

FELHASZNÁLÁSI JAVALLAT

A Sigma-Aldrich Silver Stain készlet a gombák, alap membrán és néhány alkalmazkodó organizmus hisztológiai bemutatására javallt. Az ACCUSTAIN® Silver Stain készlet in vitro diagnosztikai felhasználásra javallt.

Az ezüst-metén-amin-borát eljárások jól dokumentáltak.^{1,2} Általában, a vizsgálat elvégzése előtt ezek szükségesek az oldat preparátum kidolgozásához. Az oldat stabilitása korlátozott és az eredmények jelentősen változnak a fém impregnálás és a fotografikus fejlődés önfejű természete miatt.

A Sigma-Aldrich most egy olyan Silver Stain-t ajánl, mely egyesíti a stabil munka ezüst-metén-amin só pufferrel, a színező reagenst és a developer. Ez egyedüli csomagot biztosít a laboratóriumnak a gombák, alap membrán és alkalmazkodó organizmusok (pl. *Pneumocystis carinii*) láthatóvá tételéhez.³⁻⁵ Ezüst technikákat tartalmaz a gyors, mikrohullámú sütőben történő festéshez.⁶⁻⁸

Röviden, a mikrobás sejttel és alap membrán poliszacharidokat aldehiddé oxidálják perjódsvavas kezeléssel. Az aldehid-csoport lúgos pH-n, az ezüst-iont fém ezüstté redukálja. Arany-sós öblítés stabilabb arany-komplexet alkot és a felesleges ezüstöt tisztulófatos mosással eltávolítják.

REAGENSEK

PERIODIC ACID SOLUTION, Katalógus szám: HT100-1
Perjódsvav, 1 g/l, ioncserélt vízben.

BORAX SOLUTION, Katalógus szám: HT100-2
Borax, 5 g/l, ioncserélt vízben.

SILVER METHENAMINE REAGENT, Katalógus szám: HT100-3
Ezüst-metén-amin, 110 mg/ampulla.

GOLD CHLORIDE SOLUTION, Katalógus szám: HT100-4
Arany-klorid, 200 mg/dl ioncserélt vízben.

SODIUM THIOSULFATE SOLUTION, Katalógus szám: HT100-5
Nátrium-tioszulfát, 2 g/l, ioncserélt vízben.

TÁROLÁSI KÖRÜLMÉNYEK ÉS ELTARTHATÓSÁG:

A Periodic Acid Solution, a Working Silver Methenamine Reagent, a Gold Chloride Solution, és a Sodium Thiosulfate Solution hűtve tárolandó (2-8 °C).

A Borax Solution szobahőmérsékleten tárolandó (18-26 °C). MEGJEGYZÉS: A borax hűtés közben csapadékot képezhet. Használat előtt melegítsék szobahőmérsékletre és oldják újra.

A reagens címkéin feltüntették a lejárat dátumot.

ELŐKÉSZÍTÉS:

A Working Silver Methenamine Solution 8 ml Borax Solution, 100 ml ioncserélt víz és a Silver Methenamine Reagent ampulla tartalmának összekeverésével készíthető. Keverjék, amíg feloldódik. Egyszer használják, majd semmisítsék meg.

MEGJEGYZÉS: Az ampullánkénti vizsgálatokat kétfőre növelendő a Silver Methenamine 100 ml ioncserélt vízben feloldható 1-szorosán lezárva tárolható. Hűtve (2-8 °C) 1 hónapig felhasználható. Amikor használatra kész, vegyenek 50 ml Silver Methenamine Solution-t és adjanak hozzá 4 ml Borax Solution-t. A Silver Methenamine Solution nem használt részét tegyék vissza hűtőszekrénybe.

Minden reagenst melegítsenek fel szobahőmérsékletűre használat előtt.

ÖVINTÉZKEDÉSEK:

A laboratóriumi reagenssel történő munka során a szokásos övintézkedéseket be kell tartani. Hulladék-megsemmisítés az összes helyi, állami, tartományi vagy nemzeti szabály figyelembevételével. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni, és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőruházatot, védőkesztyűt és szem-, illetve arcvédőt kell viselni. A legfrissebb kockázati, veszély vagy biztonsági információkat lásd az Anyagbiztonsági adatlapban.

