skal dette meddeles producenten og/eller dennes autoriserede repræsentant og den nationale myndighed.

Litteratur

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Brandfarlig væske og damp.

P210: Holdes væk fra varme, varme overflader, gnister, åben ild og andre antændelseskilder. Rygning forbudt.

Life science-afdelingen hos Merck drives under navnet MilliporeSigma i US og Canada.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germany og/eller dennes tilknyttede selskaber. Alle rettigheder forbeholdes. Merck og Sigma-Aldrich er varemærker tilhørende Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Alle andre varemærker tilhører deres respektive ejere. Detaljerede oplysninger om varemærker kan findes via de offentligt tilgængelige ressourcer.

- P233: Hold beholderen tæt lukket.
P240: Beholder og modtageudstyr jordforbindes/potentialudlignes.
P241: Anvend eksplosionssikkert elektrisk/ ventilations-/ lys-/ udstyr.
P242: Anvend værktøj, som ikke frembringer gnister.
P243: Træf foranstaltninger mod statisk elektricitet.

Revisionshistorik

Version	Kommentar til modifikation
2024-Jul-01	Første version med introduktion af revisionshistorik
2024-Jul-01 V.2	Ingen ændring af den danske oversættelse

Se brugervejledningen

Producent

Varenummer

Partikode

Forsigtig: Se den medfølgende dokumentation

Skal bruges inden ÅÅÅÅ-MM-DD

Tilladt temperatur

Status: 2024-Jul-01 V.2

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroskopija

Löfflerova metilensko plava otopina

za mikroskopiju

Samo za profesionalnu uporabu

IVD

In vitro dijagnostički medicinski proizvod

CE

Namjena

Ova „Löfflerova metilensko plava otopina – za mikroskopiju“ upotrebljava se za dijagnozu ljudskih medicinskih stanica i služi za bakteriološko i histološko istraživanje uzorka ljudskog podrijetla. To je otopina za bojenje spremna za uporabu zahvaljujući kojoj je, kada se upotrebljava s drugim *in vitro* dijagnostičkim proizvodima iz naše ponude, moguće procijeniti ciljne strukture (cidorezistentne bakterije (AFB)) i to fiksiranjem, bojenjem, protuboženjem, poklapanjem u bakteriološkim i histološkim uzorcima, primjerice razmazu obogaćenih bakterijskih kultura ili histološke sekcije npr. pluća, u dijagnostičke svrhe.

Neobojene strukture imaju relativno niski kontrast i iznimno ih je teško razlikovati pod svjetlosnim mikroskopom. Slike dobivene uz primjenu otopina za bojenje ovlaštenom i kvalificiranom ispitivaču pomažu da u takvim slučajevima bolje definira oblik i strukturu. Daljnja ispitivanja moraju se provesti prema priznatim, valjanim metodama da bi se postavila konačna dijagnoza.

Princip

Stanična stijenka acidorezistentne bakterije ima visok udio voska i lipida te stoga boje apsorbira jedino vrlo polako. Najučinkovitija je metoda bojenja vruće bojenje prema Ziehl-Neelsenu. Ovom se metodom otopina karbol fuksina primjenjuje na uzorak i zagrijava. Taj proces zagrijavanja ubrzava stopu apsorpcije boje fuksin, a time i formiranja mikolat-fuksin kompleksa u staničnoj stijenci. Nakon što acidorezistentne bakterije apsorbiraju boju fuksin, gotovo je nemoguće da opet izgube boju, čak i kad se intenzivno tretiraju otopinom za uklanjanje boje kao što je npr. klorovodična kiselina u etanolu. Dakle, acidorezistentne bakterije se nazivaju otpornima na kiseline i alkohol kod bojenja te poprimaju crvenu boju kod mikroskopske vizualizacije. Prema tome, svi mikroorganizmi koji nisu otporni na kiseline protubojaju se odgovarajućom bojom. Prema aktualnim uputama za rad, protubojaju se u skladu s metilen plavom. Predobradom uzoraka proizvodom Sputofluor™ otapaju se bakterije iz okolnog viscidnog sputuma i staničnog materijala.

Uzorak

Razmazi bakterioloških materijala koji su osušeni zrakom i fiksirani toplinom te prethodno tretirani proizvodom Sputofluor™, poput sputuma, razmaza iz aspiracijskih biopsija tankom iglom (FNAB), ispiranja, otisaka, efuzija, gnoj, eksudata i kultura u tekućem i krutom stanju. Sekcije formalinom fiksiranih, u parafin uklopljenih tkiva (sekcije parafina debljine 3 – 4 µm)

Reagensi

Kat. br. 1.01287	Löfflerova metilensko plava otopina	100 ml, 500 ml,
	za mikroskopiju	2,5 l

Također potrebno:

Kat. br. 1.09215	Ziehl-Neelsenova otopina karbol fuksina za mikroskopiju	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat. br. 1.08512	AFB-Color karbol fuksin otopina za mikroskopska istraživanja acidorezistentnih bakterije (AFB) (hladno bojenje)	500 ml, 2,5 l
Kat. br. 1.00327	Kloridna kiselina u etanolu za mikroskopiju	1 l, 5 l
Kat. br. 1.08000	Sputofluor™ za mikroskopiju	1 l

Alternativno:

Umjesto kombinacije jednog reagensa može se upotrebljavati komplet za bojenje 1.00497.0001 za razmaze:

Kat. br.	AFB-Color modificirani komplet za detekciju acidorezistentnih bakterije (AFB) vrućom metodom bojenja	1 set
1.00497.0001		

Priprema uzorka

Uzorkovanje mora provoditi kvalificirano osoblje.

Svi uzorci moraju se obraditi vrhunskom tehnologijom.

Svi uzorci moraju se jasno označiti.

Prilikom uzimanja uzoraka i njihove pripreme moraju se upotrebljavati prikladni instrumenti. Slijedite upute proizvođača za primjenu/upotrebu.

Kada upotrebljavate odgovarajuće pomoćne reagentse, treba se pridržavati njihovih uputa za uporabu.

Sputum

Acidorezistentne bakterije treba prethodno tretirati proizvodom Sputofluor™ da bi se razdvojile od sluzi i staničnih struktura. U ovom postupku aktivni sastojak hipoklorit otapa organske tvari oksidacijom i lagano otpušta acidorezistentne bakterije tako da se mogu dalje obrađivati.

Priprema reagensa: Priprema Sputofluor™ otopine, 15 %

Za pripremu približno 100 ml otopine:

Sputofluor™	15 ml
Destilirana voda	85 ml

Priprema uzorka u epruvetama za centrifugiranje:	
Uzorak	1 dio (min. 2 ml)
Sputofluor™ otopina (15 %, u destiliranoj vodi)	3 dijelova
Snažno protresti	10 min
Centrifugirati pri 3000 – 4800 o/min	20 min
Dekantirati supernatant Pripremiti razmaze sedimenta Osušiti na zraku	

Punktati, ispiranja, sedimenti

Nakon poduzimanja odgovarajućih mjera obogaćivanja, razmažite uzorak na stakalce i ostavite ga da se osuši na zraku.

Histološke sekcije

Löfflerova metilensko plava otopina modrila treba se koristiti za bojenje histoloških presjeka. Kod kompaktnog tkiva postoji tendencija pretjeranog bojenja; za takva tkiva preporučuje se razrjeđivanje Löfflerove otopine metilenskog modrila (razrjeđivanje destiliranom vodom u omjeru 1:10 (1+9)). Uklonite parafin sa sekcija na uobičajen način i rehidrirajte silaznim nizom alkohola. Predobrada proizvodom Sputofluor™ nije nužna za uzorke fiksirane formalinom.

Fiksacija uzoraka razmaka

Uzorci se fiksiraju iznad plamena Bunsenova plamenika (2 – 3 puta, vodeći računa da se izbjegne prekomjerno zagrijavanje).

Uzorci se mogu fiksirati zagrijavanjem na 100 – 110 °C u komori za sušenje ili na grijaćoj ploči u trajanju od 20 min.

Previsoke temperature ili duže zagrijavanje mogu dovesti do pogoršanja učinkovitosti bojenja.

Priprema reagensa

Löfflerova metilensko plava otopina - za mikroskopiju upotrebljava se za bojenje razmaza i spremna je za uporabu, što znači da otopinu nije potrebno razrjeđivati jer bi se time samo pogoršali rezultati bojenja i njihova stabilnost.

Za histološke presjeke preporučuje se razrjeđivanje Löfflerove otopine metilenskog modrila (razrjeđivanje destiliranom vodom u omjeru 1+9).

Postupak

Bojenje uzoraka razmaza

Bojenje na podlozi za bojenje

Potrebno je pridržavati se navedenih vremena za optimalne rezultate bojenja.

Stakalce s fiksiranim razmazom		
Ziehl-Neelsenova otopina karbol fuksina	u potpunosti pokrijte i pažljivo zagrijavajte tri puta odozdo Bunsenovim plamenikom dok se ne stvori para Nemojte dopustiti da otopina za bojenje zakuha!	bojite ukupno 5 min
Voda iz slavine	ispirite dok se više ne proizvode oblaci boje	
Klorovodična kiselina u etanolu	u potpunosti pokrijte i pričekajte reakciju	15-30 s*
Voda iz slavine	odmah isperite	
Löfflerova metilensko plava otopina	protubojenje, u potpunosti pokrijte i pričekajte reakciju	30 s**
Voda iz slavine	oprezno isperite	
Sušenje zrakom (npr. preko noći pri 50 °C u komori za sušenje)		

* ovisno o debljini uzorka
**ili 1 min s razrijeđenom Löfflerovom metilensko plavom otopinom (razrjeđivanje: 1:10 (1+9) s destiliranom vodom)

Pokrivanje s medijem za poklapanje bez vode (npr. Neo-Mount™, Entellan™, Novi DPX ili Novi Entellan™) i stakleni pokrov preporučuje se za pohranu bakterioloških uzoraka na nekoliko mjeseci. Obojani uzorci moraju se u tu svrhu vrlo dobro osušiti.
Upotreba imerzijskog ulja preporučuje se za analizu obojanih stakalaca s pomoću mikroskopskog povećanja > 40x.

Bojenje histoloških uzoraka

Bojenje u stanicama za bojenje

Uklonite parafin s histoloških stakalaca na uobičajen način i rehidrirajte silaznim nizom alkohola.
Stakalca se trebaju postaviti tako da se dobro ocijede nakon svakog zasebnog koraka bojenja da bi se izbjegla nepotrebna unakrsna kontaminacija otopina.
Potrebno je pridržavati se navedenih vremena za optimalne rezultate bojenja.

Stakalce s histološkim tkivom	
AFB-Color karbol fuksin otopina	30 min
Voda iz slavine	45 s
Klorovodična kiselina u etanolu	15 s
Voda iz slavine	15 s
Löfflerova metilensko plava otopina*	5 min
Isprati vodom iz slavine	10 s
Etanol 70 %	1 min
Etanol 70 %	1 min
Etanol 96 %	1 min
Etanol 96 %	1 min
Etanol 100 %	1 min
Etanol 100 %	1 min
Ksilen ili Neo-Clear™	5 min
Ksilen ili Neo-Clear™	5 min
Mokra stakalca s otopinom Neo-Clear™ poklopite otopinom Neo-Mount™ ili mokra stakalca s ksilenom npr. otopinom Novi Entellan™ i staklenim pokrovom.	

* Za kontrastno bojenje histoloških uzoraka preporučuje se razrjeđivanje Löfflerove otopine metilenskog modrila (razrjeđivanje destiliranom vodom u omjeru 1:10 (1+9)). Radna otopina može se rabiti do 2 tjedna.

Rezultat

Acidorezistentne bakterije	crveno
Pozadina	plava

Procjena

Pozitivan rezultat znači „prisutne acidorezistentne bakterije“, a negativan rezultat „acidorezistentne bakterije nisu prisutne“. Pozitivan rezultat ne znači da je moguća taksonomska klasifikacija mikroskopom. Ako se otkriju acidorezistentne bakterije, moraju se provesti dodatne analize u posebno opremljenim laboratorijima. Također, ne može se utvrditi ni vitalnost bakterija (aktivne, neaktivne).

Otklanjanje poteškoća
Fiksacija uzoraka razmaka

Neophodna je određena razina fiksiranja toplinom s pomoću Bunsenova plamenika da bi se spriječio zarazni potencijal uzorka i daljnje širenje bakterija.

Ne dolazi do bojenja acidorezistentne bakterije

Ključan korak tog postupka bojenja jest korak dekolorizacije, na koji može utjecati debljina razmaza uzorka.
Uz to, svježa otopina klorovodične kiseline u etanolu vrlo je reaktivna, zbog čega se rezultat mora pažljivo procijeniti. U koraku uklanjanja boje treba se precizno pridržavati vremena inkubacije navedenih u ovom protokolu jer inače mogu uslijediti lažno negativni rezultati.

Tehničke napomene

Upotrebljavani mikroskop mora zadovoljavati preduvjete medicinskog dijagnostičkog laboratorija.
Prilikom upotrebe automatske opreme za bojenje slijedite upute za uporabu dobavljača sustava i softvera.
Prije punjenja uklonite suvišno imerzijsko ulje.

Značajke analitičke učinkovitosti

„Löfflerova metilensko plava otopina“ boji i tako omogućava vizualizaciju bioloških struktura, kao što je opisano u poglavlju „Rezultat“ u ovim uputama za uporabu. Ovaj proizvod smiju upotrebljavati samo ovlaštene i kvalificirane osobe. To se, između ostaloga, odnosi na pripremu uzoraka i reagensa, rukovanje uzorcima, histološku obradu, donošenje odluka o odgovarajućim kontrolama itd.
Analitička učinkovitost ovog proizvoda potvrđena je ispitivanjem svake proizvodne serije. Uspješno redovito sudjelovanje u međunarodnim među-laboratorijskim ispitivanjima pruža dodatnu i nezavisnu potvrdu analitičke specifičnosti.
Za sljedeće je postupke bojenja potvrđena 100 %-tna analitička učinkovitost proizvoda u pogledu specifičnosti, osjetljivosti i ponovljivosti:

	Specifičnost među ispitivanjima	Osjetljivost među ispitivanjima	Specifičnost unutar ispitivanja	Osjetljivost unutar ispitivanja
Bakteriološko bojenje				
Acidorezistentne bakterije	20/20	20/20	7/7	7/7
Pozadina	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Rezultati analitičke učinkovitosti

Podaci dobiveni unutar ispitivanja (provedeno na istoj seriji) i među ispitivanjima (provedena na različitim serijama) pokazuju broj ispravno obojenih struktura s obzirom na broj provedenih ispitivanja.

Rezultati ove procjene učinkovitosti potvrđuju da je proizvod prikladan za predviđenu uporabu i da pouzdano djeluje.

Dijagnostika

Dijagnoze smije donositi jedino ovlašteno i kvalificirano osoblje.
Potrebno je upotrebljavati valjanu nomenklaturu.
Ova se metoda može koristiti kao dopuna u dijagnostici na ljudima.
Potrebno je odabrati i implementirati dodatne testove sukladno prepoznatim metodama.
Potrebno je provesti odgovarajuće kontrole prilikom svake primjene da bi se izbjegli neispravni rezultati.

Skладиštenje

Pohranite proizvod Löfflerova metilensko plava otopina - za mikroskopiju na +15 °C do +25 °C.

Rok uporabe

Löfflerova metilensko plava otopina – za mikroskopiju može se upotrebljavati do navedenog roka trajanja.
Nakon prvog otvaranja boce, sadržaj se može upotrebljavati do navedenog roka uporabe ako je pohranjen na +15 °C do +25 °C.
Boce moraju biti čvrsto zatvorene u svakom trenutku.

Kapacitet

oko 250 bojenja / 500 ml

Dodatne upute

Samo za profesionalnu uporabu.
Da bi se izbjegle pogreške, primjenu smije provoditi samo kvalificirano osoblje.
Potrebno je slijediti nacionalne smjernice za sigurnost na radu i osiguravanje kvalitete.
Potrebno je upotrebljavati mikroskope opremljene sukladno standardu. Ako je to potrebno, upotrebljavajte standardnu centrifugu prikladnu za medicinski dijagnostički laboratorij.

Zaštita od infekcije

Potrebno je poduzeti učinkovite mjere za zaštitu od infekcije sukladno smjernicama laboratorija.

Upute za odlaganje

Pakiranje se mora odložiti sukladno trenutnim smjernicama za odlaganje. Korištene otopine i otopine kojima je istekao rok uporabe moraju se odložiti kao poseban otpad sukladno lokalnim smjernicama. Informacije o odlaganju možete dobiti na brzoj poveznici „*Hints for Disposal of Microscopy Products*“

(Savjeti za odlaganju mikroskopskih proizvoda) na adresi www.microscopy-products.com. Unutar EU-a primjenjuje se trenutano primjenjiva UREDBA (EZ) br. 1272/2008 o razvrstavanju, označavanju i pakiranju tvari i smjesa, o izmjeni i stavljanju izvan snage Direktive 67/548/EZ i 1999/45/EZ i o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1907/2006.

Pomoćni reagensi

Kat. br. 1.00327	Kloridna kiselina u etanolu za mikroskopiju	1 l, 5 l
Kat. br. 1.00497	AFB-Color modificirani komplet za detekciju acidorezistentnih bakterije (AFB) vrućom metodom bojenja	1 set
Kat. br. 1.00579	Novi DPX nevodeni medij za poklapanje za mikroskopiju	500 ml
Kat. br. 1.04699	Imerziono ulje za mikroskopiju	Boca kapaljka od 100 ml, 100 ml, 500 ml
Kat. br. 1.07960	Entellan™, medij za brzo uklapanje za mikroskopiju	500 ml
Kat. br. 1.07961	Novi Entellan™ brzi medij za uklapanje za mikroskopiju	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. br. 1.08000	Sputofluol™ za mikroskopiju	1 l
Kat. br. 1.08298	Ksilen (izomerna smjesa) za histologiju	4 l
Kat. br. 1.08512	AFB-Color karbol fuksin otopina za mikroskopska istraživanja acidorezistentnih bakterije (AFB) (hladno bojenje)	500 ml, 2,5 l
Kat. br. 1.09016	Neo-Mount™ bezvodni medij za poklapanje za mikroskopiju	Boca kapaljka od 100 ml, 500 ml
Kat. br. 1.09215	Ziehl-Neelsenova otopina karbol fuksina za mikroskopiju	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat. br. 1.09843	Neo-Clear™ (zamjena za ksilen) za mikroskopiju	5 l

Klasifikacija rizika

Kat. br. 1.01287
Slijedite klasifikaciju rizika ispisanu na oznaci i informacije navedene na sigurnosno-tehničkom listu.
Sigurnosno-tehnički list dostupan je na web-mjestu i na zahtjev.

Glavne komponente proizvoda

Kat. br. 1.01287	
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0-8,6
1 l =	0,97 kg

Opća napomena

Ako se tijekom uporabe ovog uređaja ili zbog njegove uporabe dogodi ozbiljan štetni događaj, prijavite ga proizvođaču i/ili njegovom ovlaštenom zastupniku te nacionalnom nadležnom tijelu.

Književnost

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Zapaljiva tekućina i para.

P210: Čuvati odvojeno od topline, vrućih površina, iskri, otvorenih plamena i ostalih izvora paljenja. Ne pušiti.
P233: Čuvati u dobro zatvorenom spremniku.

The Life Science Business tvrtke Merck posluje kao MilliporeSigma u SAD-u i Kanadi.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germany i/ili društva-kćeri tog društva. Sva prava pridržana. Merck i Sigma-Aldrich u jarkim bojama zaštitni su znakovi društva Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Svi drugi zaštitni znakovi pripadaju odgovarajućim vlasnicima. Detaljne informacije o zaštitnim znakovima dostupne su putem javno dostupnih resursa.

HR
P240: Uzemljiti i učvrstiti spremnik i opremu za prihvrat kemikalije.
P241: Rabiti električnu/ ventilacijsku/ rasvjetnu /opremu koja neće izazvati eksploziju.
P242: Rabiti neiskreći alat.
P243: Poduzeti mjere za sprečavanje statičkog elektriciteta.

Povijest revizija

Verzija	Komentar o izmjeni
2024-Jul-01	Izvorna verzija s uvodom u povijest revizija
2024-Jul-01 V.2	Nema izmjena u prijevodu na hrvatski



Pročitajte upute za uporabu



Proizvođač



Kataloški broj



Kod serije



Oprez, pročitajte popratnu dokumentaciju



Upotrijebite do GGGG-MM-DD



Ograničenje temperature

Status: 2024-Jul-01 V.2

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroskopia

Błękit metylenowy Löfflera, roztwór

do mikroskopii

Wyłącznie do użytku przez specjalistów

IVD

Urządzenia medyczne do diagnostyki *in vitro*

CE

Przeznaczenie

„Błękit metylenowy Löfflera, roztwór – do mikroskopii” jest wykorzystywany w procesie medycznej diagnostyki komórek ludzkich i służy do bakteriologicznej i histologicznej oceny próbek pochodzenia ludzkiego. Jest to gotowy do użycia roztwór do barwienia, który w połączeniu z innymi dostępnymi w naszej ofercie wyrobami do diagnostyki *in vitro* umożliwia przygotowanie docelowych struktur (bakterii kwasoodpornych (AFB)) poprzez utrwalanie, barwienie, barwienie kontrastujące, zamykanie w preparatach bakteriologicznych i histologicznych, np. rozmazach wzbogaconych kultur bakterii lub wycinkach histologicznych (np. płuca), do celów diagnostycznych.

Niezabarwione struktury mają stosunkowo niski kontrast i są niezwykle trudne do odróżnienia pod mikroskopem świetlnym. Obrazy utworzone z użyciem roztworów barwiących pomagają upoważnionemu i wykwalifikowanemu badaczowi lepiej zdefiniować formę i strukturę w takich przypadkach. Aby postawić ostateczną diagnozę, należy wykonać dalsze badania, stosując uznane i sprawdzone metody.

Zasada działania

Ściany komórkowe bakterii kwasoodpornych zawierają dużą ilość wosków i lipidów, wskutek czego bardzo powoli wchłaniają barwniki. Najefektywniejszą metodą barwienia jest barwienie na gorąco metodą Ziehla-Neelsena. Metoda ta polega na pokryciu preparatu roztworem fuksyny karbolowej i ogrzaniu. Proces ogrzewania przyspiesza wchłanianie fuksyny i, co za tym idzie, powstawanie kompleksów mykolowo-fuksynowych w ścianie komórkowej.

Gdy bakterii kwasoodpornych wchłona fuksynę, ich ponowne odbarwienie jest niemal niemożliwe, nawet w przypadku intensywnego stosowania roztworu odbarwiającego takiego jak np. roztwór kwasu solnego w etanolu. Dlatego też bakterii kwasoodpornych klasyfikuje się jako kwaso- i alkoholoodporne dla celów barwienia, a pod mikroskopem przybierają one czerwone zabarwienie. Wszystkie drobnoustroje niekwasoodporne należy natomiast poddać barwieniu kontrastowemu odpowiednim barwnikiem. Aktualne instrukcje zakładają barwienie kontrastujące z użyciem błękitu metylenowego. Oczyszczenie próbek roztworem Sputofluol™ powoduje uwolnienie bakterii z otaczającej gęstej płwociny i materiału komórkowego.

Materiał próbek

Rozmazy materiału bakteriologicznego, które zostały wysuszone na powietrzu, utrwalone przez podgrzewanie i oczyszczone roztworem Sputofluol™, takie jak płwocina, rozmazy z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, płukanki, odciski, wysięki, ropa i kultury płynne lub stałe. Skrawki tkanek utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (skrawki parafinowe o grubości 3 - 4 µm)

Odczynniki

Nr kat. 1.01287 Błękit metylenowy Löfflera, roztwór 100 ml, 500 ml, 2,5 l do mikroskopii

Również wymagane:

Nr kat. 1.09215 Fuksyna karbolowa 100 ml, 500 ml, 2,5 l Ziehla-Neelsena, roztwór do mikroskopii

Nr kat. 1.08512 Roztwór fuksyny karbolowej 500 ml, 2,5 l AFB-Color do mikroskopowego badania bakterii kwasoodpornych (AFB) (barwienie na zimno)

Nr kat. 1.00327 Kwas solny, roztwór etanolowy 1 l, 5 l do mikroskopii

Nr kat. 1.08000 Sputofluol™ do mikroskopii

1 l

Rozwiązanie alternatywne:

Zamiast łączenia pojedynczych odczynników do rozmazów można użyć zestawu do barwienia 1.00497.0001:

Nr kat. 1.00497.0001 AFB-Color zmodyfikowany zestaw barwników do mikroskopowego badania bakterii kwasoodpornych (AFB) metodą barwienia na gorąco

1 set

Przygotowywanie próbek

Próbki muszą być pobierane przez wykwalifikowany personel.

Wszystkie próbki muszą być przetwarzane z użyciem najnowocześniejszych technologii.

Wszystkie próbki muszą być wyraźnie oznaczone.

Do pobierania i przygotowywania próbek należy używać odpowiednich instrumentów. Postępować zgodnie z instrukcjami producenta dotyczącymi zastosowania/użytkowania.

Podczas stosowania odpowiednich odczynników pomocniczych należy przestrzegać odpowiedniej instrukcji użytkowania.

Płwocina

Bakterii kwasoodpornych należy oczyścić roztworem Sputofluol™, aby uwolnić je ze śluzu i struktur komórkowych. W tym procesie substancja czynna – podchloryn – rozpuszcza materiał organiczny w drodze utleniania i delikatnie uwalnia bakterii kwasoodpornych, umożliwiając ich dalsze przetwarzanie.

Przygotowywanie odczynnika: Przygotowywanie 15% roztworu Sputofluol™

W celu przygotowania ok. 100 ml roztworu, należy zmieszać:

Sputofluol™	15 ml
Woda destylowana	85 ml

Przygotowywanie próbek w probówkach wirówkowych:

Próbka	1 część (min. 2 ml)
Roztwór Sputofluol™ (15% w wodzie destylowanej)	3 części
Energicznie wstrząsając.	10 min
Odwirować przy 3000 - 4800 obr./min.	20 min
Zdekantować supernatant Przygotować rozmazy osadu. Wysuszyć na powietrzu	

Materiał z punkcji, popłuczyny, osady

Po odpowiednim wzbogaceniu należy wykonać rozmaz materiału na szkiełku i pozostawić do wyschnięcia na powietrzu.

Próbki histologiczne:

Błękit metylenowy Löfflera, roztwór, należy stosować do barwienia skrawków histologicznych. Zwarta tkanka ma tendencję do przebarwiania; w przypadku takich tkanek zaleca się rozcieńczenie roztworu błękitu metylenowego Löfflera (rozcieńczenie: 1:10 (1+9) wodą destylowaną). Odparafinować skrawki w sposób konwencjonalny i uwodnić w malejącym szeregu alkoholowym. Czyszczenie roztworem Sputofluol™ nie jest wymagane w przypadku próbek utrwalonych w formalinie.

Utrwalanie próbek rozmazu

Próbki są utrwalane nad płomieniem palnika Bunsena (2-3 razy – należy uważać, aby nie dopuścić do nadmiernego ogrzania). Próbki można także utrwalic, ogrzewając je w temp. 100 - 110°C w suszarce lub na płytce do podgrzewania przez 20 min. Zbyt wysoka temperatura lub zbyt długie ogrzewanie może doprowadzić do pogorszenia wyników barwienia.

Przygotowywanie odczynnika

Błękit metylenowy Löfflera, roztwór – do mikroskopii, stosowany do barwienia rozmazów, jest gotowy do użycia i rozcieńczanie go nie jest wymagane – doprowadzi tylko do pogorszenia wyników barwienia i ich stabilności.

W przypadku skrawków histologicznych zaleca się rozcieńczenie roztworu błękitu metylenowego Löfflera (1+9 wodą destylowaną).

Procedura

Barwienie próbek rozmazu

Barwienie na statywie do barwienia

W celu zagwarantowania optymalnych rezultatów barwienia należy stosować się do zalecanych czasów.

Szkiełko z utrwalonym rozmazem		
Roztwór fuksyny karbolowej Ziehla-Neelsena	dokładnie przykryć, ostrożnie trzykrotnie ogrzać od spodu na palniku Bunsena aż do powstania pary. Nie dopuścić do zagotowania się roztworu do barwienia!	barwić łącznie przez 5 min.
Woda z kranu	spłukiwać aż do ustania powstawania obłoków barwnika.	
Kwas solny w etanolu	dokładnie przykryć i pozostawić do wystąpienia odczynu	15 - 30 sek.*
Woda z kranu	natychmiast spłukać.	
Błękit metylenowy Löfflera, roztwór	counterstaining, dokładnie przykryć i pozostawić do wystąpienia odczynu	30 sek.**
Woda z kranu	ostrożnie spłukać	
Osuszyć na powietrzu (np. przez noc lub w temp. 50°C w suszarce)		

* w zależności od grubości skrawka
**lub 1 min z użyciem rozcieńczonego błękitu metylenowego Löfflera, roztwór (rozcieńczenie: 1:10 (1+9) z wodą destylowaną)

Na potrzeby przechowywania preparatów bakteriologicznych przez kilka miesięcy zalecane jest użycie bezwodnego odczynnika do zamykania preparatów (np. Neo-Mount™, Entellan™, DPX nowy lub Entellan™ nowy) i szkiełka nakrywkowego. W tym celu należy bardzo dokładnie osuszyć barwione preparaty.
Użycie olejku immersyjnego jest zalecane na potrzeby analizy barwionych preparatów przy powiększeniu mikroskopowym >40x.

