

USO PREVISTO

La soluzione di ematosilina di Mayer è comunemente utilizzata come colorazione di contrasto nelle procedure di immunocitochimica e di citochimica. Può inoltre essere impiegata per la colorazione standard con ematosilina ed eosina, anche se è utilizzata più frequentemente per le procedure in cui la differenziazione tramite alcol acido, o l'esposizione all'alcol, potrebbe distruggere il componente citoplasmatico colorato.³ La formulazione della soluzione di ematosilina di Mayer non prevede l'uso di alcol, pertanto non causa la dissoluzione di sostanze quali l'AEC (3-amino-9-etilcarbazoletolo), la fosfatasi alcalina/il cromogeno Fast Red o altri prodotti colorati solubili. Le soluzioni di ematosilina di Mayer sono riservate al solo uso "diagnostico in vitro".

L'ematossilina è una comune colorazione nucleare, che viene isolata da un estratto di legno azzurro (Haematoxylin campechianum).¹ La prima applicazione biologica dell'ematossilina venne proposta da Bohmer¹ nel 1865. Mayer presentò la sua formulazione nel 1903.² Da allora ne sono state utilizzate svariate formulazioni, le più importanti delle quali sono state descritte da Harris, Gill, Mayer e Weigert. Prima di poter utilizzare l'ematossilina per la colorazione nucleare, è necessario trasformarla mediante ossidazione in emateina e combinarla con uno ione metallico (mordente). I mordenti più adatti sono risultati i sali di alluminio o ferro.

In genere le soluzioni di ematosilina sono classificate come progressive o regressive sulla base della concentrazione di colorante. Le colorazioni progressive (ad esempio, l'ematossilina di Mayer) hanno una concentrazione più bassa di colorante e colorano selettivamente la cromatina nucleare senza intaccare le strutture citoplasmatiche. L'intensità desiderata è in funzione del tempo. Se i tempi di colorazione sono eccessivamente prolungati, è possibile che la colorazione progressiva si comporti in modo simile a una soluzione di colorazione regressiva. La colorazione regressiva in genere richiede più tempo di quella regressiva. Le colorazioni regressive (ad esempio, l'ematossilina di Harris) agiscono in modo intenso su tutte le sezioni di tessuto colorabili (nucleari e citoplasmatiche). Per ottenere il risultato desiderato, occorre rimuovere il colorante in eccesso dalla sezione di tessuto. Dopo un'adeguata differenziazione, sulla sezione decolorata sarà visibile la colorazione nucleare, mentre le strutture citoplasmatiche non risulteranno colorate.

Il passaggio finale nella colorazione con ematosilina è l'applicazione del blu alla sezione di tessuto. Inizialmente le sezioni di tessuto sono di colore viola o rosso-violetto. Dopo l'esposizione alle soluzioni alcaline (acqua corrente calda [se leggermente alcalina], soluzione acquosa di ammoniaca diluita, acqua di Scott tampone o carbonato di litio), la sezione di tessuto assume la caratteristica colorazione blu dei vetrini colorati con l'ematossilina.

REAGENTE

SOLUZIONE EMATOSSILINA DI MAYER, n. di catalogo MHS
Ematosilina certificata (1,0 g/l); iodato di sodio (0,2 g/l); solfato di alluminio e ammonio 12 H₂O (50 g/l); idrato di cloro (50 g/l) e acido citrico (1 g/l).

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare il reagente a temperatura ambiente (18–26°C) e al riparo dalla luce. Il reagente si mantiene stabile sino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Non riporre la soluzione già usata nel flacone aperto.

DETERIORAMENTO

Scartare se i tempi di colorazione diventano eccessivi o se la soluzione assume una colorazione marrone.

PREPARAZIONE

Filtrare la soluzione di ematosilina di Mayer prima di ogni uso. A questo punto la soluzione è pronta per l'uso.

PRECAUZIONI

Seguire le normali precauzioni adottate per i reagenti di laboratorio. Smaltire i rifiuti in conformità alle normative vigenti a livello locale, regionale o nazionale. Fare riferimento al foglio dati relativo alla sicurezza dei materiali per informazioni aggiornate riguardanti i rischi, i pericoli e la sicurezza associati all'uso di questi prodotti.

Dichiarazioni sui rischi e la sicurezza (U.S.A.)

La soluzione di ematosilina di Mayer è TOSSICA. Tossica per ingestione. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti e guanti adeguatamente protettivi. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile). Organi colpiti: nervi e fegato.

