

POUŽITÍ

Sigma-Aldrich stříbrné barvivo, Steiner-Steiner modifikace, je určeno k demonstraci spirochet a nefilamentózních bakterií v parařinových tkáňových řezech. Reagencie stříbrného barviva jsou určena k použití v "diagnostice in vitro."

Zdokumentované postupy k demonstraci spirochet a dalších oportunistických organizmů zahrnují postupy Warthin-Starry, Dieterle a Steiner-Steiner.¹⁻³ Tyto procedury vyžadují často provedení velmi přesné přípravy roztoku a výsledky výrazně kolísají.

Metoda společnosti Sigma-Aldrich je modifikací metody Steiner-Steiner a zahrnuje i aplikaci pro mikrovlnnou troubu k urychlení a akcentaci stříbra z barviva v tkáňových řezech. Teplou produkovanou mikrovlnnou troubou umožňuje impregnaci nitrátu stříbra do tkáňových řezů, často je výsledkem více čistě pozadí než při použití tradiční metody. Promyjte ve vodovodní vodě a nechejte uschnout na vzduchu nebo vysajte do sucha. Steiner-Steiner modifikovaný postup Sigma-Aldrich poskytuje konzistentní, reprodukovatelné výsledky zobrazení.

REAGENCIE

ROZTOK NITRÁTU URANYLU, katalogové č. HT101-1

Nitrát uranilu, 1 %, ve vodě.

ROZTOK NITRÁTU STŘÍBRA, katalogové č. HT101-2

Nitrát stříbra, 1 %, ve vodě.

ALKOHOLOVÝ ROZTOK PRYSKYŘICE, katalogové č. HT101-3

Pryskyřice v absolutním alkoholu.

HYDROQUINONOVÉ TABLETY, katalogové č. HT101-4

Hydroquinon, 0,5 g, s pomocnými látkami.

ULOŽENÍ A STABILITA:

Reagencie barviva s obsahem stříbra by se měla skladovat v ledničce (2-8 °C). Zlikvidovat, když se objeví zakalení. Štítek reagencie uvádí datum použitelnosti.

ZHORŠENÍ:

Alkoholové roztoky nitrátu uranilu, nitrátu stříbra pryskyřice je třeba zlikvidovat, pokud se objeví zakalení.

PŘÍPRAVA:

Pracovní roztok hydroquinonu se připraví rozpuštěním jedné tablety hydroquinonu v 25 mL deionizované vody. Dobře promíchat.

Alkoholové roztoky nitrátu uranilu, nitrátu stříbra pryskyřice jsou připraveny k okamžitému použití.

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 TISSUE-TROL pro spirochety jsou králíčí nebo lidské tkáňové řezy zalité v parafínu obsahující spirochety / helicobacter a je třeba s nimi zacházet jako s potencionálně infekčními.

US PROHLÁŠENÍ O RIZICÍCH A BEZPEČNOSTI

Roztok nitrátu uranilu je TOXICKÝ. Toxický při vdechnutí a při požití. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Zasažené orgány: Ledviny a játra.

Roztok nitrátu stříbra. Škodlivý pro vodní organismy, může způsobit dlouhodobé negativní dopady ve vodním prostředí. Upozornění: Zamezte kontaktu a vdechnutí. Zasažené orgány: Krev a nervy.

Pryskyřicový roztok je HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Udržujte nádobu na dobře větraném místě. 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: Játra a nervy.

Tablety hydroquinonu jsou TOXICKÉ a nebezpečné pro životní prostředí. Škodlivý při požití. Dráždí oči. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Riziko vážného poškození očí. Může způsobit přecitlivělost kontaktem s pokožkou. Velmi toxický pro vodní organismy. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. Zabraňte úniku do životního prostředí. Viz speciální instrukce / bezpečnostní listy.

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).

EU prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Roztok nitrátu uranilu je TOXICKÝ. Toxický při vdechnutí a při požití. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Roztok nitrátu stříbra. Škodlivý pro vodní organismy, může způsobit dlouhodobé negativní dopady ve vodním prostředí. Nevdechujte výpary. Zamezte kontaktu s kůží a očima.

Pryskyřicový roztok 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.

Tablety hydroquinonu jsou ŠKODLIVÉ a nebezpečné pro životní prostředí. Škodlivý při požití. Omezené důkazy o karcinogenním vlivu. Riziko vážného poškození očí. Může způsobit přecitlivělost kontaktem s pokožkou. Velmi toxický pro vodní organismy. Možné nebezpečí nevratných účinků. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. Zabraňte úniku do životního prostředí. Viz speciální instrukce / bezpečnostní listy.

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.

POSTUP

ODBĚR VZORKŮ A SKLADOVÁNÍ

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.

Fixujte vzorky v 10 % neutrálním pufovaném roztoku formalinu, zalijte do parafínu a nařežte na tloušťku pěti mikronů.

POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

Positivní kontrolní sklíčka, například Sigma TISSUE-TROL pro spirochety, katalogové č. S 2645 nebo sklíčka TISSUE-TROL pro Helicobacter, katalogové č. H 1898, je třeba zahrnout do každého cyklu.