Barwienie próbek histologicznych

Barwienie w komorze

Preparaty histologiczne należy odparafinować w sposób konwencjonalny i uwodnić w szeregu roztworów alkoholu o malejących stężeniach.
Po każdym z etapów barwienia preparaty należy pozostawić do obcieknięcia, aby uniknąć niepotrzebnego krzyżowego zanieczyszczenia roztworów
Aby osiągnąć optymalny wynik, należy stosować się do zalecanych czasów barwienia.

Szkiełko z tkanką histologiczną	
Roztwór fuksyny karbolowej AFB-Color	30 min.
Bieżąca woda wodociągowa	45 sek.
Kwas solny w etanolu	15 sek.
Bieżąca woda wodociągowa	15 sek.
Błękit metylenowy Löfflera, roztwór*	5 min.
Opłukać wodą wodociągową	10 sek.
Etanol 70%	1 min.
Etanol 70%	1 min.
Etanol 96%	1 min.
Etanol 96%	1 min.
Etanol 100%	1 min.
Etanol 100%	1 min.
Ksylene lub Neo-Clear™	5 min.
Ksylene lub Neo-Clear™	5 min.
Preparaty nasączone roztworem Neo-Clear™ należy zamknąć, używając środka Neo-Mount™, a preparaty nasączone ksylenem należy zamknąć, używając np. preparatu Entellan™ nowy i szkiełka nakrywkowego.	

* Do barwienia kontrastowego próbek histologicznych zaleca się rozcieńczenie roztworu błękitu metylenowego Löfflera (rozcieńczenie: 1:10 (1+9) wodą destylowaną). To rozwiązanie robocze może być stosowane przez okres do 2 tygodni.

Wynik

Bakterii kwasoodporne	czerwony
Tło	niebieski

Ocena

Wynik dodatni oznacza obecność bakterii kwasoodpornych, a wynik ujemny – brak bakterii kwasoodpornych. Wynik pozytywny nie oznacza, że możliwa jest klasyfikacja taksonomiczna pod mikroskopem. W przypadku wykrycia bakterii kwasoodpornych należy przeprowadzić dalsze analizy w specjalnie wyposażonych laboratoriach. Nie można również ustalić żywotności bakterii (aktywne, nieaktywne).

Rozwiązywanie problemów

Utrwalanie próbek rozmazu

Odpowiedni stopień utrwalenia preparatów za pomocą palnika Bunsena lub suszarki ma zasadnicze znaczenie dla zapobiegania infekcjom i dalszemu namnażaniu się bakterii.

Brak wybarwienia bakterii kwasoodpornych

Krytycznym etapem tego procesu barwienia jest etap odbarwiania, na który może mieć wpływ grubość rozmazu próbki.
Ponadto świeży roztwór kwasu chlorowodorowego w etanolu jest wysoce reaktywny, co oznacza, że wynik należy oceniać ostrożnie. Należy ściśle przestrzegać podanych w niniejszej procedurze czasów inkubacji na etapie odbarwiania, gdyż w przeciwnym wypadku otrzymane wyniki mogą być fałszywie ujemne.

Uwagi techniczne

Używany mikroskop powinien spełniać wymogi laboratorium diagnostyki medycznej.
Podczas korzystania z automatycznych systemów barwiących należy postępować zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta systemu i oprogramowania.
Przed przystąpieniem do przechowywania należy usunąć nadmiar olejku immersyjnego.

Parametry wydajności analitycznej

„Błękit metylenowy Löfflera, roztwór” wybarwia i tym samym wizualizuje struktury biologiczne, jak opisano w rozdziale „Wynik” niniejszej Instrukcji obsługi (IFU). Produkt może być używany wyłącznie przez osoby upoważnione i wykwalifikowane. Dotyczy to między innymi przygotowania próbek i odczynników, postępowania z próbkami, obróbki histologicznej, decyzji dotyczących odpowiednich kontroli i innych.
Wydajność analityczna produktu jest potwierdzana poprzez testowanie każdej partii produkcyjnej. Regularny udział w międzynarodowych badaniach międzylaboratoryjnych stanowi dodatkowo, niezależne potwierdzenie swoistości analizy.
Dla poniższych barwników, w zakresie paramterów analitycznych wymienionych poniżej, potwierdzono, że wskaźnik swoistości, czułości i powtarzalności produktu wynosi 100%:

	Swoistość międzyse-ryjna	Czułość międzyse-ryjna	Swoistość wewnątrz-seryjna	Czułość wewnątrz-seryjna
Barwienie bakteriologiczne				
Bakterii kwasoodporne	20/20	20/20	7/7	7/7
Tło	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Wyniki analityczne

Dane wewnątrz- (wykonane na tej samej serii) i międzyseryjne (wykonane na różnych seriach) przedstawiają wiele prawidłowo wybarwionych struktur w stosunku do liczby wykonanych testów.

Wyniki niniejszej Oceny Wydajności potwierdzają, że produkt jest odpowiedni do zamierzonego zastosowania i działa niezawodnie.

Diagnostyka

Diagnozy może stawiać wyłącznie odpowiednio upoważniony i wykwalifikowany personel.
Należy stosować obowiązujące nazewnictwo.
Metodę tą można dodatkowo stosować w diagnostyce ludzkiej.
Należy wyznaczyć i przeprowadzić dalsze badania zgodnie z uznanymi metodami.
Podczas każdego zastosowania należy korzystać z materiałów kontrolnych w celu zweryfikowania wyników.

Przechowywanie

Błękit metylenowy Löfflera, roztwór – do mikroskopii należy przechowywać w temperaturze od +15°C do +25°C.

Okres przydatności do użycia

Błękit metylenowy Löfflera, roztwór – do mikroskopii nie należy używać po upływie wskazanego terminu przydatności do użycia.
Po otwarciu butelki po raz pierwszy zawartość nadaje się do użycia do wskazanego terminu przydatności do użycia, jeżeli wyrób jest przechowywany w temperaturze od +15°C do +25°C.
Podczas przechowywania butelki powinny zawsze pozostawać szczelnie zamknięte.

Pojemność

ok. 250 barwień/500 ml

Dodatkowe instrukcje

Wyłącznie do użytku przez specjalistów.
W celu uniknięcia błędów wyrobu powinien używać wyłącznie wykwalifikowany personel.
Należy przestrzegać krajowych wytycznych w zakresie bezpieczeństwa pracy i kontroli jakości.
Należy używać mikroskopów, których wyposażenie odpowiada obowiązującym normom.
W razie potrzeby należy użyć standardowej wirówki odpowiadającej wymogom laboratorium diagnostyki medycznej.

Ochrona przed zakażeniem

Należy stosować skuteczne środki ochrony przed zakażeniami zgodne z wytycznymi laboratoryjnymi.

Instrukcje dotyczące utylizacji

Opakowanie należy zutylizować zgodnie z obowiązującymi przepisami dotyczącymi usuwania odpadów. Zużyte roztwory i roztwory po terminie przydatności do użycia należy zutylizować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi odpadów specjalnych. Informacje dotyczące utylizacji można znaleźć, korzystając z łącza „Hints for Disposal of Microscopy Products” („Wskazówki dotyczące utylizacji produktów do mikroskopii”) w witrynie www.microscopy-products.com. Na terenie UE obowiązuje obecnie rozporządzenie (WE) nr 1272/2008 w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, zmieniające i uchylające dyrektywy 67/548/EWG i 1999/45/WE oraz zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1907/2006.

Odczynniki pomocnicze

Nr kat. 1.00327	Kwas solny, roztwór etanolowy do mikroskopii	1 l, 5 l
Nr kat. 1.00497	AFB-Color zmodyfikowany zestaw barwników do mikroskopowego badania bakterii kwasoopornych (AFB) metodą barwienia na gorąco	1 set
Nr kat. 1.00579	DPX nowy bezwodny środek do zamykania preparatów do mikroskopii	500 ml
Nr kat. 1.04699	Olejek imersyjny do mikroskopii	100 ml – butelka z zakraplaczem, 100 ml, 500 ml
Nr kat. 1.07960	Entellan™ środek do szybkiego zamykania preparatów mikroskopowych	500 ml
Nr kat. 1.07961	Entellan™ nowy środek do szybkiego zamykania preparatów mikroskopowych	100 ml, 500 ml, 1 l
Nr kat. 1.08000	Sputofluol™ do mikroskopii	1 l
Nr kat. 1.08298	Ksylan (mieszanina izomerów) do histologii	4 l
Nr kat. 1.08512	Roztwór fuksyny karbolowej AFB-Color do mikroskopowego badania bakterii kwasoopornych (AFB) (barwienie na zimno)	500 ml, 2,5 l
Nr kat. 1.09016	Neo-Mount™ bezwodny środek do zamykania preparatów do mikroskopii	100 ml – butelka z zakraplaczem, 500 ml
Nr kat. 1.09215	Fuksyna karbolowa Ziehla-Neelsena, roztwór do mikroskopii	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Nr kat. 1.09843	Neo-Clear™ (zamiennik ksylenu) do mikroskopii	5 l

Klasyfikacja zagrożeń

Nr kat. 1.01287
Należy stosować się do klasyfikacji zagrożeń wydrukowanej na etykiecie i informacji podanych w karcie charakterystyki substancji chemicznej. Karta charakterystyki substancji chemicznej jest dostępna w witrynie internetowej i na żądanie.

Główne składniki produktów

Nr kat. 1.01287	
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 - 8,6
1 l = 0,97 kg	

Uwaga ogólna

Jeśli podczas użytkowania tego urządzenia lub w wyniku jego użytkowania wystąpił poważny incydent, to należy zgłosić to producentowi i/lub jego upoważnionemu przedstawicielowi oraz organowi krajowemu.

Literatura

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage

Działalność w segmencie Life Science firmy Merck odbywa się pod marką MilliporeSigma w USA i Kanadzie.
© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germany i/lub jej spółki stowarzyszone. Wszelkie prawa zastrzeżone. Merck i Sigma-Aldrich to znaki towarowe firmy Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Wszystkie inne znaki towarowe należą do ich właścicieli. Szczegółowe informacje na temat znaków towarowych są dostępne w publicznie dostępnych zasobach.

PL
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Edition



- H226: Łatwopalna ciecz i pary.
- P210: Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić.
- P233: Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty.
- P240: Uziemić/połączyć pojemnik i sprzęt odbiorczy.
- P241: Używać elektrycznego/ wentylującego/ oświetleniowego/ przeciwwybuchowego sprzętu.
- P242: Używać nieiskrzących narzędzi.
- P243: Podjąć działania zapobiegające wyladowaniom elektrostatycznym.

Historia zmian

Wersja	Komentarz do modyfikacji
2024-Jul-01	Pierwsza wersja z wprowadzoną historią zmian
2024-Jul-01 V.2	Brak zmian w tłumaczeniu na język polski

Zapoznać się z instrukcją użytkowania

Producent

Numer katalogowy

Kod partii

Uwaga: należy zapoznać się z dokumentacją towarzyszącą.

Termin przydatności do użycia: RRRR-MM-DD

Ograniczenia termiczne

Status: 2024-Jul-01 V.2

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Microscopia

Solução de azul de metileno de Löffler

para microscopia

Apenas para uso profissional

IVD

Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



Finalidade prevista

Esta "Solução de azul de metileno de Löffler - para microscopia" é utilizada para o diagnóstico médico de células humanas e serve para a investigação bacteriológica e histológica de material de amostra de origem humana. Trata-se de uma solução de coloração pronta a usar que, quando utilizada em conjunto com outros produtos de diagnóstico *in vitro* do nosso portefólio, torna as estruturas alvo avaliáveis para fins de diagnóstico [bactérias ácido-resistentes (AFB)] através da fixação, coloração, contracoloração, montagem) em materiais bacteriológicos para amostras, por exemplo, esfregaços de culturas bacterianas enriquecidas ou cortes histológicos, por exemplo, do pulmão.

As estruturas não coradas têm um contraste relativamente baixo e são extremamente difíceis de distinguir sob microscopia ótica. As imagens criadas utilizando as soluções de coloração ajudam o investigador autorizado e qualificado a definir melhor a forma e a estrutura nesses casos. Devem ser realizados testes adicionais, de acordo com métodos válidos e reconhecidos, para alcançar um diagnóstico definitivo.

Princípio

A parede celular de bactérias ácido-resistentes tem uma elevada proporção de cera e lípidos e, por conseguinte, absorve corantes muito lentamente. O método de coloração mais eficiente é a coloração quente segundo Ziehl-Neelsen. Neste método, uma solução de carbol-fucsina é aplicada à amostra e aquecida. Este processo de aquecimento acelera a taxa à qual o corante de fucsina é absorvido e, assim, também a da formação do complexo de micolato-fucsina na parede celular. Após as bactérias ácido-resistentes absorverem o corante fucsina, é praticamente impossível descolorá-las novamente, mesmo quando são intensivamente tratadas com uma solução descolorante como, por exemplo, ácido clorídrico em etanol. Por conseguinte, as bactérias ácido-resistentes são denominadas como resistentes a ácido e álcool para coloração e são coradas a vermelho na visualização microscópica. Consequentemente, todos os microrganismos não resistentes a ácidos são contracolorados com um corante adequado. Nestas instruções de utilização, é utilizado o azul de metileno para contracoloração. O pré-tratamento das amostras com Sputofluor™ dissolve as bactérias da expectoração viscosa circundante e do material celular.

Material da amostra

Esfregaços de material bacteriológico que tenham sido secos ao ar, fixados pelo calor e pré-tratados com Sputofluor™, tipo expectoração, esfregaços de biopsias por aspiração com agulha fina (FNAB), lavagens, impressões, efusões, pus, exsudatos, culturas líquidas e sólidas. Cortes de tecido fixado em formalina e envolvido em parafina (cortes de parafina com 3 - 4 µm de espessura).

Reagentes

N.º de cat. 1.01287

Solução de azul de metileno de Löffler 100 ml, 500 ml, 2,5 l para microscopia

Também necessário:

N.º de cat. 1.09215	Solução de carbol fucsina de Ziehl-Neelsen para microscopia	100 ml, 500 ml, 2,5 l
N.º de cat. 1.08512	AFB-Color solução de carbol-fucsina para a investigação microscópica de bactérias ácidorresistentes (AFB) (coloração a frio)	500 ml, 2,5 l
N.º de cat. 1.00327	Ácido clorídrico em etanol para microscopia	1 l, 5 l
N.º de cat. 1.08000	Sputofluor™ para microscopia	1 l

Em alternativa:

Em vez da combinação de reagentes individuais, pode ser utilizado o kit de coloração 1.00497.0001 para esfregaços:

N.º de cat. 1.00497.0001

Kit de coloração AFB-Color modificado para deteção de bactérias ácido-resistentes (AFB) por método de coloração a quente

1 conjunto

Preparação de amostras

A amostragem deve ser efetuada por pessoal qualificado.

Todas as amostras devem ser tratadas utilizando tecnologia de ponta.

Todas as amostras devem ser claramente rotuladas.

Devem ser utilizados instrumentos adequados para a colheita de amostras e a respetiva preparação. Seguir as instruções do fabricante para a aplicação/utilização.

Ao utilizar os reagentes auxiliares correspondentes, devem ser respeitadas as instruções de utilização correspondentes.

Expetoração

As bactérias ácido-resistentes devem ser pré-tratadas com Sputofluor™ para as dissolver do muco e das estruturas celulares. Neste processo, o ingrediente ativo hipoclorito dissolve o material orgânico por oxidação e liberta suavemente as bactérias ácido-resistentes para que possam continuar a ser processadas.

Preparação de reagentes: Preparação da solução Sputofluor™ a 15%

Para a preparação de aproximadamente 100 ml de mistura de solução:

Sputofluor™	15 ml
Água destilada	85 ml

Preparação do material da amostra em tubos de centrífuga:	
Amostra	1 parte (mín. 2 ml)
Solução de Sputofluor™ (15% em água destilada)	3 partes
Agitar vigorosamente	10 min
Centrifugar a 3000 - 4800 rpm	20 min
Sobrenadante decante Preparar os esfregaços do sedimento Secar ao ar	

Punções, lavagens, sedimentos

Após as medidas de enriquecimento adequadas, espalhe material de amostra na lâmina e deixe secar ao ar.

Cortes histológicos

A solução de azul de metileno de Löffler deve ser utilizada para corar cortes histológicos. O tecido compacto tem tendência a ficar demasiado manchado; para estes tecidos, recomenda-se uma diluição da solução de azul de metileno de Löffler (diluição: 1:10 (1+9) com água destilada). Desparafinar os cortes da forma convencional e voltar a hidratar numa série de álcool descendente. O pré-tratamento com Sputofluor™ não é necessário para amostras fixadas com formalina.

Fixação de amostras de esfregaço

As amostras são fixadas sobre uma chama de bico de Bunsen (2 - 3 vezes, tendo o cuidado de evitar aquecimento excessivo). As amostras também podem ser fixadas aquecendo a 100 - 110 °C numa cabina de secagem ou numa placa de aquecimento durante 20 minutos. Temperaturas excessivas ou um aquecimento prolongado podem envolver uma deterioração do desempenho da coloração.

Preparação de reagentes

A solução de azul de metileno de Löffler - para microscopia utilizada para esfregaços de coloração está pronta a usar. A diluição da solução não é necessária e apenas produz uma deterioração do resultado da coloração e da sua estabilidade.

Para cortes histológicos, recomenda-se uma diluição da solução de azul de metileno de Löffler (1+9 com água destilada).

Procedimento

Coloração de amostras de esfregaço

Coloração no suporte de coloração

Os tempos indicados devem ser respeitados para garantir um resultado de coloração ideal.

Lâmina com esfregação fixo		
Solução de carbolfucsina Ziehl-Neelsen	cubra completamente, aqueça cuidadosamente três vezes a partir de baixo com o bico de Bunsen até formar vapor Não deixe ferver a solução de coloração!	core durante 5 minutos no total
Água da torneira	enxaguar até deixarem de ser produzidas nuvens de corante	
Ácido clorídrico em etanol	cobrir completamente e deixar reagir	15 - 30 s*
Água da torneira	enxaguar imediatamente	
Solução de azul de metileno de Löffler	contracoloração, cubra completamente e deixe reagir	30 seg**
Água da torneira	enxaguar cuidadosamente	
Secar ao ar (por exemplo, durante a noite ou a 50°C na cabina de secagem)		

* dependendo da espessura da amostra
** ou 1 min com solução diluída de azul de metileno de Löffler (dilução: 1:10 (1+9) com água destilada)

A cobertura com meios de montagem não aquosos (por exemplo, Neo-Mount™, Entellan™, DPX new ou Entellan™ new) e um vidro de cobertura é recomendada para o armazenamento de amostras bacteriológicas durante vários meses. Para este efeito, as amostras coradas têm de ser muito bem secas.
Recomenda-se a utilização de óleo de imersão para a análise de lâminas coradas com ampliação microscópica > 40×.

Coloração de amostras histológicas

Coloração na célula de coloração

Desparafinar as lâminas histológicas da forma convencional e voltar a hidratar numa série de álcool descendente.
As lâminas têm de ser imersas e movimentadas brevemente nas soluções. A imersão simples produz resultados de coloração inadequados.
As lâminas devem escorrer bem após as etapas de coloração individuais, como medida para evitar qualquer contaminação cruzada desnecessária de soluções.

Lâmina com tecido histológico	
Solução de carbolfucsina AFB-Color	30 min
Água da torneira corrente	45 seg
Ácido clorídrico em etanol	15 seg
Água da torneira corrente	15 seg
Solução de azul de metileno de Löffler*	5 min
Lavar com água da torneira	10 seg
Etanol 70%	1 min
Etanol 70%	1 min
Etanol 96%	1 min
Etanol 96%	1 min
Etanol 100%	1 min
Etanol 100%	1 min
Xileno ou Neo-Clear™	5 min
Xileno ou Neo-Clear™	5 min
Montar as lâminas húmidas Neo-Clear™ com Neo-Mount™ ou as lâminas húmidas com xileno com, por exemplo, Entellan™ new e vidro de cobertura.	

* Para a contracoloração de amostras histológicas, recomenda-se uma diluição da solução de azul de metileno de Löffler (dilução: 1:10 (1+9) com água destilada). Esta solução de trabalho pode ser utilizada durante até 2 semanas.

Resultado

Bactérias ácido-resistentes	vermelho
Histórico	azul

Avaliação

Um resultado positivo significa "bactérias ácido-resistentes detetadas" e um resultado negativo "bactérias ácido-resistentes não detetadas". Um resultado positivo não significa que seja possível uma classificação taxonómica por microscopia. Se forem detetadas bactérias ácido-resistentes, devem ser realizadas análises adicionais em laboratórios especialmente equipados.
A vitalidade (ativa, inativa) das bactérias também não pode ser determinada.

Resolução de problemas

Fixação de amostras de esfregação

Um grau suficiente de fixação térmica utilizando um bico de Bunsen ou uma cabina de aquecimento é essencial para evitar o potencial infecioso das amostras e a proliferação adicional das bactérias.

Sem coloração de bactérias ácido-resistentes

A etapa crítica deste processo de coloração é a etapa de descoloração, que pode ser influenciada pela espessura do esfregação da amostra. Além disso, uma solução fresca de ácido clorídrico em etanol é altamente reativa, isto significa que o resultado deve ser avaliado com precaução. Os tempos de incubação indicados neste protocolo devem ser respeitados com exatidão na etapa de descoloração, caso contrário podem ocorrer resultados falsos negativos.

Notas técnicas

O microscópio utilizado deve cumprir os requisitos de um laboratório de diagnóstico médico.
Ao utilizar sistemas de coloração automática, siga as instruções de utilização fornecidas pelo fornecedor do sistema e do software.
Remova o óleo de imersão em excesso antes de limar.

Características de desempenho analítico

A "Solução de azul de metileno de Löffler" colora e, assim, visualiza estruturas biológicas, conforme descrito no capítulo "Resultado" destas instruções de utilização. A utilização do produto só deve ser efetuada por pessoas autorizadas e qualificadas, o que inclui, entre outras tarefas, preparação de amostras e reagentes, manuseamento de amostras, processamento histológico, decisões relativas a controlos adequados, entre outros.
O desempenho analítico do produto é confirmado testando cada lote de produção. A regular participação bem-sucedida em testes interlaboratoriais internacionais fornece uma confirmação adicional e não afiliada da especificidade analítica.
Para as seguintes colorações, o desempenho analítico foi confirmado em termos de especificidade, sensibilidade e repetibilidade do produto com uma taxa de 100%:

	Especi-fidade interensaio	Sensi-bilidade interensaio	Especi-fidade intraensaio	Sensi-bilidade intraensaio
Bacteriológico				
coloração				
Bactérias ácido-resistentes	20/20	20/20	7/7	7/7
Histórico	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Resultados de desempenho analítico

Os dados intraensaio (realizados no mesmo lote) e interensaio (realizados em lotes diferentes) indicam o número de estruturas coradas corretamente em relação ao número de ensaios realizados.

Os resultados desta avaliação de desempenho confirmam que o produto é adequado para a utilização prevista e tem um desempenho fiável.

Diagnóstico

Os diagnósticos devem ser efetuados apenas por pessoal autorizado e qualificado.
Têm de ser utilizadas nomenclaturas válidas.
Este método pode ser utilizado de forma complementar no diagnóstico humano.
Devem ser selecionados e implementados testes adicionais de acordo com métodos reconhecidos.
Devem ser efetuados controlos adequados em cada aplicação, de forma a evitar um resultado incorreto.

Armazenamento

Conservar a solução de azul de metileno de Löffler - para microscopia, entre +15 °C e +25 °C.

Durabilidade

A solução de azul de metileno de Löffler - para microscopia pode ser utilizada até à data de validade indicada.
Após a primeira abertura do frasco, o conteúdo pode ser utilizado até à data de validade indicada, quando conservado entre +15 °C e +25 °C.
Os frascos devem ser sempre mantidos bem fechados.

Capacidade

aprox. 250 colorações/500 ml

Instruções adicionais

Apenas para uso profissional.
Para evitar erros, a aplicação deve ser efetuada apenas por pessoal qualificado.
Devem ser seguidas as diretrizes nacionais para a segurança no trabalho e a garantia da qualidade.
Devem ser utilizados microscópios equipados de acordo com a norma.

Se necessário, utilize uma centrífugadora padrão adequada para um laboratório de diagnóstico médico.

Proteção contra infeções

Devem ser tomadas medidas eficazes para proteger contra infeções, em conformidade com as diretrizes laboratoriais.

Instruções para eliminação

A embalagem deve ser eliminada de acordo com as diretrizes de eliminação atuais.
As soluções usadas e as soluções cuja durabilidade tenha expirado devem ser eliminadas como resíduos especiais, de acordo com as diretrizes locais. As informações sobre a eliminação podem ser obtidas através da ligação rápida "Hints for Disposal of Microscopy Products" (Sugestões para a eliminação de produtos de microscopia) em www.microscopy-products.com. Na UE, é aplicável o REGULAMENTO (CE) n.º 1272/2008 relativo à classificação, rotulagem e embalagem de substâncias e misturas, que altera e revoga as Diretivas 67/548/CEE e 1999/45/CE, e altera o Regulamento (CE) n.º 1907/2006.

Reagentes auxiliares

N.º de cat. 1.00327	Ácido clorídrico em etanol para microscopia	1 l, 5 l
N.º de cat. 1.00497	AFB-Color Modificado kit de coloração para detecção de bactérias ácidorresistentes por método de coloração a quente	1 conjunto
N.º de cat. 1.00579	DPX novo meio de montagem não aquoso para uso em microscopia	500 ml
N.º de cat. 1.04699	Óleo de imersão para microscopia	Frasco conta-gotas de 100 ml, 100 ml, 500 ml, 500 ml
N.º de cat. 1.07960	Entellan® Meio de montagem rápido para a microscopia	
N.º de cat. 1.07961	Entellan® Novo meio de montagem rápido para microscopia	100 ml, 500 ml, 1 l
N.º de cat. 1.08000	Sputofluo TM para microscopia	1 l
N.º de cat. 1.08298	Xileno (mistura de isómeros) para histologia	4 l
N.º de cat. 1.08512	AFB-Color solução de carbol-fucsina para a investigação microscópica de bactérias ácidorresistentes (AFB) (coloração a frio)	500 ml, 2,5 l
N.º de cat. 1.09016	Neo-Mount® Meio de montagem anidro para microscopia	Frasco conta-gotas de 100 ml, 500 ml
N.º de cat. 1.09215	Solução de carbol fucsina de Ziehl-Neelsen para microscopia	100 ml, 500 ml, 2,5 l
N.º de cat. 1.09843	Neo-Clear TM (substituto do xileno) para microscopia	5 l

Classificação de perigo

N.º de cat. 1.01287
Respeite a classificação de perigo impressa no rótulo e as informações fornecidas na ficha de dados de segurança. A ficha de dados de segurança está disponível no website e mediante pedido.

Componentes principais do produto

N.º de cat. 1.01287	
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 - 8,6
1 l =	0,97 kg

Observação geral

Se, durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da utilização do mesmo, tiver ocorrido um incidente grave, comunique-o ao fabricante e/ou ao representante autorizado e à sua autoridade nacional.

Bibliografia

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Líquido e vapores inflamáveis.

- P210: Mantenha afastado do calor/ faísca/ chama aberta/ superfícies quentes.- Não fume.
P233: Mantenha o recipiente hermeticamente fechado.
P240: Aterre e vincule o recipiente e equipamento de recepção.
P241: Utilize equipamento elétrico/ de ventilação/ de iluminação à prova de explosão.
P242: Use ferramentas que não produzam faíscas.
P243: Previna-se para evitar descargas estáticas.

Histórico de revisões

Versão	Comentário à modificação
2024-Jul-01	Versão inicial com a introdução do histórico de revisões
2024-Jul-01 V.2	Nenhuma alteração na tradução para português



Consultar as instruções de utilização



Fabricante



Número de Catálogo



Código de lote



Atenção, consultar os documentos anexos.



Utilizar até AAAA-MM-DD



Limites de temperatura

Status: 2024-Jul-01 V.2

O sector Life Science da Merck opera como MilliporeSigma nos EUA e Canadá.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germany e/ou as suas sociedades afiliadas. Todos os direitos reservados. Merck e Sigma-Aldrich são marcas comerciais da Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Todas as outras marcas comerciais são propriedade dos seus respetivos proprietários. Para informações pormenorizadas em matéria de marcas comerciais consultar os recursos disponíveis ao público.



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



1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Microscopy

Метиленово синьо разтвор по Льофлер

за микроскопия

Само за професионална употреба

IVD

Медицинско изделие за *in vitro* диагностика

CE

Предназначение

Метиленово синьо разтвор по Льофлер за микроскопия се използва за медицинска диагностика на човешки клетки с цел бактериологични и хистологични изследвания на материал за проби от човешки произход. Този готов за употреба оцветяващ разтвор, използван заедно с други продукти за *in vitro* диагностика от нашето портфолио, позволява оценката на бактериални прицелни структури с диагностична цел (киселиноустойчиви бактерии (AFB)) чрез фиксиране, влагане, оцветяване, контраоцветяване, включване в среда в материали от човешки бактериологични и хистологични проби, например намазки от обогатени бактериални култури или хистологични срези от напр. белия дроб.