L'alcol anidro è INFIAMMABILE e IRRITANTE. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Mantenere i contenitori ben chiusi. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei.

Acqua di Scott tampone. Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

L'eosina in soluzione alcolica è INFIAMMABILE E NOCIVA. Nociva per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Nociva: possibile rischio di effetti irreversibili per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. Indossare indumenti e guanti adeguatamente protettivi. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile).

Eosina in soluzione acquosa. Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

Lo xilene è INFIAMMABILE e NOCIVO. Possibile rischio di riduzione della fertilità. Può provocare danni al feto. Nocivo per inalazione e a contatto con la cute. Irritante per il sistema respiratorio e la cute. Rischio di gravi lesioni oculari. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile).

Dichiarazioni sui rischi e la sicurezza (U.E.)

La soluzione di ematosilina di Mayer è NOCIVA. Nociva per ingestione.

L'alcol anidro è FACILMENTE INFIAMMABILE e IRRITANTE. Facilmente infiammabile. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Mantenere i contenitori ben chiusi. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei.

Acqua di Scott tampone. Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

L'eosina in soluzione alcolica è FACILMENTE INFIAMMABILE e NOCIVA. Facilmente infiammabile. Nociva per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Nociva: possibile rischio di effetti irreversibili per inalazione, a contatto con la cute o per ingestione. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. Indossare indumenti e guanti adeguatamente protettivi. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile).

Eosina in soluzione acquosa. Attenzione: sostanza non ancora pienamente testata.

Lo xilene è NOCIVO. Infiammabile. Nocivo per inalazione e a contatto con la cute. Irritante per la cute. Evitare il contatto con gli occhi.

PROCEDURA

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Per la raccolta dei campioni, attenersi alla procedura descritta nel documento NCCLS numero M29-A2. Nessun metodo di analisi noto garantisce con assoluta certezza che i campioni di sangue o il tessuto non trasmettano infezioni. Di conseguenza tutti i derivati del sangue e i campioni di tessuto devono essere considerati potenziali veicoli di infezioni.

Le pubblicazioni classiche di istologia forniscono informazioni sull'raccolta e la conservazione dei campioni.^{4,5}

MATERIALI SPECIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Colorazioni di contrasto in soluzione di Eosina Y:

Alcolica, n. di catalogo HT110-1; Acquosa, n. di catalogo HT110-2; Alcolica con floxina, n. di catalogo HT110-3

Alcol anidro OPPURE Etanolo al 100%

Acqua di Scott tampone concentrato, n. di catalogo S 5134

Xilene o un sostituto dello xilene

Microscopio, vetrini per microscopio, vetrini coprioggetti e piatti di colorazione

NOTE

1. I tempi suggeriti nel foglietto illustrativo sono approssimativi e possono essere variati in base alle proprie esigenze specifiche. Se sono utilizzate in modo intenso, le soluzioni per la colorazione possono perdere le loro proprietà coloranti, pertanto è necessario prolungare i tempi di colorazione oppure sostituire le soluzioni con prodotti nuovi.⁶
2. È possibile ricorrere ad altre soluzioni alcaline diluite invece dell'acqua corrente calda. In questo modo è possibile ridurre i tempi della procedura di colorazione. Se si utilizza una soluzione alcalina diluita, prolungare il risciacquo dei vetrini in acqua corrente per altri 2–3 minuti prima di procedere alla colorazione con eosina.
3. Alcuni impianti idraulici erogano acqua acida, inadatta all'uso per la parte della procedura relativa alla colorazione blu. Se l'acqua è acida, utilizzare una soluzione alcalina diluita.
4. La presenza di nuclei violacei o rosso-marroni indica una colorazione blu insoddisfacente.
5. Se la colorazione con eosina è eccessiva, la colorazione nucleare può risultare mascherata. Se eseguita correttamente, la colorazione con eosina mostra un effetto a 3 tonalità. Per incrementare la differenziazione dell'eosina, prolungare i tempi di immersione in alcol oppure utilizzare un primo alcol con un maggiore contenuto d'acqua. È possibile regolare i tempi di immersione in alcol per ottenere una colorazione con eosina adeguata.
6. Ogni giorno filtrare la soluzione di lavoro per la colorazione e alternare l'uso degli alcol e dello xilene/sostituto dello xilene.
7. Quando le soluzioni di ematosilina di Mayer o di eosina sono quasi esaurite, si sconsiglia di rabboccarne il livello con la soluzione madre.
8. Evitare un trascinarsi eccessivo (carry-over) di acqua nell'ematossilina di Mayer.
9. Includere vetrini di controllo positivi in ogni seduta.
10. I dati generati da questa procedura sono da utilizzarsi soltanto a sostegno della diagnosi e devono essere valutati congiuntamente ad altri esami e dati diagnostici.

