INSO
10222
1st. Revision
2016

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۱۰۲۲۲
تجدید نظر اول
۱۳۹۴

وسایل پزشکی تشخیص آزمایشگاهی ـ اطلاعات تهیه شده توسط سازنده همراه معرف‌های تشخیص آزمایشگاهی برای رنگ‌آمیزی در زیست‌شناختی

In vitro diagnostic medical devices– Information supplied by the manufacturer with in vitro diagnostic reagents for staining in biology

ICS: 11.040.55; 11.100.10

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج ، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸- ۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.org.ir

وبگاه: http://www.isiri.org

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.1294 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.org.ir

Website: http://www.isiri.org

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)[1]، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4- Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«وسایل تشخیص آزمایشگاهی ـ اطلاعات تهیه شده توسط سازنده همراه معرف های تشخیص آزمایشگاهی برای رنگ آمیزی در زیست شناختی»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
کلانی، مهدی (دکترای ایمنی شناسی)	مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
دبیر:	
کلائی، زینت (لیسانس بهداشت)	اداره کل استاندارد فارس
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
پور خسرو، آذر (فوق لیسانس شیمی)	بخش فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
زیبائی، محمد (دکترای ایمونوپارازیتولوژی)	هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی البرز
طیار، سحر (فوق لیسانس تغذیه)	اداره کل استاندارد فارس
کیانی فرد، مینا (فوق لیسانس زیست شناسی)	دانشکده علوم دانشگاه شیراز
محسنی، پروانه (فوق لیسانس تغذیه)	دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز
مولائی، سیده محبوبه (فوق لیسانس شیمی)	بخش بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
مصلایی، مهرداد (فوق لیسانس شیمی)	اداره کل استاندارد فارس

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

پیش‌گفتار و

۱ هدف و دامنه کاربرد ۱

۲ مراجع الزامی ۱

۳ اصطلاحات و تعاریف ۲

۴ الزامات اطلاعات تهیه شده توسط سازنده ۵

پیوست الف (اطلاعاتی) مثال‌هایی از اطلاعات تهیه شده توسط سازندگان معرف‌های معمول در روش رنگ‌آمیزی زیست شناختی ۱۰

کتاب‌نامه ۲۰

پیش‌گفتار

استاندارد «وسایل پزشکی تشخیص آزمایشگاهی- اطلاعات تهیه شده توسط سازنده همراه معرف‌های تشخیص آزمایشگاهی برای رنگ‌آمیزی در زیست‌شناختی» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده است، در پانصد و هفتاد و یکمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد مهندسی پزشکی مورخ ۱۳۹۴/۱۲/۱۳ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون‌های مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۲۲۲: سال ۱۳۸۶ می شود.

منبع و مأخذی که برای تهیه و تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

ISO 19001: 2013, In vitro diagnostic medical devices–Information supplied by the manufacturer with in vitro diagnostic reagents for staining in biology

وسایل پزشکی تشخیص آزمایشگاهی- اطلاعات تهیه شده توسط سازنده، همراه معرف‌های تشخیص آزمایشگاهی برای رنگ‌آمیزی در زیست‌شناختی

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین الزامات برای اطلاعاتی است که باید توسط سازنده معرف‌های رنگ آمیزی زیست‌شناختی تهیه و با آنها عرضه شود. این استاندارد برای تولیدکنندگان، عرضه‌کنندگان و فروشندگان رنگ‌ها[1]، محلول‌های رنگی[2] و معرف‌های رنگ‌زا[3] و سایر معرف‌های مورد استفاده برای رنگ‌آمیزی بافت‌شناسی، سلول‌شناسی شامل باکتری‌شناسی، خون‌شناسی، شیمی‌بافتی[4]، آزمایشگاه بالینی شامل باکتری‌شناسی تحقیقاتی و معمول کاربرد دارد.

الزاماتی که در این استاندارد برای اطلاعات عرضه شده توسط سازنده تعیین شده است، یک پیش نیاز برای دستیابی به نتایج قابل مقایسه[5] و تجدیدپذیر[6] در تمام حوزه‌های رنگ‌آمیزی زیست‌شناختی می‌باشد.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین‌ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره۱_۹۸۱۹:کمیت‌ها و یکاها- قسمت۱- اصول کلی

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۹-۹۸۱۹ : کمیت‌ها و یکاها- قسمت۹- شیمی فیزیک و فیزیک مولکولی

۲-۳ استاندارد ملی ایران شماره۱-۱۴۳۸۵: وسایل تشخیص طبی برون تنی- اطلاعات فراهم شده توسط سازنده (نشانه‌گذاری) – قسمت۱: اصطلاحات، تعاریف و الزامات کلی

---

1 - Dyes
2 - Stains
3 - Chromogenic
4 - Histochemistry
5 - Comparable
6 - Reproducible

۲-۴ استانـــدارد ملی ایران شماره۲-۱۴۳۸۵: وسایل تشخیص طبی برون تنی- اطلاعات فراهم شده توسـط سازنده (نشانه گذاری) – قسمت۲: شناساگرهای تشخیص برون‌تنی برای مصارف حرفه‌ای

۳ اصطلاحات و تعاریف

دراین استاندارد اصطلاحات و تعاریف زیر به‌کار می‌رود:

۳-۱

پادتن

antibody

ایمنوگلوبولین اختصاصی که به وسیله لنفوسیت‌هایB که پس از قرارگـرفتن درمعـرض یـک مـاده ایمنـی‌زا تولید شده و قادر است به آن متصل شود.

یادآوری- مولکول یک ماده ایمنی‌زا، دارای یک یا چند قسمت با ساختارهای شیمیایی مشخص (شاخص‌های پادگنی[1]) مـی باشد.