Неоцветените структури са с относително нисък контраст и са изключително трудни за разграничаване под светлинен микроскоп. Изображенията, създадени с помощта на разтворите за оцветяване, служат на оторизирани и квалифицирани патолози като помощно средство за по-добро дефиниране на формата и структурата в такива случаи. За поставяне на окончателната диагноза е необходимо да се проведат допълнителни изследвания в съответствие с признатите валидни методи.

Принцип

В клетъчната стена на киселиноустойчивите бактерии има висок процент въглерод и липиди и затова багрилата се абсорбират много бавно. Най-ефективният метод за оцветяване е горещото оцветяване по Ziehl-Neelsen. При този метод върху пробата се прилага разтвор на карболфуксин и се нагрява. Този процес на нагряване ускорява абсорбцията на фукиновото багрило и по този начин и образуването на миколатфукиновия комплекс в клетъчната стена. След като киселиноустойчивите бактерии са абсорбирали багрилото фуксин, практически е невъзможно да ги обезцветите отново, дори когато са интензивно третирани с обезцветяващ разтвор като напр. солна киселина в етанол. Следователно киселиноустойчивите бактерии се наричат киселино- и алкохолно-устойчиви за оцветяване и се оцветяват в червено при микроскопска визуализация. Съответно всички не-киселиноустойчиви микроорганизми се оцветяват с подходящо багрило. В тази инструкция за употреба метиленовото синьо се използва за контраоцветяване.

Предварителна обработка на пробите със Sputofluor™ разтваря бактериите от заобикалящия висциден секрет и клетъчен материал.

Материал за проби

Намазки от бактериологичен материал, който е изсушен на въздух, топлинно фиксиран и предварително обработен със Sputofluor™ като храчка, намазки от тънкоиглена аспирационна биопсия (FNAB), изплаквания, отпечатъци, изливи, гной, ексудати, течни и твърди култури. Срези фиксирана във формалин, вложена в парафин тъкан (парафинови срези с дебелина 3-4 µm)

Реактиви

Кат. № 1.01287

Метиленово синьо разтвор по Льофлер 100 ml, 500 ml, 2,5 l за микроскопия

Също така е необходимо следното:

Кат. № 1.09215 Карбол-фуксин разтвор на Цил-Нилсен 100 ml, 500 ml, за микроскопия 2,5 l

Кат. № 1.08512 AFB-Color Карбол-фуксин разтвор 500 ml, 2,5 l за изследване под микроскоп на киселиноустойчиви бактерии (acid-fast bacteria, AFB) (студено оцветяване)

Кат. № 1.00327 Солна киселина в етанол за микроскопия

1 l, 5 l

Кат. № 1.08000 Sputofluor™ за микроскопия

1 l

Като алтернатива:

Вместо комбинация от единични реактиви, за намазки може да се използва наборът за оцветяване 1.00497.0001:

Кат. № 1.00497.0001

AFB-Color модифициран

1 набор

Набор за оцветяване за детекция на киселиноустойчиви бактерии (acid-fast bacteria, AFB) по метода на топло оцветяване

Подготовка на пробите

Вземането на проби трябва да се извършва от квалифициран персонал.

Всички проби трябва да се обработват с помощта на най-съвременна технология.

Всички проби трябва да обозначат ясно посредством етикети.

За вземането и подготовката на пробите трябва да се използват подходящи апарати. Следвайте инструкциите на производителя по отношение на приложението / употребата.

При използване на съответните помощни реактиви трябва да се спазват съответстващите им инструкции за употреба.

Храчка

Киселиноустойчивите бактерии трябва да бъдат предварително третирани със Sputofluor™, за да се разтворят слузта и клетъчните структури от тях. В този процес активната съставка хипохлорит разтваря органичния материал чрез окисление и внимателно освобождава киселиноустойчивите бактерии, така че да могат да се обработят допълнително.

Подготовка на реактивите: Подготовка на Sputofluor™ разтвор 15%

За подготовката на приблиз. 100 ml смес на разтвора:

Sputofluor™	15 ml
Дестилирана вода	85 ml

Подготовка на материала за проби в центрофужни епруветки:	
Проба	1 част (мин. 2 ml)
Sputofluor™ разтвор (15% в дестилирана вода)	3 части
Разклатете енергично	10 min
Центрофугирайте при 3 000-4 800 rpm	20 min
Декантирайте супернатанта Пригответе намазки от седимента Изсушете на въздух	

Пунктати, лаважи, седименти

След подходящи мерки за обогатяване, намажете материала на пробата върху предметното стъкло и оставете да изсъхне на въздух.

Хистологични срези

Метиленово синьо разтвор по Льофлер следва да се използва за оцветяване на хистологични срези. При компактните тъкани обикновено се наблюдава прекомерно оцветяване. За такива тъкани се препоръчва разреждане на разтвора на метиленово синьо на Löffler (разреждане: 1:10 (1+9) с дестилирана вода).

Срезите следва да се депарафинизират по конвенционален начин и да се рехидратират в низходяща последователност в спирт. Предварителна обработка със Sputofluor™ не е необходима за проби, фиксирани с формалин.

Фиксиране на проби намазки

Пробите се фиксират с помощта на горелка Bunsen (2-3 пъти, като се внимава да се избегне прекомерно нагряване).

Пробите могат също така да се фиксират чрез нагряване при 100-110 °C в сушилен шкаф или върху нагревателна плоча за 20 min. Прекомерните температури или продължителното нагряване могат да доведат до влошаване на характеристиките на оцветяване.

Подготовка на реактивите

Метиленово синьо разтвор по Льофлер за микроскопия, използван за оцветяване на намазки, е готов за употреба и не е необходимо разреждане на разтвора, което само би довело до влошаване на резултата от оцветяването и на стабилността.

За хистологични срези се препоръчва разреждане на Метиленово синьо разтвор по Льофлер (1+9 с дестилирана вода).

Процедура

Оцветяване на проби намазки

Оцветяване на в статива за оцветяване

За да се гарантира оптималният резултат от оцветяването, е необходимо да се спазва посоченото време.

Предметно стъкло с фиксирана намазка

Ziehl-Neelsen разтвор на карболфуксин

покрийте напълно, внимателно загрейте три пъти отдолу с помощта на горелка Bunsen, докато се образува пара
Не позволявайте разтворът за оцветяване да заври!

оцветете общо за 5 min

Чешмяна вода

Солна киселина в етанол

покрийте цялостно и оставете да реагира

15-30 sec*

Чешмяна вода

Метиленово синьо разтвор по Льофлер

контраоцветяване, покрива се цялостно и се оставя да реагира

30 sec**

Чешмяна вода

Изсушете на въздух (напр. през нощта или при 50°C в сушилният шкаф)

* в зависимост от дебелината на пробата

**или 1 min с разреден Метиленово синьо разтвор по Льофлер (разреждане: 1:10 (1+9) с дест. вода)

За съхранение на бактериологични проби в продължение на няколко месеца се препоръчва покриването им в безводна включваща среда (напр. Neo-Mount™, Entellan™, DPX new или Entellan™ new) и покривно стъкло. За целта оцветените проби трябва да се изсушат много добре. За анализ на оцветените предметни стъкла се препоръчва употребата на имерсионно масло с микроскопско увеличение > 40x.

Оцветяване на хистологични проби

Оцветяване в оцветителната клетка

Хистологичните предметни стъкла следва да се депарафинизират по конвенционалния начин и да се рехидратират в низходяща последователност в спирт.

Предметните стъкла трябва да се потопят и раздвижат за кратко в разтворите. Ако бъдат само потопени, без раздвижване, може да се получат неадекватни резултати от оцветяването.

Предметните стъкла трябва да се оставят да се отцедят добре след отделните етапи на оцветяване, като мярка за избягване на ненужно кръстосано замърсяване на разтворите.

Предметно стъкло с хистологична тъкан	
AFB-цветя карбол фуксин разтвор	30 min
Течаща чешмяна вода	45 sec
Солна киселина в етанол	15 sec
Течаща чешмяна вода	15 sec
Метиленово синьо разтвор по Льофлер *	5 min
Измийте с чешмяна вода	10 sec
Етанол 70%	1 min
Етанол 70%	1 min
Етанол 96%	1 min
Етанол 96%	1 min
Етанол 100%	1 min
Етанол 100%	1 min
Ксилол или Neo-Clear™	5 min
Ксилол или Neo-Clear™	5 min
Включете навлажнените с Neo-Clear™ предметни стъкла в Neo-Mount™ или навлажнените с ксилол предметни стъкла в напр. Entellan™ new и поставете покривно стъкло.	

* За контраоцветяване на хистологични проби се препоръчва разреждане на Метиленово синьо разтвор по Льофлер (разреждане: 1:10 (1+9) с дестилирана вода). Този работен разтвор може да се използва до 2 седмици.

Резултат

Киселиноустойчиви бактерии	червено
Фон	синьо

Оценка

Положителен резултат означава „открити киселиноустойчиви бактерии“, а отрицателен резултат - „не са открити киселиноустойчиви бактерии“. Положителният резултат не означава, че е възможна таксономична

класификация чрез микроскопия. Ако бъдат открити киселиноустойчиви бактерии, трябва да се извършат допълнителни анализи в специално оборудвани лаборатории. Жизнеността (активна, неактивна) на бактериите също не може да се определи.

Отстраняване на проблеми

Фиксиране на проби намазки

За предотвратяване на инфекциозния потенциал на пробите и по-нататъшното разпространение на бактериите е съществено важно да бъдат топлинно фиксирани в достатъчна степен с помощта на горелка Bunsen или в нагревателен шкаф.

Без оцветяване на киселиноустойчиви бактерии

Етапът, който е от съществено важно значение за този процес на оцветяване е стъпката на обезцветяване, която може да бъде повлияна от дебелината на намазката на пробата. Освен това пресният разтвор на солна киселина в етанол е силно реактивен, което означава, че резултатът трябва да се оценява внимателно. Инкубационните времена, посочени в този протокол, трябва да се спазват точно в етапа на обезцветяване, тъй като в противен случай може да се получат фалшиво отрицателни резултати.

Технически забележки

Използваният микроскоп трябва да отговаря на медико-диагностичните лабораторни изисквания. При използване на автоматични системи за оцветяване трябва да се следват инструкциите за употреба, предоставени от доставчика на системата и софтуера. Отстранете излишното имерсионно масло преди напълване.

Работни характеристики на анализа

Метиленово синьо разтвор по Льофлер оцветява и по този начин визуализира биологични структури, както е описано в раздел „Резултат“ на тези инструкции за употреба. Продуктът трябва да се използва само от упълномощени и квалифицирани лица по отношение на, но без да се изключват и други неща, подготовката на пробите и реактивите, обработката на пробите, хистологичната обработка, вземането на решения относно подходящите контроли и др.

Аналитичните характеристики на продукта са потвърдени чрез тестване на всяка производствена партида. Успешното редовно участие в международни междублабораторни тестове дава допълнително и необвързано потвърждение на аналитичната специфичност.

Аналитичните характеристики за следните петна бяха потвърдени по отношение на специфичност, чувствителност и повтаряемост на продукта със степен 100%:

	Специ- фичност между анализите	Чувстви- телност между анализите	Специ- фичност в рамките на ана- лиза	Чувстви- телност в рамките на ана- лиза
Бактериологично				
оцветяване				
Киселиноустой- чиви бактерии	20/20	20/20	7/7	7/7
Фон	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Резултати от аналитичните характеристики

Данните в рамките на анализа (извършено с една и съща партида) и между анализите (извършени с различни партии) посочват броя на правилно оцветените структури във връзка с броя на извършените анализи.

Резултатите от тази оценка на работните характеристики потвърждават, че продуктът е годен за предназначението и работи надеждно.

Диагностика

Диагнозите трябва да се поставят само от оторизирани и квалифицирани специалисти. Необходимо е да се използват валидни номенклатури. Този метод може да се използва допълнително при диагностика на хора. Необходимо е да се изберат и приложат допълнителни изследвания в съответствие с признатите методи. За да се избегнат неправилни резултати, е необходимо с всяко приложение да се извършва подходящ контрол.

Съхранение

Съхранявайте Метиленово синьо разтвор по Льофлер за микроскопия при температура от +15 °C до +25 °C.

Срок на съхранение

Метиленово синьо разтвор по Льофлер за микроскопия може да се използва до посочения срок на годност. След първо отваряне на шишето, съдържанието може да се използва до посочения срок на годност, ако се съхранява при температура от +15 °C до +25 °C. Шишетата трябва винаги да се съхраняват плътно затворени.

Допълнителни инструкции

Само за професионална употреба.

За да се избегнат грешки, приложението трябва да се извършва само от квалифицирани специалисти. Необходимо е да се спазват националните насоки за безопасност при работа, както и за осигуряване на качеството. Използваните микроскопи трябва да бъдат оборудвани в съответствие със стандарта. Ако е необходимо, използвайте стандартна центрофуга, подходяща за медицинска диагностична лаборатория.

Защита от инфекции

Необходимо е да се предприемат ефективни мерки за защита от инфекции съгласно указанията на лабораторията.

Указания за изхвърляне

Опаковката трябва да се изхвърля съгласно актуалните указания за изхвърляне. Използваните разтвори и разтворите, чийто срок на съхранение е изтекъл, трябва да се изхвърлят като специален отпадък съгласно местните указания. Информация относно изхвърлянето може да се намери на бързата връзка „Hints for Disposal of Microscopy Products“ (Съвети за изхвърляне на продукти за микроскопия) на адрес www.microscopy-products.com. В рамките на ЕС понастоящем важи приложимият Регламент (ЕО) № 1272/2008 относно класифицирането, етикетирането и опаковането на вещества и смеси, за изменение и за отмяна на Директиви 67/548/ЕО и 1999/45/ЕО и за изменение на Регламент (ЕО) № 1907/2006.

Помощни реактиви

Кат. № 1.00327	Солна киселина в етанол за микроскопия	1 l, 5 l
Кат. № 1.00497	AFB-Color модифициран Набор за оцветяване за детекция на киселиноустойчиви бактерии (acid-fast bacteria, AFB) по метода на топло оцветяване	1 набор
Кат. № 1.00579	DPX Ново неводна среда за заливка при микроскопия	500 ml
Кат. № 1.04699	Имерсионно масло за микроскопия	100 ml шише с капкомер, 100 ml, 500 ml
Кат. № 1.07960	Entellan™ бърза среда за заливка за микроскопия	500 ml
Кат. № 1.07961	Entellan™ new бърз среда за заливка за микроскопия	100 ml, 500 ml, 1 l
Кат. № 1.08000	SputofluoI™ за микроскопия	1 l
Кат. № 1.08298	Ксилол (изомерна смес) за хистология	4 l
Кат. № 1.08512	AFB-Color Карбол-фуксин разтвор за изследване под микроскоп на киселиноустойчиви бактерии (acid-fast bacteria, AFB) (студено оцветяване)	500 ml, 2,5 l
Кат. № 1.09016	Neo-Mount™ безводна среда за микроскопия	100 ml шише с капкомер, 500 ml
Кат. № 1.09215	Карбол-фуксин разтвор на Цил-Нилсен за микроскопия	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Кат. № 1.09843	Neo-Clear™ (заместител на ксилол) за микроскопия	5 l

Класификация на опасностите

Кат. № 1.01287
Моля, съблюдавайте класификацията на опасностите, отпечатана на етикета, както и информацията, дадена в информационния лист за безопасност. Информационният лист за безопасност е наличен на уебсайта, както и при поискване.

Основни компоненти на продукта

Кат. № 1.01287	
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0-8,6
1 l =	0,97 kg

Общи бележки

Ако по време на използване или в резултат на употреба на това изделие възникне сериозен инцидент, моля, докладвайте на производителя и/

или на негов упълномощен представител, както и на съответния национален орган.

Използвана литература

- Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
- Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
- Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
- Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
- Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Запалими течност и пари.

- P210: Да се пази от топлина, нагорещени повърхности, искри, открит пламък, и други източници на запалване. Тютюнопушенето забранено.
- P233: Съдът да се съхранява плътно затворен.
- P240: Заземяване и еквипотенциална връзка на съда и приемателното устройство.
- P241: Използвайте електрическо/вентилационно/осветително оборудване, обезопасено срещу експлозия.
- P242: Използвайте инструменти, които не предизвикват искри.
- P243: Предприемете действия за предотвратяване на освобождаването на статично електричество.

Хронология на редакциите

Версия	Коментар за модификацията
2024-Jul-01	Първоначална версия с въвеждането на хронология на редакциите
2024-Jul-01 V.2	Без промяна в превода на български език



Вижте инструкциите за употреба



Производител



Каталожен номер



Код на партидата



Внимание! Вижте придружаващата документация



Използвайте до ГГГГ-ММ-ДД



Температурно ограничение

Status: 2024-Jul-01 V.2

Лифе Сциенце подразделение на Merck функционира като MilliporeSigma в САЩ и Канада.

© 2025 Merck KGaA, Дармшат, Германия и/или техните филиали. Всички права запазени. Merck и Sigma-Aldrich са търговски марки на Merck KGaA, Дармшат, Германия. Всички други търговски марки са притежание на съответните им собственици. Подробна информация за търговските марки може да се намери в публично достъпните източници.



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



1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroszkópia

Löffler-féle metilénkék oldat

mikroszkópiai célra

Kizárólag szakember általi használatra

IVD

In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz

CE

Rendeltetése

Ez a „Löffler-féle metilénkék oldat mikroszkópiai célra” humán eredetű mintaanyagok bakteriológiai és szövettani vizsgálatára szolgál a humángyógyászati sejt diagnosztikában. Ez egy használatra kész festékkoldat, amely a portfóliónk egyéb *in vitro* diagnosztikai termékeivel együtt használva lehetővé teszi a célstruktúrák (saválló baktériumok – acid-fast bacteria [AFB]) diagnosztikai célú értékelését fixálással, beágyazással, festéssel, kontrasztfestéssel, lefedéssel bakteriológiai és szövettani mintaanyagokban, például dúsított baktériumtenyészetek keneteiben vagy tüdőből készült szövettani metszetekben.

A meg nem festett struktúrák viszonylag kevésbé kontrasztosak, így nagyon nehéz felismerni őket a fénymikroszkóp alatt. A festési megoldások felhasználásával készített képek segítik a tevékenység végzésére jogosult és képzett vizsgálatokat abban, hogy az ilyen esetekben hatékonyabban meghatározhassák a formákat és struktúrákat. A végső diagnózis felállításához bevett és validált módszerekkel további vizsgálatokat kell végezni.

Elv

A saválló baktériumok sejtfala nagy arányban tartalmaz viaszt és lipideket, ezért csak nagyon lassan abszorbeálja a festékeket. A leghatékonyabb festési módszer a Ziehl-Neelsen-féle forró fuksinos festés. Ebben a módszerben karbol-fukszin-oldattal kezelik a mintát, majd melegítik azt. Ez a melegítési eljárás felgyorsítja a fukszin festék abszorbeálását és ezzel a mikolát-fukszin komplex kialakulásának sebességét a sejtfalban. Amint a saválló baktériumok abszorbeálták a fukszin festéket, már szinte lehetetlen ezeket újra színteleníteni, még abban az esetben is, ha intenzíven kezelik színtelenítőoldattal, például etanolban oldott sósavval. Ezt figyelembe véve a saválló baktériumok a festés során mutatott sav- és alkohollállóságról kapták a nevüket, és piros színre festődnek a mikroszkópos vizsgálathoz. Ennek megfelelően, minden nem saválló mikroorganizmus a megfelelő festékekkel kap kontrasztfestést. Ebben a használati útmutatóban metilénkék használatát kontrasztfestésre. A minták előkezelése Sputofluor™-oldattal feloldja a baktériumokat körülvevő viszkózus köpetet és sejtanyagokat.

Mintaanyag

A bakteriológiai vizsgálatra levett anyag, például köpet, vékonytű-aspirációs biopsziás (fine needle aspiration biopsy – FNAB) minta kenete, mosófoliadék, lenyomat, foliadékgyűlem, genny, folyékony és szilárd baktériumtenyészet, kenetét levegőn megszáritották, hővel fixálták és előkezelték Sputofluor™-oldattal. Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szövetből készült metszetek (3–4 µm vastag paraffinos metszetek)

Reagens

Kat. sz. 1.01287

Löffler-féle metilénkék oldat 100 ml, 500 ml, 2,5 l
mikroszkópiai célra

Szintén szükséges:

Kat. sz. 1.09215 Ziehl-Neelsen karbolfukszin oldat 100 ml, 500 ml,
mikroszkópiai célra 2,5 l

Kat. sz. 1.08512 AFB-Color carbol fuksin oldat 500 ml, 2,5 l
savgyors baktériumok (AFB)
mikroszkópos vizsgálatához (hideg
festés)

Kat. sz. 1.00327 Sósav, etanolban oldva, 1 l, 5 l
mikroszkópiai célra

Kat. sz. 1.08000 Sputofluor™ 1 l
mikroszkópiai célra

Alternatívaként:

A külön reagens kombinálása helyett az 1.00497.0001 festőkészlet is használható a kenetekre:

Kat. sz. 1.00497.0001

AFB-Color módosított

1 készlet

Festő kit savgyors baktériumok (AFB) mikroszkópiás vizsgálatához melegen festődő metodikával

Mintaelőkészítés

A mintavételt szakembernek kell elvégeznie.

Minden mintát a legkorszerűbb technikával kell kezelni.

Minden mintát egyértelműen kell felcímkézni.

A mintavételezéshez és a minták előkészítéséhez megfelelő eszközöket kell használni. Az alkalmazással/használatl kapcsolatban kövesse a gyártó utasításait.

A megfelelő segédreagens használatkor a hozzájuk tartozó használati útmutatót kell követni.

Köpet

A saválló baktériumokat Sputofluor™-oldattal kell előkezelní, hogy kioldja azokat a nyálkából és a sejt szerkezetéből. Ebben az eljárásban a hipoklorit hatóanyag oxidációval oldja fel a szerves anyagokat, és szabadítja ki kíméletesen a saválló baktériumokat, hogy aztán ezek további feldolgozásra kerüljenek.

Reagens-előkészítés: 15%-os Sputofluor™-oldat elkészítése

Körülbelül 100 ml oldat elkészítéséhez keverje össze a következőket:

Sputofluor™	15 ml
Desztillált víz	85 ml

A mintaanyag előkészítése centrifugacsövekben:	
Minta	1 rész (min. 2 ml)
Sputofluor™-oldat (15%-os desztillált vízben)	3 rész
Alaposan rázza össze	10 perc
Centrifugálja 3000–4800 rpm-en	20 perc
Öntse le a felülúszót Az üledékből készítsen kenetet Levegőn szárítsa meg	

Punkciók, lavázsok, üledékek

A megfelelő dúsítási eljárás elvégzése után kenje ki a mintaanyagot egy tárgylemezre és levegőn szárítsa meg.

Szövettani metszetek

A Löffler-féle metilénkék oldatot kell használni a szövettani metszetek festésére. A kompakt szövetek hajlamosak túlfestődni; ilyen szöveteknél a Löffler-féle metilénkék oldat hígítása ajánlott (hígítás: 1:10 (1+9) desztillált vízzel).

A szövettani metszeteket deparaffinálja a hagyományos módon, és rehidratálja leszálló alkoholsorozattal. Sputofluor™ előkezelés a formalinnal fixált minták esetén nem szükséges.

A kenetminták fixálása

A mintákat Bunsen-égő lángja fölött fixálják (2–3-szor, elkerülve a túlzott melegítést).

A minták 100–110 °C-on történő melegítéssel is fixálhatók

száritószekrényben vagy fűtőlapon 20 percig.

A túl magas hőmérséklet vagy a hosszan tartó melegítés a festési minőség romlásával járhat.

Reagens-előkészítés

A Löffler-féle metilénkék oldat mikroszkópiai célra kenetek festésére használatra kész, az oldatot nem kell hígítani, mert az csak rontaná a festés minőségét és a stabilitását.

Szövettani metszetekre a Löffler-féle metilénkék oldat hígítása ajánlott (1+9 desztillált vízzel).

Eljárás

Kenetminták festése

Festés a festőállványon

Az optimális festési eredmény érdekében be kell tartani az előírt időtartamokat.

Tárgylemez a fixált kenettel		
Ziehl-Neelsen karbol-fuxin oldat	teljesen fedje le, óvatosan melegítse háromszor alulról a Bunsen-égővel, amíg gőz képződik Ne hagyja, hogy a festékkoldat felforrjon!	fesse összesen 5 percig
Csapvíz	öblítse addig, amíg a festék elszínezi a vizet	
Sósav, etanolban oldva	teljesen fedje el és hagyja, hogy reakcióba lépjen	15–30 másodperc*
Csapvíz	öblítse le azonnal	
Löffler-féle metilénkék oldat	kontrasztfestés, teljesen fedje el és hagyja, hogy reakcióba lépjen	30 mp**
Csapvíz	öblítse le alaposan	
Levegőn szárítsa meg (például egész éjszaka 50°C-on szárítószekrényben)		

* a minta vastagságától függően
** vagy 1 percig hígított Löffler-féle metilénkék oldattal (hígítás: 1:10 (1+9) desztillált vízzel)

A vízmentes fedőanyaggal (például Neo-Mount™, Entellan™, DPX new vagy Entellan™ new) és fedőlemezzel történő lefedés ajánlott, hogy a bakteriológiai mintákat hónapokig tárolhassa. Ennek érdekében minden festett mintát alaposan meg kell szárítani.
A megfestett tárgylemezek >40-szeres mikroszkópos nagyításához immerziós olaj használata ajánlott.

Szövettani minták festése

Festés tárgylemeztartó üvegdobozban

A szövettani metszeteket deparaffinálja a hagyományos módon, és rehidratálja leszálló alkoholsorozattal.
A tárgylemezeket alá kell meríteni és mozgatni kell az oldatokban, mert az egyszerű bemerítés önmagában nem ad megfelelő festési eredményt.
A tárgylemezeket az egyes festési lépéseket követően hagyni kell alaposan lecsepegni, hogy megelőzhető legyen az oldatok felesleges keresztzsennyeződése.

Tárgylemez a szövettani mintával	
AFB-színezők, karbol-fukszin-oldat	30 perc
Folyó csapvíz	45 mp
Sósav, etanolban oldva	15 mp
Folyó csapvíz	15 mp
Löffler-féle metilénkék oldat*	5 perc
Mossa csapvízzel	10 mp
Etanol, 70%-os	1 perc
Etanol, 70%-os	1 perc
Etanol, 96%-os	1 perc
Etanol, 96%-os	1 perc
Etanol, 100%-os	1 perc
Etanol, 100%-os	1 perc
Xilol vagy Neo-Clear™	5 perc
Xilol vagy Neo-Clear™	5 perc
Fedje le a Neo-Clear™-oldattal benedvesített tárgylemezeket Neo-Mount™ fedőanyaggal, vagy a xilollal benedvesített tárgylemezeket például Entellan™ new fedőanyaggal és fedőlemezzel.	

* Szövettani minták kontrasztfestésére a Löffler-féle metilénkék oldat hígítása ajánlott (hígítás: 1:10 (1+9) desztillált vízzel). A munkaoldat legfeljebb 2 hétig használható fel.

Eredmény

Saválló baktériumok	vörös
Háttér	kékek

Értékelés

A pozitív eredmény azt jelenti, hogy „saválló baktériumokat mutattak ki”, míg a negatív eredmény azt, hogy „saválló baktériumokat nem mutattak ki”. A pozitív eredmény nem azt jelenti, hogy a mikroszkópos taxonómiai besorolás lehetséges. Ha saválló baktériumokat mutattak ki, akkor a további elemzéseket speciálisan felszerelt laboratóriumokban kell elvégezni. A baktériumok életképessége (aktív, inaktív) sem határozható meg.

Hibaelhárítás
Kenetminta fixálása

A Bunsen-égővel vagy sütőben történő minták megfelelő mértékű hővel történő fixálása szükséges ahhoz, hogy a minták ne legyenek fertőzőképesek, és a baktériumok ne tudjanak tovább szaporodni.

Nem festődő saválló baktériumok

A festési eljárás kritikus lépése a színtelenítési lépés, amit befolyásolhat a kenetminta vastagsága.
Emellett a friss sósav, etanolban oldva nagyon reakcióképes, vagyis a reakciót folyamatosan figyelemmel kell kísérni. Az ebben a protokollban megállapított inkubációs időt pontosan be kell tartani, mivel máskülönben hamis negatív eredményeket kaphat.

Műszaki megjegyzések

A használt mikroszkópnak meg kell felelnie az orvosi diagnosztikai laboratóriumok előírásainak.
Automatikus festőrendszerek használatakor be kell tartani a rendszer és a szoftver forgalmazójától kapott használati útmutató utasításait.
Tárolás előtt távolítsa el a felesleges immerziós olajat.

Az analitikai teljesítmény jellemzői

A „Löffler-féle metilénkék oldat” festi, ezzel láthatóvá teszi a biológiai struktúrákat, ahogy az a jelen használati útmutató „Eredmény” fejezetében olvasható. A terméket csak az arra jogosult, szakképzett személyek használhatják, ami – többek közt – magába foglalja a minta és a reagensek előkészítését, a minták kezelését, a szövettani feldolgozást, a megfelelő kontrollokkal kapcsolatos döntéseket stb.
A termék analitikai teljesítménye minden gyártási tétel esetében igazolt. A laboratóriumok közötti nemzetközi vizsgálatokban való rendszeres, sikeres részvétel további, független megerősítést jelent az analitikai specificitás szempontjából.
Az alábbi festékek esetében az analitikai teljesítményt a specificitás, az érzékenység és a megismételhetőség tekintetében 100%-os arányban igazolták:

	Mérések közötti specificitás	Mérések közötti érzékenység	Mérésen belüli specificitás	Mérésen belüli érzékenység
Bakteriológiai				
festés				
Saválló baktériumok	20/20	20/20	7/7	7/7
Háttér	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Az analitikai teljesítményeredmények

A mérésen belüli (ugyanannál a gyártási tételnél elvégzett) és a mérések közötti (különböző gyártási tételeken elvégzett) adatok tükrözik a helyesen festődő struktúrák elvégzett vizsgálatokhoz viszonyított számát.

