

Para-Pak® TRICHOME STAIN

REF 400101, 400112

IVD

Rx Only

INTENDED USE

Para-Pak Trichrome Stain is a rapid staining procedure which provides excellent differentiation of internal structures of intestinal parasites as well as facilitating the separation of these organisms from background material and artifacts.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The trichrome stain was first introduced by Masson in 1929 as an easy, rapid alternative to tissue stains then in use. It was particularly useful at the time for the study of muscles. A number of authors have modified the stain for suitability to the study of other tissues, but in 1949 Gomori developed a more rapid methodology which, after preliminary nuclear staining with hematoxylin, was broadly applicable to tissue sections and cytologic smears.^{1,3,8,10} In 1951 Wheatley noted the affinity of the chromatin material of *E. histolytica* for chromotrope 2R and found that with changes in fixation and dehydration a simple and rapid staining procedure for intestinal amoeba and flagellates was possible.¹¹ Para-Pak Trichrome Stain is suggested for use in the regimen of Wheatley for intestinal parasites which follows. It is also suitable for use in staining tissues with the Gomori technique. The contrast of the blue-green, purplish-tinged or red-stained organisms with the green background material is a considerable aid to locating organisms when compared with iron-hematoxylin.^{4,9}

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

1. Chromotrope 2R
2. Light green SF
3. Fast green FC
4. Phosphotungstic Acid
5. Acetic Acid
6. Distilled H₂O

MATERIALS NOT PROVIDED**Solution A – Schaudin's fixative:**

95% Ethanol 33.3 mL
Mercuric chloride 66.6 mL
(saturated aqueous solution about 14 g/100 mL H₂O). Just prior to use add 5 mL of glacial acetic acid/100 mL of solution.

Solution B – Iodine alcohol:

Prepare stock solution: To 70% ethanol add enough iodine crystals to make a dark, concentrated solution. Amount will vary from lot to lot of iodine.

Prepare working solution: Dilute stock solution to port wine, strong tea and amber colored solution by adding 70% ethanol. The exact concentration is unimportant.

Solution C – Acid ethanol:

To 100 mL 90% Ethanol add .5 mL glacial acetic acid.

Solution D – Carbol-xylene:

Melt sufficient crystals of carbolic acid (phenol) to produce 100 mL of liquid in a water bath and add to 300 mL xylene or add 100 gm phenol crystals to 300 mL xylene and dissolve by shaking.

PRECAUTIONS

1. All reagents are for *in vitro* diagnostic use only.
2. When utilizing PVA fixed specimens the slides must be absolutely dry. Accelerating the drying process by warming may distort some organisms.
3. When utilizing Schauden's fixed specimens the slides must not be allowed to dry at any time until finally mounted.
4. If necessary to interrupt the staining procedure the slides may be stored for long periods of time in the last ethanol bath prior to staining. (**Smear Preparation:** Step No. 3).
5. The purpose of the iodine alcohol (**Staining:** Step No. 1) is to remove the mercuric chloride in Schaudin's fixative and PVA fixative. Many problems experienced in the trichrome method are directly attributable to saturation of this solution; change it frequently.
6. The purpose of the first alcohol rinse after decolorizing is to halt decolorization. Since carryover of the acid alcohol will occur, change this solution frequently.

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

| | |
|--|--|
|  Trichrome Stain | Signal word Warning Hazard statements H313 - May be harmful in contact with skin Precautionary Statements - EU (§28, 1272/2008) P262 - Do not get in eyes, on skin, or on clothing P302 + P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water |
|--|--|

SHELF LIFE AND STORAGE

Shelf life of the Para-Pak Trichrome Stain is indicated on the outer package label. Store at 15-30 C. Excessive heat and cold should be avoided.

TEST PROCEDURE**Smear Preparation:**

For preparation of smears from PVA fixative or SAF fixative, please refer to the appropriate Meridian Bioscience package insert supplied with the collection kit or fixative. A complimentary insert will be provided on request.

