

## Lendrum/MSB (Lendrum's Martius Scarlet Blue Methode), Histologilaboratorium, Enhet for patologi, Avd. for patologi SSK

Side 1 av 3

Dokumentplassering:

II.MSK.Pat.2.3.2.4.2-6

Godkjent dato:

09.11.2022

Gyldig til:

09.11.2024

Dato endret:

09.11.2022

Revisjon:

16.00

Medisinsk serviceklinikk/Avd for patologi SSK/Pasienter og brukere/Histologisk enhet/Histologilaboratorium


DISTRIBUSJONSliste: EK, forenklet versjon i MSB-kit.

ENDRINGER FRA FORRIGE VERSJON: Nytt kit med ready-to-use reagenser.

<b>Omfang</b>	Prosedyren gjelder for bioingeniører ved Enhet for histologi.																				
<b>Bakgrunn</b>	<p>Metoden differensierer fibrin, kollagen og muskel.</p> <p>Kan anvendes ved mistanke om vaskulære sykdommer og fibrinoid nekrose i vaskulitt.</p> <p>Synliggjøring av bindevev kan hjelpe ved diagnostisering av kollagenøs og mikroskopisk kolitt.</p>																				
<b>Akkreditert?</b>	Ja																				
<b>Prinsipp</b>	<p><b>Trikrom fargeteknikk</b> benyttes. Tre sure fargeløsninger brukes slik at basiske vevskomponenter farges selektivt, ved hjelp av pH, molekylvekt og inkuberingstid med de ulike reagensene.</p> <p>Fargemolekyler med lav molekylvekt trenger inn i vev gjennom porer i cellene. Når fargemolekyler med større molekylvekt tilsettes vil de trenge inn gjennom porene som er store nok og fortrenge de mindre fargemolekylene.</p> <p>På denne måten kan kollagen og glatt muskulatur differensieres, og fibrin og erytrocytter differensieres.</p> <p>Weigerts jernhematoxylin er motstandsdyktig mot syre og brukes derfor som kjernefarge.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Reagensnavn</th> <th>Molekylvekt</th> <th>Trenger inn i</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Martius yellow</td> <td>Lav</td> <td>Erytrocytter</td> </tr> <tr> <td>Scarlet red</td> <td>Mellomstor</td> <td>Cytoplasma og kollagen</td> </tr> <tr> <td>Fosforwolframsyre (polyacid)</td> <td>Stor</td> <td>Kollagen og ben</td> </tr> <tr> <td>Anilinblue</td> <td>Mellom mellomstor og stor</td> <td>Kollagen</td> </tr> <tr> <td>Weigerts Hematoxylin</td> <td></td> <td>Kjerne</td> </tr> </tbody> </table> <p>Gjelder ved optimale forhold</p> <p>Martius yellow trenger inn i vevets celler og farger det hele gult.</p> <p>Scarlet red fortrenge det gule fargemolekylet i cytoplasma, muskel og kollagen. Erytrocytter har for liten porestørrelse til at Scarlet red kan passere og farge cellene.</p> <p>Polyacid fortrenge rødfargen fra kollagen og ben.</p> <p>Anilinblå tar plassen rødfargen hadde i kollagenet.</p>			Reagensnavn	Molekylvekt	Trenger inn i	Martius yellow	Lav	Erytrocytter	Scarlet red	Mellomstor	Cytoplasma og kollagen	Fosforwolframsyre (polyacid)	Stor	Kollagen og ben	Anilinblue	Mellom mellomstor og stor	Kollagen	Weigerts Hematoxylin		Kjerne
Reagensnavn	Molekylvekt	Trenger inn i																			
Martius yellow	Lav	Erytrocytter																			
Scarlet red	Mellomstor	Cytoplasma og kollagen																			
Fosforwolframsyre (polyacid)	Stor	Kollagen og ben																			
Anilinblue	Mellom mellomstor og stor	Kollagen																			
Weigerts Hematoxylin		Kjerne																			
<b>Ytelse</b>	<p>Selektiviteten avhenger av:</p> <p><u>Fiksering og etterbehandling.</u> 10% bufret formalin vil medføre dannelse av kryssbindende metylenbroer mellom aminosyrer. Permeabiliteten for de sure fargene nedsettes. Etterbehandling med Bouins reagens (blanding av eddiksyre, pikrinsyre og formaldehyd) reverserer formalinfikseringen til en viss grad slik at metylenbroene ikke hindrer fargemolekyler å trenge inn. Fargeintensiteten økes. <u>pH</u> senkes til et nivå som er fordelaktig for sure fargeløsninger som et resultat av etterbehandling med Bouins reagens.</p> <p><u>Fargetid</u> tilpasses slik at molekylene fra hvert reagens får nok tid til å trenge inn i de vevskomponentene de skal farge, men ikke så lenge at de også klarer å trenge inn i de andre vevskomponentene.</p> <p><u>Skylletid</u> kan gi dårlig selektivitet dersom den er forlenget slik at farge vaskes ut.</p>																				


