

638A-71**638A-85****Microscopie****Solution d'hématoxyline de Harris avec aluminium (sans mercure) Harleco®**

Dispositif médical de diagnostic in vitro

Utilisation prévue

La solution d'hématoxyline de Harris avec aluminium (sans Hg) Harleco® est utilisée pour les examens histologiques et cytologiques d'échantillons d'origine humaine.

Principe

La procédure de coloration la plus couramment utilisée pour évaluer la morphologie générale des tissus est la technique à l'hématoxyline et à l'éosine (ou coloration HE)¹. Elle est principalement utilisée pour différencier les noyaux des cytoplasmes des cellules et pour identifier divers types de tissus. La modification de Harris de l'hématoxyline consiste à utiliser de l'alun de potassium en tant qu'agent mordant². Dans la première étape, le colorant nucléaire à charge positive (hématoxyline) se lie aux groupes phosphates des acides nucléiques du noyau. Les noyaux sont alors marqués en bleu foncé à violet foncé. La deuxième étape est la contre-coloration à l'aide de colorants xanthènes anioniques à charge négative (éosine Y, éosine B ou érythrosine B). Ils se lient aux protéines plasmatiques à charge positive. Le cytoplasme et les substances intracellulaires sont marqués d'une couleur rose à rouge, tandis que les érythrocytes prendront une couleur jaune à orange. Cela produit la différenciation caractéristique bleu/violet des noyaux et rose des cytoplasmes des cellules.

Échantillons

Des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (de 3 à 4 µm d'épaisseur) ou des cryosections, ainsi que des spécimens cytologiques cliniques, servent d'échantillons de départ.

Réactifs

Réf. 638A 500 ml, 4 l
Hématoxyline de Harris avec aluminium (sans Hg) Harleco®

Autre matériel requis :

Xylène ou toluène
Alcool SD3
Alcool acide
Hydroxyde d'ammonium
Réf. 588X Solution d'éosine Y 1 l, 10 l
Réf. 7831 Liquide de fixation de Bouin 4 l, 20 l
Réf. 65348 Alcool Harleco®, 95 % 4 l
Réf. 65354 Réactif de bleuissement 4 l
Réf. 64969 Milieu de montage
Krystalon™ Harleco® 0,05 l, 0,5 l

Préparation des échantillons

Les échantillons doivent être prélevés par un personnel qualifié. Tous les échantillons doivent être clairement marqués. Des instruments adaptés doivent être utilisés pour le prélèvement et la préparation des échantillons. Suivre le mode d'emploi / les instructions d'application du fabricant.

Méthode de marquage manuelle

1. Obtenir plusieurs coupes de tissus.
2. Éliminer la paraffine en immergeant les lames dans deux récipients contenant du xylène ou du toluène, deux minutes chaque.
 - a. Une élimination incomplète de la paraffine produit un marquage irrégulier, car les solutions aqueuses et alcooliques de coloration ne peuvent pas passer à travers la paraffine insuffisamment éliminée.
3. Éliminer le xylène ou le toluène utilisé à l'étape précédente en immergeant les lames

- dans deux récipients contenant de l'alcool SD3A, deux minutes chaque.
4. Passer les lames dans deux récipients contenant une solution aqueuse d'alcool SD3A à 50 %, une minute chaque.
 5. Rincer les lames à l'eau désionisée ou distillée pendant une minute.
 - a. Le rinçage à l'eau permet de réhydrater l'échantillon.
 - b. Le tissu peut maintenant recevoir les solutions de coloration aqueuses ou alcooliques.
 - c. Si l'échantillon venait à sécher (complètement ou partiellement) lors du transfert entre le xylène ou le toluène et l'alcool ou entre l'alcool et l'eau, il ne serait pas complètement réhydraté.
 - d. Cela mènerait à une pénétration inadéquate du colorant dans certaines parties de l'échantillon.
 6. Si les coupes ont été fixées au formol, passer à l'étape 7.
 - a. Si les coupes ont été fixées dans du liquide de Bouin (Réf. 7831), les placer dans l'eau du robinet jusqu'à ce qu'elles ne soient plus de couleur jaune, mais pas plus d'une demi-heure.
 - Passer à l'étape 7.
 - Lorsque les tissus sont fixés dans du liquide de Bouin, leurs noyaux sont marqués de façon moins intense à l'hématoxyline.
 - Si le liquide de Bouin est décoloré dans le délai précisé de 30 minutes, les noyaux seront marqués.
 - Si l'échantillon n'est pas décoloré, les noyaux ne seront pas marqués.
 - b. Si les coupes ont été fixées dans du liquide de Zenker, les placer dans une solution de Lugol pendant cinq minutes puis les rincer à l'eau distillée.
 - Ensuite, rincer les lames dans du thiosulfate de sodium à 5 % jusqu'à ce qu'elles soient décolorées.
 - Rincer à l'eau et passer à l'étape 7.
 7. Filtrer la solution d'hématoxyline à travers un filtre en papier Whatman No. 2 (ou équivalent) avant l'emploi.
 - a. Placer les lames dans l'hématoxyline pendant 15 minutes.
 - b. Une précipitation peut survenir avec notre produit.
 - c. Une filtration est nécessaire pour éliminer ce précipité qui se forme graduellement et éviter les artéfacts dans l'échantillon à marquer.
 8. Rincer les lames à l'eau du robinet courante pendant cinq minutes.
 9. Différencier les lames en les plongeant brièvement deux à quatre fois dans de l'alcool acide à 1 %.
 - a. Préparer l'alcool acide à 1 % en ajoutant 1 ml de HCl concentré à 99 ml d'alcool SD3A à 70 %.
 - b. En raison de la grande solubilité de l'hématoxyline dans l'alcool acide, une sur-différenciation peut extraire toute la coloration nucléaire si cette étape est trop poussée.
 10. Laver à l'eau distillée en y plongeant les lames lentement 10 fois.
 - a. Il est important d'éliminer l'intégralité de l'alcool acide avant de passer à la solution de bleuissement (hydroxyde d'ammonium).
 - b. Si l'intégralité de l'alcool acide n'est pas éliminée, l'efficacité du développement de la couleur nucléaire bleue sera réduite en raison du faible pH de la solution.
 - c. Changer cette solution d'eau distillée après chaque série de lames.
 11. Plonger les coupes dans l'hydroxyde d'ammonium à 0,2 % jusqu'à ce qu'elles soient de couleur bleu vif.
 - a. Trois à cinq immersions sont suffisantes.
 - b. L'hydroxyde d'ammonium est préparé en ajoutant 2 à 3 ml d'hydroxyde d'ammonium à 1000 ml d'eau du robinet.
 12. Laver dans deux récipients contenant de l'eau distillée, en plongeant les lames lentement 10 fois chaque.
 - a. Si le lavage est inadéquat, le marquage à l'éosine sera hétérogène.

