

1.05175.0500
1.05175.1000
1.05175.2500

Mikroskopie

Hämatoxylinlösung modifiziert nach Gill II



Prinzip

Färbelösungen und Farbstoffe für die zytologischen Krebs- und Zyklusdiagnostik

Die Papanicolaous Färbung ist die meist genutzte Färbemethode für zytologisches Material. Im ersten Schritt werden die Kerne mit einer Hämatoxylinlösung gefärbt. Die Kerne erscheinen blau, dunkelviolett bis schwarz. Der zweite Schritt ist die Zytoplasmafärbung mit einer Orangefärbelösung, die besonders die reifen und verhornten Zellen darstellt. Die Zielstrukturen werden in unterschiedlichen Intensitäten orange gefärbt. Im dritten Färbeschritt wird die sogenannte Polychromlösung verwendet, die eine Mischung aus Eosin, Lichtgrün SF und Bismarckbraun ist. Mit der Polychromlösung wird die Differenzierung des Plattenepithels dargestellt.

Anwendung

Die Hämatoxylin Farbstoffe werden mit dreiwertigen Metallsalzen gemischt und bilden die sogenannten Hämatoxylinlacke, die selektiv zur Anfärbung der Kerne (DNA) genutzt werden. Hämatoxylin oder besser Hämatein bildet mit den jeweiligen Metallionen der Alaune (Aluminium, Eisen oder Chrom) Komplexverbindungen, Chelatverbindungen, die im sauren Milieu verwendet werden und die die charakteristische blaue Farbe durch Spülen in Leitungswasser, dem sogenannten Bläuen, ergeben. Dieser Schritt fixiert zugleich die Farbe an den Zielstrukturen. Man unterscheidet progressive Hämatoxylinfärbung, bei der bis zum Endpunkt gefärbt wird und dann im Leitungswasser gebläut und haltbar gemacht wird. Bei der regressiven Methode wird mit Hämatoxylin überfärbt, der Überschuss an Farbe wird in sauren Differenzierschritten wieder entfernt. Auch hier wird mit Leitungswasser gebläut und die Färbung haltbar gemacht. Bei der regressiven Färbung erscheinen die Kernstrukturen differenzierter und sind besser sichtbar.

Material

Gynäkologische und nicht-gynäkologische Proben wie Sputum, Urin, FNAB, Ergüsse, Spülflüssigkeiten

Fixierung

Sofortige Feuchtfixierung mit dem Sprayfixativ Merckofix® oder sofortige Feuchtfixierung in 96% Ethanol für mindestens 30 min.

Reagenzien

| | | |
|-----------------|---|--------------------|
| Art. Nr. 109253 | Papanicolaous Lösung 1a, Harris Hämatoxylinlösung | 500 ml, 1 l, 2,5 l |
| Art. Nr. 109254 | Papanicolaous Lösung 1 b, Hämatoxylinlösung S | 500 ml, 1 l, 2,5 l |
| Art. Nr. 105175 | Hämatoxylinlösung nach Gill II, | 500 ml, 2,5 l |
| Art. Nr. 115938 | Hämatoxylin-Monohydrat (C.I. 75290) für die Mikroskopie Certistain® | 25 g, 100 g |
| Art. Nr. 104302 | Hämatoxylin krist. (C.I. 75290) für die Mikroskopie | 25 g, 100 g |
| Art. Nr. 111487 | Hämatein (C.I. 75290) für die Mikroskopie | 25 g |
| Art. Nr. 100983 | Ethanol absolut zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur | 1 l |
| Art. Nr. 101047 | Kaliumaluminiumsulfat p.a. | 1 kg |
| Art. Nr. 100063 | Essigsäure 100% (Eisessig) p.a. | 1 l |
| Art. Nr. 106525 | Natriumiodat p.a. | 100 g |
| Art. Nr. 101102 | Aluminiumsulfat extra rein | 5 kg |
| Art. Nr. 109621 | Ethylenglykol p.a. | 1 l |
| Art. Nr. 159681 | Thymol Reag Ph Eur | 5 g |