DokumentID: D01981

Utarbeidet av: <b>Britt Bringaker, Hege Wiksén</b>	Fagansvarlig: <b>Hege Wiksén</b>	Godkjent av: <b>Avdelingssjef Hilde Bjørnestøl Hansen</b>	Verifisert av: <b>04.11.2022 - Linda Kvelland Skaara</b>
---	-------------------------------------	--	---

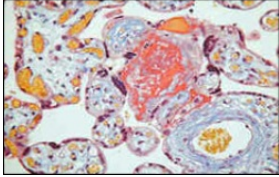
 SØRLANDET SYKEHUS	<b>Lendrum/MSB (Lendrum's Martius Scarlet Blue Methode), Histologilaboratorium, Enhet for patologi, Avd. for patologi SSK</b>				Side: 2 Av: 3
Dokumentplassering: II.MSK.Pat.2.3.2.4.2-6	Utarbeidet av: Britt Bringaker, Hege Wiksén	Fagansvarlig: Hege Wiksén	Godkjent dato: 09.11.2022	Godkjent av: Avdelingsjef Hilde Bjørnestrøl Hansen	Revisjon: 16.00

Medisinsk serviceklinikk/Avd for patologi SSK/Pasienter og brukere/Histologisk enhet/Histologilaboratorium

	<b>Fargereagensenes konsentrasjon:</b> Ready to use, reagensene skal ikke fortynnes. <b>Snittykkelse:</b> Optimal tykkelse 3,5 til 4,5 µm.
<b>Sikkerhet</b>	Arbeid i avtrekk. Bruk av hansker. Beskytt øyne. Hematoxylin Weigert A: H225 Meget brannfarlig væske og damp. Martius Yellow: H225 Meget brannfarlig væske og damp. H302 Farlig ved svelging. H315 Irriterer huden. H319 Gir alvorlig øyeirritasjon. H371 Kan forårsake organskader.
<b>Prøvemateriale</b>	Parafinsnitt, 3,5-4,5 µm tykt, på superfrost plus-glass med tilhørende kontroll.
<b>Undersøkelse</b>	Farging av snitt til mikroskopering.
<b>Forsendelse</b>	Ikke relevant.
<b>Oppbevaring og prøvepreparering</b>	Fargekit samt Bouins reagens oppbevares i romtemperatur i kjemikalieskap på rom 1009BI.
<b>Utstyr, kalibrering</b>	Fargebro eller fargekammer i avtrekkskap, lite begerglass til blanding av A og B, Coplinglass til skylling, pipette dersom behov.
<b>Interferens/kryssreaksjoner og andre feilkilder</b>	Valg av fikseringsløsning og etterbehandling. Ugunstig pH, fargekonsentrasjon, fargetid og skylletid. Ved forlenget tid med scarlet red vil den kunne konkurrere ut Martius yellow og erytrocyttene vil framstå som røde.
<b>Reagenser, slå sammen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bouins Fixative, 7000.1000, VWR</li> <li>• Rektifisert etanol teknisk, 600050, Antibac</li> <li>• Absolutt etanol prima, 600065, Antibac</li> <li>• Hydrochloric acid, HCl, 37%, 1.00317, VWR</li> <li>• Martius Scarlet Blue, RRSK2-100, Atom scientific, Histolab</li> <li>• Weigert's Jernhematoxylin, løsning A og B</li> <li>• Martius Yellow Sat. Alcoholic with 2% Phosphotungstic Acid</li> <li>• Phosphotungstic Acid</li> <li>• Brilliant Crystal Scarlet</li> <li>• Aniline Blue (1% vannløslig)</li> </ul>
<b>Tillaging løsninger</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Weigert's Jernhematoxylin, løsning A og B: bland ønsket mengde med like store deler av hver løsning. 2 mL totalt pr snitt.</li> <li>• 1% saltsyrealkohol: Konsentrert saltsyre fortynnes 1:100 i Absolutt etanol prima.</li> </ul>
<b>Kontrollmateriale</b>	Positiv kontroll: Snitt med fibrin
<b>Utførelse</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Avparafinering og rehydrering: Bruk programmet «Avparafinering» på TissueTek Prisma. <a href="#">Egen prosedyre</a>.</li> <li>2. Bouins fixative: 1 time i forvarmet løsning, 60 °C (varmeskap i fremføringsrom).</li> <li>3. Skyll godt i rennende kranvann i 5 min (under avtrekk) til alt det gule er borte.</li> <li>4. Weigert's Jernhematoxylin, 10 min.</li> <li>5. Skyll raskt i kranvann.</li> <li>6. Differensier i 1 % saltsyrealkohol, et raskt dypp.</li> <li>7. Blån i rennende kranvann, minst 10 min.</li> <li>8. Dypp i 96 % Alkohol.</li> <li>9. Martius yellow, 5 min.</li> <li>10. Skyll raskt i rennende kranvann.</li> <li>11. Brilliant crystal scarlet, 5 min.</li> <li>12. Skyll i rennende kranvann.</li> <li>13. Phosphotungstic acid, 10 min.</li> </ol>

