

HEMATOKSILIN G2

IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod CE

Hematoksilin po Gillu za bojenje jezgre

Reagens nove generacije srednjeg intenziteta za progresivno bojenje u histopatologiji, citologiji i za kontrastno bojenje u imunohistokemiji

UPUTA ZA RUKOVANJE

REF Kataloški broj: HEMG2-OT-100 (100 mL) HEMG2-OT-500 (500 mL) HEMG2-OT-1L (1000 mL) HEMG2-OT-2.5L (2500 mL)

Uvod

BioGnostov Hematoksilin G2 reagens je visoke stabilnosti i jedna od formulacija hematoksilina koje se koriste u histopatologiji i citologiji radi preciznog bojenja staničnih jezgara. U usporedbi s Hematoksilinom G1, Hematoksilin G2 boji preparate jačim intenzitetom jer sadrži dvostruko veću koncentraciju hematoksilina tako da je vrijeme postizanja željenih rezultata kraće. Hematoksilin G2 idealan je za tamnije, intenzivnije bojenje staničnih jezgara citoloških razmaza ili histoloških preparata, premda se često koristi i za kontrastno bojenje u imunohistokemiji. Za razliku od ostalih formulacija hematoksilina, hematoksilini po Gillu boje i včaste žlijezdane stanice u epitelu tankog crijeva i respiracijskom epitelu dišnog sustava. 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. Hematoksilini po Gillu specifične su otopine hematoksilina koje se koriste za bojenje včastih žlijezdanih stanica, kromatina normalnih i abnormalnih stanica tkivnih prereza ili citoloških razmaza. BioGnostovi Hematoksilini G1, G2 i G3 su napola oksidirani, stabilizirani glikolima i sadrže aluminijeve ione. Daju izvanredne rezultate bojenja jezgrine membrane, nukleoplazme te jezgrice.

Opis proizvoda:

- HEMATOKSILIN G2** – Reagens za progresivno nuklearno bojenje u histologiji, citologiji i za kontrastno bojenje u imunohistokemiji. Sadrži optimalo oksidirani hematoksilin, glikolne stabilizatore i antioksidanse.

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

- 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 ksilena ili supstituta poput BioClear New sredstva na bazi alifatskih ugljikovodika
- Sredstvo za infiltraciju i uklopavanje poput BioGnostovih granuliranih parafina BioWax 52/54, BioWax Plus 56/58, BioWax 56/58, BioWax Blue, BioWax Micro
- Predmetna stakla visoke kvalitete za primjenu u histopatologiji i citologiji poput VitroGnost SUPER GRADE ili neka od tridesetak vrsta BioGnostovih predmetnih stakala
- Sredstvo za diferencijaciju poput BioGnostovog Kiselog alkohola
- Sredstvo za plavljenje poput BioGnostove Scottove otopine ili Bluing reagensa
- 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 C, BioMount Aqua,
- VitroGnost pokrovnna stakla dimenzija od 18x18 mm do 24x60 mm
- Reagensi za kontrastno bojenje poput BioGnostovih otopina eozina
- Monokromatski reagens za citoplazmatsko bojenje po Papanicolaou metodi poput BioGnostovog OG-6 reagensa, Papa 2A
- Polikromatski reagensi za citoplazmatsko bojenje po Papanicolaou metodi poput BioGnostovih: EA 31 reagens, Papa 2A i EA 50 reagens, Papa 3B

A) Priprema histoloških preparata za bojenje

- Tkivni uzorak kvalitetno fiksirati (Formaldehid NB 4%, Formaldehid NB 10%), isprati vodom i dehidrirati kroz seriju uzlaznih alkoholnih otopina (Histanol 95 i Histanol 100).
- Prosvjetliti uzorak intermedijem; ksilenom (BioClear) ili supstitutom ksilena (BioClear New).
- Infiltrirati i uklopiti uzorak u parafin (BioWax 52/54, 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.