۳-۲

معرف بلاکه کننده

blocking reagent

ماده‌ای که به منظور کاهش اتصال غیر اختصاصی رنگ مورد نظر یا آنتی‌بادی مورد نظر قبل از رنـگ‌آمیـزی به‌کار می‌رود.

۳-۳

معرف رنگ‌زا

chromogenic reagent

معرفی که با گروه‌های شیمیایی معین موجود یا ایجاد شده در یاخته‌ها و بافـت‌هـا واکـنش داده و در همـان محل واکنش، ترکیب رنگی تشکیل می‌دهد.

مثال- نمک دیازونیوم، معرف شیف

1 - Epitope

۴-۳

رنگدانه

dye

ترکیب آلی رنگی که هنگام حل شدن در یک حلال مناسب، می‌تواند به یک ماده رنگ بدهد.

۵-۳

رنگ فلورسانس

fluorochrome

معرفی که وقتی در معرض نور برانگیخته با طول موج کوتاه‌تر قرار می‌گیرد، نور مرئی ساطع می‌کند.

یادآوری- انواع مختلف مواد فلورسنتی که در رنگ آمیزی زیست شناختی به کار گرفته می‌شود برای اینکه نور فلورسانس در نمونه ایجاد کند.

۶-۳

معرف تشخیص آزمایشگاهی

in vitro diagnostic reagent

ترکیب شیمیایی، زیستی، ایمنولوژیکی و یا محلولی که توسط سازنده برای کاربرد در وسایل پزشکی تشخیص آزمایشگاهی در نظر گرفته می‌شود.

[به استاندارد ملی ایران شماره ۱- ۱۴۳۸۵ رجوع کنید.]

۷-۳

اطلاعات تهیه شده توسط سازنده

برچسب‌گذاری

labelling

هر اطلاعات چاپی، نوشتاری یا ترسیمی درج شده:

- بر روی وسایل پزشکی تشخیصی یا جعبه‌ها و یا هر نوع بسته‌بندی یا

- اطلاعاتی که برای نحوه کار با وسایل پزشکی تهیه شده،

که این اطلاعات مربوط به معرفی، توصیف تکنیک و کاربرد وسایل می‌باشد.

مثال- برچسب‌ها و دستورالعمل استفاده

یادآوری-کاتالوگ‌ها و اطلاعات مربوط به قیمت به عنوان برچسب‌های وسایل پزشکی محسوب نمی‌شوند.

[به استاندارد ملی ایران شماره ۱- ۱۴۳۸۵ رجوع کنید.]

۳-۸

برچسب

label

هر نوع اطلاعات چاپی، نوشتاری یا ترسیمی که بر روی وسایل پزشکی یا جعبه‌ها درج شده است.

یادآوری- برچسب به طور دائمی بر روی یک وسیله تشخیص آزمایشگاهی به عنوان مشخصه آن دستگاه نصب می‌شود.

۳-۹

لکتین

lectin

پروتئین از منشا غیر ایمونوژنیک دارای دو یا چند محل اتصال که دنباله‌های ساکاریدی خاص را تشخیص داده و به آن می‌چسبد.

۳-۱۰

پادتن‌های تک دودمانی

monoclonal antibody

پادتن‌هایی با قابلیت واکنش اختصاصی با یک شاخص پادگنی ازیک ماده ایمنی‌زای معین را گویند.

۳-۱۱

پادتن‌های چند دودمانی

polyclonal antibody

مخلوطی از پادتن‌ها که بر ضد یک ماده ایمنی‌زای اختصاصی ترشح می‌شود و هر کدام توانایی شناسایی یک شاخص پادگنی متفاوت را دارد.

۳-۱۲

رنگ‌آمیزی

staining

رنگ دهی به یک ماده از طریق واکنش با یک محلول رنگی یا معرف رنگ‌زا می‌باشد.

۳-۱۳

رنگ

stain

محلول یک یا چند رنگ که در غلظت‌های معین و در یک حلال معین برای رنگ‌آمیزی به کار می‌رود.

یادآوری- رنگی که به وسیله حل شدن مستقیم رنگ در حلال یا بوسیله رقیق شدن یک محلول استاک[1] با عوامل مناسب تهیه می‌شود.

۳-۱۴

محلول رنگی استاک

stock solution of stain

محلول معین پایدار از یک یا چند رنگ در غلظت بالاتر از آنچه که برای رنگ‌آمیزی استفاده می‌شود.

یادآوری- پایداری رنگ، به ویژگی‌های ثابت رنگ، حتی در حضور رنگ‌های دیگر اشاره دارد.

۳-۱۵

کاوشگر اسید نوکلئیک

nucleic acid probe

اولیگونوکلئوتید یا پلی نوکلئوئید تک رشته‌ای یا دو رشته‌ای که مکمل توالی ویژه از نوکلئوتیدها در نوکلئیک اسید است.

۴ الزامات اطلاعات تهیه شده توسط سازنده

۴-۱ الزامات عمومی

۴-۱-۱ ارتباط تامین‌کنندگان

وقتی سازنده از مواد تهیه شده توسط تولیدکننده استفاده می‌کند، سازنده باید برای جلب اطمینان، به تولیدکننده اجازه بازدید از سیستم‌های مدیریت کیفیت توصیف شده در استانداردهای ISIRI/ISO 9001 و ISIRI/ISO 13485 را بدهد.

1 - Stock

۴-۱-۲ هشدار و احتیاط

سازنده معرف‌های مورد استفاده در رنگ‌آمیزی زیست‌شناختی، باید اطلاعاتی در مورد هشدارها و مراقبت‌ها با توجه به استانداردهای ملی شماره ۱-۱۴۳۸۵و ۲-۱۴۳۸۵ ارائه کند.

