

POUŽITÍ

Trichromová barviva Sigma-Aldrich (Gomori) jsou určena k použití pro studii pojivové tkáně, svalů a kolagenových vláken. Reagencie Trichrome Stain jsou určena k použití v "diagnostice in vitro."

Barviva "Trichrome" jsou určena zejména k rozlišování kolagenu ze svalové tkáně. Obecně se dá říci, že jsou složena z jaderných, kolagenových a cytoplazmatických barviv v mořidlech, například kyselina fosforowolframová nebo fofomolybdenová. První systém v historii byl přisuzován Mallorymu.^{2,3} Další modifikace byly představeny Massonem, Footem a Gomorim.^{3,4} Zde popsaný postup je založen na práci Gomoriho a je to systém o jednom kroku kombinující cytoplazmatické barvení a barvení pojivových vláken v roztoku kyseliny fosforowolframové / octové. Tkáňové řezy se upravují v Bouinově roztoku, aby se dosáhlo intenzivnějšího konečného zbarvení. Jádra jsou potom barvena Weigertovým železitým hematoxylinem, potom chromotropem 2R (barví cytoplazmu a svalová vlákna) a fast green (rychlou zelení) FCF nebo anilinovou modří (barví kolagenová vlákna). Propláchnutí po barvení v kyselině octové dělá odstíny barvy citlivější a zřetelnější.⁴ Barvení zahrnuje i techniku barvení Gomoriho trichromem pro rychlé barvení v mikrovlnné troubě.⁵⁻⁸

REAGENCIE

ROZTOK TRICHROME STAIN L, katalogové č. HT10-3-16

Chromotrop 2R, 0,6 % (w/v), fast green FCF, (certifikováno), 0,1 % (w/v), kyselina fosforowolframová, 0,8 % (w/v) a kyselina octová, 1,0 % (v/v). Reagencie barví kolagen zeleně.

ROZTOK TRICHROME STAIN AB, katalogové č. HT10-5-16

Chromotrop 2R, 0,6 % (w/v), anilinová modř, (certifikováno), 0,3 % (w/v), kyselina fosforowolframová, 0,8 % (w/v) a kyselina octová, 1,0 % (v/v). Reagencie barví kolagen modře.

ULOŽENÍ A STABILITA:

Roztoky Trichrome Stain, Bouinův roztok, Weigertův železitý hematoxylin, Trichrome TISSUE-TROL, roztok kyseliny octové a koncentrát Scott's Tap Water Substitute a pracovní roztok je třeba skladovat v pokojové teplotě (18-26 °C).

Roztoky Trichrome Stain, Bouinův roztok, Weigertův železitý hematoxylin (části A a B), Trichrome TISSUE-TROL, roztok kyseliny octové a koncentrát Scott's Tap Water Substitute a pracovní roztok jsou stabilní až do data použitelnosti.

Pracovní roztok Weigertova železitého hematoxylinu je třeba pro každé použití připravit čerstvý.

PŘÍPRAVA:

Roztok Trichrome Stain LG, Trichrome Stain AB a Bouinův roztok jsou k okamžitému použití.

Roztok Weigertův železitý hematoxylin se připravuje smícháním stejné části roztoku A a roztoku B.

Substit Scott's Tap Water se připraví zředěním 1 dílu koncentrátu Scott's Tap Water Substitute s 9 díly deionizované vody.

Příprava 0,5 % kyseliny octové se provede zředěním 4,4 mL 1N kyseliny octové s 45,6 mL vody.

Příprava 1 % kyseliny octové se provede zředěním 8,8 mL 1N kyseliny octové s 41,2 mL vody.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagenty. Odpad likvidujte v souladu se všemi místními, státními a oblastními předpisy. Viz Bezpečnostní list k materiálu, který uvádí aktuální informace o riziku, nebezpečí a bezpečnosti.

Kontrolní sklíčka Trichrome TISSUE-TROL jsou lidské tkáňové řezy zalité v parafínu obsahující kolagenovou a svalovou tkáň a je třeba s nimi zacházet jako s potenciálně infekčními.

US prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Roztok Trichrome Stain LG - upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Roztok Trichrome Stain AB - upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Reagenční alkohol je HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku.

Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Udržujte mimo zdrojů zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy. Zasažené orgány: Nervy a játra.

Xylen je HOŘLAVÝ a ŠKODLIVÝ. Možné riziko poruch plodnosti. Může poškodit nenarozené dítě. Škodlivý je vdechnutím a v kontaktu s pokožkou. Dráždí dýchací systém a pokožku. Riziko vážného poškození očí. Udržujte mimo zdrojů zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Bouinův roztok je ŠKODLIVÝ. Za sucha je vznětlivý. Škodlivé při vdechnutí, v kontaktu s pokožkou a spolknutím. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Může způsobit přecitlivělost kontaktem s pokožkou. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. Používejte pouze v dobře větraných prostorách. Uchovávejte uzavřené a mimo dosah dětí.

