

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

Side 1 av 4

Dokumentplassering:

II.MSK.Pat.2.3.2.4.2-6

Godkjent dato:

24.01.2025

Gyldig til:

24.01.2027

Dato endret:

24.01.2025

Revisjon:

17.00

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

DISTRIBUSJONSliste: EK, forenklet versjon i MSB-kit.

ENDRINGER FRA FORRIGE VERSJON: Ny mal

Omfang	Prosedyren gjelder for bioingeniører ved Enhet for histologi.																				
Bakgrunn	Metoden differensierer fibrin, kollagen og muskel. Kan anvendes ved mistanke om vaskulære sykdommer og fibrinoid nekrose i vaskulitt. Synliggjøring av bindevev kan hjelpe ved diagnostisering av kollagenøs og mikroskopisk kolitt.																				
Akkreditert?	Ja																				
Prinsipp	Trikrom fargeteknikk benyttes. Tre sure fargeløsninger brukes slik at basiske vevskomponenter farges selektivt, ved hjelp av pH, molekylvekt og inkuberingstid med de ulike reagensene. 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. På denne måten kan kollagen og glatt muskulatur differensieres, og fibrin og erytrocytter differensieres. Weigerts jernhematoxylin er motstandsdyktig mot syre og brukes derfor som kjernefarge. <table><tr><th>Reagensnavn</th><th>Molekylvekt</th><th>Trenger inn i</th></tr><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></table> Gjelder ved optimale forhold Martius yellow trenger inn i vevets celler og farger det hele gult. 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. Polyacid fortrenge rødfargen fra kollagen og ben. Anilinblå tar plassen rødfargen hadde i kollagenet.			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																			
Ytelse	Selektiviteten avhenger av: <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. <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. <u>Skylletid</u> kan gi dårlig selektivitet dersom den er forlenget slik at farge vaskes ut.																				

DokumentID: D01981

Utarbeidet av: Britt Bringaker, Hege Wiksén	Fagansvarlig: Hege Wiksén	Godkjent av: Avdelingssjef Hilde Bjørnestøl Hansen	Verifisert av: 24.01.2025 - Linda Kvelland Skaara
---	-------------------------------------	--	---

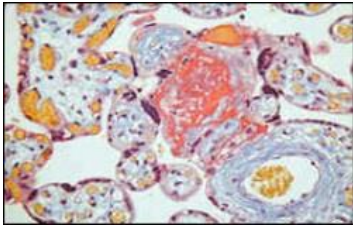
 SØRLANDET SYKEHUS	Lendrum/MSB (Lendrum's Martius Scarlet Blue Methode), Histologilaboratorium, Enhet for patologi, Avd. for patologi SSK				Side: 2 Av: 4
Dokumentplassering: II.MSK.Pat.2.3.2.4.2-6	Utarbeidet av: Britt Bringaker, Hege Wiksén	Fagansvarlig: Hege Wiksén	Godkjent dato: 24.01.2025	Godkjent av: Avdelingssjef Hilde Bjørnestøl Hansen	Revisjon: 17.00

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

	Fargereagensenes konsentrasjon: Ready to use, reagensene skal ikke fortynnes. Snittykkelse: Optimal tykkelse 3,5 til 4,5 µm.
Sikkerhet	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.
Prøvemateriale	Parafinsnitt, 3 µm tykt, på superfrost plus-glass med tilhørende kontroll.
Undersøkelse	Farging av snitt til mikroskopering.
Forsendelse	Ikke relevant.
Oppbevaring og prøvepreparering	Bouins: I kjemikaliekap på rom 101BM, romtemperatur. Fargekit: På hylle, histlab, romtemperatur. Preparering omfatter skjæring av snitt.
Utstyr	Fargebro eller fargekammer i avtrekkskap, lite begerglass til blanding av A og B, Coplinglass til skylling, pipette dersom behov.
Interferens/kryssreaksjoner og andre feilkilder	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.
Reagenser, slå sammen	- Bouin Fixeringsvätska, AR-RRFF5010-E, Histolab - Rektifisert etanol teknisk, 600050, Antibac - Absolutt etanol prima, 600065, Antibac - Hydrochloric acid, HCl, 37%, 1.00317, VWR - Martius Scarlet Blue, RRSK2-100 eller -500, Atom scientific, Histolab - Weigert's Jernhematoxylin, løsning A og B - Martius Yellow Sat. Alcoholic with 2% Phosphotungstic Acid - Phosphotungstic Acid - Brilliant Crystal Scarlet - Aniline Blue (1% vannløsning)
Tillaging løsninger	- Weigert's Jernhematoxylin, løsning A og B: bland ønsket mengde med like store deler av hver løsning. 2 mL totalt pr snitt. 1% saltsyrealkohol: Konsentrert saltsyre fortynnes 1:100 i Absolutt etanol prima.
Kontrollmateriale	Positiv kontroll: Snitt med fibrin
Utførelse	- Avparafinering og rehydrering: Bruk programmet «Avparafinering» på TissueTek Prisma. Egen prosedyre. - Bouins fixative: 1 time i forvarmet løsning, 60 °C (varmeskap i fremføringsrom). - Skyll godt i rennende kranvann i 5 min (under avtrekk) til vannet ikke lenger er gult. - Weigert's Jernhematoxylin, 10 min. - Skyll raskt i kranvann. - Differensier i 1% saltsyrealkohol, et raskt dypp. - Blå i rennende kranvann, minst 10 min. - Dypp i 96% Alkohol. - Martius yellow, 5 min. - Skyll raskt i rennende kranvann. - Brilliant crystal scarlet, 5 min.

