

# HEMATOXILINA PARA HISTOCITOLOGÍA

Para diagnóstico "in vitro"



## PRINCIPIO

La prueba de Papanicolaou, que debe su nombre al Dr. Georgios Papanicolaou, pionero en citología y cáncer, se realiza para diagnosticar el cáncer cervicouterino y de otros órganos. Permite detectar cambios de las células que pueden ser precursores de cáncer. En ésta técnica, el primer paso es la tinción de núcleos, con hematoxilinas. El segundo paso es la tinción de citoplasmas con una solución anaranjada, que tiñe las células maduras y queratinizadas con diferente intensidad. En el tercer paso de tinción se usa la llamada solución policroma, que es una mezcla de eosina, verde luz SF y pardo de Bismarck. Con la solución policroma se muestra la diferenciación del epitelio escamoso simple. La tinción de Hematoxilina -Eosina es la más utilizada en histología.

Los colorantes de Hematoxilina están formados básicamente por lacas metálicas de hematoxilina oxidada con iones divalentes o trivalentes. El mecanismo de tinción se realiza mediante uniones covalentes del complejo metal-hematoxilina con radicales aniónicos del tejido. En el caso del material nuclear en la reacción intervendrían los grupos aniónicos del ácido fosfórico del ADN. La selectividad de la tinción se incrementa con el medio ácido del colorante, ya que dificulta la coloración de elementos de carácter anfótero, como son los aminoácidos de las proteínas. Los núcleos aparecen azul a violeta oscuro.

Con la hematoxilina se puede realizar la tinción progresiva y la regresiva. En la tinción regresiva las estructuras del núcleo se presentan más diferenciadas y se pueden ver mejor.

## UTILIDAD DIAGNÓSTICA

Para la tinción de núcleos en histocitología.

## REACTIVOS

### Hematoxilina de Harris

1 x 500 mL	Ref. 99 22 32
1 x 1000 mL	Ref. 99 59 60
1 x 5000 mL	Ref. 99 12 97

### Composición

Hematoxilina, CI nº 75 290	0,5 %
Sulfato de Aluminio	6 %
Etilenglicol	15 %

### Hematoxilina de Carazzi

1 x 1000 mL	Ref. 99 16 43
1 x 5000 mL	Ref. 99 41 75

### Composición

Hematoxilina, CI nº 75 290	0,1 %
Sulfato de Aluminio/Potasio	6 %
Glicerina	20 %

### Hematoxilina de Mayer

1 x 1000 mL	Ref. 99 77 50
1 x 5000 mL	Ref. 99 06 38

### Composición

Hematoxilina, CI nº 75 290	0,5 %
Sulfato de Aluminio y Amonio	5 %
Glicerina	30 %

## PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE TRABAJO:

El colorante está listo para su uso.

## CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Los reactivos almacenados a 15-30°C y protegidos de la luz, son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Los envases deben mantenerse siempre bien cerrados.

Con el tiempo, puede aparecer un ligero precipitado en algún reactivo, que no afecta a la funcionalidad del producto. Se aconseja filtrar el colorante antes de su uso.

## MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

Material de uso general de laboratorio de anatomía patológica  
Colorante para tinción de citoplasmas: Colorantes EA 50 ó EA 36 ó EA 65, Orange G 6, Eosina alcohólica o acuosa al 1%  
Etanol, de diferentes concentraciones.  
Xileno o Sustituto de Xileno  
Medio de montaje  
Microscopio

## PRECAUCIONES

Los productos son para uso profesional. Todos los reactivos deben manipularse con precaución por personal técnico formado. Se aconseja consultar antes de su uso la ficha de datos de seguridad.

La eliminación de los residuos debe hacerse según la normativa local vigente.

## MUESTRA

Muestras citológicas de distintos orígenes: ginecológicas, esputos, líquidos de biopsias. Muestras histológicas.

La manipulación de las muestras debe realizarse de acuerdo con los protocolos establecidos en cada laboratorio para la preparación de muestras para teñir con la metódica de Papanicolaou o con la tinción Hematoxilina-Eosina.