Roztok Weigertův železitý hematoxylin, část A, je HOŘLAVÝ a ŠKODLIVÝ. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Udržujte mimo zdrojů zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy. Zasažené orgány: Nervy a játra.

Roztok Weigertův železitý hematoxylin, část B, je TOXICKÝ. Při vdechnutí jedovatý. Způsobuje popáleniny. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Roztoky Gill hematoxylinu jsou ŠKODLIVÉ. Škodlivý při požití. Dráždí dýchací systém a pokožku. Riziko vážného poškození očí. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy. Zasažené orgány: Játra a ledviny.

Scott's Tap Water Substitute. Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Roztok 1N kyseliny octové je ŽÍRAVÝ. Způsobuje popáleniny. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Zasažené orgány: Ledviny a zuby.

EU prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Roztok Trichrome Stain LG - upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Roztok Trichrome Stain AB - upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Reagenční alkohol je VYSOCE HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Vysoce hořlavý. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Udržujte mimo zdrojů zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy.

Xylen je ŠKODLIVÝ. Hořlavý. Škodlivý je vdechnutím a v kontaktu s pokožkou. Dráždí oči. Zamezte kontaktu s očima.

Bouinův roztok je ŠKODLIVÝ. Za sucha je vznětlivý. Škodlivé při vdechnutí, v kontaktu s pokožkou a spolknutím. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Může způsobit přecitlivělost kontaktem s pokožkou. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Tento materiál a jeho nádoba se musí likvidovat jako nebezpečný odpad. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice.

Roztok Weigertův železitý hematoxylin, část A, je VYSOCE HOŘLAVÝ a ŠKODLIVÝ. Vysoce hořlavý. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Udržujte mimo zdrojů zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy.

Roztoky Gill Hematoxylin jsou ŠKODLIVÉ. Škodlivý při požití. Dráždí oči. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc.

Scott's Tap Water Substitute. Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná.

Roztoky 1N kyseliny octové. Zamezte kontaktu s kůží a očima. Po kontaktu s kůží, odstraňte okamžitě kontaminovaný oděv a ihned omyjte velkým množstvím... (podle specifikace výrobce). Nevdechujte výparny.

POSTUP

ODBĚR VZORKŮ:

Doporučuje se provádět odběr vzorků v souladu s dokumentem M29-A2 směrnice NCCLS. Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout úplné zajištění, že krevní vzorky nebo tkáň nebudou přenášet infekci. Proto všechny krevní deriváty nebo tkáňové vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční.

Ze použít jakékoli dobře fixované parafinové řezy nařezané na tloušťku 5 mikronů nebo méně.

POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

Pozitivní kontrolní sklíčka, například Sigma Trichrome TISSUE-TROL, katalogové č. T 8800, je třeba zařadit do každého cyklu

Roztoky 1N kyseliny octové

Bouinův roztok, katalogové č. HT10-1-32 nebo HT10-1-128, nasycená vodná kyselina pikrová, 71 %, formaldehydu, 24 % a kyselina octová, 5 %

POUZE PRO STANDARDNÍ POSTUP:

Set Weigertova železitého hematoxylinu, katalogové č. HT10-79

Roztok Weigertova železitého hematoxylinu, část A, katalogové č. HT10-7, 1 % certifikovaný hematoxylin v ethanolu

Roztok Weigertova železitého hematoxylinu, část B, katalogové č. HT10-9, chlorid železitý 1,2 % (w/v) a kyselina chlorovodíková, 1 % (v/v)

POUZE PRO POSTUP S MIKROVLNNOU TROUBOU:

Roztok hematoxylinu, Gill č. 3, Katalogové č. GHS-3

Koncentrát Scott's Tap Water Substitute, katalogové č. S 5134

Mikrovlnná trouba ACCUMATE™ H2100, katalogové č. A 9084 (110 v) nebo A 9209 (220 v)

POZNÁMKY:

Před použitím mikrovlnné trouby Sigma-Aldrich H2100 Microwave se prosím seznáme s Návodem k použití výrobce.

Údaje získané z tohoto postupu slouží pouze jako diagnostická pomůcka a měly by se prověřit ve spojení s jinými klinickými diagnostickými testy nebo informacemi.

POSTUP:

STANDARDNÍ POSTUP

- Podle návodu na štítku připravte pracovní roztok Weigertova železitého hematoxylinu.
- Odstraňte parafin ze sklíček a hydratujte řezy deionizovanou vodou.
- Umístěte sklíčka do předehřátého Bouinova roztoku při 56 °C na 15 minut nebo při pokojové teplotě přes noc.
- Ochlaďte sklíčka ve vodovodní vodě (18-26 °C) v nádobě Coplin.
- Aby se odstranila žlutá barva z řezů, umyjte v tekoucí vodě.