۴-۱-۳ قالب اطلاعات تهیه شده توسط سازنده

قالب اطلاعات تهیه شده توسط سازنده، همراه معرف‌ها برای رنگ‌آمیزی زیست‌شناختی، باید با استانداردهای ملی شماره‌های ۱-۹۸۱۹ و ۹-۹۸۱۹ مطابقت داشته باشد همچنین در موارد مناسب، باید الزامات بندهای ۴-۱-۴ ، ۵-۱-۴ و ۶-۱-۴ برای معرف‌های گوناگون مورد استفاده برای رنگ آمیزی زیست شناختی نیز آورده شود.

۴-۱-۴ اطلاعات تهیه‌شده توسط سازنده، همراه معرف‌های مورد استفاده برای رنگ‌آمیزی زیست‌شناختی

اطلاعات تهیه شده توسط سازنده، همراه معرف‌های مورد استفاده برای رنگ‌آمیزی زیست‌شناختی، باید با استانداردهای ملی شماره‌های ۱-۹۸۱۹ و ۹-۹۸۱۹ مطابقت داشته باشد. همچنین باید مطابق استانداردهای ملی شماره ۱-۱۴۳۸۵و ۲-۱۴۳۸۵ به توضیحات احتیاطی توجه خاص شود. همچنین در موارد مناسب باید الزامات بندهای ۲-۱-۴ ، ۳-۱-۴ و ۴-۱-۴ برای معرف‌های گوناگون مورد استفاده برای رنگ آمیزی زیست شناختی برآورده شود.

۴-۱-۵ نام محصول

نام محصول باید "در موارد مناسب" شامل شماره ثبت CAS [1][۷] و نام و شماره شاخص رنگ[2] [۲۳] باشد.

یادآوری۱ – شماره‌های ثبت CAS، رمزهای عددی منحصر به فردی هستند که به مواد شیمیایی دسته‌بندی شده در چکیده نامه شیمیایی[3] اختصاص یافته است.

یادآوری۲– شاخص رنگ یک شماره ۵ رقمی است که شماره CI و نام اختصاصی ایجاد شده را برای بیشتر رنگ‌ها ارائه می‌دهد.

۴-۱-۶ مشخصه فرآورده

توصیف معرف باید شامل داده‌های فیزیک و شیمیایی مناسب از طریق برگه‌های اطلاعاتی مربوط برای هر بهر[4] باشد. داده‌ها باید شامل حداقل اطلاعات زیر باشد:

الف– فرمول مولکولی حاوی جفت یون‌های واکنش‌دهنده؛

---

1 - Chemical Abstracts Service (CAS)
2 - Colour Index
3 - Chemical Abstracts
4 - Batch

ب- جرم مولی(g/mol)که به وضوح با ذکر حضور و عدم حضور جفت یون‌های واکنش‌دهنده بیان شود؛

پ- حدود مجاز مواد مداخله‌گر؛

ت- نگهداری و ذخیره؛

برای ترکیبات آلی رنگ شده، داده‌ها همچنین باید شامل:

ث- جذب مولی (مقدار درصد خلوص رنگ (نه مقدار کل رنگ) را می‌توان جایگزین جذب مولکولی کرد)؛

ج- طول موج یا عدد موج در ماکزیمم جذب؛

چ- اطلاعات کروماتوگرافی لایه نازک[1]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[2] یا کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا[3].

۴-۱-۷ ارائه راهنمایی جهت استفاده

پیشنهادات کاربردی باید شامل راهنمایی‌های لازم برای رنگ‌آمیزی زیست‌شناختی باشد.

این اطلاعات باید شامل:

الف- نوع (انواع) ماده زیست شناختی، جابه‌جایی و طرز عمل قبل از رنگ‌آمیزی باشد.

یادآوری ۱- اطلاعات در مورد انواع مواد زیست‌شناختی، جابه‌جایی و طرز عمل آنها در مرجع[۱۵].کتابنامه وجود دارد.

مثال- آیا نمونه‌های بافت یا یاخته یا هر دو می‌تواند استفاده شود؛ آیا مواد منجمد شده یا مواد تثبیت شده به‌طریقه شیمیایی یا هر دو می‌تواند استفاده شود؛ آیا رویه مورد توافق برای آماده‌سازی بافت موجود است؛ کدام محیط آغشته کننده[4] می‌تواند استفاده شود.

یادآوری ۲- منبع [۱۵] روش‌هایی را برای استفاده در آزمون رنگ، مواد رنگ‌زا، رنگ‌های فلورسنت، پادتن‌ها و نشانگر نوکلئیک اسید که در رنگ آمیزی زیست شناختی استفاده می‌شود، ارائه می‌کند.

ب- جزئیات رویه مناسب توسط سازندگان برای آزمون واکنش رنگ، محلول رنگ، معرف رنگ‌زا، فلورسانس، پادتن، نشانگر اسید نوکلئیک یا لکتین که برای رنگ‌آمیزی زیست‌شناختی استفاده می‌شود.

پ- نتایج مورد انتظار در رنگ‌آمیزی با رویه پیشنهادی سازندگان مواد شیمیایی بیان شود؛

مثال- به الف-۲ و الف-۳ رجوع کنید.

---

1 - Thin Layer Chromatographic (TLC)
2 - High performance liquid Chromatographic (HPLC)
3 - High performance thin layer Chromatographic (HPTLC)
4- Embedding

ت- نکاتی در مورد کنترل مثبت و منفی بافت‌ها و تفسیر نتایج ارائه شود؛

ث- منابع مورد استفاده در نتایج به دست آمده با رویه پیشنهادی سازندگان، ارائه شود.

