

ІНСТРУКЦІЯ ЩОДО ЗАСТОСУВАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ЗАБАРВЛЕННЯ ЗА ПАПАНІКОЛАУ (НАБІР «ФІЛО-ПАП-ТЕСТ»)

IVD

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для диференціального забарвлення гінекологічних та негінекологічних препаратів (Див. **Примітку 1**) при цитологічній діагностиці та скринінгу за Папаніколау в клініко-діагностичних лабораторіях і науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на проведення до **200** аналізів (розраховано для компонентів 1-3, інші компоненти цього набору призначені лише для ознайомлення з цією методикою. Подальше, при їх використанні, вони придбаються окремо) (Див. **Примітку 8**).

Зберігання набору - при температурі від плюс 15 °С до плюс 25 °С.

Гарантійний термін придатності набору - 12 місяців від дня виготовлення.

Зберігати в захищеному від світла місці.

Увага! Заморожувати неприпустимо!

Набір призначено для застосування *in vitro* тільки кваліфікованим лабораторним персоналом.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

При забарвленні за Папаніколау послідовно застосовуються забарвлювачі: гематоксилін для забарвлення ядер, забарвлювачі OG6 та EA для забарвлення цитоплазми у різні кольори залежно від типу клітин та їх зрілості. При забарвленні в комбінованому цитоплазматичному забарвлювачі EA відбувається спочатку швидке забарвлення цитоплазми еозином в рожевий колір, потім частина клітин перефарбовується в зелений колір в результаті дії барвника світло-зелений SF і протрави - фосфорновольфрамної (або фосфорномолібденової) кислоти.

СКЛАД НАБОРУ

1 Розчин гематоксиліну	- 1 флакон з (100 ± 2) мл;
2 Забарвлювач OG6	- 1 флакон з (100 ± 2) мл;
3 Забарвлювач EA	- 1 флакон з (100 ± 2) мл;
4 Промиваючий розчин	- 7 флаконів по (100 ± 2) мл;
5 Розчин для дегідратації	- 3 флакони по (100 ± 2) мл;
6 Просвітлюючий розчин	- 3 флакони по (100 ± 2) мл;
7 Фіксатор	- 1 флакон з (100 ± 2) мл;
8 Дистильована вода з консервантом	- 4 флакони по (100 ± 2) мл;
9 Підлужена дистильована вода	- 1 флакон з (100 ± 2) мл;
10 Безводне монтуюче середовище для мікроскопії («ФілоМаунт С»)	- 1 флакон з (10,0 ± 0,5) мл;
Компоненти 4 – 6 та 10 можуть бути придбані окремо при необхідності (Див. Примітку 8).	

АНАЛІЗУЄМИЙ МАТЕРІАЛ

Гінекологічні та негінекологічні зразки (Див. **Примітку 1**).

Предметне скло перед дослідженням знежирюють і роблять на ньому мазок досліджуваних культур. Мазок слід робити тонким, щоб клітини рівномірно розподілялися на поверхні скла і не утворювали скупчень.

Добре розплющені клітини є кращими для **оптимального фарбування та відображення**. Свіжі нефіксовані клітини ідеально розподіляють у вигляді моношару на предметне скло або збирають на мембранний фільтр і негайно **волого** фіксують у 95% етиловому спирті⁷. Нерозплющені клітини можуть займати значно більше плями та ускладнювати мікроскопічне дослідження. Відсутність згладжування в клітинах може бути пов'язано з наступним: (1) збиранням у консерванті (тобто рівному об'ємі 50–70% спирту), (2) розподілом по альбумінізованим скельцям, (3) товстим спредом, (4) частинами фрагмента тканини, (5) суспензії в потоці слизу, (6) фіксація спреєм. Вищезазначені обставини пов'язані між собою тим, що під час фіксації клітини фактично перебувають у суспензії, і таким чином стають затверділими сферами, які не можуть розплющитися.