A Fungi TISSUE-TROL/Pneumocystis TISSUE-TROL kontroll lemezek paraffinba ágyazott, gombákat/pneumocistist tartalmazó emberi szövetek, melyek esetlegesen fertőzőnek tekintendők.

US Kockázati és biztonsági mondatok

A Periodic Acid Solution MARÓ. Égési sérülést okoz. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni, és orvoshoz kell fordulni. A szennyezett ruhát azonnal le kell vetni/venni. Megfelelő védőruházatot, védőkesztyűt és szem-, illetve arcvédőt kell viselni.

Borax Solution. Figyelem: Az anyagot még nem vizsgálták meg teljesen. Kerülni kell az anyag érintését és belélegzését.

A Silver Methenamine Reagent MARÓ. Lenyelve ártalmas. Égési sérülést okoz. Rákot okozhat (karcinogén hatású lehet). Belélegezve és bőrrel érintkezve túlérzékenységet okozhat (szenzibilizáló hatású lehet). Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni, és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőruházatot, védőkesztyűt és szem-, illetve arcvédőt kell viselni. Baleset vagy rosszullét esetén azonnal orvost kell hívni. Ha lehetséges, a címkét meg kell mutatni.

A Gold Chloride Solution IRRITATÍV. A szemet, légzőrendszert és bőrt irritálja. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni, és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőruházatot és védőkesztyűt kell viselni.

A Sodium Thiosulfate Solution IRRITATÍV. Szem- és bőrizgató hatású. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni, és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőkesztyűt és arc/szemvédőt kell viselni.

A reagens alkohol GYŰLÉKONY és IRRITATÍV. A szemet, légzőrendszert és bőrt irritálja. Az edényzet hermetikusan lezárva tartandó. Gyújtóforrásoktól távol tartandó. - Dohányozni tilos! Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni, és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőruházatot kell viselni. Célszervek: Idegek és máj.

A xilol GYŰLÉKONY és ÁRTALMAS. A fertilitást (fogamzóképeséget vagy nemzőképeséget) károsíthatja. A születendő gyermekekre ártalmas lehet. Belélegezve és bőrrel érintkezve ártalmas. Bőrizgató hatású, izgatja a légutakat. Súlyos szemkárosodást okozhat. Gyújtóforrásoktól távol tartandó. - Dohányozni tilos! Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni, és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőruházatot, védőkesztyűt és szem-, illetve arcvédőt kell viselni. Baleset vagy rosszullét esetén azonnal orvost kell hívni. Ha lehetséges, a címkét meg kell mutatni.

A 10 % Neutral Buffered Formalin ÁRTALMAS. Belélegezve, bőrrel érintkezve és lenyelve ártalmas. Belélegezve, bőrrel érintkezve és lenyelve ártalmas: maradandó egészségkárosodást okozhat. Belélegezve és bőrrel érintkezve túlérzékenységet okozhat (szenzibilizáló hatású lehet). A keletkező gőzt nem szabad belélegezni. Megfelelő védőruházatot és védőkesztyűt kell viselni. Baleset vagy rosszullét esetén azonnal orvost kell hívni. Ha lehetséges, a címkét meg kell mutatni.

EU Kockázati és biztonsági mondatok

A Periodic Acid Solution MARÓ. Égési sérülést okoz. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni, és orvoshoz kell fordulni. A szennyezett ruhát azonnal le kell vetni/venni. Megfelelő védőruházatot, védőkesztyűt és szem-, illetve arcvédőt kell viselni.

Borax Solution. Kerülni kell a bőrrel való érintkezést és a szembejutást.

A Silver Methenamine Reagent MARÓ. Lenyelve ártalmas. Égési sérülést okoz. Rákot okozhat (karcinogén hatású lehet). Belélegezve és bőrrel érintkezve túlérzékenységet okozhat (szenzibilizáló hatású lehet). Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni, és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőruházatot, védőkesztyűt és szem-, illetve arcvédőt kell viselni. Baleset vagy rosszullét esetén azonnal orvost kell hívni. Ha lehetséges, a címkét meg kell mutatni.