۴-۲ سایر الزامات برای انواع ویژه‌ای از معرف‌ها

۴-۲-۱ فلورسانس

فلورسانس‌های پیشنهاد شده برای رنگ‌آمیزی در زیست‌شناختی، صرف‌نظر از نوع کاربرد، باید شامل اطلاعات زیر باشد:

الف- میزان انتخابی بودن، برای مثال توصیفی از اهداف که با به کارگرفتن شرایط اختصاص داده شده اثبات می‌شود.

ب- طول موج‌های تحریک و انتشار

پ- برای فلورسانس‌های متصل شده با پادتن، نسبت فلورسانس به پروتئین (F/P)، برای اهداف کمی ضروری است. نسبت F/P به صورت جداگانه از طریق اندازه‌گیری غلظت‌های پروتئین و فلورسانس متصل شده محاسبه شده و به صورت کسر بیان می‌شود.

۴-۲-۲ نمک‌های فلز

در رویه‌های مطرح شده چنانچه استفاده از ترکیبات فلزی پیشنهاد شود اطلاعات زیر باید اضافه شود :

الف- نام سیستماتیک؛

ب- درصد خلوص.

۴-۲-۳ پادتن‌ها

پادتن‌های پیشنهادی برای رنگ‌آمیزی در زیست‌شناختی باید شامل اطلاعات زیر باشند،

الف- پادگن[1] (ماده ایمنی‌زا) که باعث ایجاد پادتن شده است، شرح داده شود. اگر پادگن بر اساس دسته‌ای از سیستم‌های تمایزی تعریف شده باشد، یک شماره CD[2] ارائه شود. در صورت امکان، نوع مولکول یا این که کدام قسمت آن برای تولید پادتن شناسایی شده و در کدام یاخته یا بافت پیدا شده، همچنین چگونگی واکنش متقاطع آن با سایر شاخص‌های پادگنی مشخص شود .

ب- برای پادتن‌های تک دودمانی[3] گونه‌های حیوانی میزبان، دودمان[4]، روش تولید (مایع رویی کشت بافت یا مایع صفاقی موش)، زیر گروه ایمنوگلوبولین و مشخصات زنجیره سبک؛ ذکر شود.

---

1 - Antigen
2 - Cluster of Differentiation
3 -Monoclonal
4 - Clone

یادآوری- منبع[۸] اطلاعات در مورد روش‌های جدید ایمنوهیستوشیمی ارائه می‌دهد.

پ- برای پادتن‌های چند دودمانی، حیوان میزبان و اینکه تمام سرم یا قسمت گاماگلبولین آن مورد استفاده قرار گرفته است؛ مشخص شود.

ت- توصیف حالت (محلول یا پودر خشک شده)، مقدار پروتئین کل و پادتن ویژه و اگر به صورت محلول است ماهیت و غلظت ماده رقیق کننده به کار برده شده؛ را شامل شود.

ث- در صورت لزوم شرحی از هر مولکول اتصال یافته یا مولکول‌های وسعت دهنده[1] اضافه شده به پادتن ارائه شود.

ج- بیان خلوص، تکنیک‌های تصفیه و رویه‌های کشف ناخالصی را شامل شود.

مثال- روش وسترن بلات[2]، ایمنوهیستوشیمی

چ- مراجع انتشاریافته مناسب که مربوط به کاربرد پادتن است ارائه شود.

یادآوری- مثال‌هایی از روش‌هایی که توسط سازنده‌ها یا آخرین کاربر به کار رفته، ممکن است در CLSI راهنمای I/LA28 یافت شود. [۸]

۴-۲-۴ کاوشگرهای اسید نوکلئیک

کاوشگرهای اسید نوکلئیک که برای رنگ‌آمیزی در زیست‌شناختی توصیه شده‌اند باید شامل اطلاعات زیر باشند:

الف- توالی بازهای آلی و اینکه نشانگرها تک رشته‌ای یا دو رشته‌ای هستند؛

ب- جرم مولکولی نشانگر یا تعداد بازهای آلی در صورت کاربردی بودن نسبت عددی (درصد) زوج بازهای گوانین و سیتوزین؛

پ- نشانه استفاده شده (ایزوتوپ رادیواکتیو یا مولکول غیر رادیواکتیو)، برای نشانه‌های غیر رادیواکتیو نواحی اتصال نشانگر(۵ انتهایی و یا ۳ انتهایی)، قسمتی از ماده در درصدی از نشانگرهای نشان‌دار شده مشخص شود؛

ت- ژن هدف (توالی دزاکسی ریبونوکلئیک اسید(DNA) یا ریبونوکلئیک اسید (RNA)) مشخص شود؛

ث- توصیف حالت (پودر خشک شده یا محلول) و جرم بر حسب پیکوگرم pg یا مقدار ماده برحسب پیکومول pmol یا غلظت جرمی برحسب pg/ml یا مقدار غلظت ماده برحسب pmol/ml و اگر به حالت محلول است ماهیت و غلظت حلال به کاربرده شده؛

---

1 - Extender
2 - Western blotting

ج- بیان خلوص، تکنیک‌های تصفیه و روش‌های کشف ناخالصی، به طـور مثـال کرومـاتوگرافی مـایع بـا کارایی بالا؛

مثال- HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا)

چ- ذکر منابع مناسب از نشریات بیان‌کننده منبع توالی DNA ؛[۱۸] ، [۲۲]

ح- اطلاعات انحصاری و اطلاعات کاربردی نشانگرهای اسید نوکلئیک.

پیوست الف

(اطلاعاتی)

مثال‌هایی از اطلاعات تهیه شده توسط سازندگان معرف‌های معمول در روش رنگ‌آمیزی زیست‌شناختی

الف-۱ کلیات

اطلاعات زیر، مثال‌هایی از روش‌های رنگ‌آمیزی زیست‌شناختی هستند و نباید به عنوان تنها روش اجرایی مدنظر قرار گیرند. این روش‌ها توسط سازندگان برای آزمون واکنش رنگ‌ها استفاده می‌شود و همچنین اطلاعاتی درخصوص چگونگی استفاده از این استاندارد ملی توسط سازندگان ارائه می‌دهد.