Zusätzlich erforderlich

| | | |
|-----------------|--|--------------------|
| Art. Nr. 106888 | Papanicolaous Lösung 2 a, Orange G Lösung | 500 ml, 1 l, 2,5 l |
| Art. Nr. 106887 | Papanicolaous Lösung 2 b, Orange II Lösung | 500 ml, 2,5 l |

| | | |
|-----------------|--|--------------------|
| Art. Nr. 109271 | Papanicolaous Lösung 3a, Polychromlösung EA 31 | 500 ml, 2,5 l |
| Art. Nr. 109272 | Papanicolaous Lösung 3b, Polychromlösung EA 50 | 500 ml, 1 l, 2,5 l |
| Art. Nr. 109270 | Papanicolaous Lösung 3c, Polychromlösung EA 65 | 100 ml |
| Art. Nr. 109269 | Papanicolaous Lösung 3d, Polychromlösung EA 65 | 100 ml, 2,5 l |

Vorbereitung

1. Hämatoxylinlösung nach Harris

5 g Hämatoxylin Certistain® oder krist. in 50 ml Ethanol unter Erwärmen im Wasserbad lösen. 100 g Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun) in 950 ml Aqua dest. unter Rühren und Erwärmen lösen.

In die noch heiße Alaunlösung die Hämatoxylinlösung unter ständigem Rühren eingießen und aufkochen lassen. Die Lösung von der Wärmequelle nehmen. 370 mg Natriumiodat unter Rühren zugeben und im Wasserbad rasch abkühlen. 4 ml Eisessig zugeben. In gut verschließbare Flaschen filtrieren. Vor Gebrauch filtrieren.

2. Hämatoxylinlösung nach Gill

2 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumiodat und 17,6 g Aluminiumsulfat (x18H₂O) in einer Lösung aus 250 g Ethylenglykol und 730 ml Aqua dest. lösen. 20 ml Eisessig zugeben. Eine Stunde bei Raumtemperatur rühren. Vor Gebrauch filtrieren.

3. Hämateinlösung

1 g Hämatein in 50 ml 96%igem Ethanol unter Erwärmen lösen. 50 g Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun) in 1 l Aqua dest. lösen. Beide Lösungen mischen und etwas Thymol zufügen. Zur Stabilisierung können bis zu 0.1% Eisessig zugegeben werden. Vor Gebrauch filtrieren.

4. 0.1% wässrige HCl Lösung

27.5 ml HCl 1 N, auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen.

5. Natriumhydrogencarbonatlösung 1.5%

15g NaHCO₃ in 1 l Aqua dest. lösen.

Durchführung

Manuelle Färbung - progressiv:

1. Waschen mit 96 % Alkohol*.
2. Waschen mit 80 % Alkohol*.
3. Waschen mit 70% Alkohol*.
4. Waschen mit 50 % Alkohol*.
*Wenn Merckofix® verwendet wird, entfallen die Schritte 1 – 4
5. Waschen mit Aqua dest.
6. Färben in Hämatoxylinlösung

Harris Hämatoxylinlösung 3 min, Hämatoxylinlösung S 2-3 min, Hämatoxylinlösung nach Gill 2-5 min, Hämateinlösung 5 min

7. Spülen in fließendem Leitungswasser 3-5 min
8. Waschen mit 70 % Alkohol
9. Waschen mit 80 % Alkohol
10. Waschen mit 96 % Alkohol.
11. Färben in Orange G Lösung oder Orange II Lösung 3 min
12. Waschen mit 96 % Alkohol
13. Waschen mit 96 % Alkohol
14. Färben in Polychromlösung EA 31 oder EA 50 3 min
15. Entwässern mit 96 % Alkohol
16. Entwässern mit 96 % Alkohol
17. Entwässern mit absolutem Alkohol 5 min
18. Entwässern mit gleichen Teilen absolutem Alkohol und Neo-Clear® oder Xylol
19. Klären mit Neo-Clear® oder Xylol
20. Klären mit Neo-Clear® oder Xylol 2 min

Eindecken mit Neo-Mount® (für Neo-Clear®) oder Entellan® Neu (für Xylol).

