

H.B.F.P. KOMPLET

IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod CE

Komplet od tri reagensa za bojenje histoloških preparata infarkta miokarda

Hematoksilin – Basic Fuchsin – Pikrinska kiselina

UPUTA ZA RUKOVANJE

REF Kataloški broj: HBFP-100T (3x30 mL) HBFP-K-100 (3x100 mL)

Uvod

Histološka dijagnoza rane faze ishemije ili infarkta miokarda klasičnim hematoksilin-eozin histološkim metodama i svjetlosnim mikroskopom izuzetno je delikatna. Razlog tome su minimalne histopatološke promjene koje nastaju na srčanom mišiću u prvih 6 sata od početka simptoma.

Ipak, bojenjem preparata kombinacijom boja u kojima se nalaze hematoksilin, bazični fuksin i pikrinska kiselina moguće je histološki prikazati rane promjene na srčanom mišiću proistekle nakon ishemije ili infarkta miokarda.

Opis proizvoda

- H.B.F.P. KOMPLET** – Komplet od 3 reagensa za utvrđivanje ishemije ili infarkta miokarda.

Komplet sadrži:	100 testiranja (HBFP-100T)	3 x 100 mL (HBFP-K-100)
Hematoksilin ML	30 mL (HEMML-OT-30)	100 mL (HEMML-OT-100)
Fuchsin Basic, otopina	30 mL (FBO-OT-30)	100 mL (FBO-OT-100)
Pikrinska kiselina u acetonu, otopina	30 mL (PKA-OT-30)	100 mL (PKA-OT-100)

Ostali preparati i reagensi koji mogu biti upotrijebljeni u metodi bojanja:

- Sredstvo za fiksaciju poput BioGnostovih neutralno puferiranih otopina formaldehida: Formaldehid NB 4%, Formaldehid NB 10%
- Sredstvo za dehidraciju/rehidraciju poput BioGnostovih alkoholnih otopina: Histanol 70, Histanol 80, Histanol 95 i Histanol 100
- Sredstvo za prosvjetljavanje poput BioClear ksileni ili supstituta poput BioClear New sredstva na bazi alifatskih ugljikovodika
- Sredstvo za infiltraciju i uklapanje poput BioGnostovih granuliranih parafina BioWax Plus, BioWax 56/58, BioWax Blue, BioWax Micro
- Sredstvo za prekrivanje mikroskopskih preparata i montiranje pokrovnih stakala poput BioGnostovih BioMount, BioMount High, BioMount M, BioMount New, BioMount New Low, BioMount DPX, BioMount DPX High, BioMount DPX Low, BioMount DPX Low Eco, BioMount C, BioMount Aqua, Kanada Balzam
- Predmetna stakla visoke kvalitete za primjenu u histopatologiji i citologiji poput VitroGnost SUPER GRADE ili VitroGnost COLOR ili neka od tridesetak vrsta BioGnostovih VitroGnost predmetnih stakala
- BioGnostova sredstva za imerizaciju poput Imerzijskog ulja, Imerzijskih ulja tipova A, C, FF, 37 ili Imerzijskog ulja Tropical Grade

Priprema histoloških preparata za bojanje

- Uzorak 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 uzorak intermedijem; ksilenom (BioClear) ili supstitutom ksileni (BioClear New).
- Infiltrirati i uklopiti uzorak u parafin (BioWax Plus, 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 (HBFP-100T)