الف-۲ متیل سبز - رنگ پیرونین Y - مثال ۱

اطلاعات ارائه شده توسط سازنده برای رنگ‌هایی که در این روش جهت رنگ‌آمیزی‌های بیولوژیکی استفاده می‌شود (هرکدام از متیل سبز یا اتیل سبز و پیرونین Y) در زیر آمده است:

الف-۲-۱ رنگ‌های استفاده شده در روش متیل سبز - پیرونین Y

الف-۲-۱-۱ رنگ متیل سبز

احتیاط-R36/37/38 : محرک چشم، سیستم تنفسی و پوست است؛ S26: در صورت تماس با چشم سریعاً شستشو شود؛ S36: لباس ایمنی مناسب پوشیده شود.

الف-۲-۱-۱-۱ مشخصه فرآورده (نام)

میتل سبز (مترادف‌ها : سبز دوگانه SF و سبز روشن؛

شماره ثبت CAS :۰- ۱۶-۲۲۳۸۳؛

شماره و نام شاخص رنگ : آبی بازی ۲۰٫۴۲۵۸۵

الف- ۲-۱-۱-۲ ترکیبات فرآورده

فرمول مولکولی شامل یون‌های مزدوج: $C_{26}H_{33}N_3^{2+}\ 2\ BF_4^-$

جرم مولی با یون‌های مزدوج، ۵۶۱٫۱۷ g/mol و بدون یون‌های مزدوج، ۳۸۷٫۵۶ g/mol؛

نسبت جرمی کاتیون متیل گرین: ٪ ۸۵، که به‌وسیله طیف سنجی جذبی اندازه‌گیری شده است؛

محدوده مجاز مواد تداخل کننده به صورت نسبت‌های جرمی ارائه شده است:

- آب: کمتر از ٪ ۱؛
- نمک‌های معدنی: کمتر از ٪ ۰٫۱؛
- پاک‌کننده‌ها: نباید موجود باشد؛
- ناخالصی‌های رنگی شامل کریستال ویولت: غیرقابل شناسایی به‌وسیله کروماتوگرافی لایه نازک؛
- ترکیبات بی‌اثر: ٪ ۱۴ نشاسته محلول.

الف- ۲-۱-۱-۳ حمل و نقل و نگهداری

برای پایداری باید در ظرف شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ کاملا در بسته در دمای اتاق (۱۸°C تا ۲۸ °C) نگهداری شود.

حداکثر طول موج جذب محلول رنگ: ۶۳۳ nm.

کروماتوگرافی لایه نازک: فقط یک ترکیب اصلی که متیل سبز است وجود دارد.

الف-۲-۱-۲ رنگ اتیل سبز

احتیاط-R36/37/38 : محرک چشم، سیستم تنفسی و پوست است؛ S26: در صورت تماس با چشم سریعاً شستشو شود ؛ S36: لباس ایمنی مناسب پوشیده شود.

الف-۲-۱-۲-۱ مشخصه فرآورده (نام)

اتیل سبز (مترادف: متیل سبز).

شماره ثبت CAS : ۶-۰۳- ۷۱۱۴ .

شماره و نام شاخص رنگ: نام شاخص رنگ وجود ندارد،۴۲۵۹۰.

الف-۲-۱-۲-۲ ترکیبات فرآورده

فرمول مولکولی شامل یون‌های مزدوج: $C_{27}H_{35}N_3^{2+}\,2BF_4^-$؛

جرم مولی با یون‌های مزدوج، ۵۷۵٫۱۹ g/mol و بدون یون‌های مزدوج، ۴۰۱٫۵۸ g/mol؛

نسبت جرمی کاتیون اتیل سبز: ٪۸۵، که به وسیله طیف‌سنجی جذبی اندازه‌گیری شده است؛

محدوده مجاز مواد تداخل کننده به صورت نسبت‌های جرمی:

- آب: کمتر از ٪ ۱؛

- نمک‌های معدنی: کمتر از ٪ ۰٫۱؛
- پاک‌کننده‌ها: وجود نداشته باشد؛
- ناخالصی‌های رنگی مانندکریستال ویولت: غیرقابل شناسایی به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک؛
- ترکیبات بی‌اثر: ٪ ۱۴ نشاسته محلول.

الف- ۲-۱-۲-۳ حمل و نقل و نگهداری

برای پایداری باید در ظرف شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ کاملا در بسته در دمای اتاق (۱۸°C تا ۲۸ °C) نگهداری شود.

حداکثر طول موج جذب محلول رنگ: ۶۳۳ nm.

کروماتوگرافی لایه نازک: فقط یک ترکیب اصلی که اتیل گرین است وجود دارد.

الف-۲-۱-۳ رنگ پیرونین Y

اخطار- R20/21/22: استنشاق، تماس با پوست و بلعیدن مضر می‌باشد.

الف-۲-۱-۳-۱ مشخصه فرآورده (نام)

پیرونین Y (مترادف‌ها: پیروناین Y، پیرونین G، پیروناین G)؛

شماره ثبت CAS: ۰-۳۲-۹۲؛

شماره و نام شاخص رنگ: نام شاخص رنگ وجود ندارد , ۴۵۰۰۵.

الف-۲-۱-۳-۲ ترکیبات فرآورده

فرمول مولکولی شامل یون‌های مزدوج: $C_{17}H_{19}N_2O^+Cl^-$؛

جرم مولی با یون‌های مزدوج، ۳۰۲٫۷۵ g/mol و بدون یون‌های مزدوج، ۲۶۷٫۳۰ g/mol؛

نسبت جرمی کاتیون پیرونین Y: ٪۸۰ که توسط طیف سنجی جذبی اندازه‌گیری شده است.