A Gold Chloride Solution IRRITATÍV. A szemet, légzőrendszert és bőrt irritálja. Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni, és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőruházatot és védőkesztyűt kell viselni.

Sodium Thiosulfate Solution. Kerülni kell a bőrrel való érintkezést és a szembejutást.

A reagens alkohol RENDKÍVÜL GYŰLÉKONY és IRRITATÍV. Rendkívül gyúlékony. A szemet, légzőrendszert és bőrt irritálja. Az edényzet hermetikusan lezárva tartandó. Gyújtóforrásoktól távol tartandó. - Dohányozni tilos! Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni, és orvoshoz kell fordulni. Megfelelő védőruházatot kell viselni.

A xilol ÁRTALMAS. Gyúlékony. Belélegezve és bőrrel érintkezve ártalmas. Bőrizgató hatású. Kerülni kell a szembejutást.

A 10 % Neutral Buffered Formalin ÁRTALMAS. Belélegezve, bőrrel érintkezve és lenyelve ártalmas. Rákot okozhat (karcinogén hatású lehet). Bőrrel érintkezve túlérzékenységet okozhat. Megfelelő védőruházatot és védőkesztyűt kell viselni.

ELJÁRÁS

MINTA BEGYŰJTÉSE:

Javasolt a minta begyűjtését az M29-A2 NCCLS dokumentum szerint végezni. Semmiféle vizsgálati módszer nem ismert, mely teljes bizonyossággal kimutathatja, hogy a vérminták vagy a szövet nem terjeszt fertőzést. Ezért, minden vér származék vagy szövetminta esetlegesen fertőzőnek tekintendő.

Gomba és alkalmazkodó organizmusok, pl. *P. carinii*: Fixálják 10 % semleges pufferelt formalinban vagy Bouin's Solution-ban, ágyazzák paraffinba és vágják 5 mikronos metszetekre.¹

Alap membrán: Fixálják 10 % semleges pufferelt formalinban vagy Bouin's vagy Zenker's Solution-ban, ágyazzák paraffinba és vágják 1-4 mikronos metszetekre.¹

SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT SPECIÁLIS ANYAGOK:

Műanyag fogók vagy paraffinnal bevont fémfogók
Pozitív kontroll lemezek, pl. Sigma Fungi TISSUE-TROL, Katalógus szám: F 0766 vagy Pneumocystis TISSUE-TROL tárgylemezek, Katalógus szám: P 2418, futtatandó minden menetben

CSAK SZABVÁNYOS ELJÁRÁS ESETÉN:

Vízfürdő, 62 °C

CSAK A MIKROHULLÁMÚ ELJÁRÁSHOZ:

Műanyag Coplin edények tetőkkel

Accumate™ H2100 Microwave Oven, Katalógus szám: A 9084, (110 volt) vagy Katalógus szám: A 9209, (220 volt)

MEGJEGYZÉSEK:

- A festőedények SIGMACLEAN™ Liquid Laboratory Cleaning Concentrate-ban, Katalógus szám: S 4107, mosandók, majd fehéritő oldatban, csapvízben jól leöblítve, majd legalább hatszor ioncserélt vízben.
- Megfelelő kontroll lemezek, pl. Fungi TISSUE-TROL, Katalógus szám: F 0766 vagy Pneumocystis TISSUE-TROL, Katalógus szám: P 2418, futtatandó minden menetben.
- Ha Sigma-Aldrich H2100 Microwave Oven-t használnak, lásd a Tulajdonosi kézikönyvet.
- Jelen eljárás során kapott adatok csak segítségként szolgálnak és azokat egyéb klinikai diagnosztikai vizsgálatokkal vagy információkkal együtt át kell nézni.

ELJÁRÁS:

SZABVÁNYOS ELJÁRÁS:

- A Working Silver Methenamine Solution-t készítsék el az "Előkészítés" szakaszban leírtak szerint és tegyék 62 °C vízfürdőbe.
MEGJEGYZÉS: Ne hagyják, hogy a Working Silver Methenamine Solution fémekkel érintkezzen. Ellenőrizték, hogy az oldat biztosan 62 °C-on legyen.
- Paraffinmentesítsék a szövetmetszeteket és hidratálják ioncserélt vízben.