Jelen teljesítményértékelés eredményei megerősítik, hogy a termék megfelel a rendeltetésszerű használat céljaira és megfelelően működik.

Diagnosztika

A diagnosztizálást csak arra jogosult, szakképzett személy végezheti el. Az érvényes nomenklatúrát kell használni.
Ez a módszer csak kiegészítésként használható a humán diagnosztikában. A további vizsgálatokat az elismert módszerek alapján kell kiválasztani és végrehajtani.
Minden alkalmazásnál megfelelő kontrollokat kell használni a téves eredmények elkerülése érdekében.

Tárolás

A Löffler-féle metilénkék oldat mikroszkópiai célokra +15 °C és +25 °C között tárolandó.

Eltarthatóság

A Löffler-féle metilénkék oldat mikroszkópiai célra a feltüntetett lejárati időig használható fel.
A palack tartalma az első felnyitást követően – +15 °C és +25 °C közötti tárolás esetén – a feltüntetett lejárati időig használható fel.
A palackokat mindig szorosan lezárva kell tartani.

Kapacitás

körülbelül 250 festés / 500 ml

További utasítások

Kizárólag szakember által használható.
A hibák elkerülése érdekében csak szakképzett személyek használhatják. Be kell tartani a nemzeti munkavédelmi és minőségbiztosítási előírásokat. Az előírások szerint felszerelt mikroszkópokat kell használni.
Szükség szerint használjon az orvosi diagnosztikai laboratóriumok számára megfelelő szabványos centrifugát.

A fertőzések elleni védelem

A fertőzések megelőzése érdekében a laboratóriumi előírásoknak megfelelő, hatékony intézkedéseket kell alkalmazni.

Ártalmatlanítással kapcsolatos utasítások

A csomagolást az aktuális ártalmatlanítási útmutatók szerint kell ártalmatlanítani.
A felhasználót, illetve lejárt felhasználhatósági idejű oldatokat a speciális hulladékokra vonatkozó helyi előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani. Az ártalmatlanítással kapcsolatos tájékoztatás megtalálható a „Hints for

Disposal of Microscopy Products” (Mikroszkópiás vizsgálatokkal kapcsolatos termékek ártalmatlanítására vonatkozó tippek) gyorshivatkozás címen a www.microscopy-products.com weboldalon. Az EU-n belül a vonatkozó hatályos alkalmazandó rendelet a 67/548/EGK és az 1999/45/EK rendeleteket módosító és hatályon kívül helyező, valamint az (EK) 1907/2006 rendeletet módosító, a vegyi anyagok és keverékek osztályba sorolására, csomagolására és címkézésére vonatkozó (EK) 1272/2008 sz. RENDELET.

Segédreagensek

Kat. sz.	1,00327	Sósav, etanolban oldva, mikroszkópiai célra	1 l, 5 l
Kat. sz.	1.00497	AFB-Color módosított Festő kit savgyors baktériumok (AFB) mikroszkópiás vizsgálatához melegen festődő metodikával	1 készlet
Kat. sz.	1.00579	DPX új nem-vizes rögzítőszer mikroszkópiai célra	500 ml
Kat. sz.	1.04699	Immerziós olaj mikroszkópiai célra	100 ml-es csepegtetőpalack, 100 ml, 500 ml
Kat. sz.	1,07960	Entellan™ gyorsfedőanyag a mikroszkópiához	500 ml
Kat. sz.	1.07961	Entellan™ new gyorsfedőanyag a mikroszkópiához	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. sz.	1.08000	Sputofluo™ mikroszkópiai célra	1 l
Kat. sz.	1.08298	Xilol (izometrikus elegy) szövettani célokra	4 l
Kat. sz.	1.08512	AFB-Color carbol fuksin oldat savgyors baktériumok (AFB) mikroszkópos vizsgálatához (hideg festés)	500 ml, 2,5 l
Kat. sz.	1.09016	Neo-Mount™ vízmentes fedőanyag mikroszkópiai célra	100 ml-es csepegtetőpalack, 500 ml
Kat. sz.	1.09215	Ziehl-Neelsen karbolfukszin oldat mikroszkópiai célra	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat. sz.	1.09843	Neo-Clear™ (xilolhelyettesítő) mikroszkópiai célra	5 l

Veszélyességi osztályok

Kat. sz. 1.01287

Tanulmányozza át a címkén látható veszélyességi osztályokat és a biztonsági adatlapon található tájékoztatást. A biztonsági adatlap a weboldalon érhető el, és kérésre is elküldjük.

A termék fő alkotóelemei

Kat. sz.	1.01287
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0–8,6
1 l =	0,97 kg

Általános megjegyzés

Ha jelen eszköz használata során vagy annak eredményeképp súlyos baleset következne be, akkor azt jelentse a gyártónak és/vagy a hivatalos képviselőének, illetve az adott ország hatóságának.

Irodalom

1. Romeis – Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A.). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Tűzveszélyes folyadék és gőz.

P210: Hőtől, forró felületektől, szikrától, nyílt lángtól és más gyújtóforrástól távol tartandó. Tilos a dohányzás.

P233: Az edény szorosan lezárva tartandó.

P240: A tárolóedényt és a fogadóedényt le kell földelni és át kell kötni.

P241: Robbanásbiztos elektromos/ szellőztető/ világító berendezés használandó.

P242: Szikramentes eszközök használandók.

P243: Az elektrosztatikus kisülés megakadályozására óvintézkedéseket kell tenni.

Felülvizsgálati előzmények

verzió	Módosítással kapcsolatos megjegyzé
2024-Jul-01	A Felülvizsgálati előzmények bevezetésével készült első változat
2024-Jul-01 V.2	Nincs változás a magyar fordításban



Lásd a használati utasítást



Gyártó:



Katalógusszám



Tételkód



Figyelem, olvassa el a mellékelt dokumentumokat



Felhasználható: ÉÉÉÉ-HH-NN



Hőmérsékleti határértékek

Status: 2024-Jul-01 V.2

A Merck Life Science üzletága az USA-ban és Kanadában MilliporeSigma néven működik.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Németország és/vagy leányvállalatai. Minden jog fenntartva. Merck és Sigma-Aldrich a Merck KGaA, Darmstadt, Németország, védjegyei. Minden más védjegy megfelelő tulajdonosa birtokában van. A védjegyekre vonatkozó információ rendelkezésre áll nyilvánosan elérhető forrásokból.



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

MERCK

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroskopija

Löffler metilēnzilā šķīdums

mikroskopiskai izmeklēšanai

Drīkst lietot tikai speciālisti

IVD

In vitro diagnostikas medicīniskā ierīce

CE

Paredzētā lietošana

Izstrādājumu "Löffler metilēnzilā šķīdums mikroskopiskai izmeklēšanai" izmanto cilvēka izcelsmes medicīnisko šūnu diagnostikai un cilvēka izcelsmes paraugu materiāla bakterioloģiskai un histoloģiskai izmeklēšanai. Tas ir lietošanai gatavs iekrāsošanas šķīdums, kas, lietojot kopā ar citiem *in vitro* diagnostikas produktiem no mūsu piedāvājumu klāsta, ļauj novērtēt bakteriālās mērķa struktūras diagnostikas vajadzībām (skābjnoturīgas baktērijas (AFB)), fiksējot, iestrādājot, iekrāsojot, pretkrāsojot, nostiprinot bakterioloģisko un histoloģisko paraugu materiālus, piemēram, bagātinātu baktēriju kultūru uztriepes vai, piemēram, plaušu histoloģiskos griezumus.

Nekrāsotās struktūras ir salīdzinoši zema kontrasta, un tās ir ļoti grūti atšķirt gaismas mikroskopā. Attēli, kas izveidoti, izmantojot iekrāsošanas šķīdumus, palīdz pilnvarotam un kvalificētam pētniekam šādos gadījumos labāk noteikt formu un struktūru. Lai noteiktu galīgo diagnozi, ir jāveic papildu testi saskaņā ar atzītām, derīgām metodēm.

Principis

Skābjnoturīgo baktēriju šūnu sienā ir augsts vaska un lipīdu īpatsvars, tāpēc tā ļoti lēni absorbē krāsvielas. Visefektīvākā iekrāsošanas metode ir karstā iekrāsošana saskaņā ar Čila-Nilsena metodi. Izmantojot šo metodi, paraugam uzklāj karbolfuksīna šķīdumu un karsē. Šis sildīšanas process paātrina fuksīna krāsvielas uzsūkšanās ātrumu un līdz ar to arī mikolātu-fuksīna kompleksa veidošanos šūnas sienā.

Tiklīdz skābjnoturīgās baktērijas ir absorbējušas fuksīna krāsvielu, tās praktiski nav iespējams atkal atkrāsot, pat ja tās intensīvi apstrādā ar atkrāsošanas šķīdumu, piemēram, sāļsskābi etanolā. Attiecīgi skābjnoturīgās baktērijas tiek apzīmētas kā skābi un spirtu izturīgas baktērijas, un mikroskopiskajā vizualizācijā tās tiek iekrāsotas sarkanā krāsā. Attiecīgi visus mikroorganismus, kas nav skābjnoturīgi, iekrāso ar atbilstošu krāsvielu. Šajā lietošanas instrukcijā pretkrāsošanai izmantots metilēnzilais.

Iepriekšēja paraugu apstrāde ar Sputofluor™ izšķīdina baktērijas no apkārtējām viscīdajām krēpām un šūnu materiāla.

Parauga materiāls

Bakterioloģiskā materiāla uztriepes, kas ir žāvētas gaisā, termiski fiksētas un iepriekš apstrādātas ar Sputofluor™, piemēram, krēpas, smalkas adatas aspirācijas biopsijas (FNAB) uztriepes, izskalojumi, nospiedumi, izsvīdumi, strutas, eksudāti, šķidrās un cietās kultūras. Formalinā fiksētu, parafinā iestrādātu audu griezumus (3 – 4 µm biezi parafina griezumus).

Reaģenti

Atsauces Nr. 1.01287
Löffler metilēnzilā šķīdums
mikroskopiskai izmeklēšanai 100 ml, 500 ml, 2,5 l

Nepieciešams arī:

Atsauces Nr. 1.09215 Čila-Nilsena karbolfuksīna šķīdums 100 ml, 500 ml,
mikroskopiskai izmeklēšanai 2,5 l
Atsauces Nr. 1.08512 AFB-Color karbolfuksīna šķīdums 500 ml, 2,5 l
acidorezistentu baktēriju (AFB)
mikroskopiskai izmeklēšanai
(aukstā krāsošana)
Atsauces Nr. 1.00327 Sāļsskābe etilspirtā 1 l, 5 l
mikroskopiskai izmeklēšanai
Atsauces Nr. 1.08000 Sputofluor™ 1 l
mikroskopiskai izmeklēšanai

Alternatīvi:

Atsevišķu reaģentu kombinācijas vietā var izmantot krāsošanas komplektu 1.00497.0001:

Atsauces Nr. 1.00497.0001

AFB-Color modificētais
krāsošanas komplekts acidorezistentu baktēriju (AFB)
noteikšanai ar karstās krāsošanas metodi

1 komplekts

Parauga sagatavošana:

Paraugu ņemšana jāveic kvalificētam personālam.

Visi paraugi jāapstrādā, izmantojot modernākās tehnoloģijas.

Visiem paraugiem jābūt skaidri marķētiem.

Paraugu ņemšanai un sagatavošanai jāizmanto piemēroti instrumenti.

Sekojiēt ražotāja norādījumiem par uzklāšanu / lietošanu.

Lietojot attiecīgos palīgreaģentus, jāievēro attiecīgās lietošanas instrukcijas.

Krēpas

Skābjnoturīgas baktērijas iepriekš jāapstrādā ar Sputofluor™, lai tās izšķīdinātu no gļotām un šūnu struktūrām. Šajā procesā aktīvā viela hipohlorīts oksidējošies izšķīdina organisko materiālu un viegli atbrīvo skābjnoturīgas baktērijas, lai tās varētu pārstrādāt tālāk.

Reaģentu sagatavošana Sputofluor™ 15% šķīduma pagatavošana

Lai pagatavotu aptuveni 100 ml šķīduma maisījuma:

Sputofluor™	15 ml
Destilēts ūdens	85 ml

Parauga materiāla sagatavošana centrifūgas mēģenēs:	
Paraugs	1 daļa (min. 2 ml)
Sputofluor™ šķīdums (15% destilētā ūdenī)	3 daļas
Spēcīgi sakratiet	10 min
Centrifugēšana ar 3 000-4 800 apgriezieniem minūtē	20 min
Supernatanta dekantēšana Nosēdumu uztriepju sagatavošana Žāvējiet gaisā	

Punktāti, uztriepes, nosēdumi

Pēc atbilstošiem bagātināšanas pasākumiem parauga materiālu uzklāj uz priekšmetstiklīņa un ļauj nožūt gaisā.

Histoloģiskie griezumumi

Histoloģisko griezumumu iekrāsošanai jāizmanto Löffler metilēnzilā šķīdums. Kompaktiem audiem ir tendence iekrāsties par daudz; šādiem audiem ieteicams atšķaidīt Löffler metilēnzilā šķīdums (atšķaidījums: 1:10 (1+9) ar destilētu ūdeni).

Deparafinējiet histoloģiskos priekšmetstiklīņus parastajā veidā un rehidratējiet dīlstošas koncentrācijas spirta apstrādes sērijā. Formalinā fiksētiem paraugiem iepriekšēja apstrāde ar Sputofluor™ nav nepieciešama.

Uztriepju paraugu fiksācija

Paraugus fiksē virs Bunsena degļa liesmas (2 – 3 reizes, lai nepārkarsētu). Paraugus var arī fiksēt, karsējot 100-110 °C temperatūrā žāvēšanas skapī vai uz karsēšanas plates 20 min. Pārmērīga temperatūra vai ilgstoša karsēšana var pasliktināt krāsošanas īpašības.

Reaģentu sagatavošana

Löffler metilēnzilā šķīdums mikroskopiskai izmeklēšanai, kuru izmanto uztriepju iekrāsošanai ir gatavs lietošanai, šķīduma atšķaidīšana nav nepieciešama un tikai pasliktina iekrāsošanas rezultātu un stabilitāti. Histoloģiskajiem griezumumiem ieteicams atšķaidīt Löffler metilēnzilā šķīdums 1+9 ar destilētu ūdeni).

Procedūra

Uztriepju paraugu iekrāsošana

Iekrāsošana uz krāsošanas statīva

Lai garantētu optimālu iekrāsošanas rezultātu, ir jāievēro norādītie laiki.

Priekšmetstiklīņš ar fiksētu, gaisā žāvētu uztriepi		
Cīla-Nilsena karbolfuksīna šķīdums	pilnībā nosegt, trīs reizes uzmanīgi karsēt no apakšas ar Bunsena degli, līdz veidojas tvaiks Neļaujiet iekrāsošanas šķīdumam vārties!	kopumā iekrāsojiet 5 minūtes
Ar tekošu ūdeni	skalo, līdz vairs neveidojas krāsvielu mākoņi.	
Sālsskābe etanolā	pilnībā pārklāj un atstāj reaģēt	15-30 sekundes*
Ar tekošu ūdeni	nekavējoties izskalojiet	
Löffler metilēnzilā šķīdums	pretkrāsošanai pilnībā pārklāj un atstāj reaģēt	30 sec**
Ar tekošu ūdeni	skalojiet uzmanīgi	
Žāvēšana gaisā (piemēram, pa nakti vai 50°C temperatūrā žāvēšanas skapī).		

* atkarībā no parauga biezuma

**vai 1 min ar atšķaidītu Löffler metilēnzilā šķīdums (atšķaidījums: 1:10 (1+9) ar dest. ūdeni)

Bakterioloģisko paraugu uzglabāšanai vairākus mēnešus ieteicams izmantot bezūdens nostiprināšanas līdzekli (piemēram, Neo-Mount™, DPX new vai Entellan™ new) un segstiklu. Šim nolūkam iekrāsotie paraugi ir ļoti labi jāizžāvē.

Analizējot iekrāsotus priekšmetstiklīšus ar mikroskopisko palielinājumu > 40×, ieteicams izmantot imersijas eļļu.

Histoloģisko paraugu iekrāsošana

Iekrāsošana krāsošanas traukā

Deparafinējiet histoloģiskos priekšmetstiklīšus parastajā veidā un rehidratējiet dilstošā spirta sērijā.

Diapozitīvi ir jāiegremdē un īslaicīgi jāpārviesto šķīdumos, vienkārša iegremdēšana vien dod nepietiekamus krāsošanas rezultātus.

Lai izvairītos no nevajadzīgas šķīdumu savstarpējas piesārņošanas, pēc atsevišķiem iekrāsošanas posmiem priekšmetstiklīņi ir labi jānoslauka.

Priekšmetstiklīš ar histoloģiskajiem audiem	
AFB-Color karbolfuksīna šķīdums	30 min
Tekoškrāna ūdens	45 sec
Sālsskābe etanolā	15 sec
Tekoškrāna ūdens	15 sec
Löffler metilēnzilā šķīdums*	5 min
Nomazgāt tekošā ūdenī	10 sec
Etanols 70%	1 min
Etanols 70%	1 min
Etanols 96%	1 min
Etanols 96%	1 min
Etanols 100%	1 min
Etanols 100%	1 min
Ksilols vai Neo-Clear™	5 min
Ksilols vai Neo-Clear™	5 min
Nostipriniet Neo-Clear™ samitrinātos priekšmetstiklīšus ar Neo-Mount™ vai ksilolā samitrinātos priekšmetstiklīšus ar, piemēram, Entellan™ new un segstiklu.	

* Histoloģisko paraugu pretkrāsošanai ieteicams atšķaidīt Löffler metilēnzilā šķīdums (atšķaidījums: 1:10 (1+9) ar destilētu ūdeni). Šo darba šķīdumu var lietot līdz 2 nedēļām.

Rezultāts

Skābjnoturīgas baktērijas	sarkanā krāsā
Pamatinformācija	zila

Vērtējums

Pozitīvs rezultāts nozīmē "konstatētasskābjnoturīgas baktērijas", bet negatīvs rezultāts – "skābjnoturīgas baktērijas nav konstatētas". Pozitīvs rezultāts nenozīmē, ka ir iespējama taksonomiska klasifikācija, izmantojot mikroskopiju. Ja tiek konstatētas skābjnoturīgu baktēriju klātbūtne, turpmākas analīzes jāveic īpaši aprīkotās laboratorijās. Nav iespējams noteikt arī baktēriju dzīvotspēju (aktīva, neaktīva).

Problēmu novēršana

Uztriepju paraugu fiksācija

Lai novērstu paraugu infekciozitāti un baktēriju tālāku vairošanos, ir nepieciešama pietiekama karstuma fiksācija, izmantojot Bunsena degli vai sildīšanas skapi.

Nav skābjnoturīgu baktēriju iekrāsošanās

Šī iekrāsošanas procesa kritiskais posms ir atkrāsošanas posms, ko var ietekmēt parauga uztriepes biezums. Turklāt svaigs sālsskābes šķīdums etanolā ir ļoti reaktīvs, kas nozīmē, ka rezultāts jāvērtē piesardzīgi. Šajā protokolā norādītais inkubācijas laiks ir precīzi jāievēro atkrāsošanas posmā, jo pretējā gadījumā var rasties kļūdaini negatīvi rezultāti.

Tehniskās piezīmes

Izmantotajam mikroskopam jāatbilst medicīniskās diagnostikas laboratorijas prasībām. Lietojot automatiskās krāsošanas sistēmas, ievērojiet sistēmas un programmatūras piegādātāja sniegtos lietošanas norādījumus. Pirms reģistrēšanas noņemiet iegremdēšanas eļļas pārpalikumu.

Analītiskās veikspējas raksturlielumi

"Löffler metilēnzilā šķīdums" iekrāso un tādējādi vizualizē bioloģiskās struktūras, kā aprakstīts šīs LI nodaļās "Rezultāti". Produktu drīkst lietot tikai pilnvarotas un kvalificētas personas, tas cita starpā attiecas uz paraugu un reaģentu sagatavošanu, paraugu apstrādi, histoprocēsēšanu, lēmumu pieņemšanu par piemērotām kontrolēm un citiem jautājumiem.

Produkta analītiskās īpašības apstiprina, testējot katru ražošanas partiju. Regulāra veiksmīga dalība starptautiskos starplaboratoriju testos sniedz papildu un nesaistītu analītiskā specifiskuma apstiprinājumu.

Attiecībā uz turpmāk minēto iekrāsojumu analītiskā veikspēja tika apstiprināta attiecībā uz produkta specifiskumu, jutīgumu un atkārtojamību ar 100% rādītāju:

	Starpanalīžu specifiskums	Starpanalīžu jutība	Analīžu specifiskums analīzes laikā	Analīžu jutība analīzes laikā
Bakterioloģiskā				
iekrāsošana				
Skābjnoturīgās baktērijas	20/20	20/20	7/7	7/7
Pamatinformācija	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Analītiskās darbības rezultāti

Iekšējo (veikts ar vienu un to pašu partiju) un starppartiju (veikts ar dažādām partijām) datu sarakstā ir norādīts pareizi iekrāsoto struktūru skaits attiecībā pret veikto testu skaitu.

Šī veikspējas novērtējuma rezultāti apstiprina, ka izstrādājums ir piemērots paredzētajam lietojumam un darbojas droši.

Diagnostika

Diagnozi drīkst veikt tikai pilnvarots un kvalificēts personāls. Jāizmanto derīgas nomenklatūras. Šo metodi var papildus izmantot cilvēku diagnostikā. Turpmākie testi jāizvēlas un jāveic saskaņā ar atzītām metodēm. Lai izvairītos no nepareiza rezultāta, katru reizi jāveic atbilstošās pārbaudes.

Glabāšana

Löffler metilēnzilā šķīdums mikroskopiskai izmeklēšanai uzglabāt +15 °C līdz +25 °C temperatūrā.

Glabāšanas laiks

Löffler metilēnzilā šķīdums mikroskopiskai izmeklēšanai var lietot līdz norādītajam derīguma termiņam. Pēc pudeles pirmās atvēršanas saturu var lietot līdz norādītajam derīguma termiņam, ja to uzglabā +15 °C līdz +25 °C temperatūrā. Pudeles vienmēr jāglabā cieši aizvērtas.

Ietilpība

aptuveni 250 iekrāsojumu / 500 ml

Papildu norādījumi

Tikai izpētes mērķiem.

Lai izvairītos no kļūdām, lietošanu drīkst veikt tikai kvalificēts personāls. Jāievēro valsts darba drošības un kvalitātes nodrošināšanas vadlīnijas. Jāizmanto atbilstoši standartam aprīkoti mikroskopi. Ja nepieciešams, izmantojiet standarta centrifūgu, kas piemērota medicīniskās diagnostikas laboratorijai.

Pamata aizsardzība pret infekcijām

Jāveic efektīvi pasākumi aizsardzībai pret infekciju saskaņā ar laboratorijas vadlīnijām.

Likvidēšanas norādījumi

Iepakojums jāiznīcina saskaņā ar spēkā esošajiem likvidēšanas norādījumiem. Izlietotie šķīdumi un šķīdumi, kuru derīguma termiņš ir beidzies, jālikvidē kā īpaši atkritumi saskaņā ar vietējiem norādījumiem. Informāciju par likvidēšanu var iegūt ātrās saites sadaļā "Padomi mikroskopijas produktu likvidēšanai" vietnē www.microscopy-products.com. ES ir spēkā pašlaik piemērojamā REGULA (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu, ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006.

Paligreaģenti

Atsauces Nr.	1.00327	Sālsskābe etilspirtā mikroskopiskai izmeklēšanai	1 l, 5 l
Atsauces Nr.	1.00497	AFB-Color modificētais krāsošanas komplekts acidorezistento baktēriju (AFB) noteikšanai ar karstās krāsošanas metodi	1 komplekts
Atsauces Nr.	1.00579	DPX ūj nem-vizes rögzītőszer mikroszkópai célra	500 ml
Atsauces Nr.	1.04699	Imersijas eļļa mikroskopiskai izmeklēšanai	100 ml pilināmā pudele, 100 ml, 500 ml
Atsauces Nr.	1.07960	Entellan™ ātras nostiprināšanas vide mikroskopiskai izmeklēšanai	500 ml
Atsauces Nr.	1.07961	Entellan™ new ātras nostiprināšanas vide mikroskopiskai izmeklēšanai	100 ml, 500 ml, 1 l
Atsauces Nr.	1.08000	Sputofluo™ mikroskopiskai izmeklēšanai	1 l
Atsauces Nr.	1.08298	Ksilēns (izomēru maisījums) histoloģiskai izmeklēšanai	4 l
Atsauces Nr.	1.08512	AFB-Color karbolfuksīna šķīdums acidorezistento baktēriju (AFB) mikroskopiskai izmeklēšanai (aukstā krāsošana)	500 ml, 2,5 l
Atsauces Nr.	1.09016	Neo-Mount™ ūdeni nesaturoša nostiprināšanas vide mikroskopiskai izmeklēšanai	100 ml pilināmā pudele, 500 ml
Atsauces Nr.	1.09215	Cīla-Nīlsena karbolfuksīna šķīdums mikroskopiskai izmeklēšanai	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Atsauces Nr.	1.09843	Neo-Clear™ (ksilēna aizvietotājs) mikroskopiskai izmeklēšanai	5 l

Bīstamības klasifikācija

Atsauces Nr. 1.01287
Ievērojiet uz etiķetes norādīto bīstamības klasifikāciju un drošības datu lapā sniegto informāciju.
Drošības datu lapa ir pieejama tīmekļa vietnē un pēc pieprasījuma.

Produkta galvenās sastāvdaļas

Atsauces Nr. 1.01287	
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₇ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 – 8,6
1 l = 0,97 kg	

Vispārīgas piezīmes

Ja šīs ierīces lietošanas laikā vai tās lietošanas rezultātā ir noticis nopietns negadījums, lūdzu, ziņojiet par to ražotājam un/vai tā pilnvarotajam pārstāvim un savas valsts iestādei.

Literatūra

- Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
- Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
- Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
- Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
- Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Uzliesmojošs šķidrums un tvaiki.

- P210: Sargāt no karstuma, karstām virsmām, dzirkstelēm, atklātas uguns un citiem aizdegšanās avotiem. Nesmēķēt.
- P233: Tvertni stingri noslēgt.
- P240: Tvertnes un saņēmējiekārtas iezemēt un savienot.
- P241: Izmantot sprādziendrošas elektriskās/ ventilācijas/ apgaismošanas iekā rtas.
- P242: Izmantot instrumentus, kas nerada dzirksteles.
- P243: Nodrošināties pret statistkās enerģijas izlādi.

Pārskatījumu vēsture

Versija	Izmaiņu komentārs
2024-Jul-01	Sākotnējā versija ar pārskatījumu vēstures pievienošanu
2024-Jul-01 V.2	Nav izmaiņu latviešu tulkojumā



Izlasiet lietošanas noteikumus



Ražotājs



Kataloga numurs



Sērijas kods



Uzmanību, skatiet pavaddokumentus



Izmantot līdz DD.MM.GGGG.



Temperatūras ierobežojumi

Status: 2024-Jul-01 V.2

ASV un Kanādā uzņēmums Merck uzņēmējdarbību, kas saistīta ar Life Science, veic kā uzņēmums MilliporeSigma.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Vācija un/vai tā meitasuzņēmumi. Visas tiesības aizsargātas. Merck un Sigma-Aldrich ir uzņēmuma Merck KGaA, Darmstadt, Vācija preču zīmes. Pārējās preču zīmes ir attiecīgo īpašnieku īpašums. Sīkāka informācija par preču zīmēm ir pieejama publiski pieejamos avotos.



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



1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroskopija

Löffler metileno mėlio tirpalas

mikroskopijai

Tik profesionaliam naudojimui

IVD

Diagnostikos *in vitro* medicinos priemonė



Numatytoji paskirtis

Šis Löffler metileno mėlio tirpalas naudojamas žmogaus medicininei ląstelinei diagnostikai atliekant žmogaus kilmės mėginių medžiagos bakteriologinius ir histologinius tyrimus. Tai yra paruoštas naudoti dažymo tirpalas, naudojamas su kitais diagnostikai *in vitro* skirtais mūsų asortimento produktais, kai diagnostikos tikslais (fiksuojuose, dažytoje, kontrastingai dažytoje, padengtoje) bakteriologinių ir histologinių mėginių medžiagoje, pavyzdžiui, gausių bakterinių kultūrų preparatuose arba histologiniuose pjūviuose (pvz., plaučių), reikia įvertinti tikslines struktūras (rūgštims atsparias bakterijas (AFB)).