6. Barvíte v pracovním roztoku Weigertova železitého hematoxylinu po dobu **5 minut**.
7. Promýt sklička v tekoucí vodě po dobu **5 minut**.
8. Barvíte v roztoku barviva Trichrome Stain (LG nebo AB) po dobu **5 minut**.
9. Umístěte do 0,5 % kyseliny octové na **1 minutu**.
10. Sklička propláchněte, dehydratujte alkoholem, vyčistěte v xyleny a namontujte.

MIKROVLNNÝ POSTUP ACCUMATE™ H2100

1. Odstraňte parafin ze sklíček a hydratujte řezy deionizovanou vodou.
2. Umístěte sklička do **40 mL** Bouinova roztoku v umělohmotné nádobě Coplin. Volně zakryjte víkem nebo použijte víko s otvory.
3. Spusťte mikrovlnnou troubu na **600 wattů** na **25 sekund**. Smíchejte roztok pipetou nebo tyčinkou aplikátoru a inkubujte po dobu **5 minut** pod digestoří nebo v dobře větraném prostoru.
4. Propláchněte pod tekoucí vodou, dokud nezmizí žluté zbarvení.
5. Umístěte sklička do roztoku **40 mL** Hematoxylin Gill č. 3 umístěného v umělohmotné nádobě Coplin.
6. Spusťte mikrovlnnou troubu na **800 wattů** na **5 sekund**.
7. Proplačujte pečlivě pod tekoucí vodou po dobu **30 sekund až 1 minutu**.
8. Proveďte modření v pracovním Scott's Tap Water Substitute při **pokožové teplotě**.
9. Opláchněte pečlivě pod tekoucí vodou.
10. Umístěte sklička do roztoku barviva **40 mL** Trichrome Stain (LG nebo AB) umístěného v umělohmotné nádobě Coplin.
11. Spusťte mikrovlnnou troubu na **800 wattů** na **15 sekund**. Opatrně roztok promíchejte tyčinkou aplikátoru nebo pipetou. Inkubujte **1 minutu**.
12. Opláchněte rychle ve vodě.
13. Umístěte sklička do 1 % kyseliny octové na **30 sekund až 1 minutu** při **pokožové teplotě**.
14. Sklička propláchněte, dehydratujte alkoholem, vyčistěte v xyleny a namontujte.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

Jádra	— Modrá až černá
Kolagen	— Zelený (LG) nebo modrý (AB)
Cytoplazma, sval	— Červené

Pokud se zjištěné výsledky liší od očekávaných, kontaktujte prosím technické služby společnosti Sigma-Aldrich za účelem konzultace.

REFERENCE

1. HJ Conn's Biological Stains, Edited by RD Lillie, 9th ed, Williams and Wilkins, Baltimore (MD), 1977
2. Theory and Practice of Histotechnology, Edited by DC Sheehan and BB Hrapchak, 2nd ed, Mosby, St. Louis, (MO), 1980
3. Lillie RD: Further experiments with the Masson trichrome modification of Mallory's connective tissue stain. Stain Technol 15:17, 1940
4. Gomori G: A rapid one-step trichrome stain. Am J Clin Pathol 20:661, 1950
5. Leong AS-Y, Milios J: Rapid immunoperoxidase staining of lymphocyte antigens using microwave irradiation. J Pathol 148:183, 1986
6. Brinn NT: Rapid metallic histologic staining using the microwave oven. J Histotechnol 6:125, 1983
7. Valle S: Special stains in the microwave oven. J Histotechnol 9:237, 1986
8. Histotechnology: A Self Instructional Text. Carson, ASCP Press, Chicago, 1990
9. Kok and Boon: Microwave Cookbook for Microscopists. Couloomb Press, Leyden. Leyden 1992
10. Davis Mary: The Joy of Microwaving, NSH 1995 Symposium, Buffalo, NY

Sigma-Aldrich, Inc. garantuje, že její produkty se shodují s informacemi obsaženými v této a jiných publikacích Sigma-Aldrich. Kupující musí stanovit vhodnost produktu(ů) pro dané použití. Mohou platit dodatečné podmínky. Viz zadní strana faktury nebo útržek obalu, kde jsou uvedeny dodatky k prodejním podmínkám.

Postup č. HT10
Předchozí revize: 2003-03
Revidováno: 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Velká Británie

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765

Technické služby: 800-325-0250 nebo volejte na 314-771-3122

nebo e-mailujte na clintech@sial.com

Objednávky: 800-325-3010 nebo volejte na 314-771-5750

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

P.O. 1120, 89552 Steinheim, Německo 49-7329-970