3. Tegyük az újr hidratált metszeteket Periodic Acid Solution-ba, Katalógus szám: HT100-1, **5 percre** gombák és alkalmazkodó organizmusok esetén vagy **11 percre** alap membránok esetén.
4. Vegyük ki a tárgylemezeket és öblítsük le hatszor ioncserélt vízben.
5. **A gomba alkalmazkodó organizmusok kimutatásához**, tegyük a tárgylemezeket előre felmelegített Working Silver Methenamine Solution-ba. **20 perc** után vizsgálják mikroszkópiusan. A gomba és alkalmazkodó organizmusok sötétbarnák halványsárga háttér mellett.
Az alap membrán kimutatásához, tegyük a tárgylemezeket előre felmelegített Working Silver Methenamine Solution-ba. **30 perc** után vizsgálják mikroszkópiusan. Az alap membrán fekete a sötétsárga-barna háttér mellett.
MEGJEGYZÉS: A metszetek 62 °C-os inkubálása során, tegyenek egy ioncserélt víz tartalmazó Coplin edényt 62 °C-os vízfürdőbe. Ezt a vizet használják öblítéshez az 5. lépés értékelése előtt. Vizsgálják a metszetek megfelelő festését mikroszkópiusan a megállapított intervallumonként. Tegyük vissza a tárgylemezeket a meleg Working Silver Methenamine Solution-ba a kívánt intenzitás eléréséig.
6. Vegyük ki a tárgylemezeket a Working Silver Methenamine Solution-ból, miután a megfelelő szerkezeti festést elérték és öblítsük le hatszor ioncserélt vízzel szobahőmérsékleten.
7. Színezzék a metszeteket Gold Chloride Solution-ban, Katalógus szám: HT100-4, **30 másodpercig**.
8. Öblítsük szobahőmérsékletű ioncserélt vízben hatszor.
9. Tegyük a metszeteket Sodium Thiosulfate Solution-ba, Katalógus szám: HT100-5, **2 percre**.
10. Mossák le jól folyó csapvízben.
11. A személyes preferenciák szerint színezzék után Tartrazine Solution-nal, Fast Green FCF-fel, Light Green SF Yellowish-sal, Harris Hematoxylin Solution-nal vagy Eosin Y Solution-nal.
12. Dehidratálják alkoholban, derítsék xilolban, fedjük le és vizsgálják mikroszkópiusan.

ACCUMATE™ H2100 MICROWAVE ELJÁRÁS

1. Paraffinmentesítsék a tárgylemezeket és hidratálják ioncserélt vízzel.
2. Helyezzék a tárgylemezeket műanyag Coplin edényben lévő **40 ml** Periodic Acid Solution-ba, Katalógus szám: HT100-1. Lazán fedjük le a Coplin edényeket fedéllel mielőtt a mikrohullámú sütőbe teszik, vagy használjanak lyukas fedelű Coplin edényeket. Mikrohullámozzák **800 watton 10 másodpercig**.
***A Periodic Acid Solution újra felhasználható, ha szobahőmérsékleten használják **5 percig** mikrohullámozás helyett. ***Alap membránok esetén a Periodic Acid Solution inkubációs ideje **11 perc szobahőmérsékleten**.
3. Vegyük ki a tárgylemezeket a Periodic Acid Solution-ból és öblítsük le hatszor ioncserélt vízben.
4. Helyezzék a tárgylemezeket műanyag Coplin edényben lévő **40 ml** Working Silver Methenamine Solution-ba.
5. a. **Gombás organizmusok esetén** mikrohullámozzák **600 watton 35 másodpercig**. Óvatosan keverjük össze az oldatot beral pipettával vagy applikátor bittal. Inkubálják **2-3 percig**. Nem több, mint **2-3 perc** után, tegyük a tárgylemezeket meleg ioncserélt vízbe és ellenőrizzék a fejlődést mikroszkópiusan. Ha az organizmusok nem megfelelően fejlődnek, tegyük vissza a tárgylemezeket a Working Silver Methenamine Solution-ba és hagyják benne **30 másodperc-1 percig**.
MEGJEGYZÉS: A következő gomba organizmusoknak a javasolt fejlődési idők a következők:

