

ORCEIN boja u prahu, C.I. (ed.1) 1242

IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod CE

Natural Red 28, Orcein Synthetic

Za bojanje elastičnog tkiva i antigena virusa hepatitisa B

UPUTA ZA RUKOVANJE

REF Kataloški broj: ORC-P-5 (5 g)

ORC-P-10 (10 g)

Uvod

Histologija, citologija i druge srodne znanstvene discipline proučavaju mikroskopsku anatomiju tkiva i stanica. Kako bi se postigla dobra vizualizacija tkivnih i staničnih struktura, potrebno ih je pravilno obojiti. Orcein boja preporuča se za bojenje elastičnih vlakana i lamela. Također, može bojiti biljne kromosome, spolni kromatin ljudi te se koristi i kao boja za stanične jezgre. Jedna od značajnijih primjena je i demonstracija jetrenih inkluzija, posebno za antigen hepatitisa B, ali i za nakupine proteina koji sadrže bakar.

Opis proizvoda

- **ORCEIN** - Biological Stain Commission (BSC) certificirana boja u prahu za izradu otopine boje

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 uklopavanje poput BioGnostovih granuliranih parafina BioWax Plus, BioWax 52/54, 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
- VitroGnost pokrovna stakla dimenzija od 18x18 mm do 24x60 mm
- BioGnostova sredstva za umerziju poput Imerzijskog ulja, Imerzijskih ulja tipova A, C, FF, 37 ili Imerzijskog ulja Tropical Grade
- Kalijev permanganat
- Oksalna kiselina
- Sumporna kiselina
- Perjodna kiselina, 5%-tna otopina (kat.br. PK05-OT-30, PK05-OT-100, PK05-OT-250, PK05-OT-500)
- Kiseli alkohol (kat.br. KA-OT-1L, KA-OT-2L)
- Klorovodična kiselina

Priprema otopina za postupak bojenja

Otopina kalijevog permanganata:

- Pomiješati 0,15 g kalijevog permanganata i 100 mL destilirane/demi vode. Dodati 5 mL 3%-tne sumporne kiseline.
- Dobro promiješati, baciti nakon korištenja.

5%-tna otopina oksalne kiseline

- Otopiti 5 g oksalne kiseline u 100 mL desilirane/demi vode.
- Dobro promiješati. Otopina je stabilna jednu godinu

Otopina orceina

- Otopiti 1 g Orcein boje u prahu u 100 mL 70%-tnog alkohola (Histanola 70). Dodati 1 mL klorovodične kiseline.
- Dobro promiješati. Vrijednost pH mora biti između 1 i 2. Pustiti otopinu barem 48 sati, te filtrirati prije upotrebe. Stabilno 6 mjeseci.

Priprema histoloških preparata za bojenje

- Uzorak tkiva kvalitetno fiksirati (Formaldehid NB 4%, Formaldehid NB 10%, Bouinova otopina), isprati vodom i dehidrirati kroz seriju uzlaznih alkoholnih otopina (Histanol 70, Histanol 80, Histanol 95 i Histanol 100).
- Prosvjetliti preparat intermedijem; ksilenom (BioClear) ili supstitutima ksilena (BioNene, BioClear New).
- Infiltrirati i uklopiti preparat u parafin (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 histoloških preparata

| | | |
|-----|---|--------------------------------------|
| 1. | Deparafinacija u ksilenu (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 minute |
| 3. | Rehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95) | 2 minute |
| 4. | Rehidracija u destiliranoj (demi) vodi | 2 minute |
| 5. | Tretiranje otopinom kalijevog permanganata | 10 minuta |
| 6. | Ispiranje u destiliranoj (demi) vodi | |
| 7. | Tretiranje 5%-tnom oksalnom kiselinom do obezbojenja | |
| 8. | Ispiranje u vodovodnoj vodi | |
| 9. | Isprati u destiliranoj (demi) vodi | |
| 10. | Tretiranje Perjodnom kiselinom, 0,5%-tnom otopinom | 5 minuta |
| 11. | Ispiranje u vodovodnoj vodi | |
| 12. | Isprati u destiliranoj (demi) vodi | |
| 13. | Bojenje otopinom orceina; standardno bojenje na sobnoj temperaturi ili | 4-16 sati |

| | | |
|-----|---|------------------------------------|
| | zagrijati u mikrovalnoj na slaboj jačini, pustiti da odstoji 30 minuta. Provjeriti jačinu obojenosti pod mikroskopom. Ukoliko nije dovoljno jako, ponoviti postupak | 30-45 sekundi |
| 14. | Dehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95) | |
| 15. | Ispiranje u 70%-tnom alkoholu (Histanol 70) | |
| 16. | Diferenciranje Kiselim alkoholom ukoliko je potrebno (provjeriti pod mikroskopom) | |
| 17. | Ispiranje u 70%-tnom alkoholu (Histanol 70) | |
| 18. | Dehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95) | 2 izmjene u trajanju od 30 sekundi |
| 19. | Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100) | 2 izmjene u trajanju od 1 minute |
| 12. | Bistenje u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New) | 2 izmjene u trajanju od 2 minuta |

Odmah nakon bistenja, 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.

Napomena

Navedena formulacija samo je jedan od načina pripreme otopine boje. Ovisno o osobnim zahtjevima i standardnim operativnim postupcima laboratorija, otopina boje može se pripremiti i prema drugim protokolima. 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.

Rezultat

Antigeni Hepatitisa B, elastična vlakna – tamno smeđe-ljubičasta boja

Proteini koji sadrže bakar – tamno ljubičasta boja

Pozadina – svijetla smeđe-ljubičasta boja

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 bojanja i postavljanje dijagnoze mogu provoditi samo ovlaštene i stručno osposobljene osobe. Koristiti mikroskop opremljen prema standardima medicinskog dijagnostičkog laboratorija. 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 s obavijestima i znakovima upozorenja otisnutima na etiketi proizvoda i u BioGnostovom Sigurnosno-tehničkom listu koji je dostupan na zahtjev.

Skladištenje, stabilnost i rok valjanosti

Orcein boju u prahu u čuvati u dobro zatvorenoj originalnoj ambalaži i na temperaturi od +15 °C do +25°C.. Držati na suhom, ne zamrzavati i izbjegavati izlaganje direktnoj sunčevoj svjetlosti. Rok valjanosti je otisnut na etiketi proizvoda.

Literatura

1. Conn, J. (1977): Biological Stains, 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Co.
2. Carson, F. L., Hladik, C. (2009): Histotechnology: A Self-Instructional Text, 3rd ed., Chicago: ASCP Press
3. Lillie, R.O. (1969): Biological Stains, 8th ed., Baltimore: Williams & Wilkins Co.
4. Luna, L. (1978): Recommended Procedure for Demonstrating Hepatic B Antigen in Parafin Sections, Histo-Logic, Vol. VIII. No. 4, LAB-TEK Div., Miles Lab. Inc.

ORC-P-X, V2, 15.02.2017, AKVR

| | | | | |
|--|--|--|--|---|
|  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