ОБЛАДНАННЯ

- 1 Раковини або спеціальні місткі лотки для фарбування.
- 2 Спеціальний штатив («рейки») для фарбування мазків на предметних стеклах.
- 3 Пінцет або щипці для взяття предметних стекол.
- 4 Колба мірна місткістю 1000 мл (згідно з чинними нормативними документами).
- 5 Фільтрувальний папір розміром < 4 x 1,5 см для промокування мазків.

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

1 **Всі компоненти** готові до використання. Придатні для роботи до закінчення терміну, зазначеного на упаковці, за умови зберігання при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

За півгодини до використання реактиви необхідно вийняти з холодильника. Для отримання надійних результатів необхідно дотримуватися інструкції щодо застосування набору.

Процедура забарвлення проводиться у відповідності зі схемою, наведеною у таблиці 1.

Таблиця 1

№	Реагент та етапи забарвлення		Призначення процедури
1	95% етиловий спирт ⁷ або 80% ізопропіловий спирт ⁴	15-30 хв	Фіксація
2	Промивання (водопровідна вода) (Див. <i>Примітку 3</i>)	10 повільних занурень	
3	Промиваючий розчин	5 сек	Підготовка для забарвлення
4	Розчин гематоксиліну	1-2 хв	Забарвлення хроматину (червоний колір)* та ** Контроль під мікроскопом забарвлення ядер
5	Промивання (водопровідна вода) (Див. <i>Примітку 3</i>)	10 повільних занурень	Змивання гематоксиліну
6	Промивання (водопровідна вода) (Див. <i>Примітку 3</i>)	10 повільних занурень	Змивання гематоксиліну
7	Промивання (водопровідна вода) (Див. <i>Примітку 3</i>)	2 хв	Відсинювання червоного АІ-гематеїна. Тримати до появи синього забарвлення (за потреби цей етап можна пропустити)
8	Промивання (водопровідна вода) (Див. <i>Примітку 3</i>)	10 повільних занурень	Змивання залишків гематоксиліну. Контролюйте цю стадію мікроскопічно. Перевірте предметне скло, щоб переконатися, що клітинна цитоплазма очищена від будь-якого фонового забарвлення гематоксиліном, інакше це заважатиме забарвленню Забарвлювачем ЕА
Промокування (фільтрувальний папір) - видалення зайвої рідини			
9	Забарвлювач ОГ6	2-4 хв	Забарвлення кератину у жовтий колір **
10	Промиваючий розчин	10 повільних занурень	Ополіскування із збереженням ОГ у клітинах
11	Промиваючий розчин	10 повільних занурень	Ополіскування із збереженням ОГ у клітинах
12	Промиваючий розчин (Див. <i>Примітку 4</i>)	10 повільних занурень	Ополіскування із збереженням ОГ у клітинах
13	Забарвлювач ЕА	2-4 хв	Забарвлення цитоплазми в рожевий та зелений колір **
14	Промиваючий розчин	10 повільних занурень	Ополіскування із збереженням забарвлення у клітинах (перший посуд)
15	Промиваючий розчин	10 повільних занурень	Ополіскування із збереженням забарвлення у клітинах
16	Промиваючий розчин (Див. <i>Примітку 4</i>)	10 повільних занурень	Ополіскування із збереженням забарвлення у клітинах
Промокування (фільтрувальний папір) - видалення зайвої рідини			
17	<i>Розчин для дегідратації, перша ємність</i> (Див. <i>Примітку 5</i>)	10 повільних занурень	Дегідратація
Промокування (фільтрувальний папір) - видалення зайвої рідини			
18	<i>Розчин для дегідратації, друга ємність</i> (Див. <i>Примітку 5</i>)	10 повільних занурень	Дегідратація
19	<i>Розчин для дегідратації, третя ємність</i> (Див. <i>Примітку 5</i>)	10 повільних занурень	Дегідратація

Продовження таблиці 1

20	Просвітлення (просвітлюючий розчин)) (Див. Примітку 6)	10 повільних занурень	Просвітлення
21	Просвітлення (просвітлюючий розчин)) (Див. Примітку 6)	10 повільних занурень	Просвітлення
22	Просвітлення (просвітлюючий розчин)) (Див. Примітку 6)	10 повільних занурень	Просвітлення
23	Розміщення під покривне скло (Монтуюче (заключне) середовище - за бажанням) (Див. Примітку 7)	-	
24	Мікроскопують з імерсійною системою		
* Оптимальна тривалість витримки у реагентах може залежати від пробопідготовки ** Перед першим використанням фільтрація не потрібна. Рекомендується фільтрація після кожного наступного використання для контролю перехресного забруднення ⁸.			