Blastomyce-k	2 perc
Pneumocystis	2-3 perc
Aspergillus	2-3 perc
- b. **Alap membrán esetén** mikrohullámozzák **600 watton 35 másodpercig**. Óvatosan keverjük össze az oldatot. Inkubálják **5 percig**. Mikrohullámozzák még egyszer **600 watton 10 másodpercig**. Hagyják a tárgylemezeket fejlődni **2 percig**. Ellenőrizzék a tárgylemezeket mikroszkópiusan. Ha a tárgylemezek nem eléggé fejlődnek, ismételjék meg az utolsó lépést, amíg a kívánt szint el nem érik.
6. Öblítsük le a tárgylemezeket hatszor ioncserélt vízben.
7. Színezzék a tárgylemezeket Gold Chloride Solution-ban, Katalógus szám: HT100-4, **30 másodpercig szobahőmérsékleten**.
8. Öblítsük le a tárgylemezeket hatszor ioncserélt vízben.
9. Tegyük a tárgylemezeket Sodium Thiosulfate Solution-ba, Katalógus szám: HT100-5, **2 percre szobahőmérsékleten**.
10. Mossák le jól folyó csapvízben.
11. A személyes preferenciák szerint színezzék után Fast Green FCF-fel, Light Green SF Yellowish-sal, Tartrazine vagy Hematoxylin vagy Eosin Y Solution-nal.
12. Dehidratálják alkoholban, derítsék xilolban, fedjük le és vizsgálják mikroszkópiusan.

TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK

Gombák	Bíboros-barna-fekete
P. carinii	Bíboros-barna-fekete
Alap membrán	Fekete
Háttér	Az utánfestéstől függ.

Ha a megfigyelt eredmények eltérnek a várttól, vegyük fel a kapcsolatot a Sigma Aldrich műszaki szolgálatával.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Sheehan DC, Hrapchak BB: Theory and Practice of Histotechnology, 2nd ed., CV Mosby Co. St. Louis (MO), 1980
2. Koski JP: Silver methenamine-borate (SMB): Cost reduction with technical improvement in silver nitrate-gold chloride impregnations. J Histotechnol 4:115, 1981.
3. Churukian CJ, Schenk EA, Clark G: Dilute ammoniacal silver as a substitute for methenamine silver to demonstrate *Pneumocystis carinii* and fungi. Lab Med 17:87, 1986
4. Musto L, Flanigan M, Elbadawi A: Ten-minute silver stain for Pneumocystis carinii and fungi in tissue sections. Arch Pathol Lab Med 106:292, 1982
5. Tseng CH: New stain for fungi and basement membrane. Arch Pathol Lab Med 109:196, 1985
6. Leong AS-Y, Milios J: Rapid immunoperoxidase staining of lymphocyte antigens using microwave irradiation. J Pathol 148:183, 1986
7. Brinn NT: Rapid metallic histologic staining using the microwave oven. J Histotechnol 6:125, 1983
8. Valle S: Special stains in microwave oven. J Histotechnol 9:237, 1986
9. Carson Frieda, Histotechnology: A Self Instructional Text, ASCP Press, Chicago 1990
10. Kok and Boon, Microwave Cookbook for Microscopists, Coulomb Press Leydon Leidon 1992

Sigma-Aldrich, Inc. garantálja, hogy termékei megfelelnek a jelen és egyéb Sigma-Aldrich publikációkban közölt információkkal. A vevő köteles a termék(ek) megfelelőségét az adott felhasználáshoz meghatározni. További kikötések és feltételek alkalmazhatók. Lásd a számla vagy csomagolás hátsó oldalát a további eladási kikötések és feltételek tekintetében.

Eljárás száma: HT100
Korábbi felülvizsgálás: 2003-04
Felülvizsgálva: 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Egyesült Királyság

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765
Műszaki szolgálat: 800-325-0250 vagy hívják 314-771-3122
vagy küldjenek e-mail-t a clintech@sial.com címre
Megrendelés: 800-325-3010 vagy hívják: 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Németország 49-7329-970