

## USO PREVISTO

Le colorazioni tricromatiche (Gomori) di Sigma-Aldrich sono idonee per l'esame delle fibre muscolari, collageniche e di tessuto connettivo. I reagenti delle colorazioni tricromatiche sono riservati al solo "uso diagnostico in vitro".

Le colorazioni del tipo "tricromatico" sono impiegate essenzialmente per distinguere il collagene dal tessuto muscolare.<sup>1</sup> In generale sono costituite da tre coloranti (nucleare, collagenico e citoplasmatico) in mordenti quali l'acido fosfotungstico o l'acido fosfomolibdico. Il primo sistema per la colorazione tricromatica venne sviluppato da Mallory.<sup>2,3</sup> Successivamente vennero apportate alcune modifiche da Masson, Foot e Gomori.<sup>3,4</sup> La procedura descritta nel presente documento, basata sul lavoro di Gomori, è un sistema ad una sola fase che unisce i coloranti del citoplasma e delle fibre connettive in una soluzione di acido fosfotungstico/acido acetico.<sup>4</sup> Le sezioni di tessuto vengono trattate con soluzione di Bouin per rendere più intensa la colorazione finale. Quindi i nuclei vengono colorati con ematosilina ferrica di Weigert, seguita da cromotropo 2R (per tingere il citoplasma e le fibre muscolari) e da verde rapido FCF o blu anilina (per tingere le fibre collageniche). Dopo la colorazione, il risciacquo in acido acetico conferisce alle sfumature del colore una maggiore delicatezza e trasparenza.<sup>4</sup> È inclusa una tecnica di colorazione tricromatica secondo Gomori per la colorazione rapida in forno a microonde.<sup>5-8</sup>

## REAGENTI

### SOLUZIONE PER COLORAZIONE TRICROMATICA LG (light green, verde chiaro),

n. di catalogo HT10-3-16  
Cromotropo 2R 0,6% (p/v); verde rapido FCF (certificato) 0,1% (p/v); acido fosfotungstico 0,8% (p/v); acido acetico 1,0% (v/v). Il reagente colora il collagene di verde.

### SOLUZIONE PER COLORAZIONE TRICROMATICA AB (aniline blue, blu anilina),

n. di catalogo HT10-5-16  
Cromotropo 2R 0,6% (p/v); blu anilina (certificato) 0,3% (p/v); acido fosfotungstico 0,8% (p/v); acido acetico 1,0% (v/v). Il reagente colora il collagene di blu.

### CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare a temperatura ambiente (18–26°C) la soluzione per la colorazione tricromatica, la soluzione di Bouin, l'ematosilina ferrica di Weigert, i vetrini di controllo tricromatici TISSUE-TROL, la soluzione di acido acetico e l'acqua di Scott tampone concentrato e in soluzione di lavoro.

I seguenti prodotti si mantengono stabili fino alla data di scadenza: soluzioni per la colorazione tricromatica, soluzione di Bouin, ematosilina ferrica di Weigert (parti A e B), vetrini di controllo tricromatici TISSUE-TROL, soluzione di acido acetico e acqua di Scott tampone concentrato e in soluzione di lavoro.

Si consiglia di preparare la soluzione di lavoro ematosilina ferrica di Weigert appena prima dell'uso.

### PREPARAZIONE

Le soluzioni per colorazione tricromatica LG e AB e la soluzione di Bouin sono prodotti pronti per l'uso.

La soluzione ematosilina ferrica di Weigert viene preparata mescolando parti uguali di soluzione A e soluzione B.

L'acqua di Scott tampone viene preparata diluendo 1 parte di acqua di Scott tampone concentrato con 9 parti di acqua deionizzata.

Preparare l'acido acetico allo 0,5% diluendo 4,4 ml di acido acetico 1N con 45,6 ml di acqua.

Preparare l'acido acetico all'1% diluendo 8,8 ml di acido acetico 1N con 41,2 ml di acqua.

### PRECAUZIONI

Seguire le normali precauzioni adottate per i reagenti di laboratorio. Smaltire i rifiuti in conformità alle normative vigenti a livello locale, regionale o nazionale. Fare riferimento al foglio dati relativo alla sicurezza dei materiali per informazioni aggiornate riguardanti i rischi, i pericoli e la sicurezza associati all'uso di questi prodotti.

I vetrini di controllo TISSUE-TROL per colorazione tricromatica sono sezioni di tessuto umano sparfinate contenenti collagene e tessuto muscolare, pertanto devono essere considerati potenziali veicoli di infezioni.

