

HEMATOKSILIN HP, PAPA 1B

IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod CE

Modificirani hematoksilin po Harrisu za intenzivnije bojenje jezgre po Papanicolaou metodi Reagens za progresivno i regresivno bojenje u ekfolijativnoj citologiji

UPUTA ZA RUKOVANJE

REF Kataloški broj: HEMHP1B-OT-100 (100 mL) HEMHP1B-OT-500 (500 mL) HEMHP1B-OT-1L (1000 mL) HEMHP1B-OT-2.5L (2500 mL)

Uvod

BioGnostov Hematoksilin HP, Papa 1B jedna je od formulacija hematoksilina koje se koriste u citologiji radi preciznog bojenja staničnih jezgara. Za razliku od Hematoksilina H koji se koristi u histologiji, Hematoksilin HP, Papa 1B idealan je za intenzivno bojenje citoloških razmaza progresivnom i regresivnom metodom. Hematoksilin se dobiva ekstrakcijom iz kampehovog drva (*Haematoxylon campechianum* L.). Oksidacijom hematoksilina u hematein i vezanjem s metalnim ionima (mordantima), hematein postaje nezamjenjiva nuklearna boja. Pozitivno nabijeni kompleks hematein-mordant veže se s negativno nabijenim fosfatnim ionima jezgrine DNA stvarajući karakteristično plavo obojenje. BioGnostov Hematoksilin HP, Papa 1B specifična je koncentrirana otopina hematoksilina koja se koristi za bojenje kromatina normalnih i abnormalnih citoloških razmaza. Daje izvanredne rezultate bojenja jezgrine membrane, nukleoplazme te jezgrice, u usporedbi s Hematoksilinom HP, 1A daje nešto jače obojenje. Uzorci za ispitivanje mogu biti ginekološki i neginekološki, kao što su ispljuvak, urin, uzorci dobiveni citološkom punkcijom. U cilju dobivanja optimalnih rezultata bojenja, BioGnostov Hematoksilin HP, Papa 1B reagens je karakteristikama u potpunosti usklađen s ostalim BioGnostovim reagensima za citološko bojanje po Papanicolaou metodi – OG-6, Papa 2A reagensom, EA 31, Papa 3A reagensom kao i alternativnim kontrastnim polikromatskim bojama kao što su EA 50, Papa 3B reagens, EA 65, Papa 3C reagens i EA 65, Papa 3D reagens.

Opis proizvoda

HEMATOKSILIN HP, PAPA 1B – Reagens za progresivno i regresivno bojenje jezgre u citologiji. Sadrži optimalno oksidirani hematoksilin (hematein), aluminijeve ione, stabilizatore i antioksidanse.

Priprema citološkog razmaza za bojenje

Postoje dva načina uzimanja i pripreme citoloških uzoraka:

1. Citološki uzorak nakon uzimanja brisa nanijeti na predmetno staklo (VitroGnost), odmah fiksirati sredstvom za fiksaciju u bočici s raspršivačem (CitoSpray), osušiti i čuvati do postupka bojenja. Citološki uzorak se također može fiksirati i čuvati do bojenja i uranjanjem u 95%-tnu alkoholnu otopinu (Histanol 95) na minimalno 30 minuta.
2. Metodom tekuće citologije (LBC, Liquid-Based Cytology) pomoću četkice za uzimanje citoloških uzoraka, uzorak odmah fiksirati (CitoFix, CitoFix u transportnim posudama) odvajanjem glave četkice i uranjanjem u fiksacijsko sredstvo. Na početku obrade citološkog uzorka, stanice izdvojiti iz fiksacijske tekućine (jedan od načina jest centrifugiranje fiksacijske tekućine) te ih nanijeti na predmetno staklo i to tako da su stanice jednoliko raspoređene u jednom sloju. Ovako pripremljeni citološki uzorak spreman je za bojenje.

Postupak bojenja po Papanicolaou metodi, **PROGRESIVNO**

Početak postupka bojenja ovisi o načinu na koji je citološki uzorak prikupljen i fiksiran na mikroskopsko predmetno staklo.