Absolutní alkohol

Alkohol, 95 %

Xylen

POUZE PRO STANDARDNÍ POSTUP:

Vodní lázně, 45 °C a 60 °C

Barvicí nádoby (Coplin, umělohmotné) s víky, katalogové č. S 5641

POUZE PRO POSTUP S MIKROVLNNOU TROUBOU:

Mikrovlnná trouba ACCUMATE™ H2100, katalogová č. A 9084 (110 v) nebo A 9209 (220 v) Barvicí nádoby Coplin (umělohmotné) s víky s otvory, katalogové č. C 3883

POZNÁMKY:

Nepoužívejte substituty xylenu, neboť způsobují vyblednutí spirochet.⁴

Před použitím mikrovlnné trouby Sigma-Aldrich H2100 Microwave se prosím seznámte 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:

1. Používejte chemicky čisté umělohmotné nádoby Coplin.
2. Předem nahřejte ve 40 mL nitrátu uranilu, katalogové č. HT101-1 a 40 mL roztoku nitrátu stříbra, katalogové č. HT101-2, až na 60 °C.
3. Ohřejte pryskyřicový roztok, katalogové č. HT101-3, na pokojovou teplotu.
4. Odstraňte parafín a hydratujte řezy deionizovanou vodou.
5. Vložte řezy do předehřátého roztoku nitrátu uranilu na 15 minutu ve vodní lázni o teplotě 60 °C.
6. Propláchněte ve třech vyměněných lázních deionizované vody.
7. Vložte řezy do předehřátého roztoku nitrátu stříbra ve vodní lázni o teplotě 60 °C na 1,5 hodiny.
8. Propláchněte ve třech vyměněných lázních deionizované vody.
9. Propláchněte ve dvou lázních vždy 95 % alkoholu a absolutního ethanolu.
10. Vložte řezy do roztoku pryskyřice na 5 minut.
11. Vyměňte sklíčka z roztoku pryskyřice a nechejte řezy uschnout na vzduchu.
12. Připravte redukční roztok smícháním 10 mL roztoku pryskyřice, katalogové č. HT101-3, 25 mL pracovního roztoku hydroquinonu a 5 mL absolutního alkoholu. Filtrujte přes filtry Whatman č. 54 nebo jiný vhodný papírový filtr a přidejte 200 µl roztoku nitrátu stříbrného.
13. POZNÁMKA: Redukční roztok může dostat mléčnou barvu. Zahřejte redukční roztok v umělohmotné nádobě Coplin, bez sklíček, ve vodní lázni o teplotě 45 °C. Vložte řezy do teplého redukčního roztoku a inkubujte až 25 minut.
14. Nechejte sklíčka stát v redukčním roztoku při pokojové teplotě až dosáhnou požadovaného stupně černého zabarvení, optimálně na 1-2 minuty. Delší čas barvení je také možný, pokud je to vyžadováno. Po jednom použití roztok zlikvidovat.
15. Dehydratujte řezy řadou alkoholu.
16. Vyčistěte v xylenu a namontujte.

MIKROVLNNÝ POSTUP ACCUMATE™ H2100:

1. Odstraňte parafin a hydratujte řezy deionizovanou vodou.
2. Umístěte sklíčka do roztoku **40 mL** nitrátu uranuly, katalogové č. HT101-1, umístěného v umělohmotné nádobě Coplin. Volně přikryjte nádobu víkem nebo použijte víko s otvory.
3. Spusťte mikrovlnnou troubu na **600 wattů** na **30 sekund**.
4. Opláchnout sklíčka v několika lázních deionizované vody.
5. Vložte sklíčka do **40 mL** roztoku nitrátu stříbrného, katalogové č. HT101-2.
6. Spusťte mikrovlnnou troubu na **600 wattů** na **30 sekund**. Smíchejte roztok pipetou nebo tyčinkou aplikátoru a inkubujte **10 minut**.
7. Propláchněte ve několikrát vyměněných lázních deionizované vody.
8. Propláchněte sklíčka ve dvou lázních 95 % alkoholu a dvou lázních absolutního alkoholu.
9. Vložte sklíčka do roztoku pryskyřice, katalogové č. HT101-3, inkubujte **5 minut** při **pokojevé teplotě**.
10. Vyjměte sklíčka z roztoku pryskyřice a nechejte řezy uschnout na vzduchu.
11. Připravte redukční roztok smícháním **10 mL** roztoku pryskyřice, katalogové č. HT101-3, **25 mL** pracovního roztoku hydrochinonu a **5 mL** absolutního ethanolu. Roztok přefiltrujte a přidejte **200 µl (0,2 mL)** roztoku nitrátu stříbra. Promíchejte.
12. Redukční roztok v umělohmotné nádobě Coplin, **bez sklíček** vložte do mikrovlnné trouby při **600 wattech** na **15 sekund**. Opatrně smíchejte pipetou nebo tyčinkou aplikátoru.
13. Ihned vložte sklíčka do horkého redukčního roztoku a vložte do mikrovlnné trouby při **400 wattech** na **20 sekund**.
14. Roztok smíchejte pipetou nebo tyčinkou aplikátoru a sklíčka inkubujte v redukčním roztoku až se zabarví černě na požadovaný stupeň. Optimálně na asi **45 sekund** až **1 minutu**. Delší čas barvení je také možný, pokud je to vyžadováno. Po jednom použití roztok zlikvidovat.
15. Opláchněte v deionizované vodě
16. Dehydratujte alkoholem, vyčistěte v xylenu a namontujte.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

Spirochety a další nefilamentózní bakterie se zobrazují tmavě hnědě až černě. Pozadí se barví slabě žlutě až světle hnědě.

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

REFERENCE

1. Van Orden AE, Greer PW: Modification of the Dieterle spirochete stain. J Histotechnol 1 (2):51-53, 1977
2. Churukian CJ, Schenk EA: A Warthin-Starry method for spirochetes and bacteria using a microwave oven. J Histotechnol 11 (3): 149-151, 1988
3. Swisher BL: Modified Steiner procedure microwave staining for spirochetes and nonfilamentous bacteria. J Histotechnol 10 (4): 241-243, 1987
4. Davis, Mary M., HT (ASCP): Joy of Microwaving, NSH Symposium, Buffalo, NY, Oct. 1995

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. HT101
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