Nedažytų struktūrų kontrastas santykinai prastas ir apžiūrint šviesiniu mikroskopu jas yra ypač sunku atskirti. Tokiais atvejais naudojant dažymo tirpalus gauti vaizdai įgaliojami ir kvalifikuotam tyrėjui padeda geriau apibrėžti formą ir struktūrą. Kad būtų nustatyta galutinė diagnozė, vadovaujantis pripažintais, patikrintais metodais būtina atlikti daugiau tyrimų.

Principas

Rūgštims atsparių bakterijų ląstelės sienelėje yra daug vaško ir lipidų, todėl ji labai lėtai sugeria dažus. Veiksmingiausias dažymo metodas yra karštasis Cilio-Nilseno dažymo metodas. Šiame metode ant mėgino užpilama karbolofuksino tirpalo ir kaitinama. Kaitinimo procesas pagreitina fukso dažų absorbciją, todėl ląstelės sienelėje susidaro mikolatofuksino kompleksas.

Kai rūgštims atsparios bakterijos absorbuoja fukso dažus, jų išblukinti beveik neįmanoma, net jei jos intensyviai apdorojamos blukinimo tirpalu, pvz., druskos rūgštimi etanolyje. Atitinkamai rūgštims atsparios bakterijos vadinamos atspariomis dažymui rūgštimis ir alkoholiu ir apžiūrint mikroskopu yra nusidažiusios raudonai. Taigi, rūgštims neatsparūs mikroorganizmai dažomi atitinkamais kontrastiniais dažais. Šiose instrukcijose kontrastiniam dažymui naudojamas metileno mėlis. Mėginius iš anksto apdorojus su „Sputofluor“™ aplinkiniuose klampiųjų skrepliuose ir ląstelinėje medžiagoje suskaidomos bakterijos.

Mėginio medžiaga

Ore išdžiovinti, karščiu fiksuoti ir iš anksto „Sputofluor“™ apdoroti bakteriologinės medžiagos preparatai, pavyzdžiui, skreplių, biopsijos aspiruojant plona adata (FNAB), nuoplovų, atspaudų, efuzinio skysčio, pūlių, eksudato, skystųjų ir standžiųjų kultūrų preparatai Formaline fiksuotų, į parafiną įlietų audinių nuopjovos (3–4 µm storio parafino nuopjovos)

Reagentai

Kat. Nr. 1.01287

Löffler metileno mėlio tirpalas
mikroskopijai

100 ml, 500 ml, 2,5 l

Taip pat reikia:

Kat. Nr. 1.09215	Ziehl-Neelsen karbolofuksino tirpalas mikroskopijai	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat. Nr. 1.08512	AFB-Color karbolofuksino tirpalas rūgštims atsparių bakterijų (AFB) mikroskopiniam tyrimui (šaltasis dažymas)	500 ml, 2,5 l
Kat. Nr. 1.00327	Druskos rūgštis etanolyje mikroskopijai	1 l, 5 l
Kat. Nr. 1.08000	Sputofluor™ mikroskopijai	1 l

Alternatyvus pasirinkimas:

Dažymui vietoj atskirų reagentų derinio galima naudoti dažymo rinkinį 1.00497.0001:

Kat. Nr. 1.00497.0001

AFB-Color modifikuotas

1 rinkinys

dažymo rinkinys rūgštims atsparių bakterijų (AFB) aptikimui karšto dažymo metodu

Mėginio paruošimas

Mėginį turi paimti kvalifikuoti darbuotojai.

Visus mėginius reikia apdoroti naudojant pažangiausias technologijas.

Visi mėginiai turi būti aiškiai paženklinėti.

Mėginiams paimti ir jiems paruošti būtina naudoti tinkamus instrumentus. Vadovaukitės gamintojo pateiktomis taikymo ir naudojimo instrukcijomis.

Naudojant atitinkamus pagalbinus reagentus būtina laikytis atitinkamų naudojimo instrukcijų.

Skrepliai

Rūgštims atsparias bakterijas reikia iš anksto apdoroti su „Sputofluor“™, kad jos būtų pašalintos iš gleivių ir ląstelių struktūrų. Šiame procese veikioji medžiaga hipochloritas vykstant oksidacijai išsivardina organinę medžiagą ir švelniai atpalaiduoja rūgštims atsparias bakterijas, kad jas būtų galima apdoroti vėliau.

Reagento paruošimas: „Sputofluor“™ 15 % tirpalo paruošimas

Maždaug 100 ml tirpalo paruošti sumaišykite:

„Sputofluor“™	15 ml
Distiliuotas vanduo	85 ml

Mėginio paruošimas centrifugavimo mėgintuvėliuose:	
Mėginys	1 dalis (min. 2 ml)
„Sputofluor“™ tirpalas (15 % distiliuotame vandenyje)	3 dalys
Intensyviai purtyti	10 min.
Centrifuguoti 3 000–4 800 aps./min. greičiu	20 min.
Dekantuoti supernatantą Paruošti nuosėdų preparatą Išdžiovinti ore	

Punktatai, lavažai, nuosėdos

Atlikę atitinkamas gausinimo priemones, užtepkite mėginio medžiagą ant preparato ir leiskite išdžiūti ore.

Histologiniai pjūviai

Histologiniams pjūviams dažyti reikia naudoti Löffler metileno mėlio tirpalą. Kompaktiniai audiniai linkę per daug nusidažyti; tokiems audiniams rekomenduojama praskiesti Löffler metileno mėliotirpalą (skiedimas: 1:10 (1+9) su distiliuotu vandeniu).

Įprastu būdu iš nuopjovų pašalinkite parafiną ir rehidratuokite mažėjančiomis alkoholio koncentracijomis. Formalinu fiksuotiems mėginiams išankstinio apdorojimo „Sputofluor“™ nereikia.

Mėginio preparatų fiksavimas

Mėginiai fiksuojami virš Bunseno degiklio liepsnos (2–3 kartus, stengiantis išvengti per didelio įkaitimo).

Mėginiai taip pat gali būti fiksuojami 20 min. kaitinant 100–110 °C

temperatūroje džiovinimo kameroje arba ant kaitinimo plokštės.

Dėl pernelyg aukštos temperatūros arba ilgo kaitinimo gali pablogėti dažymo savybės.

Reagento paruošimas

Löffler metileno mėlio tirpalas mikroskopijai, naudojamas preparatų dažymui, yra paruoštas naudoti, tirpalo skiesti nereikia, nes tai tik pablogina dažymo rezultatus ir stabilumą. Histologiniams pjūviams dažyti rekomenduojama Löffler metileno mėlio tirpalą praskiesti (1 + 9 su distiliuotu vandeniu).

Procedūra

Preparato mėginių dažymas

Dažymas dažymo stovelyje

Norint gauti optimalų dažymo rezultatą, reikia laikytis nurodyto dažymo laiko.

Objektinis stiklis su fiksuotu preparatu		
Ziehlio–Neelseno karbolio fuksino tirpalas	visiškai padengti, tris kartus iš apačios atsargiai pašildyti Bunseno degikliu, kol susidarys garai Neleisti dažomajam tirpalui užvirti!	dažyti iš viso 5 min.
Vandentiekio vanduo	Skalauti, kol neatsiras dažų pėdsakų	
Druskos rūgštis etanolyje	Visiškai padengti ir palikti, kad vyktų reakcija	15–30 sek.*
Vandentiekio vanduo	Nedelsiant nuplauti	
Löffler metileno mėlio tirpalas	kontrastingas dažymas, visiškai padengti ir palikti, kad vyktų reakcija	30 sek.**
Vandentiekio vanduo	Atsargiai nuplauti	
Išdžiovinti ore (pvz., per naktį arba 50°C temperatūroje džiovinimo kameroje)		

* atsižvelgiant į mėginio storį
** arba 1 min. su praskiestu Löffler metileno mėlio tirpalu (skiedimas: 1:10 (1+9) su dist. vandeniu)

Kelis mėnesius saugomus bakteriologinius mėginius rekomenduojama padengti nevandenine dengiamąja terpe (pvz., „Neo-Mount™“, „Entellan™“, „DPX new“ arba „Entellan™ new“) ir uždengti stikleliu. Šiam tikslui nudažytus preparatus reikia labai gerai išdžiovinti. Mikroskopuojant dažytus preparatus mikroskopu, kuris priartina daugiau nei 40 kartų, rekomenduojama naudoti imersinį aliejų.

Histologinių mėginių dažymas

Dažymas dažymo kameroje

Įprastu būdu iš histologinių preparatų pašalinkite parafiną ir rehidruokite juos mažėjančiomis alkoholio koncentracijomis. Preparatai turi būti trumpam panardinami ir judinami tirpaluose, vien tik panardinus juos į tirpalus, dažymo rezultatai būna netinkami. Siekiant išvengti nereikalingos tirpalų kryžminės taršos, preparatus po kiekvieno dažymo etapo reikia gerai nuvarvinti.

Objektinis stiklis su histologiniu audiniu	
„AFB-Color“ karbolio fuksino tirpalas	30 min.
Tekantis vandentiekio vanduo	45 sek.
Druskos rūgštis etanolyje	15 sek.
Tekantis vandentiekio vanduo	15 sek.
Löffler metileno mėlio tirpalas*	5 min.
Nuplauti vandentiekio vandeniu	10 sek.
Etanolis 70 %	1 min.
Etanolis 70 %	1 min.
Etanolis 96 %	1 min.
Etanolis 96 %	1 min.
Etanolis 100 %	1 min.
Etanolis 100 %	1 min.
Ksilenas arba „Neo-Clear™™	5 min.
Ksilenas arba „Neo-Clear™™	5 min.
„Neo-Clear™™“ sudrėkintus preparatus padenkite „Neo-Mount™™“ arba ksilenu sudrėkintus preparatus padenkite, pvz., „Entellan™ new“, ir uždenkite stikleliu.	

* Histologiniams mėginiams dažyti rekomenduojama naudoti Löffler metileno mėlio tirpalo skiedinį (skiedimas: 1:10 (1+9) su distiliuotu vandeniu). Šį darbinį tirpalą galima naudoti iki 2 savaičių.

Rezultatas

Rūgštims atsparios bakterijos raudona
Fonas mėlyni

Vertinimas

Teigiamas rezultatas reiškia „aptikta rūgštims atsparių bakterijų“, neigiamas rezultatas – „rūgštims atsparių bakterijų neaptikta“. Teigiamas rezultatas nereiškia, kad mikroskopuojant galimas taksonominis klasifikavimas. Jei aptikta rūgštims atsparių bakterijų, reikia atlikti papildomų tyrimų specialiai įrengtose laboratorijose. Taip pat negalima nustatyti bakterijų gyvybingumo (aktyvios, neaktyvios).

Trikdžių šalinimas
Mėginio preparatų fiksavimas

Naudojant Bunseno degiklį arba kaitinant kaitinimo kameroje būtinas pakankamas fiksavimo kaitinant lygis, siekiant išvengti galimo mėginių infekciškumo ir tolesnio bakterijų dauginimosi.

Rūgštims atsparios bakterijos nenusidazė

Blukinimo etapas yra labai svarbus šio dažymo proceso etapas; jam įtakos gali turėti mėginio preparato storis. Be to, šviežias druskos rūgšties etanolyje tirpalas yra labai reaktyvus, todėl rezultatą reikia vertinti apdairiai. Reikia tiksliai laikytis šiame protokole nurodytos blukinimo etapo trukmės, priešingu atveju galimi klaidingai neigiami rezultatai.

Techninės pastabos

Naudojamas mikroskopas turi atitikti medicininei diagnostikos laboratorijai keliamus reikalavimus. Naudodami automatinės dažymo sistemas, vadovaukitės sistemos ir programinės įrangos tiekėjo pateiktomis instrukcijomis. Prieš užpildydami pašalinkite imersinio aliejaus perteklių.

Analitinės eksploatacinės savybės

Löffler metileno mėlio tirpalas nudažo ir taip rodo biologines struktūras, kaip aprašyta šių naudojimo instrukcijų skyriuje „Rezultatas“. Procedūras naudojant produktą, įskaitant, be kita ko, mėginio ir reagento paruošimą, mėginio tvarkymą, histologinį apdorojimą, sprendimus dėl tinkamų kontrolių ir kt., turėtų atlikti tik įgalioti ir kvalifikuoti asmenys. Produkto analitinės eksploatacinės savybės patvirtino kiekvienos produkto serijos tyrimai. Sėkmingas reguliarus dalyvavimas tarptautiniuose tarplaboratoriniuose tyrimuose pateikia papildomą ir nepriklausomą analitinio specifiškumo patvirtinimą. Įvertinus toliau nurodytų dažų analitinės eksploatacinės savybės buvo patvirtintas 100 % specifiškumas, jautrumas ir atkartojamumas.

	Specifiškumas tarp testų	Jautrumas tarp testų	Testo specifiškumas	Testo jautrumas
Bakteriologinis				
dažymas				
Rūgštims atsparios bakterijos	20/20	20/20	7/7	7/7
Fonas	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Analitinių eksploatacinių savybių rezultatai

Testo (tos pačios serijos) ir palyginimo tarp testų (skirtingų serijų) duomenys nurodo tinkamai nudažytų struktūrų skaičių atsižvelgiant į atliktų testų skaičių.

Šio eksploatacinių savybių vertinimo rezultatai patvirtina, kad produktas patikimas ir tinkamas naudoti numatytajai paskirčiai.

Diagnostika

Diagnozes gali nustatyti tik įgalioti ir kvalifikuoti darbuotojai. Būtina naudoti galiojančias nomenklatūras. Šį metodą žmonių diagnostikai galima naudoti kaip papildomą priemonę. Laikantis pripažintų metodų būtina pasirinkti ir atlikti kitus tyrimus. Siekiant išvengti klaidingų rezultatų, kiekvieną kartą naudojant produktą reikia imtis tinkamų kontrolės priemonių.

Laikymas

Löffler metileno mėlio tirpalą mikroskopijai laikykite +15 °C to +25 °C temperatūroje.

Tinkamumo naudoti laikas

Löffler metileno mėlio tirpalą mikroskopijai galima naudoti iki nurodytos tinkamumo naudoti datos. Pirmą kartą atidarius buteliuką, jo turinį galima naudoti iki nurodytos tinkamumo naudoti datos, jei jis laikomas 15–25 °C temperatūroje. Buteliukus visą laiką būtina laikyti sandariai uždarytus.

Talpa

Maždaug 250 dažymo procedūrų / 500 ml

Papildomi nurodymai

Tik profesionaliam naudojimui. Siekiant išvengti klaidų, produktą turi naudoti tik kvalifikuoti darbuotojai. Būtina laikytis šalyje taikomų darbo saugos ir kokybės užtikrinimo rekomendacijų. Būtina naudoti standartų reikalavimus atitinkančius mikroskopus. Jei reikia, naudokite medicininei laboratorijai tinkamą standartinę centrifugą.

Apsauga nuo infekcijos

Laikantis laboratorijos rekomendacijų būtina taikyti efektyvias apsaugos nuo infekcijų priemones.

Atliekų šalinimo nurodymai

Pakuotę reikia šalinti laikantis galiojančių šalinimo rekomendacijų. Panaudotus tirpalus ir tirpalus, kurių tinkamumo naudoti laikas baigėsi, reikia šalinti kaip specialiąsias atliekas laikantis vietos rekomendacijų. Informacijos apie šalinimą galima rasti svetainėje www.microscopy-products.com, paspaudus sparčiąją nuorodą „Hints for Disposal of Microscopy Products“

(Patarimai dėl mikroskopijai naudotų produktų šalinimo). Europos Sąjungoje šiuo metu taikomas Reglamentas (EB) Nr. 1272/2008 dėl cheminių medžiagų ir mišinių klasifikavimo, ženklinimo ir pakavimo, iš dalies keičiantis ir panaikinantis direktyvas 67/548/EEB bei 1999/45/EB ir iš dalies keičiantis Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006.

Pagalbiniai reagentai

Kat. Nr. 1.00327	Druskos rūgštis etanolyje mikroskopijai	1 l, 5 l
Kat. Nr. 1.00497	AFB-Color modifikuotas dažymo rinkinys rūgštims atsparių bakterijų (AFB) aptikimui karšto dažymo metodu	1 rinkinys
Kat. Nr. 1.00579	DPX new nevandeninė dengimo terpė mikroskopijai	500 ml
Kat. Nr. 1.04699	Imersinė alyva, skirta mikroskopijai	100 ml buteliukas su lašintuvu, 100 ml, 500 ml
Kat. Nr. 1.07960	Entellan™ greito dengimo terpė mikroskopijai	500 ml
Kat. Nr. 1.07961	Entellan™ new greito dengimo terpė mikroskopijai	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. Nr. 1.08000	Sputofluol™ mikroskopijai	1 l
Kat. Nr. 1.08298	Ksilenas (izomerinis mišinys) histologijai	4 l
Kat. Nr. 1.08512	AFB-Color karbolfuksino tirpalas rūgštims atsparių bakterijų (AFB) mikroskopiniam tyrimui (šaltasis dažymas)	500 ml, 2,5 l
Kat. Nr. 1.09016	Neo-Mount™ bevandenė dengimo terpė mikroskopijai	100 ml buteliukas su lašintuvu, 500 ml
Kat. Nr. 1.09215	Ziehl-Neelsen karbolfuksino tirpalas mikroskopijai	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat. Nr. 1.09843	Neo-Clear™ (ksileno pakaitalas) mikroskopijai	5 l

Pavojaus klasifikavimas

Kat. Nr. 1.01287
Vadovaukitės etiketėje nurodytu pavojaus klasifikavimu bei saugos duomenų lape pateikta informacija. Saugos duomenų lapas prieinamas interneto svetainėje ir pateikiamas paprašius.

Pagrindiniai produkto komponentai

Kat. Nr. 1.01287	
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0–8,6
1 l =	0,97 kg

Bendroji pastaba

Jeigu naudojant šią priemonę arba dėl jos naudojimo įvyko rimtas incidentas, praneškite apie tai gamintojui ir (arba) jo įgaliotajam atstovui bei savo šalies institucijai.

Literatūra

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Degūs skystis ir garai.

- P210: Laikyti atokiau nuo šilumos šaltinių, karštų paviršių, žiežirbų, atviros liepsnos ir kitų uždegimo šaltinių. Nerūkyti.
- P233: Talpyklą laikyti sandariai uždarytą.
- P240: Įžeminti ir įtvirtinti talpyklą ir priėmimo įrangą.
- P241: Naudoti sprogimui atsparią elektros/ ventiliacijos/ apšvietimo įrangą.

„Merck“ Life Science verslas JAV ir Kanadoje veikia pavadinimu „MilliporeSigma“.

© 2025 „Merck KGaA“, Darmštatas, Vokietija ir (arba) jos filialai. Visos teisės saugomos. „Merck“ ir „Sigma-Aldrich“ yra „Merck KGaA“, Darmštatas, Vokietija, prekių ženklai. Visi kiti prekių ženklai yra jų atitinkamų savininkų nuosavybė. Išsamios informacijos apie prekių ženklus galima rasti viešai prieinamuose šaltiniuose.

- P242: Naudoti kibirkščių nekeliančius įrankius.
- P243: Imtis veiksmų statinei iškrovai išvengti.

Peržiūrų istorija

Versija	Pakeitimo komentaras
2024-Jul-01	Pradinė versija su peržiūrų istorijos įžanga
2024-Jul-01 V.2	Lietuvių kalbos vertimo pakeitimų neatlikta



Skaityti naudojimo instrukcijas



Gamintojas



Katalogo numeris



Partijos kodas



Įspėjimas, skaityti pridėjamus dokumentus



Tinka iki: MMMM-mm-dd



Temperatūros ribos

Status: 2024-Jul-01 V.2



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



1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroskopi

LØFFLERS metylenblå løsning

for mikroskopi

Kun til profesjonell bruk

IVD

In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr

CE

Tiltenkt formål

«LØFFLERS metylenblå løsning – for mikroskopi» brukes til humanmedisinsk cellediagnostikk og i bakteriologisk og histologisk undersøkelse av prøvemateriale av human opprinnelse. Det er en brukssklar fargeløsning som gjør det mulig å evaluere målstrukturer for diagnostiske formål (syrefaste bakterier (AFB)) ved fiksering, farging, motfarging, montering i bakteriologiske og histologiske prøvematerialer, for eksempel utstryk av berikede bakteriekulturer eller histologiske snitt av f.eks. lunge, når den brukes sammen med andre *in vitro*-diagnostiske produkter fra vår portefølje.

Ufargede strukturer er relativt lave i kontrast og er særdeles vanskelige å skille under lysmikroskopet. Bildene som er opprettet ved hjelp av fargeløsningene, hjelper den autoriserte og kvalifiserte utprøveren med å definere formen og strukturen bedre i slike tilfeller. Ytterligere tester må utføres i henhold til anerkjente, gyldige metoder for å kunne stille en endelig diagnose.

Prinsipp

Celleveggen til syrefaste bakterier har en høy andel voks og lipider, og absorberer dermed fargestoffer svært sakte. Den mest effektive fargemetoden er oppvarming av farge i henhold til Ziehl-Neelsen. I denne metoden påføres karbol-fuksinløsning på prøven og varmes opp. Denne oppvarmingsprosessen akselererer hastigheten for absorbering av fuksinfargestoffet og dermed også dannelsen av mykolat-fuksin-komplekset i celleveggen.

Når de syrefaste bakteriene har absorbert fuksinfargestoffet, er det praktisk talt umulig å avfarge dem igjen, selv når de blir intensivt behandlet med en avfargingsløsning, f.eks. saltsyre i etanol. Følgelig kalles syrefaste bakterier syre- og alkoholfast for farging og er farget røde i mikroskopisk visualisering. Tilsvarende er alle ikke-syrefaste mikroorganismer motfarget med et passende fargestoff. I denne bruksanvisningen brukes metylenblått til motfarging.

Forbehandling av prøvene med Sputofluor™ løser opp bakteriene fra omkringliggende viskøst sputum- og cellemateriale.

Prøvemateriale

Utstryk av bakteriologisk materiale som er lufttørket, varmefiksert og forbehandlet med Sputofluor™, som sputum, utstryk fra fin nålsaspirasjonsbiopsier (FNAB), skyllinger, imprint, effusjoner, puss, eksudater, flytende og faste kulturer
Snitt av formalinfiksert, parafinnstøpt vev (3–4 µm tykke parafinsnitt)

Reagenser

Kat.nr. 1.01287
LØFFLERS metylenblå løsning 100 ml, 500 ml, 2,5 l
for mikroskopi

Også nødvendig:

Kat.nr. 1.09215	Ziehl-Neelsen-karbol-fuksin løsning for mikroskopi	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat.nr. 1.08512	AFB-Color karbol-fuksin løsning for mikroskopisk undersøkelse av syrerask bakterier (AFB) (kald farging)	500 ml, 2,5 l
Kat.nr. 1.00327	Saltsyre i etanol for mikroskopi	1 l, 5 l
Kat.nr. 1.08000	Sputofluor™ for mikrobiologi og mikroskopi	1 l

Alternativt:

I stedet for kombinasjonen av enkeltreagenser kan fargesettet 1.00497.0001 brukes for utstryk:

Kat.nr. 1.00497.0001

AFB-Color modifisert

1 sett

Fargingssett for påvisning av syre-rask bakterier (AFB) ved hot staining-metode

Klargjøring av prøver

Prøvetakingen skal utføres av kvalifisert personell.

Alle prøver skal behandles ved hjelp av toppmoderne teknologi.

Alle prøver skal være tydelig merket.

Egnede instrumenter skal brukes til prøvetaking og klargjøring. Følg produsentens instruksjoner for applikasjon/bruk.

Når du bruker de tilsvarende hjelpereagensene, må du følge den tilhørende bruksanvisningen.

Sputum

De syrefaste bakteriene bør forbehandles med Sputofluor™ for å løse dem opp fra slim- og cellestrukturer. I denne prosessen løser en aktive ingrediensen hypokloritt opp det organiske materialet ved oksidasjon og frigjør de syrefaste bakteriene forsiktig, slik at de kan bearbeides videre.

Klargjøring av reagens: Klargjøring av Sputofluor™-løsning 15 %

Slik klargjøres ca. 100 ml løsningsblanding:

Sputofluor™	15 ml
Destillert vann	85 ml

Klargjøring av prøvemateriale i sentrifugerør:	
Prøve	1 del (min. 2 ml)
Sputofluor™-løsning (15 % i destillert vann)	3 deler
Rist kraftig	10 min
Sentrifuger ved 3000–4800 o/min	20 min
Dekanter supernatant Klargjør utstryk av sediment Lufttørk	

Punkteringer, utskyllinger, sedimenter

Etter egnede berikede tiltak skal prøvematerialet strykes ut på objektglassene og lufttørkes.

Histologiske snitt

LØFFLERS metylenblå løsning bør brukes for å farge histologiske snitt. Kompakt vev har en tendens til å bli overfarget. For slikt vev anbefales en fortykning av LØFFLERS metylenblå løsning (fortynning: 1 : 10 (1+9) med destillert vann).

Avparafiniser snitt på konvensjonell måte, og rehydrer i en synkende alkoholholdig serie. Forbehandling med Sputofluor™ er ikke nødvendig for prøver fiksert med formalin.

Fiksering av utstryksprøver

Prøver fikseres over flammen til en Bunsen-brenner (2–3 ganger, pass på å unngå overdreven oppvarming).

Prøvene kan også fikseres ved oppvarming ved 100–110 °C i tørkeskap eller på varmeplate i 20 min.

For høye temperaturer eller langvarig oppvarming kan medføre en forringelse av fargingsytelsen.

Klargjøring av reagens

The LØFFLERS metylenblå løsning – for mikroskopi brukes til farging av utstryk og er klar til bruk. Fortynning av løsningen er ikke nødvendig og medfører bare en forringelse av fargeresultatet og stabiliteten. For histologiske snitt anbefales en fortynning av Löffler metylenblå løsning (1+9 med destillert vann).

Fremgangsmåte

Farging av utstryksprøver

Farge på fargestativet

De angitte tidene skal overholdes for å garantere et optimalt fargeresultat.

Objektglass med fiksert utstryk		
Ziehl-Neelsen karbolfuksinløsning	Dekk helt til, varm forsiktig opp tre ganger nedenfra med Bunsen-brenneren til det dannes damp Ikke la fargeløsningen koke!	Farg i 5 minutter totalt
Springvann	Skyll til det ikke produseres ytterligere dunster av fargestoff	
Saltsyre i etanol	Dekk helt og la reagere	15–30 s*
Springvann	Skyll umiddelbart	
LØFFLERS metylenblå løsning	Som motfarge, dekk helt og la reagere	30 s**
Springvann	Skyll forsiktig	
Lufttørk (f.eks. over natten eller ved 50°C i tørkeskapet)		

- * avhengig av tykkelsen på prøven
- ** eller 1 min med fortynnet LØFFLERS metylenblå løsning (Fortynning: 1 : 10 (1+9) med destillert vann)

Tildekking med ikke-vandige monteringsmedier (f.eks. Neo-Mount™, Entellan™, DPX new eller Entellan™ new) og et dekkglass anbefales for oppbevaring av bakteriologiske prøver i flere måneder. Til dette formål må de fargede prøvene tørkes veldig godt.

Det anbefales å bruke immersjonsolje til analyse av fargede objektglass med mikroskopisk forstørrelse > 40×.

Farging av histologiske prøver

Farging i fargecellen

Avparafiniser histologiske objektglass på konvensjonell måte, og rehydrer i en synkende alkoholholdig serie.

Objektglassene må senkes ned og bevegges et øyeblikk rundt i løsningene. Nedsenkning alene gir ikke tilstrekkelige fargingsresultater.

Objektglassene skal dryppe godt av etter hvert fargetrinn som et tiltak for å unngå unødvendig krysskontaminering av løsninger.

Objektglass med histologisk vev	
AFB-Color-karbolfuksinløsning	30 min
Rennende springvann	45 sek
Saltsyre i etanol	15 sek
Rennende springvann	15 sek
LØFFLERS metylenblå løsning*	5 min
Vask med springvann	10 sek
Etanol 70 %	1 min
Etanol 70 %	1 min
Etanol 96 %	1 min
Etanol 96 %	1 min
Etanol 100 %	1 min
Etanol 100 %	1 min
Xylen eller Neo-Clear™	5 min
Xylen eller Neo-Clear™	5 min
Monter Neo-Clear™-fuktede objektglass med Neo-Mount™- eller xylen-fuktede objektglass med f.eks. Entellan™ og dekkglass.	

* For motfarging av histologiske prøver anbefales en fortynning av Löffler metylenblå løsning (fortynning: 1 : 10 (1+9) med destillert vann). Denne arbeidsløsningen kan brukes i opptil 2 uker.

Resultat

Syrefaste bakterier	rød
Bakgrunn	blå

Evaluerings

Et positivt resultat betyr «syrefaste bakterier påvist», og et negativt resultat betyr «syrefaste bakterier ikke påvist». Et positivt resultat betyr ikke at en taksonomisk klassifisering ved mikroskopi er mulig. Dersom syrefaste bakterier påvises, må det foretas ytterligere analyser i spesialutstyrte laboratorier. Bakterienes (aktiv, inaktiv) levedyktighet kan heller ikke fastsettes.

Feilsøking

Fiksering av utstryksprøver

En tilstrekkelig grad av varmekisering ved hjelp av en Bunsen-brenner eller i et varmeskap er avgjørende for å forhindre prøvenes infeksjose potensial og videre proliferasjon av bakteriene.

