

1.01287.0100

1.01287.0500

1.01287.2500

## 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 Sputofluol® oddělí bakterie od okolního vazkého sputa a buněčného materiálu.

### Materiál vzorku

Volně zaschlé a teplem fixované nátěry bakteriologických materiálů předem ošetřené přípravkem Sputofluol®, 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. 101287 Roztok methylenové modři podle Löfflera pro mikroskopii 100 ml, 500 ml, 2,5 l

### Další potřebné materiály:

Kat. č. 109215 Roztok karbolfuchsinu podle Ziehl-Neelsena pro mikroskopii 100 ml, 500 ml, 2,5 l

Kat. č. 108512 AFB-Color roztok karbolfuchsinu pro mikroskopické vyšetření acidorezistentních bakterie (AFB) (barvení za studena) 500 ml, 2,5 l

Kat. č. 100327 Kyselina chlorovodíková v ethanolu pro mikroskopii 1 l, 5 l

Kat. č. 108000 Sputofluol® 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 sada

### Alternativa k histologii:

Kat. č. 132450 Souprava pro barvení AFB pro histologii pro detekci acidorezistentních bakterie v histologické tkáni 1 sada

### Příprava vzorku

Odběr vzorku musí provést kvalifikovaný personál.

Se všemi vzorky je nutné nakládat za použití nejmodernější technologie.

Všechny vzorky musejí být jasně 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 Sputofluol® a oddělit je tak od hlenu 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 Sputofluol® 15 %

Na přípravu přibližně 100 ml směsného roztoku:

Sputofluol®	15 ml
Destilovaná voda	85 ml

Příprava materiálu vzorku v centrifugačních zkumavkách:	
Vzorek	1 díl (min. 2 ml)
Roztok Sputofluol® (15 % v destilované vodě)	3 dílů
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 Sputofluol® 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.

Skříčko s fixovaným nátěrem		
Roztok karbolfuchsinu podle Ziehl-Neelsena	zakryjte zcela, pečlivě 3krát zahřejte zespolu 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 nechte reagovat	15–30 s*
Vodovodní voda	ihned opláchněte	
Löfflerův roztok methylenové modři	dobarvení, zcela zakryjte a nechte reagovat	30 s**
Vodovodní voda	pečlivě opláchněte	
Ponechteje 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 doporučuje překrytí nevodným montovacím médiem (např. Neo-Mount®, Entellan®, DPX nový nebo Entellan® nový) a použití krycího skříčka.

Pro tyto účely musejí být barvené vzorky velmi dobře vysušené. Nezalité barvené vzorky zůstávají stabilní přibližně 3 dny, po překrytí imerzním olejem pouze několik hodin.

Při analýze obarvených nátěrů pod mikroskopem při více než 40násobném zvětšení se doporučuje používat imerzní olej.

### Barvení histologických vzorků

#### Barvení v barvicí komůrce

Histologická skříčka zbavte obvyklým způsobem parafínu a rehydratujte je sestupnou alkoholovou řadou.

Skříčka 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.

Skříčko 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
LLöfflerův 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 skříčka Neo-Clear® montujte za použití přípravku Neo-Mount®, případně xylenová vlhká skříčka např. za použití přípravku Entellan® nový a krycího skříčka.	

\* 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“, negativní výsledek znamená „nepřítomnost acidorezistentní bakterie“. Pozitivní 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 ovlivněn 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 falešně 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.

## 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 laboratorními 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 Microscopy Products“ (Tipy pro likvidaci výrobků pro mikroskopii) na adrese [www.microscopy-products.com](http://www.microscopy-products.com). V rámci EU platí stávající příslušné NARIZENÍ (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, měnicí a rušící směrnice 67/548/EHS a 1999/45/ES a měnicí nařízení (ES) č. 1907/2006.

