

# BIOGRAM HISTO KOMPLET

IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod CE

## Komplet od pet reagensa za identifikaciju bakterija prema Gramu u histološkim preparatima Za diferencijaciju Gram-pozitivnih od Gram-negativnih bakterija

### UPUTA ZA RUKOVANJE

REF Kataloški broj: BGRH-100T (7x30 mL)

#### Uvod:

Diferencijacijsko bojenje bakterijskih vrsta prema Gramu široko je poznata i korištena metoda u mikrobiologiji te predstavlja jednu od najčešće izvođenih dijagnostičkih metoda u bolničkim i kliničkim laboratorijima. Bojenjem prema Gramu bakterije se dijele na dvije skupine: Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Ta se podjela temelji na razlikama u strukturi bakterijskih membrana tih dviju skupina, točnije sposobnosti zadržavanja boje. Gram-pozitivne bakterije imaju deblju staničnu membranu koja, uz tretiranje otopinom joda odnosno stvaranjem netopivih kompleksa joda i primarne boje, omogućava zadržavanje boje unutar stanice. Gram-negativne bakterije posjeduju tanju membranu koja zbog svoje strukture nije u mogućnosti zadržati boju odnosno ona se kroz nju ispire te se tako, uz kontrastno bojenje, stvara temelj za razlikovanje te dvije skupine bakterija. BioGnostov BioGram Histo komplet sastoji se od Gram Crystal Violet 1% otopine, stabilizirane Gram Lugolove otopine, dva pakovanja Gram Dekolorizator otopine 2, Gram Safranin otopine i dva pakovanja otopine pikrinske kiseline u acetonu. Svojim karakteristikama pruža optimalno bojenje bakterijskih vrsta te daje ujednačene rezultate.

#### Opis proizvoda:

**BIOGRAM HISTO KOMPLET** - Komplet od 5 reagensa u 7 pakovanja za diferencijaciju bakterija prema Gramu u pet koraka.

Komplet sadrži:	100 testiranja (BGRH-100T)
Gram Crystal Violet 1% otopina	30 mL (GC1-OT-30)
Gram Lugol otopina, stabilizirana	30 mL (GLS-OT-30)
Gram Dekolorizator otopina 2	2x30 mL (GD2-OT-30)
Gram Safranin otopina	30 mL (GSF-OT-30)
Pikrinska kiselina u acetonu, otopina	2x30 mL (PKA-OT-30)

#### 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 ksilena 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 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
- VitroGnost pokrovna stakla dimenzija od 18x18 mm do 24x60 mm
- BioGnostova sredstva za umerizaciju 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 ksilena (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

1.	Deparafinacija u ksilenom (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 minuta
3.	Rehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	2 minute
4.	Rehidracija u destiliranoj (demi) vodi	2 minute
5.	Obojiti preparat Gram Crystal Violet 1% otopinom	1 minuta
6.	Odliti višak boje s preparata. Pažljivo isprati preparat stabiliziranim Gram Lugolovom otopinom	
7.	Fiksirati boju tretiranjem preparata stabiliziranim Gram Lugolovom otopinom	1 minuta
8.	Pažljivo isprati preparat destiliranom/demineraliziranim vodom	5 sekundi
9.	Tretirati preparat Gram Dekolorizator otopinom 2. Prestati s postupkom kada preparat poprimi sivkasto-plavu boju	10-15 sekundi

	Napomena: Prekomjernim tretiranjem otopinom dekolizatora isprati će se boja i iz Gram pozitivnih bakterija	
10.	Pažljivo isprati preparat destiliranom/demineraliziranom vodom	5 sekundi
12.	Tretirati preparat Gram Safranin otopinom	1 minuta
13.	Pažljivo isprati preparat destiliranom/demineraliziranom vodom	5 sekundi
14.	Tretirati preparat otopinom pikrinske kiseline u acetonu	10-30 sekundi
	Napomena: Tretirati dok se ne ispere pozadinsko ružičasto obojenje	
15.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu u dvije izmjene (Histanol 100)	2 izmjene od 10 kratkih urona
16.	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 blijeđenje preparata (gubitak žute boje) preporučamo bistrenje u ksilenu (BioClear) te montiranje pokrovnog stakla sa BioMount DPX ili BioMount DPX New sredstvom.

## Rezultat

Gram-pozitivne bakterije - plavo ljubičasta boja

Gram-negativne bakterije - crvena boja

Pozadinsko obojenje - svijetlo žuta boja

## Napomena:

Postupci bojenja u mikrobiologiji nisu standardizirani i ovise o standardnim operativnim postupcima pojedinih laboratorija i iskustvu djelatnika koji izvode bojenje uzoraka. Intenzitet obojenja ovisi o duljini izlaganja preparata boji. Ovisno o osobnim zahtjevima i standardnim operativnim postupcima laboratorija, obrada uzorka i bojenje može se izvoditi i prema drugim protokolima.

## Priprema uzorka i dijagnostika

Za uzimanje uzoraka i njihovu pripremu koristiti prikladne instrumente. Uzorke obraditi suvremenom tehnologijom te ih jasno obilježiti. Obavezno slijediti proizvođačevu uputu za rukovanje. Kako bi se izbjegle pogreške, postupak obrade uzorka i postavljanja 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 koji je dostupan na zahtjev.

## Skladištenje, stabilnost i rok valjanosti

BioGram Histo komplet čuvati u dobro zatvorenoj originalnoj ambalaži na +15°C do +25°C. Ne držati na hladnom, ne zamrzavati i ne izlagati direktnoj sunčevoj svjetlosti. Datum proizvodnje i rok valjanosti otisnuti su na etiketi proizvoda.

## Literatura

- Carson, F. L., Hladik, C. (2009): *Histotechnology: A Self-Instructional Text*, 3<sup>rd</sup> ed., Chicago: ASCP Press
- Kiernan, J. A. (2008): *Histological and Histochemical Methods*, 4<sup>th</sup> ed., Bloxham: Scion Publishing Ltd

BGRH-100T, V4, 27.05.2021., 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	 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