- 13.** Marquer les lames avec une solution d'éosine Y (Réf. 588X) pendant cinq à huit minutes, selon l'intensité de coloration souhaitée.
- 14.** Déshydrater dans trois récipients contenant du SD3A, en plongeant les lames lentement 10 fois chaque, jusqu'à ce que l'éosine soit éliminée.
- 15.** Passer au xylène ou au toluène, deux passages chaque, en plongeant les lames lentement 10 fois chaque.
- 16.** Monter les lames avec du milieu Krystalon (Réf. 64969) ou équivalent.

Résultats

- Les noyaux doivent être colorés en bleu et présenter une certaine métachromasie.
- Les cytoplasmes doivent être marqués en rose.
 - Le cytoplasme rose dépend de l'éosine et non de l'hématoxyline.
- L'hématoxyline devrait uniquement marquer les noyaux des cellules.

Notes techniques pour les procédures de marquage manuelles

1. Il peut être nécessaire d'expérimenter et d'ajuster les durées d'incubation pour obtenir des résultats optimaux et une nette différenciation entre les cellules.

Diagnostic

Le diagnostic doit être effectué exclusivement par un personnel formé et agréé. Une nomenclature valide doit être utilisée. Des tests complémentaires doivent être sélectionnés et réalisés selon des méthodes reconnues. Des témoins adéquats doivent être effectués pour chaque application.

Stockage

15-30 °C

La durée de conservation

La solution d'hématoxyline avec aluminium pour la microscopie peut être utilisée jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. À partir du moment où le flacon est ouvert pour la première fois, son contenu peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée, s'il est conservé entre 15 et 30 °C.

Les flacons doivent toujours être fermés hermétiquement.

Instructions supplémentaires

À usage professionnel uniquement.

La procédure doit être réalisée par un personnel qualifié uniquement.

Les directives nationales de sécurité sur le lieu de travail et d'assurance qualité doivent être suivies.

Des microscopes équipés selon les normes en vigueur doivent être utilisés.

Protection contre les infections

Des mesures efficaces doivent être prises pour éviter les infections dans le cadre des directives de laboratoire.

Instructions d'élimination

L'emballage doit être éliminé selon les directives en vigueur. Les solutions usagées et celles qui ont dépassé la durée de conservation doivent être éliminées en tant que déchets spéciaux conformément aux directives locales.

Réactifs auxiliaires

Réf. 65348	Alcool Harleco®, 95 %	4 l
Réf. 65354	Réactif de bleuissement	4 l
Réf. 64969	Milieu de montage Harleco® Krystalon™	50 ml, 500 ml
Réf. 104699	Huile à immersion pour la microscopie	100 ml, 500 ml

Classification des risques

Réf. 638A Veuillez respecter la classification des risques imprimée sur l'étiquette et les informations contenues dans la fiche de données de sécurité. La fiche de données de sécurité est disponible sur notre site Internet et sur demande.

Documentation

1. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine, 10th Edition, (ed. Horobin, R.W., and Kiernan, J.A.) Bios, 2002
2. Harris, H. F. (1900). "On the rapid conversion of haematoxylin into haematein in staining reactions". Journal of Applied Microscopic Laboratory Methods. **3** (3): 777.



Consult instructions
for use



Manufacturer



Catalog number



Batch code



Caution, consult
accompanying documents



Use by
YYYY-MM-DD



Temperature
limitation

Harleco® est une marque déposée de
Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne.

Krystalon™ est une marque de Merck KGaA,
Darmstadt, Allemagne.

Statut : 2019-10-24 20486209



EMD Millipore Corporation
400 Summit Drive
Burlington, MA 01821, USA
Tel. +1-978-715-4321