

# GRIMELIUS KOMPLET

IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod CE

## Grimelius komplet za bojenje argirofilnih granula UPUTA ZA RUKOVANJE

REF Kataloški broj: GRI-100T (za 100 testiranja) GRI-K-100 (4 x 100 mL + 15x3.5 g)

### Uvod

Grimelius komplet koristi se u histologiji za vizualizaciju argirofilnih struktura u histološkim presezima tkiva. Pojedina tkiva kao što su neuroendokrini tumori imaju sposobnost vezivanja srebrnih iona iz otopine srebrnog nitrata, ali ne i reduciranja istih do vidljivog oblika – elementarnog srebra, stoga je redukcija srebrnih iona prilikom bojenja postignuta izlaganjem preparata reducirajućoj otopini hidrokinona i natrijeva sulfit. Ispiranjem preparata otopinom natrijevog tiosulfata uklanja se višak nevezanih srebrnih iona.

### Opis proizvoda

**GRIMELIUS KOMPLET** - Komplet od 5 reagensa za bojenje argirofilnih granula.

Komplet sadrži:	100 testiranja (GRI-100T)	4 x 100 mL + 15x3.5 g (GRI-K-100)
Srebrni nitrat, 1%-tna otopina	30 mL (SN1-OT-30)	100 mL (SN1-OT-100)
Acetatni pufer, Grimelius	30 mL (APG-OT-30)	100 mL (APG-OT-100)
Hidrokinon - natrijev sulfit	15 x 1,75 g (HNS-15-175)	15 x 3,5 g (HNS-15-35)
Natrijev tiosulfat, 5%-tna otopina	30 mL (NT5-OT-30)	100 mL (NT5-OT-100)
Nuclear Fast Red (Kernechtrot) reagens	30 mL (KR-OT-30)	100 mL (KR-OT-100)

### UPOZORENJE:

Kako bi postigli što bolje rezultate slijedite ova pravila:

- koristiti destiliranu ili demineraliziranu vodu visoke čistoće **bez** imalo klora
- koristiti potpuno čisto laboratorijsko posuđe
- ne dodirivati preparate ili biti u kontaktu s otopinama tijekom bojenja metalnim predmetima (škarice, pincete i sl.)
- prije korištenja sve reagense ugrijati na sobnu temperaturu
- nanijeti reagens tako da u potpunosti prekrije preparat

### Priprema radne otopine srebrnog nitrata kod:

#### a) kompleta za 100 testiranja (GRI-100T):

U 40 mL dvostruko destiliranu (demi) vodu uz miješanje staklenim štapićem postupno dodavati 2 mL Srebrnog nitrata, 1%-tne otopine i 4 mL Acetatnog pufera, Grimelius. **Odvojiti 1-2 mL radne otopine za drugu impregnaciju.**

#### b) kompleta većeg volumena (GRI-K-100):

U 120 mL dvostruko destiliranu (demi) vodu uz miješanje staklenim štapićem postupno dodavati 6 mL Srebrnog nitrata, 1%-tne otopine i 12 mL Acetatnog pufera, Grimelius. **Odvojiti pola volumena radne otopine za drugu impregnaciju.**

### Priprema reducirajuće otopine kod:

#### a) kompleta za 100 testiranja (GRI-100T)

U 50 mL dvostruko destiliranu (demi) vodu uz miješanje staklenim štapićem dodati sadržaj jednu vrećicu Hidrokinon - natrijev sulfit, praha. **Odvojiti 1-2 mL reducirajuće otopine za drugu impregnaciju.**

#### b) kompleta većeg volumena (GRI-K-100)

U 100 mL dvostruko destiliranu (demi) vodu uz miješanje staklenim štapićem dodati sadržaj jednu vrećicu Hidrokinon - natrijev sulfit, praha. **Odvojiti pola volumena reducirajuće otopine za drugu impregnaciju**

Priprema histoloških preparata za bojanje

- Tkivni uzorak kvalitetno 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 preparat intermedijem; ksilenom (BioClear) ili supstitutom ksilena (BioClear New).
- Infiltrirati i uklopiti preparat u parafin (BioWax Plus, BioWax 56/58, BioWax Blue, BioWax Micro).
- Parafinski blok narezati na 4-6 mikrona tanke rezove i montirati na VitoGnost predmetno staklo.

### Postupak bojenja uzorka kompletom za 100 testiranja (GRI-100T)

#### a) kompletom za 100 testiranja (GRI-100T)

1.	Pripremiti <b>radnu otopinu srebrnog nitrata</b> , uliti je u posudu, poklopiti staklenim poklopcem i staviti u vodenu kupelj na 60°C. Odvojiti 1-2 mL radne otopine za drugu impregnaciju.	
	Pripremiti <b>reducirajuću otopinu</b> , uliti je u posudu, poklopiti staklenim poklopcem i staviti u vodenu kupelj na 60°C 30 minuta prije koraka 9. Odvojiti 1-2 mL reducirajuće otopine za drugu impregnaciju.	
	Napomena: preporučamo korištenje posuda tipa Coplin ili Hellendahl	
2.	Deparafinacija preparata u ksilenom (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	3 izmjene u trajanju od 3 minute
3.	Rehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	2 izmjene u trajanju od 3 i 2 minute
4.	Rehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	2 minute
5.	Rehidracija u destiliranoj (demi) vodi	2 minute
	<b>PRVA IMPREGNACIJA:</b>	
6.	Uroniti preparate u <b>radnu otopinu srebrnog nitrata</b> i inkubirati na tamnom pri temperaturi od 60°C.	3 sata
7.	Ohladiti preparate na sobnu temperaturu.	5 minuta
8.	Izlijevanje reagensa s preparata bez ispiranja	
9.	Uroniti preparate u <b>reducirajuću otopinu</b> i inkubirati na tamnom pri temperaturi od 60°C.	5 minuta
10.	Ohladiti preparate na sobnu temperaturu.	5 minuta