Manipular las muestras con precaución por su capacidad potencialmente infecciosa.

## CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda seguir las prácticas de control de calidad marcadas por el CLSI (antes NCCLS).

En cada serie de tinciones se deben realizar los controles idóneos para evitar resultados incorrectos.

## PROCEDIMIENTO

### TINCIÓN DE PAPANICOLAOU

1. Las extensiones que se hayan fijado con "spray" deben sumergirse en agua durante 5-10 minutos para que la carboximetilcelulosa (CMC) que contiene se disuelva completamente
2. Inmersión durante 1 minuto en Hematoxilina de Harris
3. Lavado con agua 15 segundos
4. Lavado con etanol-HCl (0,25%) 10 segundos
5. Lavado con agua 15 segundos
6. Lavado con agua amoniacal (0,05% en NH<sub>3</sub>) 5 segundos
7. Lavado con agua 15 segundos
8. Inmersión en etanol de 96° 10 segundos (dos veces, distinto contenedor)
9. Inmersión en el colorante OG-6, 3 minutos
10. Lavado en etanol de 96° 15 segundos (dos veces, distinto contenedor)
11. Inmersión en el colorante EA 50 ó EA 36 ó EA 65, 3 minutos
12. Lavado en etanol de 96° 15 segundos (dos veces, distinto contenedor)
13. Inmersión en etanol absoluto 15 segundos (dos veces, distinto contenedor)
14. Inmersión en etanol / xilol (50%) 15 segundos
15. Inmersión en xilol 15 segundos
16. Inmersión en xilol durante 2 minutos
17. Montar la preparación

### TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

1. Desparafinar la preparación.
2. Después de la última inmersión en etanol lavar con agua destilada durante 1 minuto
3. Inmersión durante 8 minutos en Hematoxilina
4. Lavado con agua 1 minuto
5. Lavado con etanol-HCl (0,5%) 13 segundos
6. Lavado con agua 15 segundos
7. Lavado con agua amoniacal (0,05% en NH<sub>3</sub>) 30 segundos
8. Lavado con agua 1 minuto
9. Inmersión durante 30 segundos en Eosina al 1%
10. Inmersión en etanol de 96° 6 segundos (dos veces, distinto contenedor)
11. Inmersión en etanol absoluto 6 segundos (tres veces, distinto contenedor)
12. Inmersión en xilol/eucalipto 6 segundos (dos veces, distinto contenedor)
13. Montar la preparación

### TINCIÓN HEMATOXILINA MAYER-EOSINA

1. Desparafinar la preparación.
2. Después de la última inmersión en etanol lavar con agua destilada durante 5 minutos
3. Inmersión durante 10 minutos en Hematoxilina de Mayer
4. Lavado con agua 5 minutos
5. Inmersión durante 2 minutos en Eosina alcohólica al 1%
6. Inmersión en etanol de 96° 10-15 segundos (dos veces, distinto contenedor)
7. Inmersión en etanol absoluto 10-15 segundos (dos veces, distinto contenedor)
8. Inmersión en xilol (tres veces, distinto contenedor)
9. Montar la preparación

## RESULTADOS

Núcleos: azul violeta  
Citoplasma acidófilo: rojizo  
Citoplasma basófilo: azul  
Citoplasma queratinizado: anaranjado

## NOTAS

La intensidad de la coloración es proporcional al tiempo de tinción. Para obtener resultados óptimos el colorante debe preservarse de la humedad. Cada usuario puede aplicar las diversas variantes de este procedimiento, tanto manual como automático, que se ajuste a su metódica estándar.

## BIBLIOGRAFÍA

Marshall, P.N., Galbrait, W., Bacus, J.W., (1979). Anal. Quant. Cytology, 1, 169-178.  
Baker, J.R., (1962). Quart. J. Micr. Sci., 103, 493-517.  
Boon, M.E., Drijver, J.S., Routine Cytological staining techniques, 1st. ed (1986)  
CLSI Guidelines and Standards, CLSI, Wayne, P.A

QUIMICA CLINICA APLICADA S.A.