## Pomocná činidla

Kat. č. 100327	Kyselina chlorovodíková v ethanolu pro mikroskopii	1 l, 5 l
Kat. č. 100497	AFB-Color modifikovaná barvicí souprava pro detekci acidorezistentních bakterie (AFB) metodou horkého barvení	1 sada
Kat. č. 100579	DPX nový bezvodé montovací médium pro mikroskopii	500 ml
Kat. č. 103699	Imerzní olej Type N podle ISO 8036 pro mikroskopii	100 ml kapací lahvička

Kat. č. 104699	Imerzní olej pro mikroskopii	100 ml kapací lahvička, 100 ml, 500 ml
Kat. č. 107960	Entellan® rychlé zalévací médium pro mikroskopii	500 ml
Kat. č. 107961	Entellan® nový rychlé zalévací médium pro mikroskopii	100 ml, 500 ml, 1 l
Kat. č. 108000	Sputofluol® pro mikroskopii	1 l
Kat. č. 108298	Xylen (isomerická směs) pro histologii	4 l
Kat. č. 108512	AFB-Color roztok karbolfuchsinu pro mikroskopické vyšetření acidorezistentních bakterie (AFB) (barvení za studena)	500 ml, 2,5 l
Kat. č. 109016	Neo-Mount® bezvodé montovací médium pro mikroskopii	100 ml kapací lahvička, 500 ml
Kat. č. 109215	Roztok karbolfuchsinu podle Ziehl-Neelsena pro mikroskopii	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Kat. č. 109843	Neo-Clear® (náhražka xyleny) pro mikroskopii	5 l
Kat. č. 132450	Souprava pro barvení AFB pro histologii pro detekci acidorezistentních bakterií v histologické tkáni	1 sada

### Klasifikace rizik

Kat. č. 101287

Říďte se prosím klasifikacemi rizik vytisknutými na štítku a informacemi uvedenými v bezpečnostním listě. Bezpečnostní list je dostupný na internetových stránkách a na požádání. POZOR! Obsahuje látky karcinogenní, mutagenní a/nebo toxické pro reprodukci. Dodržujte příslušné bezpečnostní pokyny v bezpečnostním listu.

### Hlavní složky výrobku

Kat. č. 101287

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

### Jiné výrobky pro IVD

Kat. č. 105174	Roztok hematoxylinu, modifikován podle Gilla III pro mikroskopii	500 ml, 1 l, 2,5 l
Kat. č. 109093	AFB-Fluor barvicí souprava pro fluorescenčně-mikroskopické stanovení acidorezistentních bakterie	6 x 500 ml
Kat. č. 109204	Giemsova azur-eosin-methylenová modř roztok pro mikroskopii	100 ml, 500 ml, 1 l, 2,5 l
Kat. č. 109844	Eosin Y 0,5 %, vodný roztok, pro mikroskopii	1 l, 2,5 l
Kat. č. 111609	Histosec® pastilky bod tuhnutí 56 -58 °C, zalévací médium pro histologii	1 kg, 10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Kat. č. 111885	Gram-Color barvicí souprava pro barvení Gramovou metodou	1 sada
Kat. č. 115161	Histosec® pastilky (bez DMSO) bod tuhnutí 56-58°C, zalévací médium pro histologii	10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Kat. č. 116450	AFB-Color barvicí souprava pro mikroskopické vyšetření acidorezistentních bakterie (AFB) (barvení za studena)	1 sada

### 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.

### 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



Viz návod k použití



Výrobce



Katalogové číslo



Kód šarže



Pozor, pročtěte si připojené dokumenty



Spotřebujte do RRRR-MM-DD



Teplotní omezení

Status: 2020-Jul-13

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany,  
Tel. +49(0)6151 72-2440  
[www.microscopy-products.com](http://www.microscopy-products.com)

EMD Millipore Corporation, 400 Summit Drive  
Burlington MA 01803, USA, Tel. +1-978-715-4321  
Sigma-Aldrich Canada Co. or Millipore (Canada) Ltd.  
2149 Winston Park, Dr. Oakville, Ontario, L6H 6J8  
Phone: +1 800-565-1400

