

Time Needed for Rinsing the Decalcification Specimen by Tap Water

Mongkol Uiprasertkul, M.D.*
Soranart Muangsomboon, M.D.*
Ananya Manuyakorn, M.D.*

Abstract :

Objectives : To determine a proper time for neutralizing the decalcified specimen by rinsing with tap water.

Methods : Fix pork from fresh market in routine fixative for 24 hours, put into 5% nitric acid for 24 hours to 7 days. Then rinse in running tap water for 1-48 hours. Process and cut the specimens into slide, stain with H&E stain. Distribute to three pathologists to evaluate the quality of staining and microscopic detail.

Results : Neutralizing for 2 hours or longer yields similar microscopic features to the specimen that soaked in acid for 72 hours or less. The histologic feature is not recovered in the tissue that soaked in acid longer than 72 hours, no matter how long it is neutralized.

Discussion : The result shows no benefit in rinsing the decalcified specimen longer than 2 hours, and soaking in acid longer than 72 hours causes permanent artifact.

Key words : Decalcification, rinse, neutralizing

เรื่องย่อ : การศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการลดความเป็นกรดของเนื้อเยื่อโดยการผ่านน้ำประปา

มงคล อุยประเสริฐกุล พ.บ.*, สรนาท เมืองสมบูรณ์ พ.บ.*, อนัญญา มนุญการ พ.บ.*

*ภาควิชาพยาธิวิทยา, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร 10700.

สารศิริราช 2546; 55: 385-387.

วัตถุประสงค์ : ศึกษาหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการลดความเป็นกรดของเนื้อเยื่อโดยการผ่านน้ำประปา

วิธีการ : ตึงเนื้อและกระดูกหมูในน้ำยาตรึงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่กรดนาน 24 ชั่วโมง ถึง 7 วันจึงนำมาผ่านน้ำประปาใช้เวลาดังแต่ 1 ชั่วโมงถึง 48 ชั่วโมงนำตัวอย่างทั้งหมดมาผ่านกระบวนการตัดและย้อมสีตามปกติ แล้วให้พยาธิแพทย์ 3 ท่าน เปรียบเทียบการติดสีและลักษณะทางจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อ

ผลการทดลอง : พบว่าเนื้อเยื่อที่แช่กรดนาน 1 ถึง 3 วันเมื่อนำมาผ่านการล้างกรดตั้งแต่ 2 ชั่วโมงขึ้นไป มีสีและลักษณะทางจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อไม่แตกต่างกัน ส่วนเนื้อเยื่อที่แช่กรดนานเกิน 3 วัน ไม่สามารถให้สีและลักษณะทางจุลทรรศน์ที่ดี แม้ว่าจะนำมาผ่านการล้างกรดนานเท่าใดก็ตาม

*Department of Pathology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand.

สรุป : การล้างกรดนานกว่า 2 ชั่วโมงทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงโดยไม่จำเป็น และหากแช่กรดนานเกิน 3 วัน การติดสีและลักษณะทางจุลทรรศน์จะด้อยลงอย่างถาวร

คำสำคัญ : Decalcification, rinse, neutralizing

INTRODUCTION

To avoid histologic artifacts in tissue decalcified by acid, reduction of acidity in the tissue before further histologic process is necessary. Rinsing in running tap water is a simple procedure used for this purpose, along with other methods using chemical reagents such as lithium carbonate.¹⁻³ The duration of this process is varyingly suggested from 1 hour to 24 hours.¹⁻⁵

In this experiment, it is found that the lowest rate to keep tap water running continuously is 700-1,000 ml. per minute. That means the longer the period used for rinsing, the more expensive the procedure. Determining the shortest rinsing period that is sufficient to reduce the artifacts can reduce excess expense.

MATERIALS AND METHODS

Cut fresh pork prepared from a fresh market into multiple 1x1 cm squares which are 0.3 cm thick; fix in 10% buffered formalin for 24 hour. Put the fixed tissue into 5% nitric acid for varying duration; 24 hours, 48 hours, 72 hours, 5 days, and 7 days. Then, rinse each group of samples from the different periods of acid treatment in running tap water for varying duration; 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours, and 48 hours. We performed the experiment on 3 samples for each final set of experiment. Then, we submitted all samples for routine histologic process and stained with H&E stain. Slides were distributed to three pathologists for evaluation of the quality of staining and histologic features, including nuclear and cytoplasmic detail. Scoring of the evaluation was set as 1 = unsatisfactory, 2 = acceptable, 3 = satisfied. We compared the ranking result of each pathologist and used the mode of satisfactory ranking as the cut-off point of satisfied section.