محدوده مجاز مواد تداخل کننده به صورت نسبت‌های جرمی:

- آب: کمتر از ٪ ۱؛
- نمک‌های معدنی: کمتر از ٪ ۰٫۱؛
- پاک‌کننده‌ها: وجود نداشته باشد؛
- ناخالصی‌های رنگی: غیر قابل شناسایی توسط کروماتوگرافی لایه نازک؛

- ترکیبات بی اثر: ٪ ۱۹ نشاسته محلول.

الف-۲-۱-۳-۳ حمل و نقل و نگهداری

برای پایداری باید در ظرف شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ کاملا در بسته در دمای اتاق (۱۸°C تا ۲۸ °C) نگهداری شود.

بیشینه طول موج جذب محلول رنگ: ۵۵۰ nm.

کروماتوگرافی لایه نازک: فقط یک ترکیب اصلی که پیرونین Y است وجود دارد .

الف-۲-۲ روش توصیه شده برای رنگ آمیزی با متیل سبز- پیرونین Y

این روش برای تشخیص RNA (ریبوزوم) و DNA (هسته) در سلول به کار می‌رود. این روش به ویژه بـرای شناسایی پلاسما سل‌ها[1] استفاده می‌شود.

الف-۲-۳ انواع مواد

رنگ متیل سبز- پیرونین Y برای رنگ‌آمیزی انواع بافت‌های تهیه شده به صورت تازه منجمد شده، برش‌های پلاستیکی یا پارافینی به کار می‌رود.

الف-۲-۴ کنترل، نگهداری و مراحل قبل از رنگ‌آمیزی

الف-۲-۴-۱ تثبیت کننده‌های پیشنهاد شده شامل

مایع کارنوی[2] (اتانول(با نسبت حجمی ٪ ۹۹) + کلروفرم + استیک‌اسید (با نسبت جرمی ٪ ۱۰۰) که به ترتیب با نسبت‌های ml (۶۰ +۳۰ +۱۰) مخلوط گردیده است) ؛ یا

فرمالدئید (نسبت جرمی ٪ ۳٫۶) که با بافر فسفات (pH= ۷٫۰) تهیه شـده اسـت. کـه پـس از آن آب‌زدایـی معمولی، شستشو، غوطه‌ور شدن در پارافین و نفوذ پارافین و روش‌های معمول تهیه برش‌های میکروتوم انجام می‌شود.

الف-۲-۵ روش رنگ‌آمیزی

الف-۲-۵-۱ آماده‌سازی محلول کاری[۱۵]، [۱۶]

الف- ۰٫۱۵ g رنگ خالص متیل سبز یا اتیل سبز (در مثال‌های فوق ۰٫۱۷۶ g با توجه به نسبت وزنی آن) را در ۹۰ ml آب مقطر گرم (۵۰°C) حل کنید. [۶] ،[۱۰]، [۱۴]

1 - Plasma cell
2 - Carnoy's

ب- ۰/۰۳g پرونین Y(که به صورت کاتیون رنگی محاسبه شده) را در ۱۰ ml بافر فتالات ۰/۱ مولار (pH =۴) حل کنید. [۹]، [۱۳]

پ- محلول را با محلول اتیل گرین یا متیل سبز مخلوط کنید.

ت- محلول ساخته شده اگر در ظرف شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ کاملا در بسته در دمای اتاق (۱۸°C تا ۲۸ °C) نگهداری شود به مدت یک هفته پایدار است.

الف-۲-۵-۲ روش رنگ‌آمیزی [۱۲] ،[۱۶]

الف- پارافین زدایی برش‌ها.

ب- آب پوشی[1] برش‌ها.

پ- رنگ‌آمیزی به مدت ۵ min در محلول رنگ در دمای اتاق (حدود ۲۲°C) در محلول کاری[2].

ت- دو مرتبه شستشو با آب مقطر هر بار ۲s تا ۳.

ج- خارج کردن آب اضافی.

ح- سه مرتبه قراردادن در محلول ۱- بوتانول

خ- انتقال دادن به‌طور مستقیم از ۱- بوتانول به یک رزین سنتزی آب گریز.

الف-۲-۶ نتایج مورد انتظار

نتایج مورد انتظار براساس روش رنگ‌آمیزی با رنگ متیل سبز– پیرونینY یا اتیل سبز – پیرونینY [۱۷]، [۲۱] به شرح ذیل می‌باشد:

- برای کروماتین هسته‌ای(DNA): سبز (تثبیت شده به روش کارنوی) یا آبی (تثبیت شده به روش فرمالدئید)؛

- برای هستک وسیتوپلاسم غنی از ریبوزوم (RNA): قرمز (تثبیت شده به‌روش کارنوی) یا (لیلاک) قرمز (تثبیت شده به‌روش فرمالدئید)؛

- برای ماده زمینه‌ای[3] غضروف وگرانول‌های ماست‌سل[4]: نارنجی؛

- برای ماهیچه، کلاژن و گلبول‌های قرمز : بی‌رنگ.

---

1 - Hydrate
2 - working solution
3 - Matrix
4 - Mast Cell

الف-۳ واکنش فلوگن- شیف[1] - مثال ۲

اطلاعات ارائه شده توسط سازنده رنگ برای تولید معرف‌های رنگ‌زا (پاراروزانیلین- معرف شیف) در این روش رنگ‌آمیزی زیست‌شناختی استفاده شده است.

الف-۳-۱ رنگ استفاده شده در واکنش فلوگن- شیف

الف-۳-۱-۱ رنگ پاراروزانیلین

احتیاط - R۴۰ : شواهد محدود از اثر سرطان‌زایی وجود دارد ؛ R22: از تنفس ذرات معلق خودداری شود؛
S ۳۶/۳۷ : پوشیدن دستکش و لباس ایمنی مناسب الزامی است.

