

GIEMSA OTOPINA

IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod



Polikromatska otopina eozina, metilenskog modrila i azurnih boja Za bojenje u hematologiji, citologiji i za bojenje prereza krvotvornih organa u histopatologiji

UPUTA ZA RUKOVANJE

REF Kataloški broj: GM-OT-100 (100 mL) GM-OT-1010 (10x100 mL) GM-OT-500 (500 mL) GM-OT-1L (1000 mL) GM-OT-2.5L (2500 mL)

Uvod

Polikromatske Romanowsky boje standardno se koriste za bojenje u hematologiji krvnih razmaza i koštane srži. Razne vrste Romanowsky boja (Giemsa, May-Gruenwald, Leishman, Wright, Jenner itd.) sadrže različite omjere metilenskog modrila kao kationske komponente (i njemu srodnih tiazinskih boja poput azura B) i eozina Y kao anionske komponente. Međudjelovanjem kationske i anionske komponente stvara se poznati Romanowsky efekt koji se ne može postići ukoliko se svaka komponenta koristi zasebno, a iskazuje se stvaranjem ljubičaste boje. Intenzitet obojenja ovisi o sadržaju azura B te omjeru azura B i eozina Y dok na sam rezultat bojenja utječe nekoliko čimbenika: pH vrijednost radne otopine te puferne otopine, način fiksacije te vrijeme izlaganja boji. BioGnostova Giemsa otopina koristi se za diferencijaciju jezgrine i/citoplazmatske morfologije limfocita, monocita, granulocita (neutrofila, eozinofila, bazofila), trombocita i eritrocita. Postoje razne metode u kojima se koristi Giemsa otopina, a jedna od najpoznatijih je tzv. metoda po Pappenheimu, odnosno May-Gruenwald Giemsa metoda gdje se u kombinaciji s May-Gruenwald otopinom boje citološki materijali (razmazi periferne krvi, aspirati citodijagnostičke punkcije, stanice iz izljeva ili sekreta) ili prerezi krvotvornih organa. Uz Pappenheim, Giemsa otopina se vrlo često koristi i za detektiranje kromosomskih aberacija u citogenetici.

Opis proizvoda

GIEMSA OTOPINA - Otopina eozina, metilenskog modrila i azurnih boja u metanolu i glicerolu uz dodatak stabilizatora.

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 uklanjanje poput BioGnostovih granuliranih parafina BioWax Plus, BioWax 56/58, BioWax Blue, BioWax Micro
- 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
- Reagensi za fiksaciju poput BioGnostovog Histanola M
- BioGnostovo lmerzijsko ulje
- BioGnostove Puferne tablete pH 6,8 ili 7,2

Priprema otopina

Puferna otopina pH 6,8

Otopiti 1 pufernu tabletu pH 6,8 u 1 litri destilirane vode uz miješanje.

Napomena: U postupku bojenja moguće je koristiti i pufernu otopinu pH vrijednosti 7,2 ili kombinaciju pufernih otopina pH 6,8 i 7,2, a rezultati postupka bojenja mogu se razlikovati u pomaku prema crvenom ili plavom spektru boje.

Radna otopina Giemse za standardnu metodu bojenja

Dodati 10 mL otopine Giemse u 190 mL puferne otopine pH 6,8, dobro promiješati, pustiti da odstoji 10 minuta. Po potrebi filtrirati.

Radna otopina Giemse za perioperativnu metodu bojenja

Dodati 50 mL otopine Giemse u 50 mL puferne otopine pH 6,8, dobro promiješati, pustiti da odstoji 10 minuta. Po potrebi filtrirati.

Radna otopina Giemse za brzu metodu bojenja

Dodati 33 mL otopine Giemse u 66 mL puferne otopine pH 6,8, dobro promiješati, pustiti da odstoji 10 minuta. Po potrebi filtrirati.

0,1%-tna vodena otopina octene kiseline

0,1 mL BioGnostove Octene kiseline za histologiju dodati u 99,9 mL destilirane/demineralizirane vode.

A1) Postupak bojenja krvnog razmaza Giemsa otopinom

1.	Osušiti krvni razmaz na zraku	
2.	Fiksirati krvne razmaze osušene na zraku izlaganjem metanolu (Histanol M)	5 minuta
3.	Uroniti fiksirani razmaz u radnu Giemsa otopinu	15-20 minuta
4.	Isprati razmaz u pufernoj otopini pH 6,8 – dvije izmjene	2 izmjene od 1 minute
5.	Osušiti preparat na zraku	

A2) Postupak bojenja krvnog razmaza brzom Giemsa metodom

1.	Osušiti krvni razmaz na zraku	
2.	Fiksirati krvne razmaze osušene na zraku izlaganjem metanolu (Histanol M)	1-3 minute
3.	Uroniti fiksirani razmaz u radnu Giemsa otopinu	3 minute
4.	Isprati razmaz u pufernoj otopini pH 6,8	2 izmjene od 1 minute
5.	Osušiti preparat na zraku	

A3) Postupak bojenja krvnog razmaza May-Gruenwald Giemsa (Pappenheim) standardnom metodom