11.	Isprati preparate u destiliranoj vodi.	3 minute
<b>DRUGA IMPREGNACIJA:</b>		
12.	Nakapati <b>radnu otopinu srebrnog nitrata</b> ( $\geq 5$ kapi) i držati na sobnoj temperaturi.	10 minuta
13.	Izlijevanje reagensa s preparata bez ispiranja	
14.	Nakapati <b>reducirajuću otopinu</b> ( $\geq 5$ kapi) i držati na sobnoj temperaturi.	5 minuta
15.	Isprati preparate u destiliranoj vodi.	3 minute
16.	Nakapati <b>Natrij tiosulfat, 5%-tnu otopinu</b> ( $\geq 5$ kapi)	2 minute
17.	Isprati preparate u destiliranoj vodi.	
18.	Nakapati <b>Nuclear Fast Red (Kernechtrot) reagens</b> ( $\geq 5$ kapi)	1-5 minuta
19.	Isprati preparate u destiliranoj vodi.	
20.	Dehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	5 urona
21.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	2 minute
22.	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.

#### b) kompletom većeg volumena (GRI-K-100)

1.	<p>1. Pripremiti <b>radnu otopinu srebrnog nitrata</b>, uliti je u posudu, poklopiti staklenim poklopcem i staviti u vodenu kupelj na 60°C. Odvojiti 1-2 mL radne otopine za drugu impregnaciju.</p> <p>2. Pripremiti <b>reducirajuću otopinu</b>, uliti je u posudu, poklopiti staklenim poklopcem i staviti u vodenu kupelj na 60°C 30 minuta prije koraka 9. Odvojiti 1-2 mL reducirajuće otopine za drugu impregnaciju.</p>	
2.	Deparafinacija preparata u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	3 izmjene u trajanju od 3 minute
3.	Rehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	2 izmjene u trajanju od 3 i 2 minute
4.	Rehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	2 minute
5.	Rehidracija u destiliranoj (demi) vodi	2 minute
<b>PRVA IMPREGNACIJA:</b>		
6.	Uroniti preparate u <b>radnu otopinu srebrnog nitrata</b> i inkubirati na tamnom pri temperaturi od 60°C.	3 sata
7.	Ohladiti preparate na sobnu temperaturu.	5 minuta
8.	Izlijevanje reagensa s preparata bez ispiranja	
9.	Uroniti preparate u <b>reducirajuću otopinu</b> i inkubirati na 60°C.	5 minuta
10.	Ohladiti preparate na sobnu temperaturu.	5 minuta
11.	Isprati preparate u destiliranoj vodi.	3 minute
<b>DRUGA IMPREGNACIJA:</b>		
12.	Uroniti preparate u <b>radnu otopinu srebrnog nitrata</b> i držati na sobnoj temperaturi.	10 minuta
13.	Izlijevanje reagensa s preparata bez ispiranja	
14.	Uroniti preparate u <b>reducirajuću otopinu</b> i držati na sobnoj temperaturi.	5 minuta
15.	Isprati preparate u destiliranoj vodi.	3 minute
16.	Uroniti preparate u <b>Natrij tiosulfat, 5%-tnu otopinu</b>	2 minute
17.	Isprati preparate u destiliranoj vodi.	
18.	Uroniti preparate u <b>Nuclear Fast Red (Kernechtrot) reagens</b>	1-5 minuta
19.	Isprati preparate u destiliranoj vodi.	
20.	Dehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	5 urona
21.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	2 minute
22.	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.

#### Rezultat

**Argirofilne granule:** svijetlo smeđa do crna boja

**Pozadina:** žuto-smeđa boja

#### Napomena

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

#### Priprema uzorka i dijagnostika

Za uzimanje i pripremu uzorka koristiti prikladne instrumente. Uzorke obraditi suvremenom tehnologijom te ih jasno obilježiti. Obavezno slijediti uputu proizvođača za rukovanje. Kako bi se izbjegle pogreške, postupak obrade uzorka 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 sa 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

Grimelius komplet čuvati u dobro zatvorenoj originalnoj ambalaži na 2°C do 8°C. Ne zamrzavati i ne izlagati direktnoj sunčevoj svjetlosti. Datum proizvodnje i rok valjanosti otisnuti su na etiketi proizvoda.

#### Literatura

1. Bancroft, J.D., Gamble, M. Livingstone, C. Theory and practice of Histological Techniques – 5<sup>a</sup> edizione 2002.
2. Grocott. A Stain for fungi in tissue section and smears. Am J Pathol. 1955; 25:975.
3. Koski, J.P. (1981): Silver methenamine-borate (SMB): Cost reduction with technical improvement in silver nitrate-gold chloride impregnations. J. Histotechnol. 4; str. 115.
4. Melis, M., Carpino, F., Di Tondo, U., Ermes, E. Tecniche in anatomia patologica. 1989.

GRI-X, V2, 09.05.2017., AK/VR

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

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