1. Make a thin smear of the fecal material on a clean glass slide. The specimen may be emulsified in a drop of saline if necessary. Alternatively, a smear may be prepared in PVA fixative and allowed to dry overnight. In this case proceed directly to **Staining:** Step No. 1.
2. While the smear is still wet, immediately place the slide in a coplin jar containing Schaudin's fixative (Solution A below) for 5 minutes at 50 C or one hour at room temperature.
3. With the exception that the iodine may be omitted from the first alcohol solution for those slides prepared in fixatives not containing mercuric chloride (such as SAF) all specimens may now be processed identically.

Staining:

1. Iodine alcohol (Solution B below) (See Note 1) 10 minutes
 2. 70% ethanol (See Note 3) 3-5 minutes
 3. 70% ethanol (See Note 3) 3-5 minutes
 4. Para-Pak Trichrome Stain 6-8 minutes
 5. Acid ethanol (Solution C below) 5-10 seconds
- Observe carefully. When stain just begins to run from the smear, transfer to the next bath immediately. Two quick dips are usually sufficient.
6. 95% ethanol (See Notes 2 & 4) Dip twice
 7. 95% ethanol (See Note 4) 5 minutes
 8. 95% ethanol (See Note 4) 5 minutes
 9. 100% ethanol (absolute) or carbol-xylene (solution D) 3 minutes
 10. Xylene 3 minutes
- (or until refraction appears at the smear-xylene interface)
11. Mount with coverslip using the mounting medium of choice (e.g., Canada balsam in xylene, D.P.X., Permount, Crisalite or clear mount).

Note 1: See Precautions.

Note 2: See Precautions.

Note 3: "Reagent Alcohol", commercially available mixture of 95% ethanol, 5% methanol, may be substituted if diluted to 70% in water.

Note 4: "Reagent Alcohol", commercially available as a mixture of 95% ethanol, 5% methanol, may be substituted without dilution.

INTERPRETATION OF RESULTS

Background material and artifacts will stain green. Bacteria and red blood cells usually stain red, while yeasts, molds, etc., are usually green. The cytoplasm and cysts of *E. histolytica* will be blue-green; usually with a slight purplish tinge. *E. coli* cysts may be somewhat more purplish. Karyosomes of nuclei, chromatoid bodies and chromatin material will appear red to purplish as will helminth eggs and larvae.

TROUBLESHOOTING

The Wheatley trichrome method is a remarkably trouble-free procedure when used exactly as directed. Occasionally, as with any procedure, problems may arise. These may be divided into four categories:

1. Problems related to incomplete fixation of the smear resulting from failure to thoroughly emulsify the fecal specimen in the fixative.
 - a. Degenerate forms staining a pale green.
 - b. Unsatisfactory staining of cytoplasm and/or nucleus.

Be sure to thoroughly mix the specimen in the fixative.
2. Failure to observe the smear carefully while decolorizing (**Staining:** Step No. 5).
 - a. Lack of contrast between organisms and background material of cytoplasm and nucleus.

Remove the slide from the acid-ethanol and proceed to the ethanol rinse as soon as the color begins to run from the smear.
3. Saturation of the iodine-alcohol when using fixatives containing mercuric chloride:
 - a. Obscuration of the smear by dark crystals.

Prepare the iodine alcohol solution exactly as directed and change it frequently.
4. Carryover of staining/decolorizing solutions from one jar to the next:
 - a. Smear too green or lack of contrast.
 - b. Smear is "cloudy".

Lack of contrast usually results from carryover of the acid-alcohol to the ethanol rinses or failure to observe the slide while decolorizing. After repeated use the stain solution may be "watered down" by carryover of 70% ethanol. "Cloudy" smears are caused by incomplete dehydration after staining and decolorization. Carbol-xylene or absolute ethanol and xylene are dehydrating agents in this procedure.

Change all solutions periodically to avoid problems.

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.

1. A positive smear should be run through the series each time the solutions are changed and the results recorded.

If the expected control reactions are not observed, repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.