Empresa Certificada ISO 9001 / ISO 13485

A 7 Km 1081 - P.O. Box 20 - E43870 AMPOSTA / SPAIN

Tel. ++ 34 (977) 70. 62. 30 Fax ++ 34 (977) 70. 30. 40

Revisión: 02.2017

PRO4\_REG9\_HEMATOX\_4



# HAEMATOXYLIN FOR HISTOCYTOLOGY

For in vitro diagnostic



## PRINCIPLE

The Papanicolaou test, which owes its name to Dr Georgios Papanicolaou, a pioneer in cytology and cancer, is performed to diagnose cervical cancer or cancer in other organs. It makes it possible to detect changes in cells which may be cancer precursors. The first step in this technique is the staining of nuclei with haematoxylin. The second step is the staining of cytoplasm with an orange solution, which stains the mature cells and the keratinised cells with different intensities. The so-called polychrome solution, which is a mixture of eosin, light green SF and Bismarck brown, is used in the third step. The differentiation of simple squamous epithelium is shown with the polychrome solution. The Haematoxylin and Eosin stain is the most commonly used stain in histology.

Haematoxylin stains are basically formed from metallic complexes of oxidised haematoxylin with divalent and trivalent ions. The mechanism of staining is carried out between the covalent bonds of the metal-haematoxylin compound and the anionic radicals of the tissue. The anionic groups of phosphoric acid in DNA will intervene if there is nuclear material in the reaction. The selectivity of the stain increases with the acid medium of the dye, since it hinders the staining of amphoteric elements, such as the amino acids of proteins. The nuclei appear blue to dark violet.

Progressive and regressive staining can be performed with haematoxylin. The structures of the nuclei show greater differentiation in regressive staining and are more easily seen.

## DIAGNOSTIC USE

For the staining of nuclei in histocytology.

## REAGENTS

### Harris's Haematoxylin

	1 x 500 mL	Ref. 99 22 32
	1 x 1,000 mL	Ref. 99 59 60
	1 x 5,000 mL	Ref. 99 12 97

### Composition

Haematoxylin C.I. No. 75 290	0.5%
Aluminium Sulphate	6%
Ethylene glycol	15%

### Carazzi's Haematoxylin

	1 x 1,000 mL	Ref. 99 16 43
	1 x 5,000 mL	Ref. 99 41 75

### Composition

Haematoxylin C.I. No. 75 290	0.1%
Aluminium/Potassium Sulphate	6%
Glycerin	20%

### Mayer's Haematoxylin

	1 x 1,000 mL	Ref. 99 77 50
	1 x 5,000 mL	Ref. 99 06 38

### Composition

Haematoxylin C.I. No. 75 290	0.5%
Aluminium Ammonium Sulphate	5%
Glycerin	30%

## PREPARATION OF THE WORKING REAGENT:

The stain is ready for use.

## STORAGE AND STABILITY

Reagents which are stored at 15-30°C and protected from light are stable until the expiry date stated on the label. Containers must always be kept tightly closed.

Over time, a light precipitate may form in some reagents. This does not affect their functionality. The stain should be filtered before use.

## MATERIAL REQUIRED (NOT SUPPLIED)

General-purpose pathological anatomy laboratory material.

Dye for staining cytoplasm: EA 50, EA 36 or EA 65 stains, Orange G-6 stain, Alcoholic or aqueous solution of eosin at 1%

Different concentrations of ethanol.

Xylene or Xylene Substitute

Mounting medium

Microscope

## PRECAUTIONS

The products are for professional use. All the reagents must be handled with care by trained technicians. The safety data sheet should be consulted before using the reagents.

Waste disposal must be carried out according to the local regulations in force.

## SAMPLE

Cytological samples of different origins: gynaecological, sputum, liquid biopsies.

Histological samples.

Handling of the samples must be carried out in accordance with the established protocols in each laboratory for the preparation of samples for staining with the Papanicolaou method or with the Haematoxylin and Eosin stain.

Handle the samples with care due to their potentially infectious nature.

## QUALITY CONTROL

Following the quality control practices defined by the CLSI (formerly NCCLS) is recommended.

Suitable controls must be carried out for each set of stains to avoid inaccurate results.

