

HEMATOXYLIN, boja u prahu, C.I. 75290

IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod CE

Hematoksilin, Natural Black 1, BSC certificirana boja Za pripremu reagensa za bojenje jezgre

UPUTA ZA RUKOVANJE

REF Kataloški broj: H-P-25 (25 g) H-P-100 (100 g)

Uvod:

Hematoksilin se dobiva ekstrakcijom iz kampehovog ogrjevnog drva (*Haematoxylon campechianum* L.). Oksidacijom hematoksilina u hematein i vezanjem s metalnim ionima (mordantima) hematein postaje nezamjenjiva nuklearna učinkovita boja. Pozitivno nabijeni kompleks hemateina i mordanta veže se s negativno nabijenim fosfatnim ionima jezgrine DNA dajući karakteristično plavo obojenje. Postoji nekoliko različitih otopina hematoksilina, reagensi za histološka bojenja (Hematoksilin H, Hematoksilin M, Hematoksilin ML, Hematoksilin G1, Hematoksilin G2, Hematoksilin G3, Hematoksilin PTA, Hematoksilin W komplet) i reagensi za citologiju (Hematoksilin G1, Hematoksilin G2, Hematoksilin G3, Hematoksilin HP). Iako navedeni reagensi imaju karakterističnu primjenu, svaki daje izvanredne rezultate bojenja jezgrine membrane, nukleoplazme te jezgre.

Opis proizvoda:

- **HEMATOXYLIN BOJA U PRAHU** – Biological Stain Commission (BSC) certificirana boja u prahu za izradu reagensa za bojenje jezgre.

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 DPX Low Eco, 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
- BioGnostova sredstva za imeriziju poput Imerzijskog ulja, Imerzijskih ulja tipova A, C, FF, 37 ili Imerzijskog ulja Tropical Grade
- Reagensi za kontrastno bojenje poput BioGnostovih otopina eozina: Eozin 0.5% vodeni, Eozin 1.0% vodeni, Eozin 0.5% alkoholni, Eozin Kontrast
- Kalij aluminijev sulfat
- Natrijev jodat
- Etilen glikol
- Sredstvo za diferencijaciju poput BioGnostovog Kiselog alkohola
- Sredstvo za plavljenje poput BioGnostove Scottove otopine ili Bluing reagensa
- Reagens za mikroskopiju poput BioGnostove Octene kiseline za histologiju

Priprema reagensa:

- Harris Hematoksilin
Otopiti 5 g Hematoxylin boje u prahu u 50 mL etilnog alkohola (Histanol 100) uz lagano zagrijavanje. Zagrijati 950 mL destilirane vode i u tome otopiti 100 g kalij aluminijevog sulfata. Pomiješati obje otopine te postupno zagrijavati do vrenja. Nakon što otopina provrije, maknuti s vatre i dodati 370 mg natrijevog jodata uz neprestano miješanje. Nakon što se ohladi dodati 4 mL BioGnostove Octene kiseline za histologiju. Reagens filtrirati prije upotrebe.
- Gill 2 Hematoksilin
Pomiješati 250 g etilen glikola i 730 mL destilirane (demi) vode. Dodati 4 g hematoksilina, 0.4 g natrijevog jodata i 70,4 g aluminijevog sulfata oktadekahidrata. Dobro pomiješati i otopiti sve sastojke. Dodati 20 mL Octene kiseline za histologiju.

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.

Postupak bojenja hematoksilin-eozin (HE) metodom, regresivno

1.	Deparafinacija u ksilenom (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 (H, ML, G3)	4-8 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.	Diferencijacija Kiselim alkoholom	3-10 urona
	Napomena: Ovim korakom uklanja se višak hematoksilina iz jezgre i citoplazme. Ako je preparat predugo tretiran sredstvom za diferencijaciju, može doći do obezbojenja jezgri.	
8.	Isprati u destiliranoj vodi	

9.	Plavljenje jezgri Scottovom otopinom ili Bluing reagensom	1 minuta
	Napomena: Zaustaviti plavljenje nakon što jezgre poprime plavu boju U nedostatku Scottove otopine ili Bluing reagensna ispirati preparate pod tekućom vodom u trajanju od 3-5 minuta	
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	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 supstitut ksilena, odgovarajuće sredstvo za prekrivanje je BioMount New. Prekriti preparat VitroGnost pokrovnim staklom.

Rezultat:

Jezgra - plava boja

Citoplazma, kolagen, mišićna vlakna, eritrociti - nijanse ružičaste boje (nijanse crvene boje kod bojenja Eozin Kontrastom)

Napomena

Vremenski periodi postupka bojenja nisu standardizirani. 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 najsuvremenijom 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. 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

Hematoxylin prah čuvati u dobro zatvorenoj originalnoj ambalaži na sobnoj temperaturi. Ne držati na hladnom, ne zamrzavati i izbjegavati izlaganje direktnoj sunčevoj svjetlosti. Stabilnost iznosi 12 mjeseci, a rok valjanosti je otisnut na etiketi proizvoda.

Literatura

1. Baker, J.R. (1962): Experiments on the action of mordants. 2. Aluminium-hematein. *Q.J.Microsc. Sci.* 103, str. 493-517.
2. Conn, J. (1977): *Biological Stains*, 9th ed., Baltimore: Williams and Wilkens Co.
3. Harris, H.F. (1898): A new method of "ripening" haematoxylin. *Microsc. Bull.* (Philadelphia) Dec. 47.
4. Harris, H.F. (1900): On the rapid conversion of haematoxylin into haematein in staining reactions. *J. Appl. Microsc.* 3: str. 777-780.

H-X, V6, 14.02.2017., 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		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