Dichiarazioni sui rischi e la sicurezza (U.S.A.)

Soluzione per colorazione tricromatica LG – Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

Soluzione per colorazione tricromatica AB – Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

L'alcol anidro è INFIAMMABILE e IRRITANTE. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Mantenere i contenitori ben chiusi. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei. Organi colpiti: nervi e fegato.

Lo xilene è INFIAMMABILE e NOCIVO. Possibile rischio di riduzione della fertilità. Può provocare danni al feto. Nocivo per inalazione e a contatto con la cute. Irritante per il sistema respiratorio e la cute. Rischio di gravi lesioni oculari. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile).

La soluzione di Bouin è NOCIVA. Esplosiva allo stato secco. Nociva per inalazione,

a contatto con la cute o per ingestione. Prove insufficienti di effetti cancerogeni. Può causare sensibilizzazione in caso di contatto con la cute. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile). In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. Utilizzare solo in ambienti adeguatamente ventilati. Conservare sotto chiave e fuori della portata dei bambini.

La soluzione ematosilina ferrica di Weigert, parte A, è INFIAMMABILE e IRRITANTE. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei. Organi colpiti: nervi e fegato.

La soluzione ematosilina ferrica di Weigert, parte B, è TOSSICA. Tossica per inalazione. Causa ustioni. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile).

Le soluzioni di ematosilina di Gill sono NOCIVE. Nocive per ingestione. Irritanti per il sistema respiratorio e la cute. Rischio di gravi lesioni oculari. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei. Organi colpiti: fegato e reni.

Acqua di Scott tampone. Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

Le soluzioni di acido acetico 1N sono CORROSIVE. Causano ustioni gravi. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile). Organi colpiti: reni e denti.

Dichiarazioni sui rischi e la sicurezza (U.E.)

Soluzione per colorazione tricromatica LG – Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

Soluzione per colorazione tricromatica AB – Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

L'alcol anidro è FACILMENTE INFIAMMABILE e IRRITANTE. Facilmente infiammabile. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Mantenere i contenitori ben chiusi. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei.

Lo xilene è NOCIVO. Infiammabile. Nocivo per inalazione e a contatto con la cute. Irritante per la cute. Evitare il contatto con gli occhi.

La soluzione di Bouin è NOCIVA. Esplosiva allo stato secco. Nociva per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Prove insufficienti di effetti cancerogeni. Può causare sensibilizzazione in caso di contatto con la cute. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Smaltire questo materiale e il relativo contenitore con le dovute precauzioni. Indossare indumenti e guanti adeguatamente protettivi.

La soluzione ematosilina ferrica di Weigert, parte A, è FACILMENTE INFIAMMABILE e IRRITANTE. Facilmente infiammabile. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei.

Le soluzioni di ematosilina di Gill sono NOCIVE. Nocive per ingestione. Irritanti per gli occhi. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico.

Acqua di Scott tampone. Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

Soluzioni di acido acetico 1N. Evitare il contatto con la cute e gli occhi. In caso di contatto con la cute, rimuovere immediatamente eventuali indumenti contaminati, sciacquare con abbondante acqua e ricorrere tempestivamente a cure mediche. Non respirare i vapori.

## PROCEDURA

### RACCOLTA DEI CAMPIONI

Per la raccolta dei campioni, attenersi alla procedura descritta nel documento NCCLS numero M29-A2. Nessun metodo di analisi noto garantisce con assoluta certezza che i campioni di sangue o il tessuto non trasmettano infezioni. Di conseguenza tutti i derivati del sangue e i campioni di tessuto devono essere considerati potenziali veicoli di infezioni.

È possibile utilizzare qualunque sezione fissata in paraffina e tagliata a 5 micron o meno.

### MATERIALI SPECIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Ad ogni seduta utilizzare vetrini di controllo positivi, quali Sigma-Aldrich TISSUE-TROL per colorazione tricromatica, n. di catalogo T 8800.

Soluzione di acido acetico 1N

Soluzione di Bouin, n. di catalogo HT10-1-32 o HT10-1-128; acido picrico acquoso saturato 71%; formaldeide 24%; acido acetico 5%

### SOLO PER LA PROCEDURA STANDARD:

Set ematosilina ferrica di Weigert, n. di catalogo HT10-79

Soluzione ematosilina ferrica di Weigert, parte A, n. di catalogo HT10-7, ematosilina certificata all'1% in etanolo

Soluzione ematosilina ferrica di Weigert, parte B, n. di catalogo HT10-9, cloruro ferrico all'1,2% (p/v) e acido cloridrico all'1% (v/v)

## SOLO PER LA PROCEDURA IN MICROONDE:

Soluzione ematossilina di Gill n. 3, n. di catalogo GHS-3

Acqua di Scott tampone concentrato, n. di catalogo S 5134

Forno a microonde ACCUMATE™ H2100, n. di catalogo A 9084 (110 v) o A 9209 (220 v)

### NOTE

Se si adotta la procedura Sigma-Aldrich per forno a microonde H2100, fare riferimento al manuale del produttore per le istruzioni operative.

