

# ALCIAN BLUE-P.A.S. KOMPLET

IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod CE

## Komplet od sedam reagensa za dokazivanje kiselih mukopolisaharida prema Mowryju UPUTA ZA RUKOVANJE

REF Kataloški broj: AB-100T (za 100 testiranja)

AB-K-100 (7 x 100 mL)

AB-K-500 (7 x 500 mL)

### Uvod

Jedna od najčešće korištenih kemijskih metoda u histologiji je P.A.S. bojenje. U kombinaciji s Alcian Blue pH 2,5 otopinom na jednom preparatu moguće je diferencirati neutralne i kisele mucine, glikogen i glikoproteine. Alcian Blue boja boji kisele mucine koji postanu netopivi i otporni na preostale reagens P.A.S. postupka bojenja. Oksidirajuće djelovanje perjodne kiseline omogućuje karakteristično purpurno (magenta) obojenje u kombinaciji sa BioSchiff reagensom. Jezgre se oboje Hematoksilinom ML (Mayer-Lillie) koji ne interferira s Alcian Blue bojom.

### Opis proizvoda

- ALCIAN BLUE-P.A.S. KOMPLET – Komplet za bojenje neutralnih i kiselih mucina te glikogena i glikoproteina.

Komplet sadrži:	100 testiranja (AB-100T)	7 x 100 mL (AB-K-100)	7 x 500 mL (AB-K-500)
Alcian Blue otopina pH 2,5	30 mL (AB2-OT-30)	100 mL (AB2-OT-100)	500 mL (AB2-OT-500)
Natrijev tetraborat, otopina	30 mL (NTB-OT-30)	100 mL (NTB-OT-100)	500 mL (NTB-OT-500)
Perjodna kiselina, 0,8%-tna otopina	30 mL (PK08-OT-30)	100 mL (PK08-OT-100)	500 mL (PK08-OT-500)
BioSchiff reagens	30 mL (BS-OT-30)	100 mL (BS-OT-100)	500 mL (BS-OT-500)
Natrijev metabisulfit, otopina	30 mL (NM-OT-30)	100 mL (NM-OT-100)	500 mL (NM-OT-500)
HCL reagens, P.A.S.	30 mL (HCLP-OT-30)	100 mL (HCLP-OT-100)	500 mL (HCLP-OT-500)
Hematoksilin ML	30 mL (HEMML-OT-30)	100 mL (HEMML-OT-100)	500 mL (HEMML-OT-500)

### Priprema dodatnih otopina potrebnih za bojenje

- Sulfitna otopina  
Promiješati 10 mL Natrij metabisulfit, otopine s 10 mL HCL reagens, PA.S. Otopini potom dodati još 200 mL vodovodne vode, promiješati.  
Napomena: sulfitnu otopinu napraviti netom prije korištenja.

### Priprema histoloških preparata za bojenje

- Uzorak tkiva kvalitetno fiksirati (Formaldehid NB 4%, Formaldehid NB 10%), isprati vodom i dehidrirati kroz seriju uzlaznih alkoholnih otopina (Histanol 70, Histanol 80, Histanol 95 i Histanol 100).
- Prosvjetliti preparat intermedijem; ksilenom (BioClear) ili supstitutom ksilena (BioClear New).
- Infiltrirati i uklopiti preparat u parafin (BioWax Plus 56/58, BioWax 56/58, BioWax Blue, BioWax Micro).
- Parafinski blok narezati na 4-6 mikrona tanke rezove i montirati na VitroGnost predmetno staklo.

### NAPOMENA

Nanijeti reagens tako da potpuno prekrije preparat.