## PROCEDURE

### PAPANICOLAOU STAIN

1. The smears which have been spray-fixed should be immersed in water for 5-10 minutes so that the carboxymethyl cellulose (CMC) that they contain is completely dissolved
2. Immerse in Harris's Haematoxylin for 1 minute
3. Rinse with water for 15 seconds
4. Rinse with ethanol-HCl (0.25%) for 10 seconds
5. Rinse with water for 15 seconds
6. Rinse with ammonia water (0.05% in NH<sub>3</sub>) for 5 seconds
7. Rinse with water for 15 seconds
8. Immerse in ethanol 96° for 10 seconds (twice, using a different container each time)
9. Immerse in OG-6 stain for 3 minutes
10. Rinse in ethanol 96° for 15 seconds (twice, using a different container each time)
11. Immerse in EA 50, EA 36 or EA 65 stain for 3 minutes
12. Rinse in ethanol 96° for 15 seconds (twice, using a different container each time)
13. Immerse in absolute ethanol for 15 seconds (twice, using a different container each time)
14. Immerse in ethanol/xylol (50%) for 15 seconds
15. Immerse in xylol for 15 seconds
16. Immerse in xylol for 2 minutes. Mount the preparation

### HAEMATOXYLIN AND EOSIN STAIN

1. Dewax the preparation
2. Rinse with distilled water for 1 minute after the last immersion in ethanol
3. Immerse in Haematoxylin for 8 minutes
4. Rinse with water for 1 minute
5. Rinse with ethanol-HCl (0.5%) for 13 seconds
6. Rinse with water for 15 seconds
7. Rinse with ammonia water (0.05% in NH<sub>3</sub>) for 30 seconds
8. Rinse with water for 1 minute
9. Immerse in Eosin 1% for 30 seconds
10. Immerse in ethanol 96° for 6 seconds (twice, using a different container each time)
11. Immerse in absolute ethanol for 6 seconds (three times, using a different container each time)
12. Immerse in xylol/eucalyptol for 6 seconds (twice, using a different container each time)
13. Mount the preparation

### MAYER'S HAEMATOXYLIN AND EOSIN STAIN

1. Dewax the preparation
2. Rinse with distilled water for 5 minutes after the last immersion in ethanol
3. Immerse in Mayer's Haematoxylin for 10 minutes
4. Rinse with water for 5 minutes
5. Immerse in alcoholic Eosin 1% for 2 minutes
6. Immerse in ethanol 96° for 10-15 seconds (twice, using a different container each time)
7. Immerse in absolute ethanol for 10-15 seconds (twice, using a different container each time)
8. Immerse in xylol (three times, using a different container each time)
9. Mount the preparation

## RESULTS

Nuclei: blue-violet  
Acidophilic cytoplasm: reddish  
Basophilic cytoplasm: blue  
Keratinised cytoplasm: orange

## NOTES

The staining intensity is proportional to the staining time. The stain must be kept away from moisture in order to obtain optimal results. Each user may apply the different versions of this procedure, both manual and automated, adapting it to their standard method.

## REFERENCES

Marshall, P.N., Galbraith, W., Bacus, J.W., (1979). Anal. Quant. Cytology, 1, 169-178.  
Baker, J.R., (1962), Quart. J. Micr. Sci., 103, 493-517.  
Boon, M.E., Drijver, J.S., Routine Cytological staining techniques, 1st. ed (1986)  
CLSI Guidelines and Standards, CLSI, Wayne, P.A



# HEMATOXILINA PARA HISTOCITOLOGIA

Para diagnóstico "in vitro"

## PRINCÍPIO

O teste de Papanicolaou, que deve o seu nome ao Dr. Georgios Papanicolaou, pioneiro em citologia e cancro, é realizado para diagnosticar o cancro do colo do útero e de outros órgãos. Permite detetar alterações das células que podem ser precursores de cancro. Nesta técnica, o primeiro passo é a coloração de núcleos, com hematoxilinas. O segundo passo é a coloração de citoplasmas com uma solução alaranjada, que cora as células maduras e queratinizadas com uma intensidade diferente. No terceiro passo da coloração é usada a chamada solução policroma, que é uma mistura de eosina, verde luz SF e pardo de Bismarck. Com a solução policroma é mostrada a diferenciação do epitélio escamoso simples. A coloração de hematoxilina-eosina é a mais utilizada em histologia.