PROCEDURA 1:

COLORAZIONE CON EMATOSSILINA ED EOSINA

1. Preparare una soluzione con alcol al 95% aggiungendo 5 ml di acqua deionizzata a 95 ml di alcol anidro (n. di catalogo R 8382) o di etanolo al 100%.
2. Deparaffinare ad acqua o fissare e idratare le sezioni congelate.
3. Colorare in una soluzione di ematosilina di Mayer15 minuti
4. Sciacquare in acqua corrente calda15 minuti
5. Immergere in acqua distillata30 secondi
6. Se è necessario utilizzare eosina alcolica:
Immergere in alcol anidro al 95%30 secondi

7. Immergere nella colorazione di contrasto in soluzione di eosina Y:
Alcolica, n. di catalogo HT110-1
Acquosa, n. di catalogo HT110-2
o Alcolica con floxina, n. di catalogo HT110-3.....30-60 secondi
8. Disidratare e chiarificare mediante due ricambi ciascuno di
Alcol anidro al 95%, alcol anidro assoluto e xilene2 minuti cad.
9. Montare con un mezzo di montaggio resinoso.

PROCEDURA 2:

COLORAZIONE DI CONTRASTO NUCLEARE PER USI SPECIALI

1. Portare a termine l'intera procedura di colorazione.
2. Sciacquare in acqua deionizzata.
3. Colorare in una soluzione ematosilina di Mayer per 1-5 minuti.
4. Sciacquare in acqua corrente o in una soluzione alcalina diluita finché i nuclei non diventano blu.
5. Sciacquare in acqua deionizzata.
6. Se sono presenti porzioni di colorazione solubili in alcol, montare su un mezzo di montaggio acquoso. Se la colorazione è insolubile in alcol, disidratare in alcol, chiarificare in xilene/sostituto dello xilene e montare su un mezzo di montaggio resinoso.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

RISULTATI PREVISTI

La cromatina nucleare deve apparire blu. I nucleoli devono essere visibili. Il citoplasma assumerà varie tonalità tra il rosa e il rosa-arancio, a seconda della colorazione di contrasto utilizzata, mentre gli eritrociti appariranno rossi.

Se i risultati osservati si discostano dai risultati attesi, contattare l'assistenza tecnica Sigma-Aldrich per informazioni di supporto.

BIBLIOGRAFIA

1. Conn's Biological Stains, 9th ed., RD Lillie, Editor, Williams and Wilkins Co., Baltimore (MD), pp 468, 472, 1977
2. Mayer P, (1903) Notiz über Hämäteïn und Hämalaun. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik, 20, 409
3. Theory and Practice of Histological Techniques, 2nd ed., Bancroft JD and Stevens A, Editors, Churchill Livingstone, New York (NY), page 111, 1982
4. Theory and Practice of Histotechnology, 2nd ed., Sheehan DC, Hrapchak BB, Editors, CV Mosby Co, St Louis (MO) 1980
5. Laboratory Methods in Histotechnology of the Armed Forces Institute of Pathology, 4th ed., Prophet EB, Mills B, Arrington JB and Sobin LH, Editors, American Registry of Pathology, Washington DC 1992
6. Theory and Practice of Histological Techniques, Edited by Bancroft JD and Gamble, M, Churchill Livingstone, New York, 2002, p129

Sigma-Aldrich, Inc. garantisce che i propri prodotti sono conformi alle informazioni contenute nel presente documento e in altre pubblicazioni Sigma-Aldrich. Spetta all'acquirente stabilire se i prodotti sono idonei all'uso particolare che ne viene fatto. È possibile che sussistano ulteriori termini e condizioni. Vedere il retro della fattura o la distinta di imballaggio per i termini e le condizioni di vendita.

Procedura n. MHS
Revisione precedente: 2003-05
Revisione: 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham TW20 9BD (Regno Unito)

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (USA) +1 314 771 5765

Assistenza tecnica: a carico del destinatario +1 314 771 3122

o tramite e-mail all'indirizzo clintech@sial.com

Per ordinare: a carico del destinatario +1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

P.O. 1120, 89552 Steinheim (Germania) 49-7329-970