

BIO-DIFF 3 REAGENS

IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod



Plava komponenta Bio-Diff kompleta

UPUTA ZA RUKOVANJE

REF Kataloški broj: BD3-OT-100 (100 mL)

BD3-OT-500 (500 mL)

BD3-OT-1L (1000 mL)

BD3-OT-2.5L (2500 mL)

Uvod

Bio-Diff 3 reagens sastavni je dio BioGnostovog Bio-Diff kompleta. Sadrži azurne boje u fosfatnom puferu. Ostali reagensi koji čine komplet su Bio-Diff 1 reagens (fiksacijska komponenta kompleta), Bio-Diff 2 reagens (crvena komponenta kompleta) i puferske tablete pH 6,8 i 7,2. Bio-Diff 1 reagens sadrži metilni alkohol, dok Bio-Diff 2 reagens sadrži otopinu eozina Y. Međudjelovanjem crvene i plave komponente stvara se poznati Romanowsky efekt koji se ne može postići ukoliko se svaka komponenta koristi zasebno, a iskazuje se stvaranjem ljubičaste boje. BioGnostov Bio-Diff komplet u kratkom vremenu učinkovito boji hematološke i citološke preparate, kao i tkivne preparate i daje precizne rezultate bojanja, poput rezultata dobivenih May Grünwald-Giemsa metodom. Svaka komponenta Bio-Diff kompleta posebno je stabilizirana i pripremljena prema najvišim standardima.

Opis proizvoda

BIO-DIFF 3 REAGENS – otopina azurnih boja u fosfatnom puferu

Primjena Bio-Diff 3 reagensa kao komponente Bio-Diff kompleta

Ostali preparati i reagensi koji mogu biti upotrijebljeni u metodi:

- BioGnostova sredstva za imeriziju poput Imerzijskog ulja, Cedrovog ulja, Imerzijskih ulja tipova C, A, FF, 37 i Tropical Grade
- Predmetna stakla za primjenu u hematologiji poput VitroGnost STANDARD GRADE ili predmetna stakla visoke kvalitete za primjenu u histopatologiji i citologiji poput VitroGnost SUPER GRADE ili neka od tridesetak vrsta BioGnostovih VitroGnost predmetnih stakala
- Preostale komponente Bio-Diff kompleta: Bio-Diff 1 reagens (kat.br. BD1-OT-100, BD1-OT-500, BD1-OT-1L, BD1-2.5L) i Bio-Diff 2 reagens (kat.br. BD2-OT-100, BD2-OT-500, BD2-OT-1L, BD2-OT-2.5L) i Puferske tablete pH 7,2 (kat.br. PT-72-50, PT-72-100) ili Puferske tablete pH 6,8 (kat.br. PT-68-50, PT-68-100)

Priprema otopina

Puferska otopina pH 6,8 ili pH 7,2

Otopiti 1 pufersku tabletu pH u 1 litri destilirane vode uz miješanje. Otopinu filtrirati.

Postupak bojanja krvnog razmaza/uzorka koštane srži

1.	Osušiti krvni razmaz na zraku	
	Napomena: Razmaz periferne krvi pripremiti od svježe izvađenog krvnog uzorka	
2.	Uroniti preparat u Bio-Diff 1 reagens	5 x 1 sekundu
3.	Ocijediti višak reagensa s preparata na filter papir	
4.	Uroniti preparat u Bio-Diff 2 reagens	3 x 1 sekundu
	Napomena: produžiti vrijeme inkubacije ukoliko želite jaču nijansu crvene/ljubičaste boje preparata	do 5 x 1 sekundu
5.	Ocijediti višak reagensa s preparata na filter papir	
6.	Uroniti preparat u Bio-Diff 3 reagens	6 x 1 sekundu
	Napomena: smanjiti vrijeme inkubacije ukoliko želite jaču nijansu crvene/ljubičaste boje preparata	5 x 1 sekundu
7.	Isprati preparat u puferskoj otopini pH 6,8	1 minutu (uz agitaciju)
8.	Osušiti preparat na zraku	

Postupak bojanja parazitoloških (Leishmania, Toxoplasma, Microsporadia) i mikrobioloških uzoraka (Cryptosporidium, Pneumocystis carinii)

1.	Uroniti preparat u Bio-Diff 1 reagens	1 minuta
2.	Ocijediti višak reagensa s preparata na filter papir	
3.	Uroniti preparat u Bio-Diff 2 reagens	25 sekundi
4.	Ocijediti višak reagensa s preparata na filter papir	
5.	Uroniti preparat u Bio-Diff 3 reagens	25 sekundi
6.	Isprati preparat u puferskoj otopini pH 7,2	1 minutu (uz agitaciju)
7.	Osušiti preparat na zraku	

Postupak bojanja spermija

Priprema razmaza spermija: 15 µL svježeg uzorka spermija kapnuti na jedan kraj predmetnog stakalca i napraviti tanak i homogen razmaz. Pustiti da se osuši na zraku (barem 10 minuta).