Os corantes de hematoxilina são formados basicamente por lacas metálicas de hematoxilina oxidada com iões divalentes ou trivalentes. O mecanismo de coloração é realizado através de uniões covalentes do complexo metal-hematoxilina com radicais aniónicos do tecido. No caso do material nuclear, na reação intervêm os grupos aniónicos do ácido fosfórico do ADN. A seletividade da coloração aumenta com o meio ácido do corante, pois dificulta a coloração de elementos de carácter anfótero, como os aminoácidos das proteínas. Os núcleos aparecem a azul a violeta escuro.

Com a hematoxilina pode-se realizar a coloração progressiva e a regressiva. Na coloração regressiva, as estruturas do núcleo são apresentadas de forma mais diferenciada e podem ver-se melhor.

## UTILIDADE NO DIAGNÓSTICO

Para a coloração de núcleos em histocitologia.

## REAGENTES

### Hematoxilina de Harris

1 x 500 mL	Ref. 99 22 32
1 x 1000 mL	Ref. 99 59 60
1 x 5000 mL	Ref. 99 12 97

### Composição

Hematoxilina, Cl n.º 75 290	0,5%
Sulfato de alumínio	6%
Etilenoglicol	15%

### Hematoxilina de Carazzi

1 x 1000 mL	Ref. 99 16 43
1 x 5000 mL	Ref. 99 41 75

### Composição

Hematoxilina, Cl n.º 75 290	0,1%
Sulfato de alumínio/potássio	6%
Glicerina	20%

### Hematoxilina de Mayer

1 x 1000 mL	Ref. 99 77 50
1 x 5000 mL	Ref. 99 06 38

### Composição

Hematoxilina, Cl n.º 75 290	0,5%
Sulfato de alumínio e amónio	5%
Glicerina	30%

## PREPARAÇÃO DO REAGENTE DE TRABALHO:

O corante está pronto a usar.

## CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Os reagentes armazenados a 15–30 °C e protegidos da luz ficam estáveis até ao prazo de validade indicado no rótulo. As embalagens devem ser sempre mantidas bem fechadas. Com o tempo pode aparecer um ligeiro precipitado em algum reagente que não afeta a funcionalidade do produto. Aconselha-se filtrar o corante antes de usar.

## MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO

Material de uso geral de laboratório de anatomia patológica  
Corante para coloração de citoplasmas: corantes EA 50 ou EA 36 ou EA 65, Orange G 6, eosina alcoólica ou aquosa a 1%  
Etanol, de diferentes concentrações.  
Xileno ou substituto de xileno  
Meio de montagem  
Microscópio

## PRECAUÇÕES

Os produtos são para uso profissional. Todos os reagentes devem ser manipulados com precaução pelo pessoal técnico com formação. É aconselhável consultar a ficha de dados de segurança antes da sua utilização.

A eliminação dos resíduos deve ser realizada segundo a legislação local em vigor.

## AMOSTRA

Amostras citológicas de distintas origens: ginecológicas, expetoração, líquidos de biopsias. Amostras histológicas.

A manipulação das amostras deve ser realizada de acordo com os protocolos estabelecidos em cada laboratório para a preparação de amostras para tingir com a metodologia de Papanicolaou ou com a coloração hematoxilina-eosina.

Manipular as amostras com precaução pela sua capacidade potencialmente infecciosa.

## CONTROLO DE QUALIDADE

Recomenda-se seguir as práticas de controlo de qualidade indicadas pelo CLSI (anteriormente NCCLS).

Em cada série de colorações devem ser realizados os controlos idóneos para evitar resultados incorretos.