Ingen farging av syrefaste bakterier

Det kritiske trinnet i denne fargeprosessen er avfargingstrinnet, som kan påvirkes av tykkelsen på utstryksprøven. I tillegg er en fersk løsning av saltsyre i etanol svært reaktiv, noe som betyr at resultatet bør evalueres med forsiktighet. Inkubasjonstidene som er angitt i denne protokollen, skal holdes nøyaktig i avfargingstrinnet. Hvis ikke kan falske negative resultater være en følge.

Tekniske notater

Mikroskopet som brukes, skal oppfylle kravene til et medisinsk diagnostisk laboratorium.

Ved bruk av automatiske fargesystemer må du følge bruksanvisningen som leveres av leverandøren av systemet og programvaren.

Fjern overflødig immersjonsolje før innlevering.

Analytiske ytelsesegenskaper

«LØFFLERS metylenblå løsning» farger og visualiserer dermed biologiske strukturer, som beskrevet i kapittelet «Resultat» i denne bruksanvisningen. Produktet skal bare brukes av autoriserte og kvalifiserte personer. Dette omfatter blant annet klargjøring av prøve og reagens, prøveåndtering, histoprosessering, beslutninger om egnede kontroller med mer.

Produktets analytiske ytelse bekreftes ved testing av hvert produksjonsparti. Regelmessig vellykket deltakelse i internasjonale prøver mellom laboratorier gir en ytterligere og ikke-tilknyttet bekreftelse av analytisk spesifisitet.

For følgende farger ble den analytiske ytelsen bekreftet med hensyn til produktets spesifisitet, sensitivitet og repeterbarhet med en hastighet på 100 %:

	Spesifisitet mellom analyser	Sensitivitet mellom analyser	Spesifisitet innenfor samme analyse	Sensitivitet innenfor samme analyse
Bakteriologisk				
farging				
Syrefaste bakterier	20/20	20/20	7/7	7/7
Bakgrunn	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Analytiske ytelsesresultater

Data innenfor samme analyse (utført på samme parti) og mellom analyser (utført på forskjellige partier) viser antall strukturer som er riktig farget, i forhold til antall utførte analyser.

Resultatene av denne ytelsesevalueringen bekrefter at produktet er egnet for tiltenkt bruk og har pålitelig ytelse.

Diagnostikk

Diagnoser skal kun stilles av autorisert og kvalifisert personell. Det må brukes gyldige nomenklaturer. Denne metoden kan brukes supplerende i human diagnostikk. Ytterligere tester må velges og gjennomføres i henhold til anerkjente metoder. Passende kontroller bør utføres med hver applikasjon for å unngå feil resultat.

Oppbevaring

Oppbevar LØFFLERS metylenblå løsning – for mikroskopi ved +15 til +25 °C.

Holdbarhet

LØFFLERS metylenblå løsning – for mikroskopi kan brukes frem til angitt utløpsdato.

Etter første åpning av flasken kan innholdet brukes frem til angitt utløpsdato ved oppbevaring fra +15 til +25 °C.

Flaskene må til enhver tid holdes tett lukket.

Kapasitet

ca. 250 farginger / 500 ml

Ytterligere instruksjoner

Kun til profesjonell bruk.

For å unngå feil må applikasjon kun utføres av kvalifisert personell. Nasjonale retningslinjer for arbeidssikkerhet og kvalitetssikring skal følges. Mikroskoper utstyrt i henhold til standarden skal brukes. Bruk om nødvendig en standard sentrifuge egnet for medisinsk diagnostisk laboratorium.

Beskyttelse mot infeksjon

Effektive tiltak må iverksettes for å beskytte mot infeksjon i tråd med laboratoriets retningslinjer.

Instruksjoner for avfallshåndtering

Pakken må kastes i henhold til gjeldende retningslinjer for avfallshåndtering. Brukte løsninger og løsninger som er gått ut på dato, skal kastes som spesialavfall i henhold til lokale retningslinjer. Informasjon om avfallshåndtering kan fås under hurtiglenken «Hints for Disposal of Microscopy Products» på www.microscopy-products.com. I EU får gjeldende FORORDNING (EF) nr. 1272/2008 om klassifisering, merking og emballering av stoffer og stoffblandinger, endring og oppheving av direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og endring av forordning (EF) nr. 1907/2006 anvendelse.

Hjelpereagenser

Kat.nr.	1.00327	Saltsyre i etanol for mikroskopi	1 l, 5 l
Kat.nr.	1.00497	AFB-Color modifisert Fargingssett for påvisning av syre-rask bakterier (AFB) ved hot staining-metode	1 sett
Kat.nr.	1.00579	DPX ny vannfritt monteringsmedium for mikroskopi	500 ml
Kat.nr.	1.04699	Immersjonsolje for mikroskopi	100 ml dråpeteller, 100 ml, 500 ml
Kat.nr.	1.07960	Entellan™ hurtig monteringsmedium for mikroskopi	500 ml
Kat.nr.	1.07961	Entellan™ y hurtig monteringsmedium for mikroskopi	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat.nr.	1.08000	Sputofluo™ for mikrobiologi og mikroskopi	1 l
Kat.nr.	1.08298	Xylen (isomer blanding) for histologi	4 l
Kat.nr.	1.08512	AFB-Color karbol-fuksin løsning for mikroskopisk undersøkelse av syrerask bakterier (AFB) (kald farging)	500 ml, 2,5 l
Kat.nr.	1.09016	Neo-Mount™ vannfritt monteringsmedium for mikroskopi	100 ml dråpeflaske, 500 ml
Kat.nr.	1.09215	Ziehl-Neelsen-karbol-fuksin løsning for mikroskopi	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat.nr.	1.09843	Neo-Clear™ (xylensubstitutt) for mikroskopi	5 l

Fareklassifisering

Kat.nr. 1.01287
Vær oppmerksom på fareklassifiseringen som er trykt på etiketten, og informasjonen som er gitt i sikkerhetsdatabladet. Sikkerhetsdatabladet er tilgjengelig på nettstedet og på forespørsel.

Hovedkomponentene i produktet

Kat.nr.	1.01287
K.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0–8,6
1 l =	0,97 kg

Generell merknad

Hvis det har oppstått en alvorlig hendelse under bruk av dette utstyret eller som følge av bruk, skal du rapportere det til produsenten og/eller den autoriserte representanten og til den nasjonale myndigheten.

Litteratur

1. Romeis – Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Brannfarlig væske og damp.

- P210: Holdes vekk fra varme, varme overflater, gnister, åpen ild og andre antenningskilder. Røyking forbudt.
- P233: Hold beholderen tett lukket.
- P240: Beholder og mottaksutstyr jordes/potensialutlignes.
- P241: Bruk elektrisk materiell/ ventilasjonsmateriell/ belysningsmateriell som er eksplosjonssikkert.

Life Science-virksomheten til Merck drives under navnet MilliporeSigma i USA og Canada.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland og/eller deres samarbeidspartnere. Med enerett. Merck og Sigma-Aldrich er varemerker for Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland. Alle andre varemerker tilhører deres respektive eiere. Detaljert informasjon om varemerker er tilgjengelig via offentlig tilgjengelige ressurser.

- P242: Bruk verktøy som ikke avgir gnister.
- P243: Treff tiltak mot statisk elektrisitet.

Revisjonshistorikk

Versjon	Endringskommentar
2024-Jul-01	Opprinnelig versjon med innføring av revisjonshistorikk
2024-Jul-01 V.2	Ingen endring i norsk oversettelse



Se bruksanvisning



Produsent



Katalognummer



Partikode



Forsiktig, se medfølgende dokumenter



Brukes innen
ÅÅÅÅ-MM-DD



Temperaturbegrensning

Status: 2024-Jul-01 V.2



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



1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroskopia

Löfflerov roztok metylénovej modrej

pre mikroskopiu

Len na profesionálne použitie

IVD

Diagnostická zdravotnícka pomôcka *in vitro*

CE

Určený účel

„Löfflerov roztok metylénovej modrej – na mikroskopiu“ sa používa na zdravotnícku diagnostiku ľudských buniek a slúži na bakteriologické a histologické vyšetrenia materiálu vzoriek ľudského pôvodu. Je to farbiaci roztok pripravený na použitie, ktorý pri použití spolu s ďalšími diagnostickými výrobkami *in vitro* z nášho portfólia umožňuje hodnotenie cieľových štruktúr na diagnostické účely [acidorezistentné baktérie (AFB)] fixáciou, farbením, kontrastným farbením, prikrytím materiálov bakteriologických a histologických vzoriek, ako sú nátery obohatených bakteriálnych kultúr alebo histologické rezy napr. pľúc.

Nezafarbené štruktúry sú relatívne málo kontrastné a pod svetelným mikroskopom sa veľmi ťažko rozlišujú. Obrazy vytvorené pomocou farbiacich roztokov pomáhajú v takýchto prípadoch autorizovanému a kvalifikovanému lekárovi lepšie definovať tvar a štruktúru. Na stanovenie definitívnej diagnózy sa musia vykonať ďalšie testy podľa uznávaných a platných metód.

Princíp

Bunková stena acidorezistentných baktérií má vysoký podiel vosku a lipidov, a preto farbivo absorbujú len veľmi pomaly. Najúčinnjšou metódou farbenia je farbenie za tepla podľa Ziehl-Neelsena. Pri tejto metóde sa na vzorku naniesie roztok karbolfuchsinu a zahreje sa. Tento proces zahrievania urýchľuje absorpciu fuchsinového farbiva a tým aj tvorbu komplexu mykolát-fuchsinu v bunkovej stene.

Keď acidorezistentné baktérie absorbujú fuchsinové farbivo, je prakticky nemožné ich znovu odfarbiť, a to ani vtedy, keď sa intenzívne ošetrí odfarbovacím roztokom, ako je napr. kyselina chlorovodíková v etanole. Preto sa acidorezistentné baktérie označujú ako acidorezistentné a alkoholorezistentné na farbenie a pri mikroskopickom zobrazovaní sa farbja načerveno. Všetky mikroorganizmy, ktoré nie sú acidorezistentné, sa primerane kontrastne zafarbujú vhodným farbivom. V tomto návode na použitie sa na kontrastné farbenie používa metylénová modrá. Predbežná úprava vzoriek prípravkom Sputofluor™ rozpúšťa baktérie z okoliťého viskózneho spúta a bunkového materiálu.

Materiál vzorky

Nátery bakteriologického materiálu, ktoré boli vysušené na vzduchu, fixované teplom a vopred upravené prípravkom Sputofluor™, ako je spútum, nátery z tenkoihlových aspiračných biopsií (FNAB), výplachy, odtlačky, výpotky, hnis, exsudáty, tekuté a pevné kultúry. Rezy formalínom fixovaného, do parafínu zaliateho tkaniva (3 – 4 µm hrubé parafínové rezy).

Reagencie

Kat. č. 1.01287

Löfflerov roztok metylénovej modrej 100 ml, 500 ml, 2,5 l na mikroskopiu

Vyžadujú sa aj:

Kat. č. 1.09215 Ziehl-Neelsenov roztok karbolfuchsinu 100 ml, 500 ml, 2,5 l pre mikroskopiu

Kat. č. 1.08512 AFB-Color carbol fuchsin riešenie 500 ml, 2,5 l pre mikroskopické skúmanie kyseliny-rýchle baktérie (AFB) (studené farbenie)

Kat. č. 1.00327 Kyselina chlorovodíková v etanole 1 l, 5 l pre mikroskopiu

Kat. č. 1.08000 Sputofluor™ 1 l pre mikroskopiu

Prípadne:

Namiesto kombinácie jednotlivých reagencií je farbiacu súpravu 1.00497.0001 možné použiť na nátery:

Kat. č. 1.00497.0001

AFB-Color, modifikovaný

1 sada

farbiaca súprava na detekciu kyslo-rýchle baktérie (AFB) metódou farbenia za tepla

Príprava vzorky

Výber vzoriek musí vykonávať kvalifikovaný personál.

Všetky vzorky musia byť spracované pomocou najmodernejšej technológie. Všetky vzorky musia byť jasne označené.

Na odber vzoriek a ich prípravu sa musia používať vhodné nástroje. Pri aplikácii/používaní postupujte podľa pokynov výrobcu.

Pri používaní príslušných pomocných reagencií je potrebné dodržiavať príslušné návody na použitie.

Spútum

Acidorezistentné baktérie treba vopred ošetriť prostriedkom Sputofluor™, aby sa uvoľnili z hlienu a bunkových štruktúr. Pri tomto procese aktívna zložka chlórnan rozpúšťa organický materiál oxidáciou a jemne uvoľňuje acidorezistentné baktérie, aby sa mohli ďalej spracovať.

Príprava reagencie: Príprava 15 % roztoku Sputofluor™

Na prípravu približne 100 ml namiešaného roztoku:

Sputofluor™	15 ml
Destilovaná voda	85 ml

Príprava materiálu vzorky v skúmavkách odstredivky:	
Vzorka	1 diel (min. 2 ml)
Roztok Sputofluor™ (15 % v destilovanej vode)	3 diely
Silno pretrepať	10 min
Odstrediť pri 3 000-4 800 otáčkach za minútu	20 min
Dekantovať supernatant Pripraviť nátery sedimentu Sušenie na vzduchu	

Bodkovanie, výplachy, sedimenty

Po vhodných opatreniach na obohatenie rozotrite materiál vzorky na podložné sklíčko a nechajte ho uschnúť na vzduchu.

Histologické rezy

Löfflerov roztok metylénovej modrej sa má používať na farbenie histologických rezov. Kompaktné tkanivo má sklon k nadmernému farbeniu. Pri takýchto tkanivách sa odporúča riedenie Löfflerovho roztoku metylénovej modrej (riedenie: 1 : 10 (1 + 9) destilovanou vodou). Rezy deparafinizujte bežným spôsobom a rehydratujte ich v zostupnej sérii alkoholu. Predbežná úprava roztokom Sputofluor™ nie je pri vzorkách fixovaných formalínom potrebná.

Fixácia vzoriek náterov

Vzorky sa fixujú nad plameňom Bunsenovho horáka (2- – 3-krát, dávajte pozor, aby ste sa vyhli nadmernému zahrievaniu). Vzorky je možné fixovať aj zahrievaním na 100 – 110 °C v sušiacей komore alebo na zahrievacej platni po dobu 20 min. Nadmerné teploty alebo dlhodobé zahrievanie môže spôsobiť zhoršenie charakteristik farbenia.

Príprava reagencie

Löfflerov roztok metylénovej modrej – na mikroskopiu, ktorý sa používa na farbenie náterov, je pripravený na použitie. Riedenie roztoku nie je potrebné a spôsobuje len zhoršenie výsledku farbenia a jeho stability. Pri histologických rezoch sa odporúča riedenie Löfflerovho roztoku metylénovej modrej (1 + 9 destilovanou vodou).

Postup

Fixácia vzoriek náterov

Farbenie na farbiacom stojane
Uvedené časy treba dodržať, aby sa zaručil optimálny výsledok farbenia.

Sklíčko s fixovaným náterom		
Ziehl-Neelsenov roztok karbolfuchsínu	úplne zakryte, opatrne trikrát zospodu zahrievajte Bunsenovým horákom, kým sa nevytvorí para Farbiaci roztok nenechajte zovrieť!	farbite celkovo 5 min.
Voda z vodovodu	oplachovať, kým sa nevytvoria ďalšie obláčiky farbiva	
Kyselina chloro-vodíková v etanole	úplne pokryť a nechať reagovať	15-30 s*
Voda z vodovodu	okamžite vypláchnuť	
Löfflerov roztok metylénovej modrej	kontrastné farbenie, úplne pokryte a nechajte reagovať	30 s**
Voda z vodovodu	starostlivo vypláchnuť	
Sušenie na vzduchu (napr. cez noc alebo pri teplote 50°C v sušiacej komore)		

* v závislosti od hrúbky vzorky
**alebo 1 min s riedeným Löfflerovým roztokom metylénovej modrej (riedenie: 1 : 10 (1 + 9) destilovanou vodou)

Na skladovanie bakteriologických vzoriek počas niekoľkých mesiacov sa odporúča zakrytie nevodným fixačným médiom (napr. Neo-Mount™, Entellan™, DPX new alebo Entellan™ new) a krycím sklíčkom. Na tento účel sa musia zafarbené vzorky veľmi dobre vysušiť.
Na analýzu zafarbených preparátov pri mikroskopickom zväčšení > 40 × sa odporúča použiť imerzný olej.

Farbenie histologických vzoriek

Farbenie vnútri bunky

Histologické preparáty deparafinujte bežným spôsobom a rehydratujte ich v zostupnej sérii alkoholu.
Sklíčka je potrebné ponoriť a krátko nimi pohybovať v roztokoch, nakoľko samotné ponorenie neposkytuje adekvátne výsledky farbenia.
Po jednotlivých krokoch farbenia sa musia sklíčka nechať dobre odkvapkať, aby sa zabránilo zbytočnej krížovej kontaminácii roztokov.

Sklíčko s histologickým tkanivom	
Roztok karbolfuchsínu AFB-Color	30 min
Tečúca voda z vodovodu	45 s
Kyselina chlorovodíková v etanole	15 s
Tečúca voda z vodovodu	15 s
Löfflerov roztok metylénovej modrej*	5 min
Umyte pod tečúcou vodou.	10 s
Etanol 70 %	1 min
Etanol 70 %	1 min
Etanol 96 %	1 min
Etanol 96 %	1 min
Etanol 100 %	1 min
Etanol 100 %	1 min
Xylén alebo Neo-Clear™	5 min
Xylén alebo Neo-Clear™	5 min
Sklíčka navlhčené zmesou Neo-Clear™ zafixujte prípravkom Neo-Mount™ alebo sklíčka pokvapkané xylénom napr. prípravkom Entellan™ new a prikryte krycím sklíčkom.	

* Na kontrastné farbenie histologických vzoriek sa odporúča riedenie Löfflerovho roztoku metylénovej modrej (riedenie: 1 : 10 (1 + 9) destilovanou vodou). Tento pracovný roztok sa môže používať až 2 týždne.

Výsledok

Acidorezistentné baktérie	červená
Pozadie	modrá

Vyhodnotenie

Pozitívny výsledok znamená „zistili sa acidorezistentné baktérie“ a negatívny výsledok znamená „nezistili sa acidorezistentné baktérie“. Pozitívny výsledok neznamená, že je možná taxonomická klasifikácia pomocou mikroskopie. Ak sa zistia acidorezistentné baktérie, musia sa vykonať ďalšie analýzy v špeciálne vybavených laboratóriách.
Ani vitalita baktérií (aktívna, neaktívna) sa nedá určiť.

Riešenie problémov

Fixácia vzoriek náterov

Dostatočný stupeň tepelnej fixácie pomocou Bunsenovho horáka alebo vo vyhrievacej komore je nevyhnutný na zabránenie infekčného potenciálu vzoriek a ďalšieho množenia baktérií.

Žiadne farbenie acidorezistentných baktérií

Kritickým krokom tohto farbiaceho procesu je krok odfarbovania, ktorý môže byť ovplyvnený hrúbkou náteru vzorky.
Okrem toho je čerstvý roztok kyseliny chlorovodíkovej v etanole vysoko reaktívny, čo znamená, že výsledok by sa mal hodnotiť opatrne. Inkubačná doba uvedená v tomto protokole treba presne dodržiavať v kroku odfarbovania, pretože inak môže dôjsť k falošne negatívnym výsledkom.

Technické poznámky

Použitý mikroskop má spĺňať požiadavky zdravotníckeho diagnostického laboratória.
Pri používaní automatických farbiacich systémov postupujte podľa návodu na použitie, ktorý poskytol dodávateľ systému a softvéru.
Pred naplnením odstráňte prebytočný imerzný olej.

Charakteristika analytických činností

„Löfflerov roztok metylénovej modrej“ farbí a tým umožňuje vizualizáciu biologických štruktúr podľa opisu v kapitole „Výsledok“ tohto návodu na použitie. Len oprávnené a kvalifikované osoby môžu používať tento výrobok, čo okrem iného zahŕňa prípravu vzoriek a reagencií, manipuláciu so vzorkami, histologické spracovanie, rozhodnutia týkajúce sa vhodných kontrol a ďalšie.

Analytické činnosti výrobu sa potvrdzujú pri testovaní každej výrobnjej šarže. Úspešná pravidelná účasť na medzinárodných medzilaboratórnych testoch poskytuje dodatočné a neovplyvnené potvrdenie analytickej špecifickosti.

V prípade nasledujúcich farbení sa potvrdili analytické činnosti z hľadiska špecifickosti, citlivosti a opakovateľnosti výrobu s podielom 100 %:

	Špecifickosť medzi testami	Citlivosť medzi testami	Špecifickosť v rámci testu	Citlivosť v rámci testu
Bakteriologické				
farbenie				
Acidorezistentné baktérie	20/20	20/20	7/7	7/7
Pozadie	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Výsledky analytických činností

V údajoch v rámci testu (vykonanými na tej istej šarži) a medzi testami (vykonanými na rôznych šaržiach) sa uvádza počet správne zafarbených štruktúr v súvislosti s počtom vykonaných testov.

Výsledky tohto hodnotenia činností potvrdzujú, že výrobok je vhodný na zamýšľané použitie a spoľahlivo funguje.

Diagnostika

Diagnostiku smie vykonávať len oprávnený a kvalifikovaný personál. Musia sa používať platné nomenklatúry.
Túto metódu možno dodatočne použiť v humánnej diagnostike. Ďalšie testy sa musia vybrať a vykonať podľa uznávaných metód. Pri každej aplikácii treba vykonať vhodné kontroly, aby sa predišlo nesprávnym výsledkom.

Skladovanie

Löfflerov roztok metylénovej modrej – na mikroskopií skladujte pri teplote +15 °C až +25 °C.

Skladovateľnosť

Löfflerov roztok metylénovej modrej – na mikroskopií sa môže používať do uvedeného dátumu expirácie.
Po prvom otvorení fľaše sa obsah môže používať do uvedeného dátumu expirácie, ak sa skladuje pri teplote +15 °C až +25 °C.
Fľaše musia byť vždy tesne uzavreté.

Kapacita

pribl. 250 náterov/500 ml

Ďalšie pokyny

Len na profesionálne použitie.
Aby sa predišlo chybám, aplikáciu smie vykonávať len kvalifikovaný personál.
Musia sa dodržiavať štátne smernice pre bezpečnosť práce a zabezpečenie kvality.
Musia sa používať mikroskopy vybavené podľa normy.
V prípade potreby použite štandardnú odstredivku vhodnú pre zdravotnícke diagnostické laboratórium.

Ochrana pred infekciou

Musia sa prijať účinné opatrenia na ochranu pred infekciami, ktoré sú v súlade s laboratórnymi usmerneniami.

Pokyny na likvidáciu

Obal sa musí zlikvidovať v súlade s aktuálnymi pokynmi na likvidáciu. Použité roztoky a roztoky, ktoré sú po dobe skladovateľnosti, sa musia zlikvidovať ako špeciálny odpad v súlade s miestnymi smernicami. Informácie o likvidácii nájdete v rýchlom prepojení „Rady pre likvidáciu výrobkov z oblasti mikroskopie“ na webovej lokalite www.microscopy-products.com. V rámci EÚ platí v súčasnosti platné NARIADENIE (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, ktorým sa menia a rušia smernice 67/548/EHS a 1999/45/ES, a ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie (ES) č. 1907/2006.

Pomocné reagenty

Kat. č. 1.00327	Kyselina chlorovodíková v etanole pre mikroskopiu	1 l, 5 l
Kat. č. 1.00497	AFB-Color, modifikovaný farbiaca súprava na detekciu kyslo-rýchle baktérie (AFB) metódou farbenia za tepla	1 sada
Kat. č. 1.00579	DPX ny vannfritt monteringsmedium for mikroskopi	500 ml
Kat. č. 1.04699	Imerzný olej pre mikroskopiu	100 ml kvap-kacia fľaštička, 100 ml, 500 ml
Kat. č. 1.07960	Entellan™ médium pre rýchlu fixáciu, pre mikroskopi	500 ml
Kat. č. 1.07961	Entellan™ new médium pre rýchlu fixáciu, pre mikroskopiu	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. č. 1.08000	Sputofluol™ pre mikroskopiu	1 l
Kat. č. 1.08298	Xylén (zmes izomérov) pre histológiu	4 l
Kat. č. 1.08512	AFB-Color carbol fuchsin riešenie pre mikroskopické skúmanie kyseliny-rýchle baktérie (AFB) (studené farbenie)	500 ml, 2,5 l
Kat. č. 1.09016	Neo-Mount™ bezvodé fixačné médium pre mikroskopiu	100 ml kvap-kacia fľaštička, 500 ml
Kat. č. 1.09215	Ziehl-Neelsenov roztok karbolfuchsinu pre mikroskopiu	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat. č. 1.09843	Neo-Clear™ (náhrada xylénu) pre mikroskopiu	5 l

Klasifikácia nebezpečnosti

Kat. č. 1.01287
Riadte sa klasifikáciou nebezpečnosti vytlačenou na etikete a informáciami uvedenými na karte bezpečnostných údajov.
Karta bezpečnostných údajov je k dispozícii na webovej lokalite a na požiadanie.

Hlavné zložky výrobku

Kat. č. 1.01287	
C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 – 8,6
1 l =	0,97 kg

Všeobecná poznámka

Ak sa počas používania tejto pomôcky alebo v dôsledku jej používania vyskytne závažná nehoda, nahláste ju výrobcovi alebo jeho autorizovanému zástupcovi a štátnemu orgánu.

Literatúra

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Horľavá kvapalina a pary.

P210: Uchovávajte mimo dosahu tepla, horúcich povrchov, iskier, otvoreného ohňa a iných zdrojov zapálenia. Nefajčite.

P233: Nádobu uchovávajte tesne uzavretú.

P240: Uzemnite a upevnite nádobu a plniace zariadenie.

P241: Používajte elektrické/ ventilačné/ osvetľovacie zariadenie do výbušného prostredia.

P242: Používajte neiskriace prístroje.

P243: Vykonať opatrenia na zabránenie výbojom statickej elektriny.

História revízií

Verzia	Poznámka k úprave
2024-Jul-01	Prvá verzia s uvedením časti História revízií
2024-Jul-01 V.2	Žiadna zmena v slovenskom preklade



Prečítajte si návod na použitie



Výrobca



Katalógové číslo



Kód dávky



Pozor, prečítajte si sprievodné dokumenty



Použitie do RRRR-MM-DD



Obmedzenie teploty

Status: 2024-Jul-01 V.2

Life Science spoločnosť Merck pôsobí v USA a Kanade pod názvom MilliporeSigma.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko a/alebo jej pobočky. Všetky práva vyhradené. Merck a Sigma-Aldrich sú ochranné známky spoločnosti Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko. Všetky ostatné ochranné známky sú majetkom príslušných vlastníkov. Detailné informácie o ochranných známkach sú k dispozícii v verejne dostupných zdrojoch.



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



1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroskopi

Löffler metilen mavisi çözeltisi

mikroskopi için

Yalnızca profesyonel kullanıma yöneliktir

IVD

In vitro Tanı Amaçlı Tıbbi Cihaz

CE

Kullanım amacı

Bu "Löffler metilen mavisi çözeltisi - mikroskopi için" ürünü insan-tıbbi hücre tanısında kullanılır ve insan kaynaklı numune materyalinin bakteriyolojik ve histolojik olarak incelenmesini sağlar. Bu, portföyümüzdeki diğer *in vitro* tanı amaçlı ürünlerle birlikte kullanıldığında zenginleştirilmiş bakteri kültürü yaymalarından veya akciğer gibi histolojik kesitlerden elde edilen bakteriyolojik ve histolojik örnek materyallerinde sabitleme, boyama, karşı boyama ve yerleştirme işlemleriyle hedef yapıları tanılamak amacıyla (aside dirençli bakteriler (AFB)) için değerlendirilebilir hale getiren kullanıma hazır bir boyama çözeltisidir.

Boyanmamış yapıların kontrastı görece düşüktür ve ışık mikroskobu altında ayırt edilmeleri son derece güçtür. Boyama çözeltileriyle oluşturulan görüntüler, yetkili ve kalifiye araştırmacının bu tip durumlarda formu ve yapıyı daha iyi tanımlamasına yardımcı olur. Kesin bir tanıya ulaşmak için kabul edilmiş ve geçerli yöntemler doğrultusunda başka testler de yapılmalıdır.

Çalışma İlkesi

Aside dirençli bakterilerin hücre duvarı yüksek oranda vaks ve lipid içerdiğinden boyaları çok yavaş emer. En etkili boyama yöntemi Ziehl-Neelsen'e göre sıcak boyamadır. Bu yöntemde örneğe karbol-fuksin çözeltisi uygulanır ve ısıtılır. Bu ısıtma işlemi, fuksin boyasının absorbe edilme hızını ve dolayısıyla hücre duvarında mikolat-fuksin kompleksinin oluşumunu da hızlandırır. Aside dirençli bakteriler fuksin boyasını absorbe ettikten sonra, örneğin etanol içinde hidroklorik asit gibi bir renk giderme çözeltisi ile yoğun bir şekilde işlenseler bile tekrar renk giderme uygulanması neredeyse imkansızdır. Bu doğrultuda aside dirençli bakteriler boyama açısından aside ve alkolle dirençli olarak adlandırılır ve mikroskobik görüntülemeye kırmızıya boyanır. Bu bağlamda aside dirençli olmayan tüm mikroorganizmalar uygun bir boya ile karşı boyanır. Bu kullanım talimatında karşı boyama için metilen mavisi kullanılmıştır. Örneklerin Sputofluor™ ile ön işleme tabi tutulması, bakterilerin çevredeki viskid sputum ve hücre materyalinden çözünmesini sağlar.