Ukoliko je uzorak suh i prethodno fiksiran CitoSpray sredstvom, prije bojenja potrebno ga je držati 10 minuta u 95% alkoholu (Histanol 95) radi uklanjanja poliglikola. Ukoliko je preparat fiksiran 95%-tnom alkoholnom otopinom (Histanol 95), ovaj korak je suvišan. Prilikom postupka bojenja citoloških uzoraka pripremljenih metodom tekuće citologije (LBC) koji sadrže nisku koncentraciju alkohola, rehidracija silaznim nizom alkoholnih otopina nije potrebna. Postupak započinje ispiranjem preparata destiliranom (demi) vodom, te se nastavlja postupkom bojenja Hematoksilin HP, Papa 1B reagensom.

1.	Rehidracija u silaznom nizu alkohola (Histanol 95 i Histanol 70) i u destiliranoj (demi) vodi	10 urona u svakoj od 3 izmjene
2.	Bojenje Hematoksilin HP, Papa 1B reagensom	30 sekundi
	Napomena: Duže izlaganje preparata Hematoksilin HP, Papa 1B reagensu može osim jezgre obojiti i citoplazmu.	
3.	Ispiranje u destiliranoj ili vodovodnoj vodi	30 sekundi
4.	Plavljenje Scottovom otopinom ili Bluing reagensom	1 minuta
	Napomena: U nedostatku navedenih reagensa, preparat plaviti pod indirektnim mlazom tekuće vode	
5.	Dehidracija u uzlaznom nizu alkohola (Histanol 70 i Histanol 95)	10 urona u svakoj od 2 izmjene
6.	Bojenje OG-6, Papa 2A reagensom	2 minute
7.	Ispiranje u 95%-tnom alkoholu kroz dvije izmjene (Histanol 95)	30 sekundi u svakoj od 2 izmjene
8.	Bojenje EA 31, Papa 3A reagensom ili EA 50, Papa 3B reagensom	4 minute
9.	Ispiranje i dehidracija u 95%-tnom alkoholu kroz dvije izmjene (Histanol 95)	1 minuta u svakoj od 2 izmjene
10.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu kroz dvije izmjene (Histanol 100)	1 minuta u svakoj od 2 izmjene
11.	Bistrenje u ksilen (BioClear) ili supstitutu ksilena kroz dvije izmjene (BioClear New)	2 minute u svakoj od 2 izmjene

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.

Postupak bojenja po Papanicolaou metodi, **REGRESIVNO**

Regresivnom metodom bojenja u pravilu se postiže bolja diferenciranost uzorka i jasnija vidljivost jezgrinih struktura.

Početak postupka bojenja ovisi o načinu na koji je citološki uzorak prikupljen i fiksiran na mikroskopsko predmetno staklo.

Ukoliko je uzorak suh i prethodno fiksiran CitoSpray sredstvom, prije bojenja potrebno ga je držati 10 minuta u 95% alkoholu (Histanol 95) radi uklanjanja poliglukola. Ukoliko je preparat fiksiran 95%-tnom alkoholnom otopinom (Histanol 95), ovaj korak je suvišan. Prilikom postupka bojenja citoloških uzoraka pripremljenih metodom tekuće citologije (LBC) koji sadrže nisku koncentraciju alkohola, rehidracija silaznim nizom alkoholnih otopina nije potrebna. Postupak započinje ispiranjem preparata destiliranom (demi) vodom, te se nastavlja postupkom bojenja Hematoksilinom HP, Papa 1B reagensom.