## PROCEDIMENTO

### COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU

- Os esfregaços fixados com «spray» devem ser mergulhados em água durante 5–10 minutos para que a carboximetilcelulose (CMC) que contém se dissolva completamente
- Imersão durante 1 minuto em hematoxilina de Harris
- Lavagem com água 15 segundos
- Lavagem com etanol-HCl (0,25%) 10 segundos
- Lavagem com água 15 segundos
- Lavagem com água amoniacal (NH<sub>3</sub> a 0,05%) 5 segundos
- Lavagem com água 15 segundos
- Imersão em etanol a 96% 10 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
- Imersão no corante OG-6, 3 minutos
- Lavagem em etanol a 96% 15 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
- Imersão no corante EA 50 ou EA 36 ou EA 65, 3 minutos
- Lavagem em etanol a 96% 15 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
- Imersão em etanol absoluto 15 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
- Imersão em etanol/xilol (50%) 15 segundos
- Imersão em xilol 15 segundos
- Imersão em xilol durante 2 minutos
- Montar a preparação

### COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA

- Desparafinar a preparação.
- Depois da última imersão em etanol, lavar com água destilada durante 1 minuto
- Imersão durante 8 minutos em hematoxilina
- Lavagem com água 1 minuto
- Lavagem com etanol-HCl (0,5%) 13 segundos
- Lavagem com água 15 segundos
- Lavagem com água amoniacal (NH<sub>3</sub> a 0,05%) 30 segundos
- Lavagem com água 1 minuto
- Imersão durante 30 segundos em eosina a 1%
- Imersão em etanol a 96% 6 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
- Imersão em etanol absoluto 6 segundos (três vezes, recipiente diferente)
- Imersão em xilol/eucalipto 6 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
- Montar a preparação

### COLORAÇÃO HEMATOXILINA MAYER-EOSINA

- Desparafinar a preparação.
- Depois da última imersão em etanol, lavar com água destilada durante 5 minutos
- Imersão durante 10 minutos em hematoxilina de Mayer
- Lavagem com água 5 minutos
- Imersão durante 2 minutos em eosina alcoólica a 1%
- Imersão em etanol a 96% 10–15 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
- Imersão em etanol absoluto 10–15 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
- Imersão em xilol (três vezes, recipiente diferente)
- Montar a preparação

## RESULTADOS

Núcleos: azul-violeta  
Citoplasma acidófilo: avermelhado  
Citoplasma basófilo: azul  
Citoplasma queratinizado: alaranjado

## NOTAS

A intensidade da coloração é proporcional ao tempo de coloração. Para obter os melhores resultados, o corante deve ser preservado da humidade. Cada utilizador pode aplicar as diversas variantes deste procedimento, tanto manual como automático, que se adaptem à sua metodologia padrão.

## BIBLIOGRAFIA

Marshall, P.N., Galbrait, W., Bacus, J.W. (1979), Anal. Quant. Cytology, 1, 169–178.  
Baker, J.R. (1962), Quart. J. Micr. Sci., 103, 493–517.  
Boon, M.E., Drijver, J.S., Routine Cytological staining techniques, 1st. ed (1986)  
CLSI Guidelines and Standards, CLSI, Wayne, P.A

## QUIMICA CLINICA APLICADA S.A.

Empresa Certificada ISO 9001 / ISO 13485

A 7 Km 1081 – P.O. Box 20 - E43870 AMPOSTA / ESPANHA

Tel. ++ 34 (977) 70. 62. 30 Fax ++ 34 (977) 70. 30. 40

Revisão: 02.2017

PRO4\_REG9\_HEMATOX\_4



# HÉMATOXYLINE POUR HISTOCYTOLOGIE

Pour diagnostic in vitro

## PRINCIPE

Le test de Papanicolaou, qui doit son nom au Dr Georgios Papanicolaou, pionnier de la recherche cytologique et sur le cancer, est réalisé pour diagnostiquer le cancer du col de l'utérus et d'autres organes. Il permet de détecter des changements dans les cellules qui peuvent être des signes précurseurs du cancer. Dans cette technique, la première étape est la coloration des noyaux à l'aide d'hématoxylines. La deuxième étape est la coloration des cytoplasmes à l'aide d'une solution orangée, qui colore les cellules matures et kératinisées avec différentes intensités. La troisième étape emploie la solution appelée solution polychrome, qui est un mélange d'éosine, de vert lumière SF et de brun de Bismarck. La solution polychrome permet de différencier l'épithélium pavimenteux simple. La coloration à l'hématoxyline-éosine est la plus employée en histologie.