RESULT

All pathologists agree that the samples that soaked in acid 24 hours, 48 hours, and 72 hours showed good histologic staining and microscopic features after being rinsed for 2 hours. There is no significant difference between rinsing for 2 hours and rinsing for a longer period. Scoring of satisfactory was shown in figure 1. All samples that soaked in acid longer than 72 hours showed too much eosinophil stain and were not be able to be corrected by rinsing them in tap water after 48 hours.

DISCUSSION

This study is a pilot study, using pork skeletal muscle instead of bone because it is feasible and because, in general practice, pathologists are concerned with histologic staining and detail of cell rather than with the bone matrix.

The result shows that for samples decalcified 72 hours or less, there is no benefit to rinsing them longer than 2 hours. The duration of sitting in acid less than 72 hours does not have an impact on the rinsing period and soaking in acid longer than 72 hours causes staining artifact unrecoverable by rinsing in running tap water.

In this experiment, each sample was cut equally into 1x1x0.3 cm sections, as is generally done in routine histologic laboratory. By doing this, the influence of specimen size was excluded. The results of this experiment can be applied to general practice.

The result also guides that it is better to resize the samples into small pieces before decalcify them in order to prevent permanent artifacts caused by soaking in the acid too long.

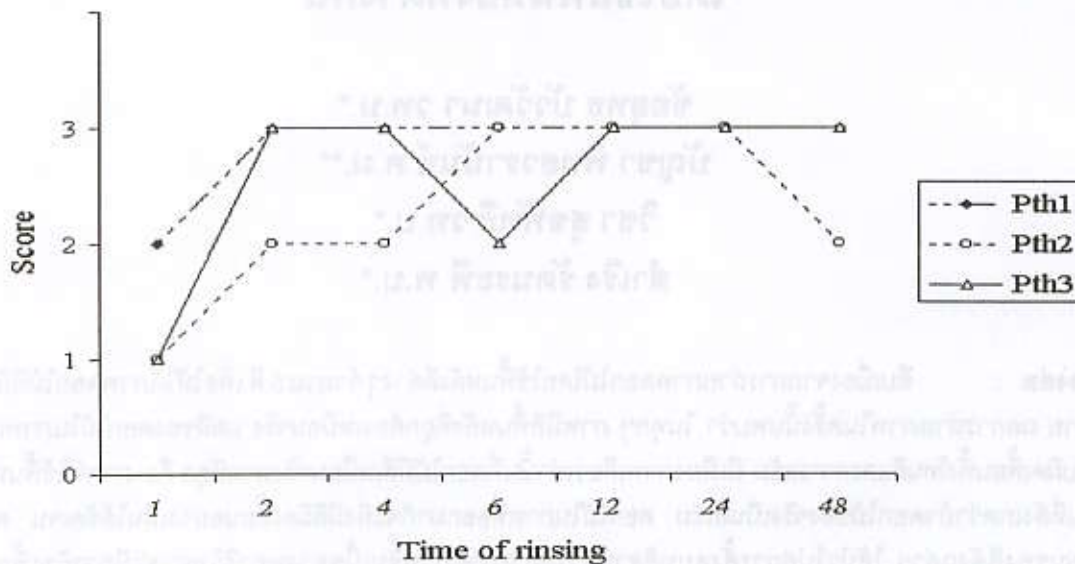


Figure 1. Concordance of pathologists in satisfactory scoring of the specimen sat in acid for 24 hours.

REFERENCES

1. Arber JMMDA, Daniel A, Jenkins, Kay A. HTL (ASCP); Battifora, Hector M.D. Effect of decalcification and fixation in paraffin-section immunohistochemistry. *Applied Immunohistochemistry* 1996; 4: 241-48.
2. John D, Bancroft AS. Theory and Practice of Histological Techniques. New York: Churchill Livingstone, 1996.
3. Ann Preece HTA. A Manual of Histologic Technicians. 3rd ed. Boston: Churchill Livingstone, 1972.
4. Edna B, Prophet BM, Jaquelyn B, Arrington, Leslie H. Sobin, M.D. Laboratory Methods in Histotechnology. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1992.
5. Gabe M. Histological Techniques. New York: Masson Springer-Verlag, 1976.