Numune materyali

Havayla kurutulmuş, ısıyla sabitlenmiş ve Sputofluor™ ile ön işlemden geçirilmiş sputum, ince iğne aspirasyon biyopsisi (FNAB) yaymaları, durulama ve iz yöntemiyle alınan numuneler, efüzyon, irin, eksüda, sıvı ve katı kültürler gibi bakteriyolojik materyal. Formalinle sabitlenmiş, parafine gömülmüş doku kesitleri (3-4 µm kalınlığında parafin kesitler)

Reaktifler

Kat. No. 1.01287

Löffler metilen mavisi çözeltisi 100 ml, 500 ml, 2,5 l mikroskopi için

Gereken diğer ürünler:

Kat. No. 1.09215 Ziehl-Neelsen carbol-fuksin çözeltisi 100 ml, 500 ml, mikroskopi için 2,5 l

Kat. No. 1.08512 AFB-Color karbol fuksin çözeltisi aside dirençli bakterilerin (AFB) mikroskobik incelemesi için (soğuk boyama) 500 ml, 2,5 l

Kat. No. 1.00327 Hidroklorik asit etanolde mikroskopi için 1 l, 5 l

Kat. No. 1.08000 Sputofluor™ mikroskopi için 1 l

Alternatif olarak:

Yaymalar için tekli reaktiflerin kombinasyonu yerine boyama kiti 1.00497.0001 kullanılabilir:

Kat. No. 1.00497.0001

AFB-Color modifiye Sıcak boyama yöntemiyle aside dirençli bakterilerin (AFB) saptanması için boyama kiti

1 set

Numune hazırlığı

Numune alımı, kalifiye personel tarafından gerçekleştirilmelidir.

Tüm numuneler son teknoloji kullanılarak işlenmelidir.

Tüm numuneler net bir şekilde etiketlenmelidir.

Numunelerin alınması ve hazırlanması için uygun cihazlar kullanılmalıdır.

Uygulama/kullanım için üreticinin talimatlarına uyun.

Uygun yardımcı reaktifler kullanılırken ilgili kullanım talimatları izlenmelidir.

Sputum

Aside dirençli bakteriler, mukus ve hücresel yapılardan çözünmeleri için Sputofluor™ ile ön işleme tabi tutulmalıdır. Bu işlemde, etkin bileşen hipoklorit organik maddeyi oksidasyon yoluyla çözer ve aside dirençli bakterileri daha fazla işlenebilmeleri için hassas bir şekilde serbest bırakır.

Reaktif hazırlığı: %15 Sputofluor™ çözeltisi hazırlama

Yaklaşık 100 ml çözelti karışımı hazırlamak için:

Sputofluor™	15 ml
Distile su	85 ml

Santrifüj tüplerinde numune materyalinin hazırlanması:	
Numune	1 ölçü (min. 2 ml)
Sputofluor™ çözeltisi (distile suda %15)	3 ölçü
Kuvvetlice çalkalayın	10 dak
3000-4800 devir/dak hızda santrifüjleyin	20 dak
Süpernatantı boşaltın Sedimentten yaymalar hazırlayın Havayla kurumaya bırakın	

Punktatlar, lavajlar, sedimentler

Uygun zenginleştirme işlemlerinden sonra numune materyalini lama yayın ve havayla kurumaya bırakın.

Histolojik kesitler

Löffler metilen mavisi çözeltisi, histolojik kesitleri boyamak için kullanılmalıdır. Kompakt doku aşırı boyanma eğiliminde olduğundan Löffler metilen mavisi çözeltisinin bu tür dokularda seyreltilmesi önerilir (seyreltme: 1:10 (1+9) distile su ile). Kesitleri geleneksel şekilde deparafinize edin ve azalan alkol serisinde rehidrate edin. Formalinle sabitlenmiş numunelerin, Sputofluor™ ile ön işleme tabi tutulması gerekli değildir.

Yayma numunelerinin fiksasyonu

Numuneler, Bunsen beki alevi üzerine sabitlenir (aşırı ısınmayı önlemeye dikkat edilerek 2-3 kez). Numuneler ayrıca bir kurutma dolabında veya ısıtma plakasında 20 dakika boyunca 100-110°C'de ısıtılarak da sabitlenebilir. Aşırı sıcaklık veya uzun süreli ısıtma, boyama performansının bozulmasına neden olabilir.

Reaktif hazırlığı

Löffler metilen mavisi çözeltisi - yaymaları boyamak üzere kullanılan mikroskopi için ürünü kullanıma hazır ve çözeltinin seyreltilmesi gerekmez; seyreltme işlemi boyama sonucunun ve stabilitenin bozulmasına neden olur. Histolojik kesitlerde Löffler metilen mavisi çözeltisinin seyreltilmesi önerilir (distile su ile 1+9).

Prosedür

Yayma numunelerinin boyanması

Boyama rafında boyama

Optimal boyama sonuçları elde etmek için belirtilen sürelerle uyulmalıdır.

Sabitlenmiş yayma bulunan lam		
Ziehl-Neelsen karbol fuksin çözeltisi	tamamen kaplayın, buhar oluşana kadar Bunsen bekiyle aşağıdan üç kez dikkatlice ısıtın Boyama çözeltisinin kaynamasına izin vermeyin!	toplam 5 dakika boyunca boyayın
Musluk suyu	daha fazla boya bulanıklığı oluşmayıncaya kadar durulayın	
Etanol içinde hidroklorik asit	tamamen kaplayın ve tepkimeye bırakın	15-30 saniye*
Musluk suyu	derhal durulayın	
Löffler metilen mavisi çözeltisi	karşı boyama, tamamen kaplayın ve tepkimeye bırakın	30 saniye**
Musluk suyu	dikkatlice durulayın	
Havayla kurumaya bırakın (ör. gece boyunca veya kurutma dolabında 50°C'de)		

* örnek kalınlığına bağlı olarak

**veya seyreltilmiş Löffler metilen mavisi çözeltisi ile 1 dakika (seyreltme: 1:10 (1+9), distile su ile)

Bakteriyolojik örneklerin birkaç ay boyunca saklanması için sulu olmayan bir yerleştirme ortamı (ör. Neo-Mount™, Entellan™, DPX new veya Entellan™ new) ve cam lamel ile kapatılmaları önerilir. Bunun için boyanmış örneklerin çok iyi kurutulması gerekir.

40 kattan fazla mikroskobik büyütme kullanılabacağı zaman boyanmış lamların analizi için immersiyon yağı kullanılması önerilir.

Histolojik numunelerin boyanması

Boyama hücresinde boyama

Histolojik lamaları geleneksel şekilde deparafinize edin ve giderek azalan bir alkol serisinde rehidrate edin.

Lamaların çözeltilere daldırılması ve kısa süreliğine hareket ettirilmesi gerekir. Basit daldırma tek başına yetersiz boyama sonuçları verir.

Çözeltilerin gereksiz şekilde çapraz kontaminasyona maruz kalmasını önlemeye ilişkin bir tedbir olarak her boyama adımından sonra lamaların iyice süzülmesi sağlanmalıdır.

Histolojik dokunun bulunduğu lam	
AFB-Color karbol fuksin çözeltisi	30 dak
Akan musluk suyu	45 saniye
Etanol içinde hidroklorik asit	15 saniye
Akan musluk suyu	15 saniye
Löffler metilen mavisi çözeltisi*	5 dak
Musluk suyuyla yıkayın	10 saniye
Etanol %70	1 dak
Etanol %70	1 dak
Etanol %96	1 dak
Etanol %96	1 dak
Etanol %100	1 dak
Etanol %100	1 dak
Ksilen veya Neo-Clear™	5 dak
Ksilen veya Neo-Clear™	5 dak
Neo-Clear™ ile ıslatılmış lamaları Neo-Mount™ veya ksilen ile ıslatılmış lamaları Entellan™ new ve cam lamel kullanarak yerleştirin.	

* Histolojik numunelerin karşı boyaması için Löffler metilen mavisi çözeltisinin seyreltilmesi önerilir (seyreltme: 1:10 (1+9) distile su ile). Bu çalışma çözeltisi en fazla 2 hafta kullanılabilir.

Sonuç

Aside dirençli bakteriler	kırmızı
Arka plan	mavisi

Değerlendirme

Pozitif sonuç, "aside dirençli bakteri tespit edildiği" ve negatif sonuç da "aside dirençli bakteri tespit edilmediği" anlamına gelir. Pozitif bir sonuç, mikroskopi ile taksonomik bir sınıflandırma yapılabileceği anlamına gelmez. Aside dirençli bakteriler tespit edilirse özel donanımlı laboratuvarlarda daha ileri analizler yapılmalıdır. Bakterilerin canlılığı (aktif, inaktif) da belirlenemez.

Sorun giderme

Yayma numunelerinin fiksasyonu

Örneklerin enfeksiyöz potansiyelini ve bakterilerin daha fazla çoğalmasını önlemek için Bunsen bekiyle veya bir ısıtma kabininde yeterli düzeyde ısıyla sabitleme yapılması şarttır.

Aside dirençli bakterilerin boyanmaması

Bu boyama işleminin kritik adımı, örnek yaymasının kalınlığından etkilenebilen renk giderme adımıdır. Ayrıca etanol içindeki taze hidroklorik asit çözeltisi oldukça reaktiftir; bu da sonucun dikkatle değerlendirilmesi gerektiği anlamına gelir. Renk giderme adımında bu protokolda belirtilen inkübasyon sürelerine doğru şekilde uyulmalıdır; aksi takdirde yanlış negatif sonuçlar çıkabilir.

Teknik notlar

Kullanılan mikroskop bir tıbbi tanı laboratuvarının gerekliliklerini karşılamalıdır. Otomatik boyama sistemleri kullanırken lütfen sistem ve yazılım tedarikçisinin sağladığı kullanım talimatlarını izleyin. Dosyalamadan önce immersiyon yağının fazlasını alın.

Analitik performans özellikleri

"Löffler metilen mavisi çözeltisi" bu Kullanım Talimatları'nın "Sonuç" bölümünde açıklandığı gibi biyolojik yapıları boyayarak görselleştirir. Ürün yalnızca yetkili ve kalifiye kişiler tarafından kullanılmalıdır. Ürünün kullanımı; numune ve reaktif hazırlığı, numune işlenmesi, histolojik işleme, uygun kontrollere ilişkin kararların alınması gibi adımları içerir.

Ürünün analitik performansı her üretim serisinin test edilmesiyle doğrulanır. Uluslararası laboratuvarlar arası testlere düzenli olarak başarılı katılım, analitik özgüllüğün bağımsız ve ekstra bir şekilde doğrulanmasını sağlamaktadır.

Aşağıdaki boyamalar için analitik performans; ürünün özgüllüğü, hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği açısından %100 oranında doğrulanmıştır:

	Analizler Arası Özgüllük	Analizler Arası Hassasiyet	Analiz İçi Özgüllük	Analiz İçi Hassasiyet
Bakteriyolojik				
boyama				
Aside dirençli bakteriler	20/20	20/20	7/7	7/7
Arka plan	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Analitik performans sonuçları

Analiz içi (aynı seri üzerinde gerçekleştirilen) ve analizler arası (farklı seriler üzerinde gerçekleştirilen) veriler, gerçekleştirilen analizlerin sayısına göre doğru boyanan yapıların sayısını listeler.

Bu Performans Değerlendirmesi, ürünün kullanıma amacına uygun olduğunu ve güvenilir şekilde performans gösterdiğini doğrular.

Tanılama

Tanılar yalnızca yetkili ve kalifiye personel tarafından yapılmalıdır.

Geçerli adlandırmalar kullanılmalıdır.

Bu yöntem, insana yönelik tanılama işlemlerinde destekleyici olarak kullanılabilir.

Kabul görmüş yöntemlere göre başka testler seçilmeli ve uygulanmalıdır. Hatalı sonuçları önlemek için her uygulamada uygun kontroller gerçekleştirilmelidir.

Saklama

Löffler metilen mavisi çözeltisi - mikroskopi için ürününü, +15°C ile +25°C arasında saklayın.

Raf ömrü

Löffler metilen mavisi çözeltisi - mikroskopi için ürünü, belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.

Şişe ilk kez açıldıktan sonra içeriği, +15°C ile +25°C arasında saklandığında belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.

Şişeler daima sıkıca kapalı tutulmalıdır.

Kapasite

yaklaşık 250 boyama/500 ml

Ek talimatlar

Yalnızca profesyonel kullanıma yöneliktir.

Hataların önlenmesi için uygulamanın yalnızca kalifiye personel tarafından gerçekleştirilmesi gerekir.

İş güvenliği ve kalite güvencesi ile ilgili ulusal yönergeler izlenmelidir.

Standartlara uygun donanımdaki mikroskoplar kullanılmalıdır.

Gerekirse tıbbi tanı amaçlı laboratuvarlara uygun bir standart santrifüj cihazı kullanın.

Enfeksiyona karşı koruma

Enfeksiyondan korunmak için laboratuvar yönergeleri doğrultusunda etkili önlemler alınmalıdır.

Bertaraf talimatları

Ambalaj, güncel bertaraf yönergeleri doğrultusunda bertaraf edilmelidir.

Kullanılmış çözeltiler ve raf ömrü geçmiş çözeltiler, yerel yönergeler uyarınca özel atık olarak bertaraf edilmelidir. Bertarafa ilişkin bilgiler

www.microscopy-products.com adresinde yer alan "Hints for Disposal of

Microscopy Products" (Mikroskopi Ürünlerinin Bertarafıyla İlgili Bilgiler)

Hızlı Bağlantısından edinilebilir. Avrupa Birliği (AB) içinde 67/548/EEC

ve 1999/45/EC sayılı Direktifleri tadil eden ve yürürlükten kaldıran ve 1907/2006 sayılı Yönetmeliği (EC) tadil eden maddelerin ve karışımların sınıflandırılması, etiketlenmesi ve ambalajlanmasına ilişkin 1272/2008 sayılı YÖNETMELİK (EC) geçerlidir.

Yardımcı reaktifler

Kat. No. 1.00327	Hidroklorik asit etanolde mikroskopi için	1 l, 5 l
Kat. No. 1.00497	AFB-Color modifiye Sıcak boyama yöntemiyle aside dirençli bakterilerin (AFB) saptanması için boyama kiti	1 set
Kat. No. 1.00579	DPX yeni susuz kapama ortamı mikroskopi için	500 ml
Kat. No. 1.04699	İmersiyon yağı mikroskopi için	100 ml damlalıklı şişe, 100 ml, 500 ml
Kat. No. 1.07960	Entellan™ hızlı destek besiyeri mikroskopi için	500 ml
Kat. No. 1.07961	Entellan™ new hızlı destek besiyeri mikroskopi için	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. No. 1.08000	Sputofluol™ mikroskopi için	1 l
Kat. No. 1.08298	Ksilen (izometrik karışım) histoloji için	4 l
Kat. No. 1.08512	AFB-Color karbol fuksin çözeltisi aside dirençli bakterilerin (AFB) mikroskopik incelemesi için (soğuk boyama)	500 ml, 2,5 l
Kat. No. 1.09016	Neo-Mount™ susuz destek besiyeri mikroskopi için	100 ml damlalıklı şişe, 500 ml
Kat. No. 1.09215	Ziehl-Neelsen carbol-fuchsin çözeltisi mikroskopi için	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat. No. 1.09843	Neo-Clear™ (ksilen ikamesi) mikroskopi için	5 l

Tehlike sınıflandırması

Kat. No. 1.01287

Lütfen etikette yer alan tehlike sınıflandırmasına ve güvenlik veri formundaki bilgilere dikkat edin. Güvenlik veri formuna web sitesinden erişilebilir ve talep üzerine temin edilebilir.

Ürünün ana bileşenleri

Kat. No. 1.01287

C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0 - 8,6
1 l =	0,97 kg

Genel açıklama

Bu cihazın kullanımı sırasında veya kullanımı sonucunda ciddi bir olay yaşanırsa lütfen durumu üreticiye ve/veya yetkili temsilcisine ve ulusal makamınıza bildirin.

Literatür

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Alevlenir sıvı ve buhar.

P210: Isıdan, sıcak yüzeylerden, kıvılcımdan, açık alevden ve diğer tutuşma kaynaklarından uzak tutun. - Sigara içilmez.

P233: Kabi sıkıca kapalı tutun.

P240: Kabı ve alıcı ekipmanı toprağa oturtun ve bağlayın.

P241: Patlamaya dayanıklı elektrikli/ havalandırma/ ışıklandırma ekipman kullanın.

P242: Ateş almayan aletler kullanın.

P243: Statik boşalmaya karşı önleyici tedbirler alın.

Revizyon Geçmişi

Sürüm	Değişiklik Yorumu
2024-Jul-01	Revizyon Geçmişi girişiyle birlikte ilk sürüm.
2024-Jul-01 V.2	Türkçe çeviride herhangi bir değişiklik yoktur



Kullanım talimatlarına başvurun



Üretici



Katalog numarası



Seri kodu



Dikkat, eşlik eden belgelere bakın



Son kullanma tarihi YYYY-AA-GG



Sıcaklık sınırlaması

Status: 2024-Jul-01 V.2

Merck'in Life Science bölümü, ABD ve Kanada'da MilliporeSigma olarak faaliyet göstermektedir.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Almanya ve/veya bağlı şirketleri. Tüm Hakları Saklıdır. Merck ve Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Almanya'nın ticari markalarıdır. Diğer tüm ticari markalar ilgili sahiplerine aittir. Ticari markalarla ilgili ayrıntılı bilgiler kamuoyuna açık kaynaklarda mevcuttur.



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

MERCK

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroskopija

Löfflerov rastvor metilen plave

za mikroskopiju

Samo za profesionalnu upotrebu

IVD

In vitro dijagnostičko medicinsko sredstvo

CE

Namena

Ovaj „Löfflerov rastvor metilen plave – za mikroskopiju“ se koristi za medicinsku dijagnostiku humanih ćelija i služi za bakteriološko i histološko ispitivanje materijala uzorka humanog porekla. To je rastvor za bojenje spreman za upotrebu koji, kada se koristi zajedno sa drugim proizvodima za *in vitro* dijagnostiku iz našeg portfolija, omogućava procenu ciljnih struktura u dijagnostičke svrhe (bakterije otporne na kiselinu (AFB)) fiksiranjem, bojenjem, kontrastnim bojenjem, postavljanjem u materijale bakterioloških i histoloških uzoraka, na primer razmaze obogaćene bakterijskim kulturama ili histološke isečke npr. pluća.

Neobojene strukture imaju relativno nizak kontrast i izuzetno ih je teško razlikovati pod svetlosnim mikroskopom. Slike napravljene korišćenjem rastvora za bojenje pomažu ovlaštenom i kvalifikovanom istraživaču da bolje definiše formu i strukturu u takvim slučajevima. Potrebno je sprovesti dodatne testove u skladu sa priznatim, važećim metodama kako bi se dobila konačna dijagnoza.

Princip

Ćelijski zid bakterija otpornih na kiselinu ima visok udeo voska i lipida i stoga veoma sporo apsorbira boje. Najefikasnija metoda bojenja je vruće bojenje prema Ziehl-Neelsenu. U ovoj metodi, rastvor karbofuksin se nanosi na uzorak i zagreva. Ovaj proces zagrevanja povećava brzinu kojom se boja fuksin apsorbira, a time i formiranje kompleksa mikolat-fuksin u ćelijskom zidu. Kada bakterije otporne na kiselinu apsorbiraju boju fuksin, praktično ih je nemoguće ponovo dekolozirati, čak i kada se intenzivno tretiraju rastvorom za dekolozaciju kao što je npr. hlorovodonična kiselina u etanolu. Shodno tome, bakterije otporne na kiselinu nazivaju se bakterijama otpornim na bojenje kiselinom ili alkoholom i obojene su crvenom bojom u mikroskopskoj vizualizaciji. S druge strane, svi mikroorganizmi koji nisu otporni na kiselinu obojeni su odgovarajućom bojom. U ovom uputstvu za upotrebu za kontrastno bojenje se koristi metilen plava.

Predtretman uzoraka sredstvom Sputofluor™ rastvara bakterije iz okolnog gustog sputuma i ćelijskog materijala.

Materijal uzorka

Razmazi bakteriološkog materijala koji su osušeni na vazduhu, toplotno fiksirani i prethodno tretirani sredstvom Sputofluor™ poput sputuma, razmaza dobijenih aspiracijom biopsijom tankom iglom (FNAB), ispiranja, otisaka, izliva, gnoja, eksudata, tečnih i čvrstih kultura

Isečki fiksirani formalinom, ukalupljeni u parafin (isečki debljine 3–4 µm)

Reagensi

Kat. br. 1.01287

Löfflerov rastvor metilen plave
za mikroskopiju

100 ml, 500 ml, 2,5 l

Dodatno potrebno:

Kat. br. 1.09215 Ziehl-Neelsenov rastvor karbofuksin 100 ml, 500 ml
za mikroskopiju 2,5 l

Kat. br. 1.08512 AFB-Color rastvor karbofuksin 500 ml, 2,5 l
za mikroskopsko istraživanje bakterija
otpornih na kiselinu (AFB) (hladno
bojenje)

Kat. br. 1.00327 Hlorovodonična kiselina u etanolu za 1 l, 5 l
mikroskopiju

Kat. br. 1.08000 Sputofluor™ 1 l
za mikroskopiju

Alternativno:

Umesto kombinovanja pojedinačnih reagenasa, za razmaze se može koristiti komplet za bojenje 1.00497.0001:

Kat br. 1.00497.0001

AFB-Color, izmenjen

1 komplet
Komplet za bojenje za detekciju bakterija otpornih na kiselinu (AFB)
metodom toplog bojenja

Priprema uzorka

Uzorkovanje mora da izvrši kvalifikovano osoblje.

Svi uzorci moraju biti tretirani primenom najsavremenije tehnologije.

Svi uzorci moraju biti jasno označeni.

Za uzimanje uzoraka i njihovu pripremu moraju se koristiti odgovarajući instrumenti. Pratite uputstva proizvođača za primenu/upotrebu.

Prilikom upotrebe odgovarajućih pomoćnih reagenasa, moraju se poštovati odgovarajuća uputstva za upotrebu.

Sputum

Bakterije otporne na kiselinu treba prethodno da se tretiraju sredstvom Sputofluor™ radi rastvaranja sluzi i ćelijskih struktura. U ovom procesu, aktivni sastojak hipohlorit rastvara organski materijal oksidacijom i pažljivo oslobađa bakterije otporne na kiselinu tako da se mogu dalje obrađivati.

Priprema reagensa: Priprema Sputofluor™ rastvora od 15%

Za pripremu približno 100 ml rastvora pomešajte sledeće:

Sputofluor™	15 ml
Destilovana voda	85 ml

Priprema materijala uzorka u epruvetama za centrifugiranje:	
Uzorak	1 deo (min. 2 ml)
Sputofluor™ rastvor (15% u destilovanoj vodi)	3 dela
Snažno protresite	10 min
Centrifugirajte na 3000–4800 o/min	20 min
Dekantni supernatant Pripremite razmaze sedimenta Osušite na vazduhu	

Punktati, ispiranje, sedimenti

Nakon odgovarajućih mera obogaćivanja, razmazati materijal uzorka na stakalcu i ostaviti da se osuši na vazduhu.

Histološki iseći

Za bojenje histoloških isečaka treba da se koristi Löfflerov rastvor metilen plave. Kompaktno tkivo ima tendenciju prekomernog bojenja; za takva tkiva se preporučuje razblaživanje Löfflerov rastvora metilen plave (razblaživanje: 1:10 (1+9) sa destilovanom vodom).

Uklonite parafin sa isečaka na konvencionalan način i rehidrirajte u opadajućoj seriji alkohola. Predtretman sredstvom Sputofluor™ nije neophodan za uzorke fiksirane u formalinu.

Fiksiranje razmaza uzoraka

Uzorci se fiksiraju iznad plamena Bunzenovog plamenika (2–3 puta, vodeći računa da se izbegne prekomerno zagrevanje).

Uzorci se takođe mogu fiksirati zagrevanjem na 100–110 °C u komori za sušenje ili na grejnoj ploči u trajanju od 20 min.

Previsoke temperature ili produženo zagrevanje mogu dovesti do pogoršanja performansi bojenja.

Priprema reagensa

Löfflerov rastvor metilen plave za mikroskopiju koji se koristi za bojenje razmaza isporučuje se spreman za upotrebu, razblaživanje rastvora nije potrebno i samo dovodi do pogoršanja rezultata i stabilnosti bojenja. Za histološke isečke preporučuje se razblaživanje Löfflerovog rastvora metilen plave (1+9 sa destilovanom vodom).

Procedura

Bojenje razmaza uzoraka

Bojenje na stalku za bojenje

Treba se pridržavati navedenih vremena kako bi se garantovao optimalan rezultat bojenja.

Stakalce sa fiksiranim razmazom		
Ziehl-Neelsenov rastvor karbofuksina	potpuno preklopite, pažljivo zagrejte tri puta ispod Bunzenovog plamenika dok ne dođe do formiranja pare Nemojte dozvoliti da rastvor za bojenje proključa!	bojite ukupno 5 minuta
Voda iz slavine	isperite dok ne prestanu da se stvaraju zamućenja od boje	
Hlorovodonična kiselina u etanolu	potpuno preklopite i ostavite da odreaguje	15–30 s*
Voda iz slavine	odmah isperite	
Löfflerov rastvor metilen plave	kontrastno bojenje, potpuno preklopite i ostavite da odreaguje	30 s**
Voda iz slavine	pažljivo isperite	
Sušenje na vazduhu (npr. preko noći ili na 50 °C u komori za sušenje)		

* u zavisnosti od debljine uzorka

**ili 1 min sa razblaženim Löfflerovim rastvorom metilen plave (razblaživanje: 1:10 (1+9) sa dest. vodom)

Preporučuje se pokrivanje nevodenim medijumom za postavljanje (npr. Neo-Mount™, Entellan™, DPX new ili Entellan™ new) i pokrovnim stakalcem kod skladištenja bakterioloških uzoraka tokom više meseci. U tu svrhu, obojeni uzorci moraju dobro da se osuše.
Za analizu obojenih stakalaca sa mikroskopskim povećanjem > 40× preporučuje se upotreba imerzionog ulja.

Bojenje histoloških uzoraka

Bojenje u ćeliji za bojenje

Uklonite parafin sa histoloških pločica na konvencionalan način i rehidrirajte u opadajućoj seriji alkohola.
Stakalca treba da se potope i nakratko promešaju u rastvorima; samo potapanje daje neadekvatne rezultate bojenja.
Stakalca treba ostaviti da se dobro ocede nakon pojedinačnih koraka bojenja kako bi se izbegla bilo kakva nepotrebna unakrsna kontaminacija rastvora.

Stakalce sa histološkim tkivom	
AFB-Color rastvor karbofuksina	30 min
Tekuća voda iz slavine	45 s
Hlorovodonična kiselina u etanolu	15 s
Tekuća voda iz slavine	15 s
Löfflerov rastvor metilen plave*	5 min
Isperite vodom iz slavine	10 s
Etanol 70%	1 min
Etanol 70%	1 min
Etanol 96%	1 min
Etanol 96%	1 min
Etanol 100%	1 min
Etanol 100%	1 min
Ksilen ili Neo-Clear™	5 min
Ksilen ili Neo-Clear™	5 min
Postavite stakalca navlažena sredstvom Neo-Clear™sa medijumom Neo-Mount™ ili stakalca navlažena ksilenom sa npr. medijumom Entellan™ new i pokrovnim stakalcem.	

* Za kontrastno bojenje histoloških uzoraka preporučuje se razblaživanje Löfflerovog rastvora metilen plave (razblaživanje: 1:10 (1+9) sa destilovanom vodom). Ovaj radni rastvor može da se koristi najviše 2 nedelje.

Rezultat

Bakterije otporne na kiselinu	crvena
Pozadina	plava

Procena

Pozitivan rezultat znači „bakterije otporne na kiselinu su detektovane“, a negativan rezultat znači „bakterije otporne na kiselinu nisu detektovane“. Pozitivan rezultat ne znači da je moguća taksonomska klasifikacija mikroskopijom. Ako se detektuju bakterije otporne na kiselinu, potrebno je obaviti dodatne analize u posebno opremljenim laboratorijama. Vitalnost bakterija (aktivna, neaktivna) takođe se ne može odrediti.

Rešavanje problema
Fiksiranje razmaza uzoraka

Dovoljan stepen fiksiranja toplotom pomoću Bunzenovog plamenika ili u komori za grejanje je od suštinskog značaja za sprečavanje infektivnog potencijala uzoraka i daljeg razmnožavanja bakterija.

Nema bojenja bakterija otpornih na kiselinu

Korak dekolorizacije predstavlja jedan od ključnih koraka ovog procesa bojenja i na njega može uticati debljina razmaza uzorka. Pored toga, svež rastvor hlorovodonične kiseline u etanolu je veoma reaktivan, što znači da rezultat treba pažljivo proceniti. Potrebno je da se u koraku dekolorizacije pridržava tačnog vremena inkubacije navedenog u ovom protokolu jer u suprotnom može doći do lažno negativnih rezultata.