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Ядра клітин - синьо-фіолетового кольору, з чіткою структурою хроматину, при якій помітні крайовий гіперхроматоз, пікноз, лізис і ядерця.

Цитоплазма пофарбована контрастно: при базофілії - в зелений колір різної інтенсивності, яка визначається щільністю цитоплазми; при ацидофілії - від блідо-жовтого до яскраво-помаранчевого у зрілих клітин. У разі неповного зроговіння цитоплазми можливе фарбування частини її в зелений колір, іншої частини - в помаранчевий.

Поверхневі (ороговілі) клітини – рожеві.

Проміжні (некорніфіційовані) клітини – зелені.

Кандида (монілії) -червона.

Трихомонади - сіро-зелені.

Цитоплазма парабазальних клітин - темно-зеленого кольору.

Червоні кров'яні клітини – помаранчевий.

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Цитоморфологія відображає клітинне здоров'я та захворювання. Цитоплазма вказує на функціональну диференціацію клітини, а її ядро сигналізує про нормальну або аномальну активність росту ⁴. За допомогою світлового мікроскопа інтерпретація значення цитоморфологічних структур найзручніша для пофарбованих клітин, оскільки незабарвлені клітини практично непомітні. Біологічну поведінку клітин можна оцінити якісно і кількісно як з точки зору активності росту, так і функціональної диференціації. Якщо правильно пофарбувати гематоксиліном, ядра клітин видно, хоча їх цитоплазма буде погано помітною, і ймовірність виявлення та ідентифікації аномальних клітин під час скринінгу буде зменшена. Цього можна уникнути за допомогою фарбування цитоплазми клітин у контрастний колір (тобто контрфарбування). Використання одного контрфарбування забарвлювало б різні типи клітин однаково, і вони виглядали б одноманітними. При застосуванні кількох контрастних кольорів різні типи клітин з'являються в різних контрастних кольорах. Така ситуація називається диференціальним контрфарбуванням ⁶. Після добре забарвленого хроматину диференціальне контрфарбування є основною метою фарбування за Папаніколау.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Більшість лабораторій можуть встановити регулярний графік заміни своїх розчинів **OG-6** і **EA** на основі кількості предметних стекол, що фарбуються за тиждень, і умов зберігання. Рекомендується проводити щоденні мікроскопічні перевірки, а також зберігати добре забарвлене предметне скло для довідки.

Кожна лабораторія повинна встановити власну внутрішню систему контролю якості та коригуючі дії, якщо контроль не відповідає допустимим нормам.

ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1 При роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.

2 Розчин гематоксиліну, Забарвлювач OG6, Забарвлювач EA – мають подразнюючі речовини.

3 Розчин для дегідратації, Просвітлюючий розчин, Безводне монтуюче середовище - є легкозаймистими. Проявляють токсичні властивості і можуть викликати сильні небезпечні необоротні явища при вдиханні пари, при контакті зі шкірою і при ковтанні. Зберігайте флакони щільно закритими. Не тримайте розчини поблизу джерел займання, не палити. При відчутті

Виробник залишає за собою право вносити зміни без попереднього повідомлення. Дата останньої перевірки **24.04.2025**

нездужання або при нещасному випадку – негайно зверніться до лікаря, по можливості пред'явивши йому етикетку.