### Postupak bojenja uzorka

#### a) kompletom za 100 testiranja (AB-100T)

1.	Deparafinacija u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	3 izmjene u trajanju od 2 minuta
2.	Rehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	2 izmjene u trajanju od 5 i 3 minute
3.	Rehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	2 minute
4.	Rehidracija u destiliranoj (demi) vodi	2 minute
5.	Bojenje Alcian Blue otopinom pH 2,5 (nakapati $\geq 5$ kapi)	30 minuta
6.	Nagnuti preparat te ukloniti Alcian Blue otopinu pH 2,5. Bez ispiranja, prekriti preparat otopinom natrijevog tetraborata (nakapati $\geq 5$ kapi)	10 minuta
7.	Ispiranje pod hladnom tekućom vodom	5 minuta
8.	Ispiranje u destiliranoj (demi) vodi	1-2 minute
9.	Tretirati Perjodnom kiselinom, 0,8%-tnom otopinom (nakapati $\geq 5$ kapi)	5-10 minuta
10.	Ispiranje pod tekućom vodom	3 minute
11.	Oprati preparat destiliranom (demi) vodom	
12.	Tretirati BioSchiff reagensom (nakapati $\geq 5$ kapi)	10-15 minuta
13.	Tretirati sulfitnom otopinom (nakapati $\geq 5$ kapi)	3 izmjene u trajanju od 2 minute
14.	Ispirati pod tekućom vodovodnom vodom	3 minute
15.	Bojenje Hematoksilinom ML (nakapati $\geq 5$ kapi)	1-3 minute
16.	Ispiranje pod tekućom vodovodnom vodom	3 minute
17.	Dehidracija u 70%-tnom alkoholu (Histanol 70)	5 urona
18.	Dehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	5 urona
19.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	2 minute
20.	Bistrenje u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	2 izmjene u trajanju od 2 minute

Odmah nakon bistrenja, na preparat nanijeti odgovarajuću vrstu BioMount sredstva za prekrivanje/montiranje pokrovnog stakla. Ako je korišten BioClear ksilen, upotrijebiti jedno od BioGnostovih sredstava za montiranje na bazi ksilena (BioMount, BioMount High, BioMount M, BioMount DPX, BioMount C ili univerzalni BioMount New). Ako je korišten BioClear New supstitut ksilena, odgovarajuće sredstvo za prekrivanje je BioMount New. Prekriti preparat VitroGnost pokrovnim staklom.

**b) kompletom sa sedam reagensa od 100 ili 500 mL (AB-K-100, AB-K-500)**

Reagense uliti u posudice za bojenje (tip Coplin, Hellendahl ili Schifferdecker) te nakon bojenja vratiti u originalne bočice. Dobro zatvoriti. Prema potrebi reagense filtrirati.

1.	Deparafinacija u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	3 izmjene u trajanju od 2 minuta
2.	Rehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	2 izmjene u trajanju od 5 i 3 minute
3.	Rehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	2 minute
4.	Rehidracija u destiliranoj (demi) vodi	2 minute
5.	Uroniti u Alcian Blue otopinu pH 2,5	30 minuta
6.	Bez ispiranja, uroniti u otopinu natrijevog tetraborata	10 minuta
7.	Ispiranje pod hladnom tekućom vodom	5 minuta
8.	Ispiranje u destiliranoj (demi) vodi	1-2 minute
9.	Uroniti u Perjodnu kiselinu, 0.8%-tnu otopinu	5-10 minuta
10.	Ispiranje pod tekućom vodom	3 minute
11.	Oprati preparat destiliranom (demi) vodom	
12.	Uroniti u BioSchiff reagens	10-15 minuta
Napomena: tijekom bojenja obavezno poklopiti posudicu kako ne bi došlo do isparavanja SO <sub>2</sub>		
13.	Bez ispiranja uroniti u sulfidnu otopinu	3 izmjene u trajanju od 2 minute
14.	Ispiranje pod tekućom vodovodnom vodom	3 minute
15.	Uroniti u Hematoksilin ML	1-3 minute
16.	Ispiranje pod tekućom vodovodnom vodom	3 minute
17.	Dehidracija u 70%-tnom alkoholu (Histanol 70)	5 urona
18.	Dehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	5 urona
19.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	2 minute
20.	Bistrenje u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	2 izmjene u trajanju od 2 minute

Odmah nakon bistrenja, na preparat nanijeti odgovarajuću vrstu BioMount sredstva za prekrivanje/montiranje pokrovnog stakla. Ako je korišten BioClear ksilen, upotrijebiti jedno od BioGnostovih sredstava za montiranje na bazi ksilena (BioMount, BioMount High, BioMount M, BioMount DPX, BioMount C ili univerzalni BioMount New). Ako je korišten BioClear New supstitut ksilena, odgovarajuće sredstvo za prekrivanje je BioMount New. Prekriti preparat VitroGnost pokrovnim staklom.