Para-Pak® TRICHOME STAIN

REF 400101, 400112

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

Para-Pak Trichrome Stain Colorant Trichrome est une procédure de coloration rapide qui permet d'obtenir une excellente différenciation des structures internes des parasites, et facilite la distinction de ces parasites par rapport au matériel de fond et aux artefacts.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Le Colorant Trichrome a été pour la première fois présenté par Masson 1929 comme une alternative facile et rapide à la coloration des tissus pratiquée à ce moment-là. Ce colorant a été particulièrement utile à cette époque pour l'étude des muscles. De nombreux auteurs ont modifié la méthode pour l'adapter à d'autres tissus, et en 1949 Gomori a développé une méthodologie plus rapide qui, après une coloration préliminaire du noyau par l'hématoxyline, est largement applicable aux coupes de tissus et aux frottils cytologiques.^{1,3,8,10} En 1951, Wheatley a remarqué l'affinité du matériel chromatien de *E. histolytica* pour le chromotrope 2R, et a montré qu'il était possible de réaliser une procédure de coloration simple et rapide pour les amibes et les flagellés intestinaux, avec certains changements dans les étapes de fixation et de déshydratation.¹¹ Le colorant Para-Pak Trichrome Stain est recommandé pour être utilisé dans la méthode de Wheatley pour détection des parasites intestinaux voir ci-dessous. Ce colorant est également adapté pour la coloration de tissus selon la technique de Gomori. Le contraste entre les organismes bleu/vert, violacés, ou colorés en rouge, et le matériel de fond coloré en vert, est une aide considérable pour localiser ces organismes, par rapport à la technique fer/hématoxyline.^{4,9}

MATERIEL FOURNI

1. Chromotrope 2R
2. Vert lumière SF
3. Vert rapide FC
4. Acide phosphotungstique
5. Acide acétique
6. Eau distillée

MATERIEL NON FOURNI**Solution A – Fixateur de Schaudin:**

Ethanol 95% 33,3 mL

Chlorure mercurique 66,6 mL

(solution aqueuse saturée à environ 14 g/100 mL d'eau). Juste avant l'utilisation, ajouter 5 mL d'acide acétique glacial pour 100 mL de solution.

Solution B – Alcool iodé:

Préparation de la solution stock: A l'éthanol 70%, ajouter suffisamment de cristaux d'iode pour réaliser une solution sombre, concentrée.

Les quantités peuvent varier en fonction du lot d'iode.

Préparation de la solution de travail: Diluer la solution stock pour obtenir une solution de couleur thé fort/porto/ambre, en ajoutant de l'éthanol 70%. La concentration exacte n'est pas importante.

Solution C – Ethanol-acide:

Ajouter 0,5 mL d'acide acétique glacial à 100 mL d'éthanol 90%.

Solution D – Carbol-Xylène:

Mélanger suffisamment de cristaux d'acide phénique (phénol) pour obtenir 100 mL de liquide dans un bain d'eau, et ajouter à 300 mL de xylène, ou ajouter 100 g de cristaux de phénol à 300 mL de xylène et dissoudre par agitation.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Lorsque des échantillons fixés dans le PVA sont utilisés, les lames doivent être parfaitement sèches. Cependant, accélérer le processus de séchage peut provoquer des distorsions dans la structure de certains organismes.
3. Lorsque des échantillons conservés dans le fixateur de Schaudin sont utilisés, les lames ne doivent au contraire pas être séchées jusqu'au montage.
4. S'il est nécessaire d'interrompre la procédure de coloration, les lames peuvent être conservées pendant longtemps dans le dernier bain d'éthanol avant la coloration (**Preparation des frottis étape 3**).
5. Le but de l'étape à l'alcool iodé (**Coloration étape 1**) est d'éliminer le chlorure de mercure du fixateur de Schaudin et du fixateur PVA. De nombreux problèmes rencontrés dans la méthode de coloration Trichrome sont directement imputables à la saturation de cette solution. Penser à la changer régulièrement.
6. Le but de la première étape de rinçage à l'alcool après la décoloration est de stopper la décoloration. Comme il se produit un transfert de la solution alcool-acide, il est nécessaire de changer régulièrement la solution d'alcool.

