Trichrome Quick-Stain Set

관련제품

제품번호	제품명	구성
R40219	Trichrome Quick-Stain Set	Wheatley Trichrome Stain (1x250ml), Ethanol 95% (2x250ml), Acid Ethanol 90% (1x250ml), Xylene-S (2x250ml)

사용목적(Intended Use)

장내 원생동물(intestinal protozoa)을 식별하기 위한 Wheatley 트리크롬 염색법에 사용된다. 무수은(mercury-free) 수송체계에 사용할 수 있도록 설계되었다.

요약 및 설명(Summary and Explanation)

원생동물에 의한 장내 기생충 감염 진단은 분변검체내 trophozoites 및 cysts 의 확인으로 이루어진다. 보다 작은 원생동물은 direct wet mount 및 농축 방법으로 검출되지 않기 때문에 장내 원생동물의 동정은 영구 염색 도말 시험에 의존한다. 트리크롬 염색(trichrome stain)은 보존 샘플을 아주 자세하고 분명한 대조로 보여준다. 이 염색법은 조직 단면 및 세포 도말을 염색하기 위해 Gomori 에 의해 처음 개발되었다[1]. 1951 년 Wheatley 가 변형시켜 고정 및 탈수 단계를 추가하여 장내 amoebas 및 flagellates 를 위한 간단하고 빠른 염색법으로 발전시켰다[2].

성상

- Wheatley Trichrome Stain (1x250ml) : 반투명 플라스틱병에 담긴 검청색의 용액
- Ethanol 95% (2x250ml) : 반투명 플라스틱병에 담긴 투명한 용액
- Acid Ethanol 90% (1x250ml) : 반투명 플라스틱병에 담긴 투명한 용액
- Xylene-S (2x250ml) : 갈색반투명 유리병에 담긴 투명한 용액
- 드롭퍼 4 개

원리(Principle)

Chromotrope 2R 은 크로마틴(chromatin) 물질에 친화성을 가진다. 핵의 크로마틴, chromatoid bodies, karyosomes, parasite eggs, parasite larvae, bacteria, 그리고 ingested erythrocytes 는 적색 또는 보라색빛 적색으로 염색된다. Light green 및 fast green 염색시약은 preserved cysts, trophozoites, 그리고 세포 구성요소들을 청록색으로 염색시킨다. Trichrome Quick-Stain Set 은 원생동물 동정에 도움을 주도록 훌륭한 대조와 영상을 제공한다[3].

조성

Wheatley Trichorme Stain:

Phosphotungstic acid (CAS 51312-42-9)	7.0	g
Chromotrope 2R (CAS 4197-07-3)	6.0	g
Light Green SF (CAS 5141-20-8)	1.5	g
Fast Green FCF (CAS 2353-45-9)	1.5	g
Glacial Acetic Acid (CAS 64-19-7)	10.0	ml
Demineralized Water (CAS 7732-18-5)	1000.0	ml

Xylene-S :

D-Limonene (CAS 5989-27-5)

Butylated Hydroxyanisole (CAS 25013-16-5)

Ethanol 95% :

Ethanol 95%

Acid Ethanol 90% :

Ethanol 90% (CAS 64-17-5)	995.5	ml
Acetic Acid 0.5% (CAS 64-19-7)	4.5	ml

주의사항(Precautions)

- 체외진단용이며 적절히 훈련된 사람이 사용해야 한다.
- 사용 후에 시료, 용기, 배지를 적절히 멸균하여 미생물 위해의 위험에 대해 주의한다.
- 지시사항을 주의 깊게 읽고 따라야 한다.
- 추가적인 정보는 물질안전자료(MSDS)를 참고한다.
- Trichrome Stain : 주의! 눈, 피부, 호흡계 자극을 초래할 수 있다. 독성은 아직 완전히 조사되지 않음.
- Xylene-S: 경고! 가연성 액체 및 증기. 알러지 피부 반응 유발할 수 있다. 눈 및 피부 자극을 초래할 수 있다. 호흡계 자극을 초래할 수 있다. 해양 오염물질이다.
- Ethanol 95% : 위험! 독성! 가연성 액체 및 증기. 삼키면 치명적이거나 시력상실을 초래할 수 있다. 삼킴, 흡입, 피부를 통한 흡수는 유해하다. 증기는 유해하다. 눈, 피부, 호흡계 자극을 초래한다. 사람의 생식 및 유아에 유해를 초래한다. 중추신경계 우울증을 초래할 수 있다. 간, 신장, 심장에 손상을 줄 수 있다. 무독성으로 만들 수 없다.
- Acid Ethanol 90%: 위험! 독성! 가연성 액체 및 증기. 삼키면 치명적이거나 시력상실을 초래할 수 있다. 삼킴, 흡입, 피부를 통한 흡수는 유해하다. 증기는 유해하다. 눈, 피부, 호흡계 자극을 초래한다. 사람의 생식 및 유아에 유해를 초래한다. 중추신경계 우울증을 초래할 수 있다. 간, 신장, 심장에 손상을 줄 수 있다. 폭발성 과산화물을 형성할 수 있다. 중간정도의 피부 자극을 초래한다. 무독성으로 만들 수 없다.