ПРИМІТКИ

1. Немає особливої відмінності між гінекологічними та негінекологічними зразками під час фарбування. Якщо фарбування, промивання та очищення виконуються належним чином, різниця в середній товщині різних препаратів рідко створює проблеми у візуалізації мікроскопічних деталей.
2. Висушений на повітрі, фіксований цитологічний матеріал, покритий карбоваксом, матиме погане ядерне фарбування, якщо його не занурити в 95% етанол принаймні на 10 хв перед фарбуванням.
3. Водопровідна вода в багатьох місцевостях є задовільною. Якщо є сумнів щодо хімічної якості водопровідної води, то використовуйте дистильовану воду замість водопровідної, а для **пункту 7 таблиці 1** підлучену дистильовану воду (2-3 краплі 25% гідроокису амонію додати до 100 мл дистильованої води). Ванни з водопровідною водою слід міняти після того, як через них проходить кожна друга стійка з матеріалом.
4. Третя ємність серії з трьох ємностей для ополіскування не повинна бути забарвлена. Розчини для ополіскування, які забарвлені, починають поводитися більше як забарвлювачі, а менше як промивачі.
5. Можливе використання абсолютного етанолу (пропанолу, ізопропанолу).
6. Можливе використання о-ксилолу та інших просвітлюючих розчинів.
7. Монтуюче (заклучне) середовище **має бути сумісно** з використовуваним Просвітлюючим розчином.
8. Додаткові реагенти (до складу набору не входить):

Назва компонентів	REF	Код за класифікатором медичних виробів НК 024:2023
Концентрат промиваючого розчину	<u>HP053.01.4</u> - 1 флакон з (100 ± 2) мл; <u>HP053.03.4</u> - 1 флакон з (1000 ± 20) мл;	43606
Розчин для дегідратації	<u>HP053.01.5</u> - 1 флакон з (100 ± 2) мл; <u>HP053.03.5</u> - 1 флакон з (1000 ± 20) мл;	57724
Просвітлюючий розчин	<u>HP053.01.6</u> - 1 флакон з (100 ± 2) мл; <u>HP053.03.6</u> - 1 флакон з (1000 ± 20) мл;	59122
ФілоМаунт С	<u>HP069.01</u> - 1 флакон з (100 ± 4) мл; <u>HP069.02</u> - 1 флакон з (10,0 ± 0,5) мл;	43550

УТИЛІЗАЦІЯ

Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і разом з можливими залишками реактивів підлягає знищенню відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил.

Паперову упаковку здайте в макулатуру, виполоскану тару - в сортоване сміття.

ЛІТЕРАТУРА

1. Papanicolaou GN. A new procedure for staining vaginal smears. Science. 1942;95:438–9.
2. Papanicolaou GN. Traut I IE. Diagnosis of uterine cancer by the vagina smear. Commonwealth Fund. New York. 1943.
3. Papanicolaou GN. Atlas of exfoliative cytology. Cambridge, MA: Published for The Commonwealth Fund by Harvard University Press;1963.
4. Danos, M.L., “Fixatives for Cytologic Use”, chapter in Compendium on Cytopreparatory Techniques, 3rd ed., Keebler, C.M., Reagan, J.W. and Wied, G.L., eds., Tutorials of Cytology, Chicago, 1974, pp. 6-8.
5. Frost, J.K., The Cell in Health and Disease, Williams and Wilkins, Baltimore, 1969.
6. Gill, G.W., “The Papanicolaou Stain”, supplementary film literature, Wexler Film Productions, Los Angeles, 1975.
7. Gill, G.W., “Principles and Practice of Cytopreparation”, chapter in Handbook of Laboratory Animal Science, Vol. III, Altman, N.H. and Melby, E.C., eds., CRC Press, Cleveland, OH, 1976, pp. 519-551.
8. Gill, G.W., Cytotechn. Bull., 12 (3), 12-13 (1975).



ТОВ НВП «Філіцит-Діагностика»,

Україна, 49051 м. Дніпро, вул. Каштанова, 32

Тел./факс: (056) 747-47-76, 747-45-34

Тел.: (093) 573-75-35, (067) 535-15-73, (095) 168-36-54

E-mail: filicit@ukr.net <http://www.felicit.com.ua>