DANGER ET MISES EN GARDE

Trichrome Stain

Mention d'avertissement

Attention

Mentions de danger

H313 - Peut être nocif par contact cutané

Conseils de prudence - UE (par 28, 1272/2008)

P262 - Éviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements

P302 + P352 - EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La durée de conservation des Para-Pak Trichrome Stain est indiquée sur son étiquette d'emballage. Conserver à 15-30 C. Eviter toute variation de température excessive (en chaud ou froid).

PROCEDURE DE TEST**Préparation des frottis:**

Pour la préparation de frottis à partir d'échantillons conservés dans le PVA ou le SAF, se référer à la notice appropriée de Meridian Bioscience, fournie avec la solution de fixation. Ces notices sont disponibles sur demande.

Avant des échantillons frais, utiliser la procédure suivante:

1. Faire un étalement fin du matériel fécal sur une lame de verre propre. L'échantillon peut être émulsionné dans une goutte de sérum physiologique si nécessaire. Procédure alternative: préparer un frottis dans le fixateur PVA, et laisser sécher pendant la nuit, puis passer directement à l'étape 1 de la coloration.
2. Lorsque l'étalement est encore humide, placer immédiatement la lame dans un récipient contenant du fixateur de Schaudin (solution A, voir ci-dessous) pendant 5 minutes à 50 C, ou 1 heure à température ambiante.
3. Tous les échantillons sont ensuite traités de la même façon, sauf pour un cas: pour les lames préparées avec des fixateurs ne contenant pas de mercure (comme le SAF), l'iode peut être omise dans la première solution alcoolisée.

Coloration:

- | | |
|--|---------------------|
| 1. Alcool iodé (solution B) (voir Remarque 1) | 10 minutes |
| 2. Ethanol 70% (voir Remarque 3) | 3-5 minutes |
| 3. Ethanol 70% (voir Remarque 3) | 3-5 minutes |
| 4. Para-Pak Trichrome Stain | 6-8 minutes |
| 5. Ethanol-acide (Solution C, voir ci-dessous) | 5-10 secondes |
| Observer soigneusement la lame, lorsque le colorant commence juste à se retirer du frottis, transférer immédiatement la lame dans le bac suivant. Deux trempages rapides sont suffisants habituellement. | |
| 6. Ethanol 95% (voir Remarques 2 et 4) | 2 trempages rapides |
| 7. Ethanol 95% (voir Remarque 4) | 5 minutes |
| 8. Ethanol 95% (voir Remarque 4) | 5 minutes |
| 9. Ethanol 100% (absolu) ou Carbol-xylène (solution D) | 3 minutes |
| 10. Xylène | 3 minutes |
| (ou jusqu'à l'apparition de la réfraction à l'interface frottis – xylène) | |
| 11. Monter le frottis avec une lamelle couvre-objet et le milieu de montage désiré (par exemple D.P.X., Permount, Crisalite, baume canadien/xylène, ou milieu de montage clair). | |

Remarque 1: Voir Précautions d'emploi.

Remarque 2: Voir Précautions d'emploi.

Remarque 3: Le "réactif alcool", disponible sur le marché en tant que mélange d'éthanol 95% et méthanol 5%, peut être un substitut en le diluant à 70% dans de l'eau.

Remarque 4: Le "réactif alcool", disponible sur le marché en tant que mélange d'éthanol 95% et méthanol 5%, peut être un substitut (ne pas diluer).

INTERPRETATION DES RESULTATS

Le matériel de fond et les artefacts sont colorés en vert. Les bactéries et les globules rouges sont habituellement colorés en rouge, alors que les levures, moisissures, etc. sont habituellement verts. Le cytoplasme et les kystes de *Entamoeba histolytica* sont bleu/vert, en général avec une légère teinte violacée. Les kystes d'*Entamoeba coli* sont parfois plus violacés. Les caryosomes du noyau, les corps chromatoides et la chromatine apparaissent rouges à violacés, comme les œufs et les larves d'helminthes.