I dati generati da questa procedura sono da utilizzarsi soltanto a sostegno della diagnosi e devono essere valutati congiuntamente ad altri esami e dati diagnostici.

### PROCEDURA

#### PROCEDURA STANDARD

1. Preparare la soluzione di lavoro ematossilina ferrica di Weigert secondo le istruzioni stampate sull'etichetta.
2. Deparaffinare i vetrini e idratare con acqua deionizzata.
3. Immergere i vetrini in soluzione di Bouin a 56°C per **15 minuti** oppure a **temperatura ambiente nel corso della notte**.
4. Raffreddare i vetrini in acqua di rubinetto (**18–26°C**) all'interno di una vaschetta Coplin.
5. Lavare in acqua corrente per rimuovere il colore giallo dalle sezioni.
6. Colorare in soluzione di lavoro ematossilina ferrica di Weigert per **5 minuti**.
7. Lavare in acqua corrente per **5 minuti**.
8. Colorare in soluzione per colorazione tricromatica (LG o AB) per **5 minuti**.
9. Collocare in acido acetico allo 0,5% per **1 minuto**.
10. Sciacquare i vetrini, disidratare con alcol, chiarificare in xilene e montare.

#### PROCEDURA PER MICROONDE ACCUMATE™ H2100

1. Deparaffinare i vetrini e idratare con acqua deionizzata.
2. Collocare i vetrini in **40 ml** di soluzione di Bouin all'interno di una vaschetta Coplin di plastica. Richiudere la vaschetta senza stringere il coperchio oppure utilizzare un coperchio perforato.
3. Mettere in microonde a **600 watt** per **25 secondi**. Agitare la soluzione con una pipetta Beral o un bastoncino applicatore, quindi incubare per **5 minuti** sotto una cappa di aspirazione o in un punto ben ventilato.
4. Sciacquare in acqua corrente finché non scompare il colore giallo.
5. Collocare i vetrini in **40 ml** di soluzione ematossilina di Gill n. 3 all'interno di una vaschetta Coplin di plastica.
6. Mettere in microonde a **800 watt** per **5 secondi**.
7. Sciacquare con cura in acqua di rubinetto per **30–60 secondi**.
8. Colorare di blu nella soluzione di lavoro acqua di Scott tampone a **temperatura ambiente**.
9. Sciacquare con cura in acqua corrente.
10. Collocare i vetrini in **40 ml** di soluzione per colorazione tricromatica (LG o AB) all'interno di una vaschetta Coplin di plastica.
11. Mettere in microonde a **800 watt** per **15 secondi**. Agitare delicatamente la soluzione con una pipetta Beral o un bastoncino applicatore. Lasciare in incubazione per **1 minuto**.
12. Sciacquare velocemente in acqua corrente.
13. Collocare i vetrini in acido acetico all'1% per **30–60 secondi** a **temperatura ambiente**.
14. Sciacquare i vetrini, disidratare con alcol, chiarificare in xilene e montare.

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Nuclei	- Da blu a nero
Collagene	- Verde (LG) o blu (AB)
Citoplasma, muscoli	- Rosso

Se i risultati osservati si discostano dai risultati attesi, contattare l'assistenza tecnica Sigma-Aldrich per informazioni di supporto.

## BIBLIOGRAFIA

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.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (USA) +1 314 771 5765

Assistenza tecnica: a carico del destinatario +1 314 771 3122

o tramite e-mail all'indirizzo [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)

Per ordinare: a carico del destinatario +1 314 771 5750

[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

Sigma-Aldrich, Inc. garantisce che i propri prodotti sono conformi alle informazioni contenute nel presente documento e in altre pubblicazioni Sigma-Aldrich. Spetta all'acquirente stabilire se i prodotti sono idonei all'uso particolare che ne viene fatto. È possibile che sussistano ulteriori termini e condizioni. Vedere il retro della fattura o la distinta di imballaggio per i termini e le condizioni di vendita.

Procedura n. HT10

Revisione precedente: 2003-03

Revisione: 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse  
Egham TW20 9BD (Regno Unito)