**Rezultat**

Mucini – plavo tirkizna boja

PAS pozitivne supstance – purpurna (magenta) boja

Jezgre – plava boja

Epitelni mucin i hrskavica – ljubičasta/tamno plava boja

**Napomena**

Vremenski periodi postupka bojenja nisu u potpunosti standardizirani te okvirno odgovaraju dugogodišnjoj kliničkoj i laboratorijskoj praksi. Intenzitet obojenja ovisi o duljini izlaganja preparata boji. Realni protokol bojenja ovisi o osobnim zahtjevima i prioritetima.

**Priprema uzorka i dijagnostika**

Za uzimanje i pripremu uzoraka koristiti prikladne instrumente. Uzorke obraditi suvremenom tehnologijom te ih jasno obilježiti. Obavezno slijediti upute proizvođača za rukovanje. Kako bi se izbjegle pogreške, postupak bojenja i postavljanje dijagnoze mogu provoditi samo ovlaštene i stručno osposobljene osobe. Koristiti mikroskop opremljen prema standardima medicinskog dijagnostičkog laboratorija.

**Zaštita na radu i zaštita okoliša**

Proizvodom rukovati u skladu sa smjernicama zaštite na radu i zaštite okoliša. Korištene otopine i otopine kojima je istekao rok trajanja moraju biti zbrinute kao poseban otpad u skladu s nacionalnim smjernicama. Kemikalije korištene u ovom postupku mogu predstavljati opasnost za ljudsko zdravlje. Ispitivani uzorci tkiva potencijalno su infektivni te je nužno poduzeti potrebne mjere zaštite ljudskog zdravlja u skladu sa smjernicama dobre laboratorijske prakse. Obavezno pročitati i postupati u skladu sa znakovima obavijesti i upozorenja otisnutima na etiketi proizvoda i u BioGnostovom Sigurnosno-tehničkom listu koji je dostupan na zahtjev.

**Skladištenje, stabilnost i rok valjanosti**

Alcian Blue-P.A.S. komplet čuvati u dobro zatvorenoj originalnoj ambalaži na temperaturi od +15 °C do +25°C. Kako bi produžili valjanost BioShiff reagensa, preporučamo da ga nakon prve upotrebe čuvate na temperaturi od 2-8°C. Valjana otopina BioSchiff reagensa je bezbojna, nakon što počne poprimati boju zbog gubitka SO<sub>2</sub> otopinu baciti. Ne zamrzavati i ne izlagati direktnoj sunčevoj svjetlosti. Datum proizvodnje i rok valjanosti otisnuti su na etiketi proizvoda.

**Literatura**

1. Culling, C.F.A.(1974): Handbook of histopathological and histochemical techniques, 2 ed ed., Butterworth, London, UK.
2. Davey, F.R. et Nelson, D.A.(1977): Periodic Acid Schiff (PAS) Stain. IN Hematology, 2<sup>nd</sup> ed., W. J. Williams, E. Buetler, A. J. Erslev, R.W. Rundles, McGraw-Hill, New York, str. 1630-1632.
3. Hotchkiss, R.D.(1948): A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations, *Arch. Biochem.* 16, str. 131.
4. Sheehan D.C. et Hrapchak, B.B.(1980): Theory an Practice Histotechnology, 2<sup>nd</sup> ed., CV Mosby, St. Louis, (MO), pp 52, str. 14-167.

AB-X, V11, 23.06.2021., KB/IŠP

	Obavezno proučiti priloženu dokumentaciju		Temperaturni raspon čuvanja		Broj testova u pakovanju		Kataloški broj		Europska sukladnost
	Pročitati priloženu uputu		Čuvati od topline i sunčevog svjetla		Za jednokratnu upotrebu		Broj serije		Proizvođač
	Samo za <i>in vitro</i> dijagnostičku primjenu		Čuvati na suhom		Oprez lomljivo		Vrijedi do		

 BIOGNOST d.o.o.  
 Međugorska 59  
 10040 Zagreb  
 CROATIA  
 www.biognost.com