Les colorants à l'hématoxyline sont essentiellement formés de vernis métalliques d'hématoxyline oxydée avec des ions bivalents et trivalents. Le mécanisme de coloration est constitué d'unions covalentes du complexe métal-hématoxyline avec les radicaux anioniques du tissu. En ce qui concerne le matériau du noyau, les groupes anioniques de l'acide phosphorique de l'ADN sont susceptibles d'intervenir dans la réaction. Le caractère sélectif de la coloration augmente avec le milieu acide du colorant, car il rend plus difficile la coloration d'éléments à caractère amphotère, comme par exemple les acides aminés des protéines. Les noyaux apparaissent bleu à violet foncé.

Avec l'hématoxyline, il est possible de réaliser une coloration progressive et régressive. En cas de coloration régressive, les structures du noyau apparaissent plus différenciées et sont plus facilement visibles.

## UTILITÉ DIAGNOSTIQUE

Pour la coloration des noyaux en histocytologie.

## RÉACTIFS

### Hématoxyline de Harris

1 x 500 mL	Réf. 99 22 32
1 x 1 000 mL	Réf. 99 59 60
1 x 5 000 mL	Réf. 99 12 97

#### Composition

Hématoxyline, CI n° 75 290	0,5 %
Sulfate d'aluminium	6 %
Éthylène glycol	15 %

### Hématoxyline de Carazzi

1 x 1 000 mL	Réf. 99 16 43
1 x 5 000 mL	Réf. 99 41 75

#### Composition

Hématoxyline, CI n° 75 290	0,1 %
Sulfate d'aluminium/Potassium	6 %
Glycérine	20 %

### Hématoxyline de Mayer

1 x 1 000 mL	Réf. 99 77 50
1 x 5 000 mL	Réf. 99 06 38

#### Composition

Hématoxyline, CI n° 75 290	0,5 %
Sulfate d'aluminium et d'ammonium	5 %
Glycérine	30 %

## PRÉPARATION DU RÉACTIF DE TRAVAIL :

Le colorant est prêt à l'emploi.

## CONSERVATION ET STABILITÉ

Conservés à une température comprise entre 15 et 30 °C et à l'abri de la lumière, les réactifs restent stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Les emballages doivent toujours rester bien fermés.

Un léger précipité peut apparaître dans les réactifs avec le temps, mais cela n'affecte pas la fonctionnalité du produit. Il est conseillé de filtrer le colorant avant utilisation.

## MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

Matériel utilisé habituellement en laboratoire d'anatomo-pathologie

Colorant pour coloration des cytoplasmes : Colorants EA 50 ou EA 36 ou EA 65, Orange G 6, éosine alcoolisée ou aqueuse à 1 %

Éthanol, à différentes concentrations.

Xylène ou substitut au xylène

Moyen de montage

Microscope

## PRÉCAUTIONS

Les produits sont destinés à un usage professionnel. Tous les réactifs doivent être manipulés avec précaution par le personnel technique formé. Il est conseillé de consulter la fiche des données de sécurité avant utilisation.

L'élimination des déchets doit être réalisée conformément aux réglementations locales en vigueur.

## ÉCHANTILLON

Échantillons cytologiques de différentes origines : gynécologiques, expectorations, liquides de biopsies.

Échantillons histologiques.

La manipulation des échantillons doit être réalisée en accord avec les protocoles établis au sein de chaque laboratoire pour la préparation d'échantillons à colorer par la méthode de Papanicolaou ou avec la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine.

Manipuler les échantillons avec précaution car ils sont potentiellement infectieux.

## CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Il est recommandé de suivre les pratiques de contrôle de la qualité établies par le CLSI (anciennement NCCLS).

Pour chaque série de colorations, les contrôles adaptés doivent être réalisés pour éviter des résultats incorrects.