Tehničke napomene

Mikroskop koji se koristi treba da ispunjava zahteve laboratorije za medicinsku dijagnostiku.
Kada koristite sisteme za automatsko bojenje, pratite uputstvo za upotrebu koje ste dobili od dobavljača sistema i softvera.
Pre pohranjivanja uklonite višak imerzionog ulja.

Karakteristike analitičkih performansi

„Löfflerov rastvor metilen plave“ boji i na taj način omogućava vizuelizaciju bioloških struktura, kako je opisano u poglavlju „Rezultat“ u ovom uputstvu za upotrebu. Proizvod smeju koristiti samo ovlašćene i kvalifikovane osobe, što između ostalog uključuje pripremu uzoraka i reagensa, rukovanje uzorcima, histološku obradu, odluke o odgovarajućim kontrolama i drugo.
Analitičke performanse proizvoda potvrđene su testiranjem svake proizvodne serije. Redovno uspešno učestvovanje u međunarodnim međulaboratorijskim ispitivanjima dodatna je i nepovezana potvrda analitičke specifičnosti.
Za sledeće bojenje, analitičke performanse su potvrđene u smislu specifičnosti, osetljivosti i ponovljivosti proizvoda sa stopom od 100%:

	Specifičnost između testova	Osetljivost između testova	Specifičnost unutar testova	Osetljivost unutar testova
Bakteriološko bojenje				
Bakterije otporne na kiselinu	20/20	20/20	7/7	7/7
Pozadina	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Rezultati analitičkih performansi

Podaci unutar testova (izvedeno na istoj seriji) i između testova (izvedeno na različitim serijama) navode broj pravilno obojenih struktura u odnosu na broj izvršenih testova.

Rezultati ove procene performansi potvrđuju da je proizvod pogodan za predviđenu upotrebu i da je pouzdan.

Dijagnostika

Dijagnoze sme da postavlja samo ovlašćeno i kvalifikovano osoblje.
Moraju se koristiti važeće nomenklature.
Ova metoda može se dodatno koristiti u humanoj dijagnostici. Daljnja ispitivanja moraju biti odabrana i provedena prema priznatim metodama.
Uz svaku primenu treba provesti odgovarajuće kontrole kako bi se izbegao netačan rezultat.

Skladištenje

Skladištite Löfflerov rastvor metilen plave – za mikroskopiju na temperaturi od +15 °C do +25 °C.

Rok trajanja

Löfflerov rastvor metilen plave – za mikroskopiju se može koristiti do navedenog roka trajanja.
Nakon prvog otvaranja bočice, sadržaj se može koristiti do navedenog roka trajanja ako se čuva na temperaturi od +15 °C do +25 °C.
Bočice moraju uvek biti dobro zatvorene.

Kapacitet

približno 250 bojenja / 500 ml

Dodatna uputstva

Samo za profesionalnu upotrebu.
Da bi se izbegle greške, primenu mora da provodi samo kvalifikovano osoblje.
Moraju se poštovati nacionalne smernice za bezbednost na radu i obezbeđenje kvaliteta.
Moraju se koristiti mikroskopi opremljeni prema standardu.
Po potrebi koristiti standardnu centrifugu pogodnu za laboratoriju za medicinsku dijagnostiku.

Zaštita od infekcije

Moraju se preduzeti efikasne mere za zaštitu od infekcije u skladu sa smernicama laboratorije.

Uputstvo za odlaganje

Pakovanje se mora odložiti u skladu sa važećim smernicama za odlaganje. Upotrebljeni rastvori i rastvori kojima je istekao rok trajanja moraju se odložiti kao poseban otpad u skladu sa lokalnim smernicama. Informacije o

odlaganju se mogu dobiti putem hiperveze „Saveti za odlaganje proizvoda mikroskopije“ na www.microscopy-products.com. Unutar EU trenutno se primenjuje UREDBA (EZ) br. 1272/2008 o klasifikaciji, obeležavanju i pakovanju supstanci i smeša, kojom se menja i ukida Direktiva 67/548/EEZ i 1999/45/EZ i izmene i dopunama Uredbe (EZ) br. 1907/2006.

Pomoćni reagensi

Kat. br.	1.00327	Hlorovodonična kiselina u etanolu za mikroskopiju	1 l, 5 l
Kat. br.	1.00497	AFB-Color, izmenjen Komplet za bojenje za detekciju bakterija otpornih na kiselinu (AFB) metodom toplog bojenja	1 komplet
Kat. br.	1.00579	DPX new nevodeni medij za postavljanje za mikroskopiju	500 ml
Kat. br.	1.04699	Imerziona ulje za mikroskopiju	bočica sa kapaljkom od 100 ml, 100 ml, 500 ml
Kat. br.	1.07960	Entellan™ medij za brzo postavljanje za mikroskopiju	500 ml
Kat. br.	1.07961	Entellan™ new medij za brzo postavljanje za mikroskopiju	100 ml, 500 ml
Kat. br.	1.08000	Sputofluo™ za mikroskopiju	1 l
Kat. br.	1.08298	Ksilen (mešavina izomera) za histologiju	4 l
Kat. br.	1.08512	AFB-Color rastvor karbofuksina za mikroskopsko istraživanje bakterija otpornih na kiselinu (AFB) (hladno bojenje)	500 ml, 2,5 l
Kat. br.	1.09016	Neo-Mount™ bočica sa kapaljkom bezvodni medij za postavljanje	od 100 ml, 500 ml za mikroskopiju
Kat. br.	1.09215	Ziehl-Neelsenov rastvor karbofuksina za mikroskopiju	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat. br.	1.09843	Neo-Clear™ (zamena za ksilen) za mikroskopiju	5 l

Klasifikacija opasnosti

Kat. br. 1.01287
Obratite pažnju na klasifikaciju opasnosti odštampanu na etiketi i informacije date u bezbednosnom listu.
Bezbednosni list je dostupan na veb-sajtu i na zahtev.

Osnovne komponente proizvoda

Kat. br.	1.01287	
C.I.	52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH		190 g/l
pH		8,0–8,6
1 l =	0,97 kg	

Opšta napomena

Ako se tokom korišćenja ovog proizvoda ili ako usled tog korišćenja dođe do ozbiljnog incidenta, prijavite ga proizvođaču i/ili njegovom ovlašćenom predstavniku, kao i nadležnom telu vaše zemlje.

Literatura

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn’s Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Editon



H226: Zapaljiva tečnost i para.
P210: Držati dalje od toplote, vrućih površina, varnica, otvorenog plamena i drugih izvora paljenja. Zabranjeno pušenje.
P233: Držati posudu čvrsto zatvorenu.
P240: Uzemljen i pričvršćen kontejner i oprema za prijem.
P241: Koristiti opremu [elektrooprema / ventilaciona / za osvetljenje] koja ne može da izazove eksploziju.
P242: Koristiti alat koji ne varniči.
P243: Preduzeti mere za sprečavanje statičkog pražnjenja.

Kompanija Merck u oblasti nauke o životu deluje kao MilliporeSigma u SAD-u i Kanadi.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka i/ili njegove podružnice. Sva prava zadržana. Merck i Sigma-Aldrich su zaštitni znakovi kompanije Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka. Svi ostali zaštitni znakovi su vlasništvo njihovih vlasnika. Detaljne informacije o zaštitnim znakovima dostupne su putem javno dostupnih izvora.

Istorija revizija

Verzija	Komentar o izmeni
2024-Jul-01	Početna verzija sa uvođenjem istorije revizija
2024-Jul-01 V.2	Dodat prevod na srpski i finski jezik

Pogledajte Uputstvo za upotrebu

Proizvođač

Kataloški broj

Šifra serije

Oprez, proučite prateće dokumente

Upotrebiti do DD. MM. GGGG.

Ograničenje temperature

Status: 2024-Jul-01 V.2

1.01287.0100
1.01287.0500
1.01287.2500

REF

Mikroskopia

Löfflerin metyleenisiniliuos

mikroskopiaan

Vain ammattilaisten käyttöön

IVD

In vitro -diagnostiikkaan tarkoitettu lääkinnällinen laite

CE

Käyttötarkoitus

Löfflerin metyleenisiniliuos – mikroskopiaan -liuosta käytetään ihmisten lääketieteelliseen soludiagnostiikkaan, ja se on tarkoitettu ihmisperäisen näyttemateriaalin bakteriologiseen ja histologiseen tutkimiseen. Se on käyttövalmis värjäysliuos, joka muiden tuotevalikoimamme *in vitro* -diagnostisten tuotteiden kanssa käytettynä muuttaa bakteriologisissa ja histologisissa näyttemateriaaleissa, kuten rikastettujen bakteeriviljelmien sivelynäytteissä tai esimerkiksi keuhkojen histologisissa leikkeissä, olevat kohderakenteet (haponkestävät bakteerit [AFB]) (kiinnityksen, värjäyksen, vastavärjäyksen ja petauksen avulla) diagnostiseen arviointiin soveltuviksi.

Värjäämättömät rakenteet ovat suhteellisen vähäkontrastisia, ja niitä on vaikea erottaa valomikroskooppilla. Tällaisissa tapauksissa värjäysliuosten avulla saadut kuvat auttavat hyväksyttävä ja pätevää tutkijaa muodon ja rakenteen paremmassa määrittelyssä. Lopullisen diagnoosin saamiseksi on tehtävä lisätestejä tunnistettujen, validien menetelmien mukaisesti.

Periaate

Suuri osa haponkestävien bakteerien soluseinästä on vahaa ja lipidejä, ja siksi soluseinään imeytyy väriaineita vain hyvin hitaasti. Tehokkain värjäysmenetelmä on Ziehl-Neelsenin mukainen kuumavärjäys. Tässä menetelmässä näytteelle levitetään karbolifuksiiniliuosta, joka kuumennetaan. Tämä kuumennuskäsittely nopeuttaa fuksiiniväriaineen imeytymistä ja siten myös mykolaatti-fuksiinikompleksin muodostumista soluseinässä. Kun fuksiiniväriaine on imeytynyt haponkestäviin bakteereihin, on käytännössä mahdotonta poistaa niistä enää väriä, edes silloin, kun ne käsitellään voimakkaasti värinpoistoliuoksella, kuten suolahappo-etanolioliuoksella. Sen vuoksi haponkestäviä bakteereita kutsutaan värjäysten suhteen hapon- ja alkoholinkestäviksi, ja ne näkyvät mikroskooppitutkimuksessa punaisiksi värjäytyneinä. Vastaavasti kaikki ei-haponkestävät mikro-organismit vastavärjätään sopivalla väriaineella. Tässä käyttöohjeessa vastavärjäykseen käytetään metyleenisinistä. Näytteiden esikäsittely Sputofluor™-tuotteella liuottaa bakteerit ympäröivästä viskoosisesta ysköksestä ja solumateriaalista.

Näyttemateriaali

Bakteerimateriaalin sivelynäytteet, joiden on annettu kuivua ja jotka on kiinnitetty lämmöllä ja esikäsittely Sputofluor™-tuotteella, kuten yskös, ohutneulabiopsioiden (FNAB) sivelynäytteet, huuhtelunäytteet, leimausnäytteet, effuusionäytteet, märkä, tulehdusnesteet, nestemäiset ja kiinteät viljelmät
Formaliinilla kiinnitetyn, parafiiniin valetun kudoksen leikkeet (3–4 µm:n paksuiset parafiinileikkeet)

Reagenssit

Luettelonro 1.01287

Löfflerin metyleenisiniliuos
mikroskopiaan

100 ml, 500 ml, 2,5 l

Muut tarvittavat materiaalit:

Luettelonro	1.09215	Ziehl-Neelsenin karbolifuksiiniliuos mikroskopiaan	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Luettelonro	1.08512	AFB-Color-karbolifuksiiniliuos haponkestävien bakteerien (AFB) mikroskooppiseen tutkimiseen (kylmävärjäys)	500 ml, 2,5 l
Luettelonro	1.00327	Suolahappo etanolissa mikroskopiaan	1 l, 5 l
Luettelonro	1.08000	Sputofluor™ mikroskopiaan	1 l

Vaihtoehtoisesti:

Yksittäisten reagenssien yhdistelmän sijasta sivelynäytteisiin voidaan käyttää värjäyssarjaa 1.00497.0001:

Luettelonro 1.00497.0001

AFB-Color muunneltu

Värjäyssarja haponkestävien bakteerien (AFB) havaitsemiseen
kuumavärjäysmenetelmällä

1 sarja

Näytteiden valmistelu

Näytteen saa ottaa vain pätevä henkilökunta.

Kaikki näytteet on käsiteltävä viimeisimmän kehityksen mukaisella tekniikalla.

Kaikki näytteet on merkittävä selkeästi.

Näytteiden ottamiseen ja niiden valmisteluun on käytettävä sopivia välineitä. Noudata valmistajan antamia käyttöohjeita.

Kun käytetään vastaavia lisäreagensseja, on noudatettava niiden vastaavia ohjeita.

Yskös

Haponkestävät bakteerit on esikäsitteltävä Sputofluor™-tuotteella niiden liuottamiseksi limasta ja muista solurakenteista. Tässä käsittelyssä vaikuttava ainesosa hypokloriitti hajottaa orgaanisen materiaalin hapettamalla ja vapauttaa haponkestävät bakteerit hellävaroen niin, että niitä voidaan käsitellä edelleen.

Reagenssien valmistelu: 15-prosenttisen Sputofluor™-liuoksen valmistaminen

Noin 100 ml liuosta valmistetaan sekoittamalla seuraavat:

Sputofluor™	15 ml
Tislattu vesi	85 ml

Näyttemateriaalin valmistaminen sentrifugiputkiin:	
Näyte	1 osa (vähintään 2 ml)
Sputofluor™-liuosta (15-prosenttinen tislatussa vedessä)	3 osaa
Ravitele voimakkaasti	10 min
Sentrifugoi nopeudella 3 000–4 800 1/min	20 min
Dekantoi supernatantti Valmista sedimentistä sivelynäytteitä Anna kuivua	

Punktionäytteet, lavaationäytteet, sedimentit

Tee asianmukaisten rikastustoimien jälkeen näyttemateriaalista sivelynäyte objektilasille ja anna kuivua.

Histologiset leikkeet

Histologisten leikkeiden värjäämiseen pitäisi käyttää Löfflerin metyleenisiniliuosta. Tiiviillä kudoksella on taipumus ylivärjäytyä; tällaisille kudoksille suositellaan Löfflerin metyleenisiniliuoksen laimentamista (laimennus: 1:10 [1+9] tislattulla vedellä). Poista parafiini leikkeistä perinteiseen tapaan ja rehydroi laskevaa alkoholisarjaa käyttäen. Esikäsittely Sputofluor™-tuotteella ei ole tarpeen formaliinilla kiinnitetyille näytteille.

Sivelynäytteiden kiinnitys

Näytteet kiinnitetään bunsenpolttimella (2–3 kertaa, varoen liiallista kuumentamista).

Näytteet voidaan kiinnittää myös kuumentamalla 20 minuuttia 100–110 °C:ssa lämpökaapissa tai lämpöalustalla.

Liiallisiin lämpötiloihin tai pitkäaikaiseen kuumentamiseen voi liittyä värjäyksen suorituskyvyn heikkenemistä.

Reagenssien valmistelu

Sivelynäytteiden värjäykseen käytettävä Löfflerin metyleenisiniliuos mikroskopiaan -tuote on käyttövalmis liuos. Liuoksen laimentamista ei tarvita, ja laimentaminen vain heikentää värjäystulosta ja säilyvyyttä. Histologisille leikkeille suositellaan Löfflerin metyleenisiniliuoksen laimentamista (1+9 tislattulla vedellä).

Menetelmä

Sivelynäytteiden värjäys

Värjäys värjäystelineellä

Ilmoitettuja aikoja on noudatettava optimaalisen värjäystuloksen takaamiseksi.

Objektilasi, jolla on kiinnitetty sivelynäyte		
Ziehl-Neelsenin karbolifuksiiniliuos	Peitä näyte kokonaan, kuumenna varovasti kolme kertaa alapuolelta bunsenpolttimella, kunnes muodostuu höyryä Älä anna värjäysliuoksen kiehua!	Värvää yhteensä 5 minuutin ajan
Hanavesi	Huuhtele, kunnes väriainepilviä ei enää muodostu	
Suolahappo etanolissa	Peitä näyte kokonaan ja anna reagoida	15–30 sekuntia*
Hanavesi	Huuhtele välittömästi	
Löfflerin metyleenisiniliuos	Vastavärjäys, peitä näyte kokonaan ja anna reagoida	30 sekuntia**
Hanavesi	Huuhtele huolella	
Anna kuivua (esim. yön ajan tai 50 °C:ssa lämpökaapissa)		

* näytteen paksuuden mukaisesti
**tai 1 min laimennetulla Löfflerin metyleenisiniliuoksella (laimennus: 1:10 [1+9] tislatulla vedellä)

Peittämistä vedettömällä petausaineella (esim. Neo-Mount™, Entellan™, DPX uusi tai Entellan™ uusi) ja peitinlasilla suositellaan bakteriologisten näytteiden säilyttämiseksi useiden kuukausien ajan. Värjätyt näytteet on tätä tarkoitusta varten kuivattava erittäin hyvin.
Immersioöljyn käyttämistä suositellaan värjättyjen objektilasien analysointiin mikroskoopin yli 40-kertaisella suurennoksella.

Histologisten näytteiden värjäys

Värjäys värjäyskammiossa

Poista parafiini histologisista näytteistä perinteiseen tapaan ja rehydroi laskevaa alkoholisarjaa käyttäen.
Objektilasit täytyy upottaa liuoksiin, ja niitä on liikuteltava lyhyesti ympäriinsä liuoksissa. Pelkällä upotuksella ei saada riittäviä värjäystuloksia.
Nesteiden on annettava valua kunnolla objektilaseista yksittäisten värjäysvaiheiden jälkeen, jotta vältetään liuosten tarpeeton ristikontaminoituminen.

Objektilasi, jolla on histologista kudosta	
AFB-Color-karbolifuksiiniliuos	30 min
Juokseva hanavesi	45 sekuntia
Suolahappo etanolissa	15 sekuntia
Juokseva hanavesi	15 sekuntia
Löfflerin metyleenisiniliuos*	5 min
Juokseva hanavesi	10 sekuntia
70-prosenttinen etanoli	1 min
70-prosenttinen etanoli	1 min
96-prosenttinen etanoli	1 min
96-prosenttinen etanoli	1 min
100-prosenttinen etanoli	1 min
100-prosenttinen etanoli	1 min
Ksyleeni tai Neo-Clear™	5 min
Ksyleeni tai Neo-Clear™	5 min
Petaa Neo-Clear™-käsittellyt objektilasit Neo-Mount™-tuotteella tai ksyleenikäsittellyt lasit esim. Entellan™ uusi -tuotteella sekä peitinlasilla.	

* Histologisten kudosten vastavärjäykseen suositellaan Löfflerin metyleenisiniliuoksen laimentamista (laimennus: 1:10 [1+9] tislatulla vedellä). Tätä käyttöliuosta voidaan käyttää enintään 2 viikkoa.

Tulos

Haponkestävät bakteerit	Punainen
Tausta	Sininen

Arviointi

Positiivinen tulos tarkoittaa, että ”haponkestäviä bakteereita on havaittu”, ja negatiivinen tulos tarkoittaa, että ”haponkestäviä bakteereita ei ole havaittu”. Positiivinen tulos ei tarkoita, että taksonominen luokittelu mikroskoopilla olisi mahdollista. Jos haponkestäviä bakteereita havaitaan, tarvitaan lisäanalyyskejä erityisvarustelluissa laboratorioissa. Myöskään bakteerien elinkelpoisuutta (aktiivinen, inaktiivinen) ei voida määrittää.

Vianmääritys

Sivelynäytteiden kiinnitys

Riittävä kuumakiinnityksen määrä bunsenpolttimella tai lämpökaapissa on olennaisen tärkeää näytteiden tartuntakyvyn ja bakteerien lisääntymisen estämiseksi.
Haponkestävät bakteerit eivät värjäydy
Tämän värjäyskäsitelyn kriittisen tärkeä vaihe on värinpoistovaihe, johon sivelynäytteen paksuus voi vaikuttaa.
Lisäksi suolahapon tuore liuos etanolissa on erittäin reaktiivista, mikä tarkoittaa, että tulosta on arvioitava varovasti. Tässä menettelyohjeessa ilmoitettuja inkubointiaikoja on noudatettava tarkasti värinpoistovaiheessa, sillä muutoin seurauksena voi olla vääriä negatiivisia tuloksia.

Teknisiä huomautuksia

Käytettävän mikroskoopin on täytettävä kaikki lääketieteellisen diagnostisen laboratorion mukaiset vaatimukset.
Kun käytetään automaattisia värjäysjärjestelmiä, noudata järjestelmän ja ohjelmiston toimittajan laatumia käyttöohjeita.
Poista liiallinen immersioöljy ennen näytteen arkistointia.

Analyyttisen suorituskyvyn ominaisuudet

Löfflerin metyleenisiniliuos värjää biologisia rakenteita ja saa ne siten näkyviin tämän käyttöohjeen ”Tulos”-kohdassa kuvatulla tavalla. Tuotetta saavat käyttää vain hyväksytyt ja pätevät henkilöt. Tämä käsittää mm. näytteen ja reagenssien valmistelun, näytteen käsittelyn, histologisen käsittelyn, sopivia kontrollinäytteitä koskevat päätökset jne.
Tuotteen analyttinen suorituskkyky varmistetaan testaamalla jokainen tuotantoerä. Säännölliset menestykselliset osallistumiset laboratorioden välisiin kansainvälisiin testeihin antavat riippumattoman lisävahvistuksen analyttisestä spesifisyydestä.

Seuraavien värjäysten analyttisen suorituskyvyn on vahvistettu olevan 100 % tuotteen spesifisyyden, herkkyyden ja toistettavuuden osalta:

	Määritysten välinen spesifisyys	Määritysten välinen herkkyys	Määrikyksen sisäinen spesifisyys	Määrikyksen sisäinen herkkyys
Bakteriologinen värjäys				
Haponkestävät bakteerit	20/20	20/20	7/7	7/7
Tausta	20/20	20/20	7/7	7/7
<i>Pasteurella multocida</i>	20/20	20/20	7/7	7/7

Analyttisen suorituskyvyn tulokset

Määritysten sisäiset (tehty samalla erällä) ja määritysten väliset (tehty eri erillä) tiedot kertovat oikein värjäytyneiden rakenteiden lukumäärän suhteessa tehtyjen määritysten lukumäärään.

Tämän suorituskkykyarviointin tulokset vahvistavat, että tuote soveltuu tarkoitettuun käyttöön ja toimii luotettavasti.

Diagnostiikka

Diagnooseja saa tehdä vain hyväksytty ja pätevä henkilökunta.
Voimassa olevaa nimitystä on käytettävä.
Tätä menetelmää voidaan käyttää täydentävänä menetelmänä ihmisten diagnostiikassa.
Lisätestit on valittava ja toteutettava tunnustettujen menetelmien mukaisesti.
Kullakin käyttökerralla on käytettävä sopivia kontrolleja virheellisen tuloksen välttämiseksi.

Säilytys

Säilytä Löfflerin metyleenisiniliuos mikroskopiaan -tuote +15...+25 °C:ssa.

Varastointiaika

Löfflerin metyleenisiniliuos mikroskopiaan -tuotetta voidaan käyttää ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka.
Ensimmäisen avaamisen jälkeen pullon sisältöä voidaan käyttää ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään saakka, kun tuotetta säilytetään +15...+25 °C:ssa.
Pullot on aina pidettävä tiukasti suljettuina.

Kapasiteetti

Noin 250 värjäystä / 500 ml.

Muita ohjeita

Vain ammattilaisten käyttöön.
Virheiden välttämiseksi vain pätevä henkilökunta saa käyttää tuotetta. Kansallisia työturvallisuus- ja laadunvalvontaohjeita on noudatettava. Käytössä olevissa mikroskoopeissa on oltava vakiovaatimusten mukaiset varusteet.
Tarvittaessa on käytettävä lääketieteelliseen diagnostiseen laboratorioon soveltuvaa vakiotyyppistä sentrifugia.

Suojaaminen tartuntaa vastaan

Tartunnalta suojaamiseen on käytettävä tehokkaita torjuntatoimia laboratorion ohjeiden mukaisesti.

Hävittämisohteet

Pakkaus on hävitettävä voimassa olevien hävittämisohteiden mukaisesti. Käytetyt liuokset ja varastointiajan ohittaneet liuokset on hävitettävä erityisjätteenä paikallisten ohjeiden mukaisesti. Hävitystä koskevat tiedot voi saada verkkosivuston www.microscopy-products.com pikalinkistä "Hints for Disposal of Microscopy Products" (Ohjeita mikroskopiatuotteiden hävittämiseen). EU:n alueella pätee voimassa oleva sovellettava ASETUS (EY) N:o 1272/2008, aineiden ja seosten luokituksesta, merkinnöistä ja pakkaamisesta sekä direktiivien 67/548/ETY ja 1999/45/EY muuttamisesta ja kumoamisesta ja asetuksen (EY) N:o 1907/2006 muuttamisesta.

Lisäreagenssit

Luettelonro	1.00327	Suolahappo etanolissa mikroskopiaan	1 l, 5 l
Luettelonro	1.00497	AFB-Color muunneltu värjääsarja haponkestävien bakteerien (AFB) havaitsemiseen kuumavärjäysmenetelmällä	1 sarja
Luettelonro	1.00579	DPX uusi vedetön pikapetausaine mikroskopiaan	500 ml
Luettelonro	1.04699	Immersioöljy mikroskopiaan	100 ml:n tippapullo, 100 ml, 500 ml
Luettelonro	1.07960	Entellan™ pikapetausaine mikroskopiaan	500 ml
Luettelonro	1.07961	Entellan™ uusi pikapetausaine mikroskopiaan	100 ml, 500 ml, 1 l
Luettelonro	1.08000	Sputofluol™ mikroskopiaan	1 l
Luettelonro	1.08298	Ksyleeni (isomeeriseos) histologiaan	4 l
Luettelonro	1.08512	AFB-Color-karbolifuksiiniliuos haponkestävien bakteerien (AFB) mikroskooppiseen tutkimiseen (kylmävärjäys)	500 ml, 2,5 l
Luettelonro	1.09016	Neo-Mount™ vedetön petausaine mikroskopiaan	100 ml:n tippapullo, 500 ml
Luettelonro	1.09215	Ziehl-Neelsenin karbolifuksiiniliuos mikroskopiaan	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Luettelonro	1.09843	Neo-Clear™ (ksyleeninkorvike) mikroskopiaan	5 l

Vaaraluokitus

Luettelonro 1.01287

Huomioi etikettiin painettu vaaraluokitus ja käyttöturvallisuustiedotteessa annetut tiedot.

Käyttöturvallisuustiedote on saatavilla verkkosivustolla ja pyynnöstä.

Tuotteen tärkeimmät ainesosat

Luettelonro 1.01287

C.I. 52015	4,2 g/l
C ₂ H ₅ OH	190 g/l
pH	8,0–8,6
1 l =	0,97 kg

Yleinen huomautus

Jos tämän laitteen käytön aikana tai sen seurauksena ilmenee vakava vaaratilanne, ilmoita siitä valmistajalle ja/tai sen valtuutetulle edustajalle sekä kansalliselle viranomaiselle.

Kirjallisuus

1. Romeis - Mikroskopische Technik, Editors: Mulisch, Maria, Welsch, Ulrich, 2015, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 19. Auflage
2. Theory and Practice of Histological Techniques, John D Bancroft and Marilyn Gamble, 6th Edition
3. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W. and Kiernan, J.A). Bios, 2002
4. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Editor: Uwe Groß, Thieme 2009, 2. Auflage
5. Histological and Histochemical Methods, Theory and practise, J.A. Kiernan, Scion, 5th Edition



H226: Syttyvä neste ja höyry.

P210: Suojaa lämmöltä, kuumilta pinnoilta, kipinöiltä, avotulelta ja muilta sytytyslähteiltä. Tupakointi kielletty.

P233: Säilytä tiiviisti suljettuna.

P240: Maadoita ja yhdistä säiliö ja vastaanottavat laitteet.

P241: Käytä räjähdysturvallisia sähkö-/ilmanvaihto-/valaisin-/laitteita.

P242: Käytä kipinöimättömiä työkaluja.

P243: Estä staattisen sähkön aiheuttama kipinöinti.

Versiohistoria

Versio	Muutoksen kommentti
2024-Jul-01	Versiohistorian lisäämisen ensimmäinen versio
2024-Jul-01 V.2	Lisätty serbian- ja suomenkielinen käännös



Perehdy
käyttöohjeisiin



Valmistaja



Luettelonumero



Eräkoodi



Huomio, perehdy
liitettyihin asiakirjoihin



Viimeinen
käyttöpäivä
VVVV-KK-PP



Lämpötilarajoitus

Status: 2024-Jul-01 V.2

Merck-yhtiön biotieteisiin perustuva liiketoiminta toimii Yhdysvalloissa ja Kanadassa nimellä MilliporeSigma.

© 2025 Merck KGaA, Darmstadt, Saksa, ja/tai sen tytäryhtiöt. Kaikki oikeudet pidätetään. Merck ja Sigma-Aldrich ovat Merck KGaA -yhtiön, Darmstadt, Saksa, tavaramerkkejä. Kaikki muut tavaramerkit ovat haltijoidensa omaisuutta. Yksityiskohtaiset tavaramerkkitiedot ovat saatavilla julkisista lähteistä.



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

MERCK