الف-۳-۱-۱-۱ مشخصه محصول (نام)

پاراروزانیلین مترادف با روبین بازی[2]، پارافوشین، پارامگنتا، مگنتا صفر؛

شماره ثبت CAS: ۹-۶۱-۵۶۹؛

شماره و نام شاخص رنگ: قرمز بازی ۹٫۴۲۵۰۰.

الف-۳-۱-۱-۲ ترکیبات فرآورده

فرمول مولکولی شامل یون‌های مزدوج : $C_{19}H_{18}N_3^+CL^-$

جرم مولکولی با یون‌های مزدوج، ۳۲۳٫۷۳ g/mol، بدون یون‌های مزدوج، ۲۸۸٫۲۸ g/mol؛

نسبت جرمی کاتیون پاراروزانیلین: ٪۸۵ درصد که به‌وسیله طیف سنجی جذبی اندازه‌گیری شده است؛

محدوده مجاز مواد تداخل کننده به صورت نسبت‌های جرمی:

- آب: کمتر از ٪ ۱؛
- نمک‌های معدنی: کمتر از ٪ ۰٫۱؛
- پاک‌کننده‌ها: وجود نداشته باشد؛
- ناخالصی‌های رنگی: مقادیر ناچیز هومولوگ‌های متیله شده پاراروزانیلین در کروماتوگرافی لایه نازک ممکن است دیده شود اما اکریدین نباید وجود داشته باشد؛
- ترکیبات بی اثر: ٪ ۱۴ نشاسته محلول.

---

1 - Felugen- schiff
2 - Basic rubin

الف-۳-۱-۱-۳ حمل و نقل و نگهداری

برای پایداری باید در ظرف شیشه‌ای قهوه‌ای رنگ کاملا در بسته دردمای اتاق (۱۸°C تا ۲۸ °C) نگهداری شود.

حداکثر طول موج جذب محلول رنگ: ۵۴۲ nm.

کروماتوگرافی با لایه نازک: یک ترکیب اصلی شامل پاراروزانیلین و مقدار خیلی کم هومولوگ‌های متیله شده وجود دارد.

الف- ۳-۲ کاربرد پیشنهادی واکنش فلوگن-شیف

این روش برای شناسایی DNA در جسم سلولی به کار می‌رود.

الف-۳-۳ انواع مواد

واکنش فلوگن- شیف برای برش‌های پلاستیکی یا پارافینی انواع مختلف بافتی یامواد سیتولوژیکی (مانند گستره سلولی، اثر گذاشتن[1] بافت، کشت سلول، سلول‌های تک لایه) به کار می‌رود.

الف-۳-۴ کنترل، نگهداری و مراحل قبل از رنگ آمیزی

تثبیت کننده‌های پیشنهادی شامل:

- بافت شناسی: فرمالدئید (نسبت جرمی ٪ ۳٫۶) که با بافر فسفات (pH=۷) تهیه شده است؛
- سلول‌شناسی:
  - مواد تثبیت شده مرطوب: اتانول نسبت حجمی ٪ ۹۶؛
  - مواد خشک شده در مجاورت هوا:
  - فرمالدئید (نسبت جرمی ٪ ۳٫۶) تهیه شده در بافر فسفات؛
  - متانول + فرمالدئید (نسبت جرمی ٪ ۳۷)+ استیک اسید (نسبت جرمی ٪ ۱۰۰) که به ترتیب با نسبت حجمی ml (۸۵+۱۰+ ۵) مخلوط شده‌اند. موادی که با تثبیت کننده بایون[2] تثبیت شده است برای این واکنش مناسب نمی‌باشد.

1 - Imprint
1- Bouin's fixative

الف-۳-۵ روش رنگ‌آمیزی

الف-۳-۵-۱ معرف کاری استفاده شده در روش رنگ‌آمیزی

معرف پاراروزانیلین - شیف[۱۱]

الف- ۰٫۵ g کلرید پاراروزانیلین را در ۱۵ ml هیدروکلریک اسید ۱ مولار (mol/l) حل کنید.

ب- ۸۵ ml محلول آبی $K_2S_2O_5$ (نسبت جرمی ٪ ۰٫۵) را اضافه کنید.

ث- پس از گذشت ۲۴ h

ج- ۱۰۰ ml این محلول را با ۰٫۳ gزغال فعال مخلوط کرده و برای ۲ min تکان داده و سپس آن را صاف کنید.

د- محلول بی‌رنگ را دردمای بالای ۵ درجه سلسیوس نگهداری کنید. محلول حداقل به مدت ۱۲ ماه درظرف کاملا در بسته پایدار می‌ماند.

الف۳-۵-۱-۱ محلول شستشو

الف- ۰٫۵ g از $K_2S_2O_5$ را در ۸۵ ml آب مقطر حل کنید.

ب- ۱۵ ml از هیدروکلریک اسید ۱ مولار (mol/l) به آن اضافه کنید. محلول پس از تهیه برای ۱۲ h قابل استفاده می‌باشد.

الف-۳-۵-۲ روش رنگ آمیزی [۱۹]، [۲۰]

الف- برش‌های پارافینه شده را در زایلین[1] برای ۵ min پارافین زدایی کنید و بعد ۲ min آن را ابتدا در اتانول با نسبت حجمی ٪ ۹۹ و سپس در اتانول با نسبت حجمی ٪ ۵۰ شستشو دهید.

ب- برش‌های پلاستیکی را آب‌دهی کنید، قسمت‌های پارافینی را پارافین زدایی کنید و مواد سیتولوژیکی را برای ۲ min در آب مقطر شستشو دهید.