1.	Rehidracija u silaznom nizu alkohola (Histanol 95 i Histanol 70) i u destiliranoj (demi) vodi	10 urona u svakoj od 3 izmjene
2.	Bojenje Hematoksilin HP, Papa 1B reagensom	4 minute
3.	Ispiranje u destiliranoj ili vodovodnoj vodi	30 sekundi
4.	Diferencijacija HCL Papa reagensom ili u 0,1%-tnoj otopini HCl-a	5-10 sekundi
	Napomena: Ovim korakom uklanja se višak hematoksilina iz jezgre i citoplazme. Ako je preparat predugo tretiran sredstvom za diferencijaciju, može doći do obezbojenja jezgri.	
5.	Ispiranje u destiliranoj vodi ili vodovodnoj vodi	10 urona
6.	Plavljenje Scottovom otopinom ili Bluing reagensom	1 minuta
	Napomena: U nedostatku navedenih reagensa, preparat plaviti pod indirektnim mlazom tekuće vode	
7.	Dehidracija u uzlaznom nizu alkohola (Histanol 70 i Histanol 95)	10 urona u svakoj od 2 izmjene
8.	Bojenje OG-6, Papa 2A reagensom	2 minute
9.	Ispiranje u 95%-tnom alkoholu kroz <u>dvije</u> izmjene (Histanol 95)	30 sekundi u svakoj od 2 izmjene
10.	Bojenje EA 31, Papa 3A reagensom ili EA 50, Papa 3B reagensom	4 minute
11.	Ispiranje i dehidracija u 95%-tnom alkoholu kroz <u>dvije</u> izmjene (Histanol 95)	1 minuta u svakoj od 2 izmjene
12.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu kroz <u>dvije</u> izmjene (Histanol 100)	1 minuta u svakoj od 2 izmjene
13.	Bistrenje u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena kroz <u>dvije</u> izmjene (BioClear New)	2 minute u svakoj od 2 izmjene

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.

Napomena

Ukoliko je došlo do taloženja u Hematoksilin HP, Papa 1B reagensu ili formiranja metalnog sjaja na površini, reagens je potrebno prije upotrebe filtrirati. Vremenski periodi regresivnog postupka bojenja nisu u potpunosti standardizirani. Predloženi postupci sukladni su karakteristikama BioGnostovih reagensa te okvirno odgovaraju dugogodišnjoj kliničkoj i laboratorijskoj praksi. Intenzitet obojenja ovisi o duljini izlaganja preparata bojama i reagensima. Postupak bojenja može se mijenjati u skladu s osobnim zahtjevima ako su u skladu s osnovnim načelima citotehnologije.

Rezultat

Jezgre - plava boja

Keratinizirane stanice - žuto-narančasta boja

Superficialne epitelne pločaste stanice, eritrociti, nukleoli, trepetljike - ružičasto-crvena boja

Citoplazma svih drugih tipova stanica (parabazalnih i intermedijarnih pločastih stanica, cilindričnih stanica, polimorfonuklearnih leukocita, limfocita, histiocita, adenokarcinoma, nediferenciranih stanica karcinoma) - zelena boja

Priprema uzorka i dijagnostika

Za uzimanje i pripremu uzorka 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

Hematoksilin HP, Papa 1B čuvati u dobro zatvorenoj originalnoj ambalaži na temperaturi od +15°C do +25°C. Držati na suhom, ne zamrzavati i ne izlagati direktnoj sunčevoj svjetlosti. Datum proizvodnje i rok valjanosti otisnuti su na etiketi proizvoda.

Literatura

- Gill, G.W., Frost, J.K, Miller, K.A. (1974): A new formula for half-oxidized hematoxylin formula that neither overstains nor requires differentiation. *Acta Cytol.* 1974;18:300-301.
- Gill, G.W. (2006): Enviro-Pap: an environmental friendly, economical, and effective Pap stain. *Lab. Med.* 37: str. 105-108.
- Harris, H.F. (1900): On the rapid conversion of haematoxylin into haematein in staining reactions. *J. Appl. Microsc.* 3: str. 777-780
- Papanicolaou, G.N. (1954): A new procedure for staining vaginal smears. *Science.* 95: str. 438-439.

HEMHP1B-OT-X, V5, 12.07.2019., AK/IŠP

 Obavezno proučiti priloženu dokumentaciju	 Temperaturni raspon čuvanja	 Broj testova u pakovanju	 REF Kataloški broj	 Europska sukladnost
 Pročitati priloženu uputu	 Čuvati od topline i sunčevog svjetla	 Vrijedi do	 LOT 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