Manuelle Färbung - regressiv:

1. Waschen mit 96 % Alkohol*.
 2. Waschen mit 80 % Alkohol*.
 3. Waschen mit 70% Alkohol*.
 4. Waschen mit 50 % Alkohol*.
*Wenn Merckofix® verwendet wird, entfallen die Schritte 1 – 4
 5. Waschen mit Aqua dest.
 6. Färben in Hämatoxylinlösung
- Harris Hämatoxylinlösung 6 min, Hämatoxylinlösung S 5 min ,
Hämatoxylinlösung nach Gill 5 min, Hämatoxylinlösung 6 min
7. Spülen in Aqua dest. 10 sec
 8. Spülen in HCl 0,1% 10 sec
 9. Spülen in Aqua dest. 10 sec
 10. Spülen in Natriumhydrogencarbonatlösung 1,5% 1 min
 11. Spülen in fließendem Leitungswasser 3 min
 12. Waschen mit 70 % Alkohol
 13. Waschen mit 80 % Alkohol
 14. Waschen mit 96 % Alkohol.
 15. Färben in Orange G Lösung oder Orange II Lösung 3 min
 16. Waschen mit 96 % Alkohol
 17. Waschen mit 96 % Alkohol
 18. Färben in Polychromlösung EA 31oder EA 50 3 min
 19. Entwässern mit 96 % Alkohol
 20. Entwässern mit 96 % Alkohol
 21. Entwässern mit absolutem Alkohol 5 min
 22. Entwässern mit gleichen Teilen absolutem Alkohol und Neo-Clear® oder Xylol
 23. Klären mit Neo-Clear® oder Xylol
 24. Klären mit Neo-Clear® oder Xylol 2 min

Eindecken mit Neo-Mount® (für Neo-Clear®) oder Entellan® Neu (für Xylol)

Resultat

| Färbung mit | 3a/EA 31 | 3b/EA 50 | 3c/EA 65 | 3d/EA 65 |
|------------------------|----------------|--------------|----------|---------------|
| Zytoplasma | | | | |
| Cyanophil (basophil) | intensiv grün | blaugrün | hellrot | zart blaugrün |
| Eosinophil (acidophil) | rosa | rosa | rot | rosa |
| Verhornt | rosa-orange | rosa-orange | braunrot | rosa-orange |
| Erythrozyten | rot | rot | braunrot | rot |
| Kerne | blau, schwarz, | dunkelviolet | | |
| Mikroorganismen | blau, schwarz, | dunkelviolet | | |
| Trichomonaden | blau, schwarz, | dunkelviolet | | |

Technischer Hinweis

Das verwendete Mikroskop sollte den Anforderungen eines medizinisch-diagnostischen Labors entsprechen.
Die Gebrauchsanweisung für das Fixiermittel ist zu befolgen.
Die zur Papanicolaous Färbung verwendeten Färbelösungen sind gebrauchsfertig, das Verdünnen der Lösungen ist nicht notwendig, mindert das Färberegebnis und die Haltbarkeit.
Bei Lagertemperaturen unter +15°C kann es bei den Lösungen zu Farbstoffausfällungen kommen. Die Farbstofflösungen sollten dann für 2-3 Stunden in ein Wasserbad mit ca. 60°C gestellt und vor Gebrauch filtriert werden.
Wird ein Färbeautomat verwendet, sind die Bedienungsanweisung des Geräte- und Softwareherstellers zu beachten.
Überschüssiges Immersionsöl ist vor dem Archivieren zu entfernen.

Präparation der Proben

Alle Proben sind entsprechend dem Stand der Technik zu behandeln.
Alle Proben sind eindeutig zu kennzeichnen.
Geeignete Instrumente sind zur Probenentnahme und bei der Präparation zu verwenden, die Anweisungen des Herstellers für die Anwendung/ den Gebrauch sind zu befolgen.

Diagnostik

Diagnosen sind nur von autorisierten und geschulten Personen zu erstellen.
Gültige Nomenklaturen sind anzuwenden. Geeignete Kontrollen sollten bei jeder Anwendung mitgeführt werden, um ein fehlerhaftes Ergebnis auszuschließen.
Weiterführende Tests sind nach anerkannten Methoden auszuwählen und durchzuführen.

Lagerung

Die Färbelösungen /die Farbstoffe bei +15°C bis +25°C/+5°C bis +30°C lagern.
Die Lösungen und Farbstoffe sind bis zum angegebenen Verfallsdatum zu verwenden.