پ- مواد را در هیدروکلریدریک اسید ۵ مولار (mol/l) در دمای ۲۲°C برای ۳۰ min تا ۶۰ هیدرولیز کنید.(زمان هیدرولیز شدن بستگی به نوع ماده دارد).

ت- با آب مقطر برای ۲ min شستشو دهید.

ث- با معرف پاراروزانیلین - شیف برای ۱ h رنگ‌آمیزی کنید.

ج- سه مرتبه متوالی با محلول شستشو هربار۵ min شستشو دهید.

---

1 - Xylene

چ- ۲ مرتبه با آب مقطر هر بارmin ۵ شستشو دهید.

ح- در اتانول با نسبت حجمی ٪۵۰ سپس ٪۷۰ و در آخر ٪ ۹۹ هر بار ۳min آب‌زدایی کنید.

خ- ۲ مرتبه با زایلین، هر بار min ۵ شستشو دهید.

د- دررزین آب‌گریز سنتزی قرار دهید.

الف۳-۶ نتایج مورد انتظار

نتایج زیر برای واکنش فولگن - شیف [۱۹]،[۲۰]مورد انتظار است:

- هسته سلولی(DNA): قرمز.

کتاب‌نامه

[1] Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures (CLP Regulation), amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. Official journal of the European Union L353 of 31.12.2008, pp. 1-1355

[2] Directive 2008/112/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 amending Council Directives 76/768/EEC, 88/378/EEC, 1999/13/EC and Directives 2000/53/EC, 2002/96/EC and 2004/42/EC of the European Parliament and of the Council in order to adapt them to Regulation (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32008L0112:en:NOT

[3] Regulation (EC) No 1336/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 amending Regulation (EC) No 648/2004 in order to adapt it to Regulation (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0060:0061:en:PDF

[4] Commission Regulation (EC) No 790/2009 of 10 August 2009 amending, for the purposes of its adaptation to technical and scientific progress, Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0060:0061:en :PDF, pp. 1-439

[5] United Nations Economic and Social Council's Sub-Committee of Experts on the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UNSCEGHS) Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS). Third. United Nations, revised edition, 2009 http://live.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/English/00e_intro.pdf

[6] Andersen A.P., Jakobsen P., Lyon H., Høyer P.E. Purification of methyl green using polyamide. Histochem. J. 1986, 18 (8) pp. 461–462

[7] Chemical Abstracts Service (CAS) CAS Registry. www.cas.org/content/chemical-substances

[8] CLSI Quality assurance for design control and implementation of immunohistochemistry assays; Approved Guideline. 2nd ed. CLSI document I/LA 28-A2, Wayne, PA 19087 USA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011

[9] European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS). Subcommittee on Reference Materials for Tissue Stains (SRMTS) Dye standards, Part II.1: Pyronin Y (CI 45005). Histochem. J. 1992, 24 (4) pp. 220–223

[10] European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS). Subcommittee on Reference Materials for Tissue Stains (SRMTS) Dye standards, Part II.2: Methyl green (CI 42585) and ethyl green (CI 42590). Histochem. J. 1992, 24 (4) pp. 224–227

[11] European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS). Subcommittee on Reference Materials for Tissue Stains (SRMTS) Dye standards, Part II.5: Pararosaniline (CI42500). Histochem. J. 1992, 24 (4) pp. 233–235

[12] Høyer P.E., Lyon H., Jakobsen P., Andersen A.P. Standardized methyl green-pyronin Y procedures using pure dyes. Histochem. J. 1986, 18 (2-3) pp. 90–94

[13] Jakobsen P., Lyon H., Treppendahl S. Spectrophotometric characteristics and assay of pure pyronin Y. Histochemistry. 1984, 81 pp. 99–101
[14] Jakobsen P., Andersen A.P., Lyon H. Preparation and characterization of methyl green tetrafluoroborate. Histochemistry. 1984, 81 pp. 177–179
[15] Kiernan J.A. Histological and histochemical methods: Theory and practice. 4th ed., Scion Publishing Ltd. Banbury, Oxfordshire, UK. 2008
[16] Lyon H., De Leenheer A.P., Horobin R.W., Lambert W.E., Schulte E.K., Van Liedekerke B. et al. Standardization of reagents and methods used in cytological and histological practice with emphasis on dyes, stains and chromogenic reagents. Histochem. J. 1994, 26 (7) pp. 533–544
[17] Lyon H., & Prentø P. Methyl green-pyronin Y staining of nucleic acids: studies on the effects of staining time, dye composition and diffusion rates. Biotech. Histochem. 2003, 78 (1) pp. 27–33
[18] Petterson E., Lundeberg J., Ahmadin N. Generations of sequencing technologies. Genomics. 2009, 93 pp. 105–111
[19] Schulte E.K., & Wittekind D.H. Standardization of the Feulgen reaction: the influence of chromatin condensation on the kinetics of acid hydrolysis. Anal. Cell. Pathol. 1990, 2 (3) pp. 149–157
[20] Schulte E.K. Standardization of the Feulgen reaction for absorption DNA image cytometry: a review. Anal. Cell. Pathol. 1991, 3 (3) pp. 167–182
[21] Schulte E.K., Lyon H., Høyer P.E. Simultaneous quantification of DNA and RNA in tissue sections. A comparative analysis of the methyl green-pyronin technique with the gallocyanin chromalum and Feulgen procedures using image cytometry. Histochem. J. 1992, 24 (6) pp. 167–182
[22] Sengupta D., & Cookson B. A general approach for improving cycle sequencing that facilitates a robust one-step combined amplification and sequencing method. J. Mol. Diagn. 2010, 12 pp. 272–277
[23] Society of Dyers and Colourists and the American Association of Textile Chemists and Colorists, Colour Index International. 4th edition online http://www.colour-index.org/ 2011