1.	Uroniti preparat u Bio-Diff 1 reagens	5 x 1 sekundu
2.	Ocijediti višak reagensa s preparata na filter papir	
3.	Uroniti preparat u Bio-Diff 2 reagens	5 x 1 sekundu
4.	Ocijediti višak reagensa s preparata na filter papir	
5.	Uroniti preparat u Bio-Diff 3 reagens	5 x 1 sekundu
6.	Isprati preparat u puferskoj otopini pH 7,2	1 minutu (uz agitaciju)
7.	Osušiti preparat na zraku	

Kako bi napravili trajni preparat, na obojeni i osušeni preparat nanijeti odgovarajuću vrstu DPX medija (BioMount DPX sredstvo za prekrivanje/montiranje pokrovnog stakla). Prekriti preparat VitroGnost pokrovnim staklom.

Rezultat

Glava spermija – homogena tamno ljubičasta boja

Akrosom spermija – blijedo ljubičasta boja

Srednji dio spermija i rep – tamno ljubičasta

Postadina – blijedo ružičasta boja

Postupak bojenja histoloških preparata

a) priprema histološkog preparata

Uzorak tkiva 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).

Prosvijetliti preparat intermedijem; ksilenom (BioClear) ili supstitutom ksilena (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 Super Grade predmetno staklo.

b) bojenje histološkog preparata

Napomena: ne koristiti Bio-Diff 1 reagens (koristi se kao fiksativ za nehistolške uzorke)

1.	Deparafinacija u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	3 izmjene u trajanju od 10 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.	Uroniti preparat u Bio-Diff 2 reagens i lagano miješati	7 sekundi
6.	Uroniti preparat u Bio-Diff 3 reagens i lagano miješati	5 sekundi
7.	Isprati puferском otopinom pH 7,2	1 minutu (uz agitaciju)
8.	Ocijediti višak reagensa s preparata na filter papir	
9.	Dehidirati i diferencirati u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95) uz lagano miješanje	10 sekundi
10.	Dehidrirati preparat u 100%-tni alkohol (Histanol 100)	1 minuta
11.	Bistrenje u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	2 izmjene u trajanju od 5 minuta

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 supstituit ksilena, odgovarajuće sredstvo za prekrivanje je BioMount New. Prekriti preparat VitroGnost pokrovnim staklom.

Postupak bojanja citobakterioloških uzoraka (urin, punktati, CSF)

1.	Osušiti citološki uzorak na zraku	
2.	Uroniti preparat u Bio-Diff 1 reagens Napomena: CSF duže inkubirati	5 sekundi 1 minutu
3.	Ocijediti višak reagensa s preparata na filter papir	
4.	Uroniti preparat u Bio-Diff 2 reagens Napomena: produžiti vrijeme inkubacije ukoliko želite jaču nijansu crvene/ljubičaste boje preparata	3 x 1 sekundu (CSF 2 x 1 sekundu) do 5 x 1 sekundu
5.	Ocijediti višak reagensa s preparata na filter papir	
6.	Uroniti preparat u Bio-Diff 3 reagens Napomena: smanjiti vrijeme inkubacije ukoliko želite jaču nijansu crvene/ljubičaste boje preparata	6 x 1 sekundu (CSF 2 x 1 sekundu) 5 x 1 sekundu
7.	Isprati preparat u puferскоj otopini pH 7,2	1 minutu (uz agitaciju)
8.	Osušiti preparat na zraku	

Rezultat (krvni razmaz)

Jezgre – crvena do ljubičasta boja

Limfociti – plazma plavo obojana

Monociti – plazma sivkasto plavo obojana

Neutrofilni granulociti – svijetlo ljubičasto obojani

Eozinofilni granulociti – žarko crveno do crvenkasto smeđe obojani

Bazofilni granulociti – tamno ljubičasto do crno obojani

Trombociti – ljubičasta boja

Eritrociti – crvena boja

Krvni paraziti – jezgra crveno obojena, a citoplazma plavo obojena

Napomena

Vremenski periodi postupka bojanja nisu u potpunosti standardizirani u kliničkoj i laboratorijskoj praksi. Periodi navedeni u Uputi okvirno odgovaraju dugogodišnjem načinu rada s optimalnim rezultatima. Intenzitet obojenja ovisi o duljini izlaganja preparata boji. Realni protokol bojanja ovisi o osobnim zahtjevima i prioritetima.

Priprema uzorka i dijagnostika

Za uzimanje i pripremu uzorka koristiti prikladne instrumente. Uzorke obraditi najsvremenijom tehnologijom te ih jasno obilježiti. Obavezno pratiti upute proizvođača za primjenu/upotrebu. 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.

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

Bio-Diff 3 reagens čuvati u dobro zatvorenoj originalnoj ambalaži na sobnoj temperaturi. Ne držati na hladnom, ne zamrzavati i ne izlagati 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. Kiernan, J.A. (2008): *Histological and histochemical methods: Theory and Practice*, 4th ed., Bloxham, Scion Publishing Ltd.
5. May, R. et Grünwald L. (1909): *Über die Färbung von Feuchtpreparaten mit meiner Azur-Eosine methode*, Deutsche med Xschr, 35, str. 1751-1752.

BD3-X, V1, 24.07.2020., KB/ISP

 Obavezno proučiti priloženu dokumentaciju	 Temperaturni raspon čuvanja	 Broj testova u pakovanju	 REF Kataloški broj	 Europska sukladnost
 Pročitati priloženu uputu	 Čuvati od topline i sunčevog svjetla	 Vrijedi do	 LOT 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

