

1.01287.0100

1.01287.0500

1.01287.2500

Mikroskopia

Błękit metylenowy Löfflera, roztwór

do mikroskopii

Wyłącznie do użytku przez specjalistów



Urządzenia medyczne do diagnostyki in vitro



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 wchłoną 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 alkohooloporne 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. 101287 Błękit metylenowy Löfflera, roztwór do mikroskopii 100 ml, 500 ml, 2,5 l

Również wymagane:

Nr kat. 109215 Fuksyna karbolowa Ziehla-Neelsena, roztwór do mikroskopii 100 ml, 500 ml, 2,5 l

Nr kat. 108512 Roztwór fuksyny karbolowej AFB-Color do mikroskopowego badania bakterii kwasoodpornych (AFB) (barwienie na zimno) 500 ml, 2,5 l

Nr kat. 100327 Kwas solny, roztwór etanolowy do mikroskopii 1 l, 5 l

Nr kat. 108000 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 zestaw

Alternatywa dla histologii:

Nr kat. 132450 Zestaw do barwienia AFB do histologii do wykrywania bakterii kwasoodpornych w tkance histologicznej 1 zestaw

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/ użycowania. 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 wstrząsnąć.	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 przebarwienia; 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 utrwalić, ogrzewając je w temp. 100 - 110°C w suszarku 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	splukiwać aż do ustania powstawania obłoków barwnika.	
Kwas solny w etanolu	dokładnie przykryć i pozostawić do wystąpienia odczynu	15 - 30 sek.*
Woda z kranu	natychmiast splukać.	
Błękit metylenowy Löfflera, roztwór	counterstaining, dokładnie przykryć i pozostawić do wystąpienia odczynu	30 sek.**
Woda z kranu	ostrożnie splukać	
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. Jeżeli preparat nie zostanie zamknięty, barwnik pozostanie stabilny przez ok. 3 dni, zanurzony w olejku immersyjnym zaledwie przez kilka godzin.

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.
Ksylen lub Neo-Clear [®]	5 min.
Ksylen 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 kwasooporne czerwony

Tło niebieski

Ocena

Wynik dodatni oznacza obecność bakterii kwasoopornych, a wynik ujemny – brak bakterii kwasoopornych. Wynik pozytywny nie oznacza, że możliwa jest klasyfikacja taksonomiczna pod mikroskopem. W przypadku wykrycia bakterii kwasoopornych 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 kwasoopornych

Krytycznym etapem tego procesu barwienia jest etap odbarwienia, 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 odbarwienia, 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.

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. 100327	Kwas solny, roztwór etanolowy do mikroskopii	1 l, 5 l
Nr kat. 100497	AFB-Color zmodyfikowany zestaw barwników do mikroskopowego badania bakterii kwasoopornych (AFB) metodą barwienia na gorąco	1 zestaw
Nr kat. 100579	DPX nowy bezwodny środek do zamykania preparatów do mikroskopii	500 ml
Nr kat. 103699	Olejek imersyjny Type N zgodnie z ISO 8036 do mikroskopii	100 ml – butelka z zakraplaczem
Nr kat. 104699	Olejek imersyjny do mikroskopii	100 ml – butelka z zakraplaczem, 100 ml, 500 ml
Nr kat. 107960	Entellan® środek do szybkiego zamykania preparatów mikroskopowych	500 ml
Nr kat. 107961	Entellan® nowy środek do szybkiego zamykania preparatów mikroskopowych	100 ml, 500 ml, 1 l
Nr kat. 108000	Sputofluol® do mikroskopii	1 l
Nr kat. 108298	Ksylene (mieszanina izomerów) do histologii	4 l
Nr kat. 108512	Roztwór fuksyny karbolowej AFB-Color do mikroskopowego badania bakterii kwasoopornych (AFB) (barwienie na zimno)	500 ml, 2,5 l
Nr kat. 109016	Neo-Mount® bezwodny środek do zamykania preparatów do mikroskopii	100 ml – butelka z zakraplaczem, 500 ml
Nr kat. 109215	Fuksyna karbolowa Ziehla-Neelsena, roztwór do mikroskopii	100 ml, 500 ml, 2,5 l
Nr kat. 109843	Neo-Clear® (zamiennik ksylenu) do mikroskopii	5 l
Nr kat. 132450	Zestaw do barwienia AFB do histologii do wykrywania bakterii kwasoopornych w tkance histologicznej	1 zestaw

Klasyfikacja zagrożeń

Nr kat. 101287

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. UWAGA! Zawiera substancje CMR. Należy przestrzegać odpowiednich wskazań bezpieczeństwa podanych w karcie charakterystyki.

Główne składniki produktów

Nr kat. 101287

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	

Inne wyroby do diagnostyki in vitro

Nr kat. 105174	Hematoksylina, roztwór modyfikowany wg Gilla III do mikroskopii	500 ml, 1 l, 2,5 l
Nr kat. 109093	AFB-Fluor zestaw do barwienia bakterii kwasoopornych wykrywanych metodą mikroskopii fluorescencyjnej	6 x 500 ml
Nr kat. 109204	Roztwór barwnika Giemsa: lazur, eozyna i błękit metylenowy, do mikroskopii	100 ml, 500 ml, 1 l, 2,5 l
Nr kat. 109844	Eozyna Y, roztwór wodny 0,5% do mikroskopii	1 l, 2,5 l
Nr kat. 111609	Histosec® pastylki temperatura krzepnięcia 56-58°C środek do zatapiania preparatów do histologii	1 kg, 10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg
Nr kat. 111885	Gram-Color zestaw roztworów do barwienia metodą Grama	1 zestaw

Nr kat. 115161 Histosec® pastylki (bez DMSO) temperatura krzepnięcia 56-58°C środek do zatapiania preparatów do histologii 10 kg (4 x 2,5 kg), 25 kg

Nr kat. 116450 AFB-Color zestaw barwników do mikroskopowego badania bakterii kwasoopornych (AFB) (barwienie na zimno) 1 zestaw

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



Zapoznać się z instrukcją użytkownika



Producent



Numer katalogowy



Kod partii



Uwaga: należy zapoznać się z dokumentacją towarzyszącą.



Termin przydatności do użycia: RRRR-MM-DD



Ograniczenia termiczne

Status: 2020-Jul-13

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