CAUSES D'ERREUR

La coloration au Trichrome de Wheatley est une procédure qui pose peu de problèmes lorsqu'elle est effectuée en suivant exactement les indications. Cependant, comme pour d'autres procédures, des difficultés peuvent survenir, qui sont divisées en quatre catégories:

1. Problèmes liés à une fixation incomplète de l'étalement, si l'échantillon de selles n'a pas été mélangé correctement dans la solution de fixation:
 - a. Formes dégénérées colorées en vert clair.
 - b. Coloration passable des cytoplasmes et/ou des noyaux.
 2. Frottis laisse sans surveillance pendant l'étape de décoloration (**Coloration** étape 5):
 - a. Manque de contraste entre les organismes et le matériel de fond, pour les cytoplasmes et les noyaux.
Retirer la lame du bain éthanol-acide, et procéder au rinçage par l'éthanol aussitôt que la couleur commence à se retirer du frottis.
 3. Saturation de l'alcool iodé lorsque des fixateurs contenant du chlorure de mercure sont utilisés:
 - a. Le frottis est obscurci par des cristaux sombres.
 4. Transfert des solutions de coloration/décoloration d'un récipient à l'autre:
 - a. Frottis trop vert, ou manque de contraste.
 - b. Le frottis est "troublé".
- Le manque de contraste résulte habituellement d'un transfert de la solution d'alcool-acide dans les bacs de rinçage d'éthanol, ou par la non-observation de la lame pendant l'étape de décoloration. Après des utilisations répétées, la solution de coloration peut également être diluée par le transfert de l'éthanol 70%.*
- Les frottis "troublés" sont dus à une déshydratation incomplète après la coloration et la décoloration. Le carbol-xylène, ou l'éthanol absolu et le xylène sont les agents déshydratants recommandés à cette étape.*
- Changer toutes les solutions régulièrement pour éviter les problèmes.**

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

1. Un frottis contrôle positif doit être utilisé et testé à chaque fois que les solutions sont changées, et les résultats doivent être enregistrés.

Si les réactions attendues ne sont pas observées, la première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.

Para-Pak® TRICHOME STAIN

REF 400101, 400112

IVD

Rx Only

USO INDICADO

La Tinción Tricromica Para-Pak es un rápido procedimiento de tinción que brinda excelente diferenciación de las estructuras internas de los parásitos intestinales, como así también facilita la distinción de estos organismos del material de trasfondo y de los artefactos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Masson introdujo por primera vez la tinción tricromica en 1929 como una alternativa fácil y rápida a las tinciones histológicas que se utilizaban entonces. Su implementación fue especialmente útil en el estudio de los músculos. Algunos autores han modificado la tinción para adaptarla al estudio de otros tejidos, pero en 1949 Gomori desarrolló una metodología más rápida que, después de la tinción nuclear preliminar con hematoxilina, se pudo aplicar ampliamente en secciones titulares y extendidos citológicos.^{1, 3, 8, 10} En 1951 Wheatley notó la afinidad del material de la cromatina para el cromotropo 2R y halló que podía ser posible la creación de un procedimiento de tinción simple y rápido para amebas y flagelados intestinales mediante cambios en la fijación y deshidratación.¹¹ La tinción tricromica Para-Pak está indicada en el régimen de Wheatley siguiente. También es apropiada para teñir tejidos con la técnica de Gomori. El contraste entre los organismos teñidos de color azul/verde con matices púrpuros o rojos y el material de trasfondo de color verde facilita considerablemente la localización de los organismos cuando se compara con la hematoxilina ferric.^{4, 9}

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

1. Cromotropo 2R
2. Verde claro SF
3. Verde diluido FC
4. Ácido fosfotungstico
5. Ácido acético
6. Agua destilada

MATERIALES NO PROPORCIONADOS**Solución A – Fijador de Schaudin:**

Etanol al 95% 33,3 mL
Cloruro mercurico 66,6 mL

(Solución acusa saturada aproximadamente 14 g/100 mL de agua) Justo antes de usar, añada 5 mL de ácido acético glacial/100 mL de solución.