 SØRLANDET SYKEHUS	<b>Lendrum/MSB (Lendrum's Martius Scarlet Blue Methode), Histologilaboratorium, Enhet for patologi, Avd. for patologi SSK</b>				Side: 3 Av: 3
Dokumentplassering: II.MSK.Pat.2.3.2.4.2-6	Utarbeidet av: Britt Bringaker, Hege Wikсэн	Fagansvarlig: Hege Wikсэн	Godkjent dato: 09.11.2022	Godkjent av: Avdelingsjef Hilde Bjørnestøl Hansen	Revisjon: 16.00

Medisinsk serviceklinikk/Avd for patologi SSK/Pasienter og brukere/Histologisk enhet/Histologilaboratorium

	<p>14. Skyll i rennende kranvann.</p> <p>15. Anilinblå, 5 min.</p> <p>16. Skyll i rennende kranvann.</p> <p>17. Dehydrer, klar og dekk ved bruk av programmet «Spesialfarg dehydrering» i Tissue-Tek Prisma/-Film. Egen prosedyre.</p>														
<i>Evaluering av resultat/ Vurdering av kontroller</i>	<p><b>Resultat:</b></p> <table border="1"> <tr> <td>Fibrin</td> <td>Rød</td> </tr> <tr> <td>Ny fibrin</td> <td>Gul</td> </tr> <tr> <td>Gammel fibrin</td> <td>Blå</td> </tr> <tr> <td>Muskulatur</td> <td>Blekere rød</td> </tr> <tr> <td>Kjerner</td> <td>Brun</td> </tr> <tr> <td>Kollagen basalmembran, retikulín, elastiske fibre</td> <td>Blå</td> </tr> <tr> <td>Erytrocytter</td> <td>Gul</td> </tr> </table> 	Fibrin	Rød	Ny fibrin	Gul	Gammel fibrin	Blå	Muskulatur	Blekere rød	Kjerner	Brun	Kollagen basalmembran, retikulín, elastiske fibre	Blå	Erytrocytter	Gul
Fibrin	Rød														
Ny fibrin	Gul														
Gammel fibrin	Blå														
Muskulatur	Blekere rød														
Kjerner	Brun														
Kollagen basalmembran, retikulín, elastiske fibre	Blå														
Erytrocytter	Gul														
<i>Usikkerhet</i>	<p>Ny fibrin kan farges gul.</p> <p>Gammel fibrin kan farges blå.</p> <p>Kryssbindene fiksativer som formalin, maskerer reaktive grupper som ellers ville binde de sure fargene i trikromteknikker. Dersom vevet ligger for lenge i formalin kan dette bli et problem og ytelsen dårligere.</p> <p>Kfr. ellers feilkilder og <a href="#">Måleusikkerhet</a>.</p>														
<i>Avfallshåndtering</i>	<p>Bouins fixative kan brukes opp til tre ganger.</p> <p>Se prosedyre for <a href="#">Faremerker/avfallshåndtering for kjemikalier. Avd. for patologi. SSK</a>.</p>														
<i>Validering/dokumentasjon/ referanser</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Histologic Preparations, Common Problems and Their Solutions, Richard W. Brown</li> <li>• <a href="#">Verifisering</a></li> <li>• <a href="#">Pakningsvedlegg</a></li> <li>• <a href="#">SLP\Histologi</a></li> <li>• <a href="#">Histological Techniques</a> nettside</li> </ul>														

### Kryssreferanser:

[II.MSK.Pat.2.1-8 Faremerker/avfallshåndtering for kjemikalier. Avd. for patologi. SSK.](#)

[II.MSK.Pat.2.3.2.1-10 Tissue-Tek® Prisma® Film®, Histab, Histologisk enhet, Avd. for patologi, SSK](#)

[II.MSK.Pat.2.3.2.4.2-14 Forenklet Lendrum/MSB \(Lendrum's Martius Scarlet Blue metode\), Histologilab, Enhet for histologi, Avd. for patologi, SSK](#)

[II.MSK.Pat.10.3.2.3.1.11-1 Endringskontroll MSB Stain kit fra Atom Scientific/Histolab, Enhet for histologi, Avdeling for patologi, SSK](#)

[II.MSK.Pat.10.3.2.3.2.12-1 Verifisering MSB stain kit fra Histolab, Enhet for histologi, Avdeling for patologi. SSK](#)

[II.MSK.Pat.10.4-1 Måleusikkerhet, Histologisk enhet. Avd. for patologi. SSK](#)