보관(Storage)

실온에서 원래 용기에 보관

제품 변질(Product Deterioration)

(1)색상이 변했거나, (2) 유효기간이 초과했거나, (3) 기타 변질의 신호가 있다면 사용하지 말 것.

시료의 수집, 보관, 수송(Specimen Collection, Storage, Transport)

권고되는 미생물실험 가이드라인에 따라 시료를 수집하고 다루어야

한다 [4-6].

제공되는 것 (Materials Supplied)

Wheatley Trichrome Stain (1x250ml)
Ethanol 95% (2x250ml)
Acid Ethanol 90% (1x250ml)
Xylene-S (2x250ml)

필요하지만 제공되지 않는 것 (Materials Required But Not Supplied)

(1) 검체보존, 고정, 수집 용기, (2) 접종 막대 또는 스왑, (3) 일회용 유리 또는 플라스틱 피펫, (4) 배양기, 슬라이드 가온기, (5) 흡수 종이, 종이 타올, (6) Coplin jar, 염색랙, 포셉, (7) 유리 현미경 슬라이드, 커버슬립, 마운팅 매체, (8) 보정된 ocular micrometer 가 달린 현미경, 검경 오일

방법(Procedure)[7]

모든 분변 검체는 잠재적 감염원으로 인식하고 그에 따라 취급하도록 한다 [5].

1. 도말 준비
   a. PVA 에 보존된 분변 검체를 최소 30 분간 고정한다. 신선하게 받은 검체는 실험실에서 PVA 와 혼합(1 부분 분변 + 3 부분 고정물질)하고 30 분간 고정한다.
   b. 검체와 PVA 를 완전히 혼합한다. 종이 타올에 혼합물을 수량을 부어 과량의 고정물질을 흡수한다. 종이 타올에 고정물질이 3 분간 흡수되도록한다.
   c. 접종 막대, 피펫, 또는 브러쉬로 종이 타올에 있는 분변검체 일부를 취해서 2 개의 깨끗한 유리 슬라이드에 옮긴다. 슬라이드 가장자리까지 혼합물을 펴 바른다. 슬라이드에 바른 혼합물의 양은 충분히 얇게하여 도말 아래에 위치한 신문지를 읽을 수 있을 정도여야 한다.
2. 슬라이드를 35~37℃에서 1 시간 또는 실온에서 밤샘 건조시킨다. 또는 슬라이드 가온기로 60℃에서 열고정 시킬 수도 있다 (약 4 분 소요).
3. 염색방법 (copper sulfate 또는 zinc PVA 조성용; 수은이 포함된 PVA 와 함께 사용되지 않음)
   a. 슬라이드에 Wheatley Trichrome Stain 을 10 분간 적용한다.
   b. 슬라이드에 Acid Ethanol 90%를 1~3 초간 적용한다. 즉시 다음 단계로 이동한다. 슬라이드를 3 초 이상 이 용액에 접촉되지 않도록 한다.
   c. 슬라이드를 Ethanol 95%에 몇 차례 담근다.
   d. 슬라이드에 Ethanol 95%를 3 분간 적용한다. 이 과정을 1 회 더 수행한다.
   e. 슬라이드에 Xylene-S 를 5~10 분간 적용한다. 이 과정을 1 회 더 수행한다.
   f. 마운팅 미디엄을 도말에 바르고 No.1 두께의 커버슬립으로 덥는다.
   g. 도말을 실온에서 밤샘 건조시키거나 35~37℃에서 1 시간 건조시킨다.
   h. 현미경으로 관찰한다. 핵을 자세히 관찰하기 위해서는 대물렌즈에 검경오일을 사용한다. 최소 200~300 개 영역을 관찰한다.

결과

염색 특성은 사용된 고정물질에 따라 많이 다를 수 있다. 전형적인 염색반응은 다음과 같다:

1. Helminth ova 및 larvae 는 적색 또는 보라색으로 염색된다.
2. 배경 물질들은 녹색으로 염색된다.
3. 핵의 chromatin, chromatoid bodies, ingested erythrocytes, bacteria 는 적색 또는 보라빛 적색으로 염색된다.
4. Cytoplasm 은 창백한 보라색 엷은 색조를 띠는 청색빛 녹색으로 염색된다.
5. Macrophages, leukocytes, yeast cells 는 염색 반응이 다양하다.