Solución B – Alcohol Yodado:

Prepare la solución "Stock": Añada suficiente cantidad de cristales de yodo a alcohol al 70%, para preparar una solución oscura y concentrada. La cantidad varía de lote a lote de yodo.

Prepare la solución de trabajo: Diluya la solución "Stock" hasta que tome la coloración de oporto, té fuerte y ámbar, añadiendo etanol al 70%. No es importante la concentración exacta.

Solución C – Etanol ácido:

Añada 0,5 mL de ácido acético glacial a 100 mL de etanol al 90%.

Solución D – carbol xileno:

Derrita una cantidad suficiente de cristales de ácido carbólico (fenol) para producir 100 mL de líquido en un baño de agua y adicione a 300 mL de xileno o añada 100 gramos de cristales de fenol a 300 mL de xileno y disuelva por agitación.

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
2. Cuando utilice muestras fijadas con PVA, las láminas deben estar completamente secas. La aceleración del proceso de secado calentando puede alterar la estructura de algunos organismos.
3. Cuando utilice muestras fijadas con Schaudin, no debe dejar que las láminas se sequen en ningún momento hasta que se realice su montaje.
4. Si es necesario interrumpir el procedimiento de tinción, se puede almacenar las láminas por largos períodos de tiempo en el último baño de etanol antes de realizar la tinción (**Preparación de frotis Paso 3**).
5. El propósito del paso del alcohol yodado (**Tinción N 1**) es remover el cloruro mercurico del fijador de Schaudin y PVA. Muchos de los problemas que se tienen con el método tricromico son directamente atribuibles a la saturación de esta solución. Cámbiala frecuentemente.
6. El propósito del primer enjuague en alcohol después de decolorar es detener la decoloración. Debido a que ocurre contaminación del alcohol ácido, recambie esta solución con frecuencia.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

| | |
|-----------------|---|
| | Palabra de advertencia Atención Indicaciones de peligro H313 - Puede ser nocivo en contacto con la piel Consejos de prudencia - UE (§28, 1272/2008) P262 - Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa P302 + P352 - EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes |
| Trichrome Stain | |

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

La vida de anaquel de los Para-Pak Trichrome Stain se indica en la etiqueta del empaque exterior. Mantenga a 15-30 C. Se debe evitar el calor y el frío excesivos.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA**Preparación de frotis:**

Para la preparación de frotis de materia fecal preservada con alcohol polivinílico (PVA) o formalina acetato de sodio (SAF), por favor dirójase al prospecto adecuado de Meridian Bioscience proporcionado con el kit de recogida o fijador. Un prospecto complementario podrá proveerse si así se lo solicitará.

Con muestras frescas proceda de la siguiente manera:

1. Prepare un frotis delgado de materia fecal en una lámina limpia. Se puede emulsificar la muestra con una gota de solución salina, si así fuera necesario. De otro modo, puede prepararse un frotis a partir de materia fecal preservada con PVA y dejarse secar hasta el día siguiente. En tal caso, proceda directamente al Paso 1 de la sección **Tinción**.
2. Mientras el frotis todavía esté mojado, coloque la lámina inmediatamente en un frasco para tinción y que contenga el fijador de Schaudin (solución A descrita a continuación) durante 5 minutos a una temperatura de 50 C o durante una hora a temperatura ambiente.
3. Con la excepción de que el yodo puede omitirse en la primera solución de alcohol en aquellas láminas preparadas con fijadores que no contienen cloruro mercurico (como por ejemplo SAF), todas las muestras pueden procesarse en forma idéntica.

Tinción:

1. Alcohol yodado (solución B descrita a continuación)
(remítase a la nota 1)
2. Etanol al 70% (remítase a la nota 3)
3. Etanol al 70% (remítase a la nota 3)
4. Tinción tricromica Para-Pak
5. Etanol ácido (solución C a continuación)
Observe cuidadosamente. Cuando comienza la tinción a correr fuera del frotis, transfiera al siguiente baño inmediatamente. Usualmente dos inmersiones rápidas son suficientes.
6. Etanol al 95% (vea notas 2 y 4)
7. Etanol al 95% (vea nota 4)
8. Etanol al 95% (vea nota 4)
9. Etanol al 100% (absoluto) o Carbol xileno (solución D)
10. Xileno
(o hasta que se observe refracción en la interfaz frotis-xileno.)