Haltbarkeit

Nach dem ersten Öffnen der Flasche bei +15°C bis +25°C /+5°C bis +30°C aufbewahrt bis zum Verfallsdatum verwendbar.
Die Flaschen sind stets gut geschlossen zu halten.
Wärmeeinwirkung vermeiden.

Gebrauchshinweise

Um Fehler zu vermeiden, ist die Färbung von Fachpersonal durchzuführen.
Nur für professionelle Anwendung.
Nationale Richtlinien für Arbeitssicherheit und Qualitätssicherung sind zu befolgen.
Entsprechend dem Standard ausgestattete Mikroskope sind zu verwenden.

Infektionsschutz

Auf wirksamen Infektionsschutz entsprechend der Laborrichtlinien ist unbedingt zu achten.

Entsorgungshinweise

Die Packung ist entsprechend der gültigen Entsorgungsrichtlinien zu entsorgen.
Gebrauchte Lösungen und Lösungen mit abgelaufener Haltbarkeit sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen, dabei ist den lokalen Entsorgungsrichtlinien zu folgen. Hinweise zur Entsorgung können unter dem Quick Link „Entsorgungshinweise für Mikroskopie-Produkte“ auf www.Mikroskopie-Produkte.com angefordert werden. Innerhalb der EU gilt die VERORDNUNG (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG), Nr. 1907/2006.

Hilfsreagenzien

| | | |
|-----------------|--|----------------|
| Art. Nr. 103981 | Merckofix® | 100 ml |
| Art. Nr. 104699 | Immersionöl | 100 ml, 500 ml |
| Art. Nr. 115577 | Immersionöl nach ISO 8036 modifiziert | 100 ml |
| Art. Nr. 106965 | Zedernholzöl | 100 ml, 500 ml |
| Art. Nr. 107961 | Entellan® Neu | 100 ml, 500 ml |
| Art. Nr. 109016 | Neo-Mount® | 500 ml |
| Art. Nr. 109843 | Neo-Clear® (Xylol Ersatz) | 5 l |
| Art. Nr. 100974 | Ethanol vergällt mit 1% Ethylmethylketon zur Analyse EMSURE® | 1l, 2,5l |
| Art. Nr. 108681 | Xylol zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur | 1l, 2,5 l |

GefahrstoffEinstufung

Art. Nr. 109253, Art. Nr. 109254, Art. Nr. 105175
Art. Nr. 115938, Art. Nr. 104302, Art. Nr. 111487
Die GefahrstoffEinstufung auf dem Etikett und die Angaben im Sicherheitsdatenblatt beachten.
Das Merck Sicherheitsdatenblatt ist erhältlich im Internet und auf Anfrage.

Hauptbestandteile der Produkte

| | |
|---|---------|
| Art. Nr. 109253 | |
| C.I. 75290 | 5,3 g/l |
| Al ₂ (SO ₄) ₃ x 18 H ₂ O | 67 g/l |
| 1l = | 1,04 kg |
| Art. Nr. 109254 | |
| C.I. 75290 | 6,0 g/l |
| Al ₂ (SO ₄) ₃ x 18 H ₂ O | 42 g/l |

$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 1.3 g/l
1 l = 1,05 kg

Art. Nr. 105175
C.I. 75290 2.0 g/l
 $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ 34 g/l
 CH_3COOH ≤ 16 g/l
pH $\approx 2,5$

Art. Nr. 115938
C.I. 75290
 $C_{16}H_{14}O_6 \cdot H_2O$
M = 320,29 g/mol
Farbstoffgehalt ≥ 95 %

Art. Nr. 104302
C.I. 75290
 $C_{16}H_{14}O_6$
M = 302,29 g/mol
Trocknungsverlust max. 10 %

Art. Nr. 111487
C.I. 75290
 $C_{16}H_{12}O_6$
M = 300,27 g/mol
Trocknungsverlust max. 12 %

Status: Juni 2014

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Tel. +49(0)6151 72-2440
www.microscopy-products.com

EMD Millipore Corporation, 290 Concord Road, Billerica,
MA 01821, USA, Tel. +1-978-715-4321