Postupak bojenja hematoksilin-eozin (HE) metodom, progresivno

1.	Deparafinacija u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	3 izmjene u trajanju od 2 minute
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 G2	3-5 minuta
	Napomena: Ukoliko je došlo do taloženja u otopini ili formiranja metalnog sjaja na površini, reagens je potrebno prije upotrebe filtrirati	
6.	Uroniti preparat u destiliranu/demineraliziranu vodu do prestanka otpuštanja boje s preparata	
7.	Plavljenje jezgri Scottovom otopinom ili Bluing reagensom	1 minuta
	Napomena: Zaustaviti plavljenje nakon što jezgre poprime plavu boju. U nedostatku Scottove otopine ili Bluing reagensa ispirati preparate pod tekućom vodom u trajanju od 3-5 minuta	
8.	Uroniti preparate u destiliranu/demineraliziranu vodu	
9.	Ukoliko se koristi alkoholna otopina eozina uroniti preparate u 95%-tni alkohol (Histanol 95). Ukoliko se koristi vodena otopina eozina ovaj korak preskočiti	
10.	Bojenje jednom od kontrastnih otopina eozina do optimalnog obojenja preparata	15 sekundi - 2 minute
	Napomena: Bojenjem preparata u alkoholnim otopinama eozina znatno se brže dobiva intenzivna eozinofilna boja (unutar 15 sekundi), dok se izlaganje preparata vodenim otopinama eozina preporuča 90 sekundi do 2 minute	
11.	Ispiranje pod tekućom vodom Napomena: Ukoliko se koristi alkoholna otopina eozina kao kontrastno bojenje, ovaj korak preskočiti.	2 minute
12.	Dehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	2 izmjene s 10-15 urona
13.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	3 izmjene s 10-15 urona
14.	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 supstitit ksilena, odgovarajuće sredstvo za prekrivanje je BioMount New. Prekriti preparat VitroGnost pokrovnim staklom.

Rezultat

Jezgre - tamno plava boja

Citoplazma, kolagen, elastin, eritrociti – nijanse ružičaste boje (kod bojenja Eozin Kontrastom nijanse crveno-ružičaste boje)

Vrčaste stanice - tamno plava boja

B) Priprema citološkog razmaza/uzorka 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 poliglignola. 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 G2.

1.	Rehidracija u silaznom nizu alkohola (Histanol 95, Histanol 80 i Histanol 70) i u destiliranoj (demi) vodi	6-8 urona u svakoj od 4 izmjene
2.	Bojenje Hematoksilinom G2	2-5 minuta
3.	Plavljenje Scottovom otopinom ili Bluing reagensom	1 minuta
	Napomena: U nedostatku navedenih reagensa, preparat plaviti pod indirektnim mlazom tekuće vode	3-5 minuta
	Uroniti preparate u destiliranu/demineraliziranu vodu	
4.	Dehidracija u uzlaznom nizu alkohola (Histanol 70, Histanol 80 i Histanol 95)	6-8 urona u svakoj od 3 izmjene
5.	Bojenje OG-6 reagensom, Papa 2A	2 minute
6.	Ispiranje u 95%-tnom alkoholu kroz dvije izmjene (Histanol 95)	6-8 urona u svakoj od 2 izmjene
7.	Bojenje EA 31 reagensom, Papa 3A ili EA 50 reagensom, Papa 3B	4 minute
8.	Ispiranje u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	6-8 urona
9.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	6-8 urona
10.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	3-5 minuta
11.	Bistrenje u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	6-8 urona
12.	Bistrenje u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	3-5 minuta

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 supstitit ksilena, odgovarajuće sredstvo za prekrivanje je BioMount New. Prekriti preparat VitroGnost pokrovnim staklom.

Rezultat

Jezgre - plava boja

Keratinizirane stanice - žuto-narančasta boja

Superficialne epitelne pločaste stanice, eritrociti, nukleoli, treptiljike - ružičasto-narančasta/crvena boja

Citoplazma svih drugih tipova stanica (parabazalnih i intermedijarnih pločastih stanica, cilindričnih stanica, polimorfonuklearnih leukocita, limfocita, histiocita, adenokarcinoma, nediferenciranih stanica karcinoma) - zelena 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 uzorka koristiti prikladne instrumente. Uzorke obraditi najsvremenijom 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 G2 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

1. 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.
2. Gill, G.W. (2006): Enviro-Pap: an environmental friendly, economical, and effective Pap stain. *Lab. Med.* 37: str. 105-108.
3. Papanicolaou, G.N. (1954): A new procedure for staining vaginal smears. *Science.* 95: str. 438-439.
4. Sheehan, D.C. et Hrapchak, B.B. (1980): *Theory and Practice of Histotechnology*, 2nd ed., St. Louise: CV Mosby Co.

HEMG2-OT-X, V13, 31.03.2021., KB/İŞP

 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