1.	Osušiti krvni razmaz na zraku	
2.	Nanijeti May-Gruenwald otopinu na osušeni razmaz	3-5 minuta
3.	Isprati nakratko razmaz u pufernoj otopini pH 6,8.	
4.	Nanijeti radnu Giemsa otopinu na razmaz	15-20 minuta
5.	Isprati nakratko razmaz u pufernoj otopini pH 6,8.	
	Napomena: Ukoliko je potrebno, na preparatu ostaviti manji volumen puferne otopine kako bi se temeljito uklonili ostaci boje te postigli jasnu i izoštreu sliku obojenih struktura. Isprati otopinu nakon 10-30 sekundi.	
6.	Osušiti preparat na zraku	

A4) Postupak bojenja krvnog razmaza May-Gruenwald Giemsa (Pappenheim) perioperativnom metodom

1.	Osušiti krvni razmaz na zraku	
2.	Nanijeti May-Gruenwald otopinu na osušeni razmaz	1-2 minuta
3.	Isprati nakratko razmaz u puferskoj otopini pH 6,8.	
4.	Nanijeti radnu Giemsa otopinu na razmaz	5 minuta
5.	Isprati nakratko razmaz u puferskoj otopini pH 6,8.	
	Napomena: Ukoliko je potrebno, na preparatu ostaviti manji volumen puferske otopine kako bi se temeljito uklonili ostaci boje te postigli jasnu i izoštrenu sliku obojenih struktura. Isprati otopinu nakon 10-30 sekundi.	
6.	Osušiti preparat na zraku	

Rezultat (pH 6,8)

Jezgre – purpurna do ljubičasta boja

Plazma limfocita – plava boja

Plazma monocita – sivkasto plava boja

Neutrofilna granula – svijetlo ljubičasta boja

Eozinofilna granula – svijetlo crvena boja

Bazofilna granula – tamno ljubičasta do crna boja

Trombociti – ljubičasta boja

Eritrociti – crvenkasta boja

Priprema histoloških preparata i otopina za bojenje Giemsa otopinom (biopsija koštane srži, ilijačne kosti)

- 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).
- Dekalcificirati uzorak uranjanjem u blago djelujuće sredstvo za dekalifikaciju (OsteoSens). Ostaviti sredstvo da djeluje 6 sati.
- Uzorak pažljivo narezati na manje dijelove (5-20 µm). Ukoliko je potrebno, ponovno tretirati sredstvom za dekalifikaciju (OsteoSens) u trajanju od 20 minuta.
- Prosvijetliti uzorak intermedijem; ksilenom (BioClear) ili supstitutom ksilena (BioClear New).
- Infiltrirati i uklopiti uzorak u parafin (BioWax Plus, BioWax 52/54, BioWax 56/58, BioWax Blue, BioWax Micro).
- Parafinski blok narezati na 4-6 mikrona tanke rezove i montirati na VitroGnost predmetno staklo.

B) Postupak bojenja histoloških preparata Giemsa otopinom

1.	Deparafinirati preparat ksilenom (BioClear) ili supstitutom ksilena (BioClear New) i rehidrirati preparat kroz seriju silaznih alkoholnih otopina (Histanol 100, Histanol 95, Histanol 80 i Histanol 70).	
2.	Ispirati preparat destiliranom/demineraliziranom vodom	10 sek
3.	Obojiti preparat Giemsa otopinom do postizanja optimalnog obojenja preparata	10-15 min
	Napomena: U ovom koraku ne koristiti radnu otopinu Gjemse, već nerazrijeđenu	
4.	Diferencirati preparat 0,1%-tnom otopinom octene kiseline	10 sek
5.	Ispirati preparat destiliranom/demineraliziranom vodom	10 sek
6.	Dehidrirati preparat kroz tri izmjene izopropilnog alkohola (Histanol IP)	3 izmjene od 10 sek
7.	Izbistriti preparat kroz dvije izmjene ksilena (BioClear) ili supstitutom ksilena (BioClear New)	2 izmjene od 2 min

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

Jezgre – plava boja

Kolagen, osteoid – svijetloplava boja

Eozinofilna zrnca – crvena boja

Acidofilni mukopolisaharidi, mastociti, matriks hrskavice – crveno ljubičasta boja

Acidofilne supstance – narančasto crvena 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 uzoraka koristiti prikladne instrumente. Uzorke obraditi suvremenom tehnologijom te ih jasno obilježiti. Obavezno pratiti 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. Reagensi korišteni 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

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

Literatura

1. Beck, R.C. (1938): *Laboratory Manual of Hematological Technique*, Philadelphia, W.B. Saunders & Co.
2. Dacie, J. et Lewis S. (1995): *Practical haematology*, 4th ed., London, Churchill Livingstone.
3. Giemsa, G. (1922): Das Wesen der Giemsa-Färbung, *Zentralb f Bakt*, 89, str. 99-106.
4. International Committee for Standardization in Haematology (1984): ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain), *British Journal of Haematology*, 57, str. 707-710.
5. May, R. et Grünwald L. (1909): *Über die Färbung von Feuchtpreparaten mit meiner Azur-Eosine methode*, Deutsche med Wschr, 35, str. 1751-1752.

GM-OT-X, V25, 22.05.2019., MAS/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		Opaziti lomljivo				

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