품질관리(Quality Control)

본 제품의 모든 로트는 다음의 품질관리 미생물을 사용하여 시험되었고 품질 적합으로 판정되었다. 품질관리 미생물의 시험은 확립된 실험실 품질관리 절차에 따라 수행되어야한다. 비정상적인 품질관리 결과가 나타난다면 검체 결과를 보고하여서는 안된다.
영구 염색 시약의 새 로트 제품에 대해서, 그리고 최소한 1 주일에 1 회 양성 대조 슬라이드를 테스트 해보길 권장한다 [5,6]. 양성 검체가 없다면, leukocytes 나 epithelial cells 를 넣은 분변 도말을 사용하는 것도 가능하다.

제한점 (Limitations)

1. 적절한 검체 수집 및 고정 방법에 결과가 크게 의존된다. 부적절하게 고정된 검체는 원생동물이 염색이 되지 않거나 강한 적색을 보일 수 있다 [6,8].
2. 부적절하게 건조된 도말/슬라이드는 염색과정중에 벗겨지거나 떨어져 나갈 수 있다. 슬라이드를 염색전에 완전히 건조시켜야 한다 [6,7].
3. 검체는 물이나 소변으로 오염되지 않아야 한다. 물은 인체 기생충으로 오인될 수 있는 생물이 있을 수 있고 소변은 운동성 생물을 파괴할 수도 있다 [7].
4. 무기 오일 같은 유분이 있는 물질은 굴절성 방울을 생성시켜 관찰을 어렵게 할 수 있다.
5. *Entamoeba coli* cysts 는 고정시키기 어려워 염색된 슬라이드상에서 동정하기 어려울 수 있다. 이러한 이유로 품질관리 기준을 충족시키는 고정물질을 확보할 필요가 있다. 보다 긴 고정시간(60 분)을 적용하면 더 좋은 형태를 얻을 수도 있다 [7].
6. Acid Ethanol 90%에서 장시간(3 초 이상) 탈색은 세포 구조의 구별을 어렵게 만든다 [6-8].
7. 주기적으로, Trichrome Stain 의 염색 강도는 뚜껑을 열고 이전 염색 jar 로부터 넘어온 Ethanol 70%를 증발시켜서 원상회복할 수 있다.
8. Trichrome stain 은 helminth eggs 또는 larvae 를 염색하는데 권장되지 않지만, 만일 검체에 존재한다면 적색~보라색으로 염색되어 식별은 가능하다.
9. *Cryptosporidium parvum* 은 trichrome 염색된 도말에서 보일

수도 있고 그렇지 않을 수도 있다(항산성 염색이 권장된다).[8]

10. Helminth eggs 및 larvae, *Balantidium coli* trophozoites 및 cysts, *Entamoeba coli* cysts, 그리고 *Isospora belli* oocytes 는 wet preparations 에서 잘 보인다.
11. 용액이 사용되는 각 단계간에 슬라이드를 잘 비우도록 한다. 흡수 종이에 2 초 정도 슬라이드의 끝부분을 접촉시켜 과량의 액체를 제거한 후에 다음 단계를 진행하도록 한다[8].
12. 분변 검체는 검사전에 배양하거나 얼리지 않도록 한다.[3]
13. 염색 jar 에서 다른 염색 jar 로 용액이 이동될 수 있으며, 이것은 뿌옇고 너무 녹색인 도말을 초래하거나 대조를 약하게 할 수도 있다. 이러한 염색약 이동으로 인한 문제를 줄이기 위해 주기적으로 모든 염색 용액을 교환해 준다.[6,7]

참고문헌(Bibliography)

1. Gomori, G. 1950. Am. J. Clin. Pathol. 20:661-664.
2. Wheatley, W.B. 1951. Am. J. Clin. Pathol. 21:990-991.
3. Melvin, D. and M. Brooke. 1982. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. U.S. Dept. of H.H.S. and CDC, Atlanta, GA.
4. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier, St. Louis, MO.
5. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M.A. Pfaller. 2007. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. ASM Press, Washington, D.C.
6. Isenberg, H.D. 2004. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2005. Procedures for the Recovery and Identification of Parasites from the Intestinal Tract; Approved Guideline, 2nd ed. M28-A2. CLSI, Wayne, PA.
8. Garcia, L.S. 2001. Diagnostic Medical Parasitology. 4th ed. ASM Press, Washington, D.C.

한글설명서 : 제개정 0 (2019.07.19.)
영문설명서 : IFU40219, Revised February 4, 2010