 SØRLANDET SYKEHUS	Lendrum/MSB (Lendrum's Martius Scarlet Blue Methode), Histologilaboratorium, Enhet for patologi, Avd. for patologi SSK				Side: 3 Av: 4
Dokumentplassering: II.MSK.Pat.2.3.2.4.2-6	Utarbeidet av: Britt Bringaker, Hege Wiksén	Fagansvarlig: Hege Wiksén	Godkjent dato: 24.01.2025	Godkjent av: Avdelingssjef Hilde Bjørnestøl Hansen	Revisjon: 17.00

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

	12. Skyll i rennende kranvann. 13. Phosphotungstic acid, 10 min. 14. Skyll i rennende kranvann. 15. Anilinblå, 5 min. 16. Skyll i rennende kranvann. 17. Dehydrer, klar og dekk ved bruk av programmet «Spes.farg dehydrering» i Tissue-Tek Prisma/-Film. Egen prosedyre.										
<i>Evaluering av resultat/ Vurdering av kontroller</i>	Resultat: <table border="1" data-bbox="448 622 1377 875"> <tr> <td>Fibrin (Ny fibrin) (Gammel fibrin)</td><td>Rød (Gul) (Blå)</td></tr> <tr> <td>Muskulatur</td><td>Blekere rød</td></tr> <tr> <td>Kjerner</td><td>Brun</td></tr> <tr> <td>Kollagen basalmembran, retikulin, elastiske fibre</td><td>Blå</td></tr> <tr> <td>Erytrocytter</td><td>Gul</td></tr> </table> 	Fibrin (Ny fibrin) (Gammel fibrin)	Rød (Gul) (Blå)	Muskulatur	Blekere rød	Kjerner	Brun	Kollagen basalmembran, retikulin, elastiske fibre	Blå	Erytrocytter	Gul
Fibrin (Ny fibrin) (Gammel fibrin)	Rød (Gul) (Blå)										
Muskulatur	Blekere rød										
Kjerner	Brun										
Kollagen basalmembran, retikulin, elastiske fibre	Blå										
Erytrocytter	Gul										
<i>Holdbarhet</i>	3 år etter tilvirkningsdato (se merking på forpakningen).										
<i>Usikkerhet</i>	Ny fibrin kan farges gul. Gammel fibrin kan farges blå. For lang eller for kort inkubering vil påvirke fargerultatet. 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. Kfr. ellers feilkilder og Måleusikkerhet .										
<i>Risiko, vurderes i samarbeid med patolog</i>	Risiko forbundet med falskt positivt resultat: Lav										
	Risiko forbundet med falskt negativt resultat: Lav, fordi diagnosen krever flere tegn										
	Sannsynlighet for feilbehandling ved feil resultat: Liten										
<i>Avfallshåndtering</i>	Bouins fix. kan brukes opp til tre ganger. Se prosedyre for Faremerker/avfallshåndtering for kjemikalier. Avd. for patologi. SSK.										
<i>Validering/dokumentasjon/ referanser</i>	- Histologic Preparations, Common Problems and Their Solutions, Richard W. Brown Verifisering Pakningsvedlegg SLP\Histologi Histological Techniques nettside										

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](#)

 SØRLANDET SYKEHUS	Lendrum/MSB (Lendrum's Martius Scarlet Blue Methode), Histologilaboratorium, Enhet for patologi, Avd. for patologi SSK				Side: 4 Av: 4
Dokumentplassering: II.MSK.Pat.2.3.2.4.2-6	Utarbeidet av: Britt Bringaker, Hege Wiksén	Fagansvarlig: Hege Wiksén	Godkjent dato: 24.01.2025	Godkjent av: Avdelingssjef Hilde Bjørnestøl Hansen	Revisjon: 17.00

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