10 minutos

3 a 5 minutos

3 a 5 minutos

6 a 8 minutos

5 a 10 segundos

sumergja 2 veces

5 minutos

5 minutos

3 minutos

3 minutos

11. Monte con cubreobjetos (laminilla) utilizando el medio de montaje de elección (por ejemplo: balsámico canadiense en xileno, "dapoxyl" (DPX), Permount, Crisalite o medio de montaje de bálsamo transparente).

Nota 1: Remítase a la sección Precauciones.

Nota 2: Remítase a la sección Precauciones.

Nota 3: "Alcohol Reactivo", disponible comercialmente como una mezcla de etanol al 95%, metanol al 5%, puede sustituirse si está diluido al 70% en agua.

Nota 4: "Alcohol Reactivo", disponible comercialmente como una mezcla de etanol al 95%, metanol al 5%, puede sustituirse sin dilución.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Tanto el material de trasfondo como los artefactos se teñirán de verde. Las bacterias y los eritrocitos usualmente se tiñen de rojo, mientras que los mohos, levaduras, etc. se tiñen usualmente de verde. El citoplasma y los quistes de *E. histolytica* se colorean de azul-verde y usualmente presentan un matiz púrpura claro. Los quistes de *E. coli* pueden verse un poco más púrpuras. Los cariosomas de los núcleos, los cuerpos cromátoides, la cromatina, y los huevos y larvas de helminto se observan de rojo a púrpura claro.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS POSIBLES

El método de tinción tricrómica de Wheatley es un procedimiento que no presenta ningún problema cuando se lo utiliza exactamente como se indica. Ocasionalmente, como con cualquier otro procedimiento, pueden surgir problemas, los cuales pueden dividirse en cuatro categorías:

1. Problemas relacionados con la fijación incompleta del frotis causada por no emulsificar completamente la muestra fecal con el fijador.
 - a. Formas anómalas que tienen verde claro.
 - b. Tinción insatisfactoria del citoplasma y o núcleo.
Asegúrese de mezclar muy bien la muestra en el fijador.
2. No se observa el frotis cuidadosamente mientras se decolora (**Tinción Paso N 5**):
 - a. Falta de contraste entre los organismos y el material de fondo (citoplasma y núcleo).
Saque la lámina del etanol ácido y proceda a realizar el enjuague en etanol tan pronto como el color comience a correr del frotis.
3. Saturación del alcohol yodado cuando utiliza fijadores que contienen cloruro mercuríco:
 - a. Oscurecimiento del frotis por la formación de cristales oscuros.
Prepare la solución de alcohol yodado exactamente como se indica y cámbiela con frecuencia.
4. Contaminación de las soluciones de tinción/decoloración entre frascos de tinción:
 - a. El frotis está demasiado verde o existe falta de contraste.
 - b. El frotis está "borroso".
La falta de contraste usualmente resulta por la contaminación del alcohol ácido durante los enjuagues con etanol, o porque no se observa la lámina durante la decoloración. Luego de su uso repetido, la solución de tinción puede "diluirse" debido a la existencia de contaminación con etanol al 70%.
Los frotis "borrosos" son causados por la deshidratación incompleta después de la tinción y decoloración. El Carbol xileno o etanol absoluto y xileno son agentes deshidratantes en este proceso.
Cambie todas las soluciones periódicamente para evitar problemas.

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

1. Un frotis positivo debe incluirse con la serie de láminas a teñir cada vez que las soluciones se cambien, y los resultados de este control deben registrarse.

Si los resultados esperados para el control no son observados, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.