1.	Deparafinacija u ksileni (BioClear) ili supstitutu ksileni (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 Hematoksilinom ML (nakapati ≥ 5 kapi)	5 minuta
6.	Ispiranje pod tekućom, vodovodnom vodom	3 minute
7.	Bojenje Fuchsin Basic otopinom (nakapati ≥ 5 kapi)	3 minute
8.	Ispirati u destiliranoj (demi) vodi	
9.	Oprati preparat u apsolutnom alkoholu (Histanol 100)	
10.	Diferencirati preparat otopinom pikrinske kiseline u acetonu (nakapati ≥ 5 kapi)	15-20 sekundi
	Napomena: Tijekom faze diferencijacije otopinom pikrinske kiseline u acetonu važno je mikroskopske preparate tretirati individualno i pažljivo svježim nekontaminiranim reagensima. Diferencijacija je završena u trenutku kada eritrociti, kolageno tkivo i ishemični mišić ostanu grimizno crveni, a ostalo tkivo bude žuto. Ukoliko se ti parametri pažljivo ne monitoriraju može doći do lažno pozitivnog ili lažno negativnog izgleda preparata. Dekolorizacija eritrocita je pri tome najosjetljiviji kriterij.	
11.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	tri izmjene u trajanju od 2 minute
12.	Oprati preparat u apsolutnom acetonu	
13.	Bistrenje u ksileni (BioClear) ili supstitutu ksileni (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 ksileni (BioMount, BioMount High, BioMount M, BioMount DPX, BioMount C ili univerzalni BioMount New). Ako je korišten BioClear New supstitut ksileni, odgovarajuće sredstvo za prekrivanje je BioMount New. Prekriti preparat VitroGnost pokrovnim staklom.

* Da bi se izbjeglo blijedenje preparata (gubitak žute boje) preporučamo bistrenje u ksilenu (BioClear) te montiranje pokrovnog stakla sa BioMount DPX ili BioMount DPX New sredstvom.

b) kompletom s tri reagensa od 100 mL (HBFP-K-100)

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 Hematoksilin ML	5 minuta
6.	Ispiranje pod tekućom, vodovodnom vodom	3 minute
7.	Uroniti u Fuchsin Basic otopinu	3 minute
8.	Isprati u destiliranoj (demi) vodi	
9.	Oprati preparat u apsolutnom alkoholu (Histanol 100)	
10.	Diferencirati preparat uranjanjem u otopinu pikrinske kiseline u acetonu	15-20 sekundi
	Napomena: Tijekom faze diferencijacije otopinom pikrinske kiseline u acetonu važno je mikroskopske preparate tretirati individualno i pažljivo svježim nekontaminiranim reagensima. Diferencijacija je završena u trenutku kada eritrociti, kolageno tkivo i ishemični mišić ostanu grimizno crveni, a ostalo tkivo bude žuto. Ukoliko se ti parametri pažljivo ne monitoriraju može doći do lažno pozitivnog ili lažno negativnog izgleda preparata. Dekolorizacija eritrocita je pri tome najosjetljiviji kriterij.	
11.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	tri izmjene u trajanju od 2 minute
12.	Oprati preparat u apsolutnom acetonu	
13.	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.

* Da bi se izbjeglo blijedenje preparata (gubitak žute boje) preporučamo bistrenje u ksilenu (BioClear) te montiranje pokrovnog stakla sa BioMount DPX ili BioMount DPX New sredstvom.

Rezultat

Ishemični srčani mišić, eritrociti i kolageno tkivo - grimizno crvena boja

Jezgre - plava boja

Ostala tkiva i strukture - žuta boja

Napomena

Rezultate očitati unutar par sati od završetka bojenja, budući da s vremenom intenzitet boje blijedi te se povećava mogućnost pogrešnog očitavanja rezultata. Vremenski periodi postupka bojenja nisu standardizirani. 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 najsuvremenijom tehnologijom te ih jasno obilježiti. Obavezno pratiti 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. Kako bi se izbjegao pogrešan rezultat, preporuča se prije primjene provesti pozitivnu i negativnu kontrolu.

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 dostupnim na zahtjev.

Skladištenje, stabilnost i rok valjanosti

H.B.F.P. komplet čuvati u dobro zatvorenoj originalnoj ambalaži na sobnoj temperaturi. Držati na suhom, ne zamrzavati i ne izlagati direktnoj sunčevoj svjetlosti. Datum proizvodnje i rok valjanosti otisnuti su na etiketi proizvoda.

Literatura

1. Lie JT et al. (1971): New histochemical method for morphologic diagnosis of early stages of myocardial ischemia. *Mayo Clin Proc*, 46:319-27.
2. HK Al-Rufai et al. (1983): Comparison of the haematoxylin basic fuchsin picric acid method and the fluorescence of haematoxylin and eosin stained sections for the identification of early myocardial infarction. *J Clin Pathol*, 36: 646-649

HBFP-X, V8, 03.03.2021., KB/ISP

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

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