## PROCÉDURE

### COLORATION DE PAPANICOLAOU

1. Les frottis fixés par pulvérisation doivent être immergés dans l'eau pendant 5 à 10 minutes pour que la carboxyméthylcellulose (CMC) qu'ils contiennent se dissolve complètement.
2. Immersion pendant 1 minute dans l'hématoxyline de Harris
3. Lavage à l'eau pendant 15 s
4. Lavage à l'éthanol-HCl (0,25 %) pendant 10 s
5. Lavage à l'eau pendant 15 s
6. Lavage à l'eau ammoniacale (0,05 % de teneur en NH<sub>3</sub>) pendant 5 s
7. Lavage à l'eau pendant 15 s
8. Immersion dans l'éthanol à 96° pendant 10 s (deux fois, différent conteneur)
9. Immersion dans le colorant OG-6 pendant 3 minutes
10. Lavage à l'éthanol à 96° pendant 15 s (deux fois, différent conteneur)
11. Immersion dans le colorant EA 50 ou EA 36 ou EA 65 pendant 3 minutes
12. Lavage à l'éthanol à 96° pendant 15 s (deux fois, différent conteneur)
13. Immersion dans l'éthanol absolu pendant 15 s (2 fois, différent conteneur)
14. Immersion dans l'éthanol/xylol (50 %) pendant 15 s
15. Immersion dans le xylol pendant 15 s
16. Immersion dans le xylol pendant 2 minutes
17. Monter la préparation

### COLORATION HÉMATOXYLINE-ÉOSINE

1. Déparaffiner la préparation.
2. Après la dernière immersion dans l'éthanol, laver à l'eau distillée pendant 1 minute
3. Immersion pendant 8 minutes dans l'hématoxyline
4. Lavage à l'eau pendant 1 minute
5. Lavage à l'éthanol-HCl (0,5 %) pendant 13 s
6. Lavage à l'eau pendant 15 s
7. Lavage à l'eau ammoniacale (0,05 % de teneur en NH<sub>3</sub>) pendant 30 s
8. Lavage à l'eau pendant 1 minute
9. Immersion pendant 30 secondes dans l'éosine à 1 %
10. Immersion dans l'éthanol à 96° pendant 6 s (deux fois, différent conteneur)
11. Immersion dans l'éthanol absolu pendant 6 s (trois fois, différent conteneur)
12. Immersion dans le xylol/eucalyptol pendant 6 s (deux fois, différent conteneur)
13. Monter la préparation

### COLORATION HÉMATOXYLINE DE MAYER-ÉOSINE

1. Déparaffiner la préparation.
2. Après la dernière immersion dans l'éthanol, laver à l'eau distillée pendant 5 minutes
3. Immersion pendant 10 minutes dans l'hématoxyline de Mayer
4. Lavage à l'eau pendant 5 minutes
5. Immersion pendant 2 minutes dans l'éosine alcoolisée à 1 %
6. Immersion dans l'éthanol à 96° pendant 10 à 15 s (deux fois, différent conteneur)
7. Immersion dans l'éthanol absolu pendant 10 à 15 s (deux fois, différent conteneur)
8. Immersion dans le xylol (trois fois, différent conteneur)
9. Monter la préparation

## RÉSULTATS

Noyaux : bleu-violet

Cytoplasme acidophile : rougeâtre

Cytoplasme basophile : bleu

Cytoplasme kératinisé : orangé

## REMARQUES

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la durée de la coloration. Pour obtenir des résultats optimaux, le colorant doit être préservé de l'humidité.

Chaque utilisateur peut appliquer les différentes variantes de cette procédure, manuelles ou automatiques, adaptées à sa méthode standard.

## BIBLIOGRAPHIE

Marshall, P.N., Galbrait, W., Bacus, J.W., (1979). Anal. Quant. Cytology, 1, 169-178.

Baker, J.R., (1962), Quart. J. Micr. Sci., 103, 493-517.

Boon, M.E., Drijver, J.S., Routine Cytological staining techniques, 1st. ed (1986)

CLSI Guidelines and Standards, CLSI, Wayne, P.A