REFERENCES

1. Belding DC, Textbook of clinical parasitology. New York; D. Appleton-Century Company: 1947.
2. Biological Stain Commission, Staining procedures. Baltimore; Williams and Wilkins: 1960
3. Gomori G, A rapid one step trichrome method. Am J Clin Pathol, 1950; 20:661-664.
4. Gurr E, Staining: practical and theoretical. Baltimore; Williams and Wilkins; 1962. p. 452-455.
5. U. S. Armed Forces Institute of Pathology, Laboratory manual of special staining technics. Washington (DC): 1953. p. 58-59.
6. Lillie RD, et. al. Ed. H. J. Conn's Biological stains. Baltimore; Williams and Wilkins; 1968. p. 76.
7. Markel AK, A comparison of three staining techniques for protozoan troponozites as applied to PVA-preserved fecal specimens. J Parasitol 1956; 42:47.
8. Masson P, Trichrome staining and their preliminary techniques. J Tech Meth 1929; 12:75-90.
9. Paik G and Morris T Suggs. Reagents, stains, and miscellaneous test procedures. Washington, DC: Chapter 96 in Manual of Clinical Microbiology, 2nd ed, A.S.M 1974.
10. Pollak OJ, 1944. A rapid trichrome stain. Arch. Path. Vol. 37:294.
11. Wheatley WB. A rapid staining procedure for intestinal amoeba and flagellates. Am J Clin Pathol 1951; 21:990-991.

SN10900

REV. 08/22

| | |
|---|--|
|  Manufactured By | <p>Meridian Bioscience, Inc. 3471 River Hills Drive Cincinnati, OHIO - 45244 USA www.meridianbioscience.com</p> <p>Contacts: Main Telephone (+1) 513.271.3700 Customer Service/Orders 800.543.1980 Technical Support Center 800.343.3858 Information Fax: 513.272.5432 Ordering Fax: 513.271.0124 E-mail: info@meridianbioscience.com</p> |
|---|--|

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product: Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simboloas, Zeichenerklärung)

| | | | |
|----------------|---|--|---|
| | Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis | CONTROL | Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle |
| LOT | Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / chargebezeichnung | CONTROL | Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle |
| IVD | In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnóstico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum | EC REP | Authorized representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft |
| | Meridian products carrying the European Conformity (CE) mark fulfill the requirements of Directive 98/79/EC or the Regulation 2017/746 on in-vitro diagnostic medical devices / I prodotti Meridian recanti il marchio di Conformità Europea (CE) soddisfano i requisiti della Direttiva 98/79/CE o del Regolamento 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Les produits Meridian portant la marque de Conformité européenne (CE) sont conformes aux exigences de la Directive 98/79/CE ou du règlement 2017/746 sur les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Los productos de Meridian que llevan la marca de conformidad europea (CE) cumplen los requisitos de la Directiva 98/79/CE o del Reglamento 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Produkte von Meridian mit der CE-Kennzeichnung erfüllen die Anforderungen der EU-Richtlinie 98/79/EG bzw. der Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika | SMP PREP DIL SPE | Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet |
| REF | Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer | | CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risques de danger / Precaución: Peligroso / WARNUNG: Risikogefahr |
| | Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten | BUF RXN | Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer |
| | Manufacturer / Fabbricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller | | For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Solo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung |
| | Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" test / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen | SOLN STOP | Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung |
| | Temperature limitaion / Limiti di temperatura / Limites de température / Límite de tempperatura / Temperaturbegrenzung | CONJ ENZ | Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugué enzymatique / Conjulado enzimático / enzymkonjugat |
| SN | Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer | CONTROL | Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest |
| TEST | Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / testgarät | REAG | Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien |
| | Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum | BUF WASH | Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer |
| BUF | Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer | | Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise |
| CONJ | Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjulado / Konjugat | DIL SPE | Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer |
| SUBS | Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat | BUF WASH 20X | Wash Buffer Concentration 20X / Soluzione dil lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat |
| Rx Only | Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig | DET REAG | Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Detection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz |
| | Do not use if package is damaged / Non utilizzare se la confezione è danneggiata / ne pas utiliser si le paquet est endommagé / No use si el paquete está dañado / Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist | TUBE | Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacío / Leeres Gefäß |
| | Single Use Only / Prodotto Monouso / A usage unique / Para Un Solo Uso / nur für die einmalige Anwendung | | |

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at 800-543-1980.