

FEULGEN KOMPLET

IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod **CE**

Komplet od pet reagensa za bojanje DNA prema Feulgenu

UPUTA ZA RUKOVANJE

REF Kataloški broj: FE-100T (za 100 testiranja) FE-K-100 (6 x 100 mL)

Uvod

Feulgenova reakcija, koju je prvi opisao Robert Feulgen jedna je od najširih i najčešće korištenih citokemijskih metoda za semikvantitativno određivanje DNA u histološkim i citološkim uzorcima. U svrhu postavljanja dijagnoze i daljnjih koraka liječenja malignih tumora izuzetno je važno utvrditi točnu količinu i stanje jezgrine DNA. Ključni parametar za točno mjerenje jezgrine DNA jest ponovljivost Feulgenove reakcije. Ukoliko se precizno slijedi uputa za rukovanje, spomenuta ponovljivost se lako i pouzdano postiže reagensima BioGnostovog Feulgen kompleta. Komplet dodatno sadrži i kontrastni reagens za bojenje citoplazme što omogućuje lakše i jasnije uočavanje obojane DNA. Upotreba kontrastnog reagensa nije nužna u protokolu bojenja, ali svakako daje bolji kontrast obojenoj DNA na preparatu.

Opis proizvoda

FEULGEN KOMPLET – Komplet za semikvantitativno određivanje DNA.

Komplet sadrži:	100 testiranja (FE-100T)	6 x 100 mL (FE-K-100)
HCL reagens, Feulgen	30 mL (HCLF-OT-30)	100 mL (HCLF-OT-100)
BioSchiff reagens	30 mL (BS-OT-30)	100 mL (BS-OT-100)
Natrijev metabisulfit, otopina za Feulgen	2x30 mL (NMF-OT-30)	2x100 mL (NMF-OT-100)
Natrijev tiosulfat, 2%-tna otopina	30 mL (NT2-OT-30)	100 mL (NT2-OT-100)
Fast Green F.C.F. kontrast reagens	30 mL (FGKR-OT-30)	100 mL (FGKR-OT-100)

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 ukapavanje poput BioGnostovih granuliranih parafina BioWax Plus, BioWax 56/58, BioWax Blue
- 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

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).
- Parafinski blok narezati na 4-6 mikrona tanke rezove i montirati na VitroGnost predmetno staklo.

NAPOMENA

Nanijeti reagens tako da potpuno prekrije preparat.

Postupak bojenja uzorka

a) kompletom za 100 testiranja (FE-100T)

1.	Deparafinacija u ksilen (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.	Nakapati HCL reagens, Feulgen (≥ 5 kapi)	40 minuta
6.	Dva puta isprati u destiliranoj (demi) vodi	
7.	Nakapati BioSchiff reagens (≥ 5 kapi) *za intenzivnije obojenje, produžiti inkubaciju do 60 min	10 minuta
8.	Bez ispiranja, ocijediti preparat te višak reagensa odstraniti s preparata pomoću filter papira	
9.	Nakapati Natrijev metabisulfit, otopinu za Feulgen (≥ 5 kapi)	2 izmjene u trajanju od 2 minute
10.	Bez ispiranja, ocijediti preparat te višak reagensa odstraniti s preparata pomoću filter papira	
11.	Nakapati otopinu Natrijeva tiosulfata, 2%-tne otopine	3 minute
12.	Isprati u tekućoj vodovodnoj vodi	2 minute
13.*	Nakapati Fast Green F.C.F. kontrast reagensom (nakapati ≥ 5 kapi)	10-15 sekundi
14.*	Isprati vodovodnom vodom	1 minuta
15.	Dehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	2 izmjene s 10-15 urona
16.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	3 izmjene s 10-15 urona
17.	Bistrenje u ksilen (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	2 izmjene u trajanju 2 minute

* Koraci 13. i 14. uključuju primjenu kontrastnog reagensa, ukoliko preparate ne treba kontrastno bojiti, ove korake preskočiti

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 s pet reagensa od 100 mL (FE-K-100)

Reagense uliti u posudice za bojenje (tip Coplin, Hellendahl ili Schifferdecker) te nakon bojenja vratiti u originalne bočice. Dobro zatvoriti. Prema potrebi reagense filtrirati.

1.	Deparafinacija u ksileni (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.	Uroniti u HCl reagens, Feulgen	40 minuta
6.	Dva puta isprati u destiliranoj (demi) vodi	
7.	Uroniti u BioSchiff reagens *za intenzivnije obojenje, produžiti inkubaciju do 60 min	10 minuta
	Napomena: prilikom bojenja poklopiti posudicu s BioSchiff reagensom, kako bi se smanjilo isparavanje sulfita	
8.	Bez ispiranja, ocijediti preparat te višak reagensa odstraniti s preparata pomoću filter papira	
9.	Uroniti u Natrijev metabisulfit, otopinu za Feulgen	2 izmjene u trajanju od 2 minute
	Napomena: prilikom tretiranja poklopiti posudicu kako bi se smanjilo isparavanje sulfita	
10.	Bez ispiranja, ocijediti preparat te višak reagensa odstraniti s preparata pomoću filter papira	
11.	Uroniti u Natrijev tiosulfat, 2%-tnu otopinu	3 minute
12.	Isprati u tekućoj vodovodnoj vodi	2 minute
13.*	Nakapati Fast Green F.C.F. kontrast reagensom (nakapati ≥ 5 kapi)	10 -15 s
14.*	Isprati vodovodnom vodom	1 minuta
15.	Dehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	2 izmjene s 10-15 urona
15.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	3 izmjene s 10-15 urona
16.	Bistrenje u ksileni (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	2 izmjene u trajanju od 2 minute

* Koraci 13. i 14. uključuju primjenu kontrastnog reagensa, ukoliko preparate ne treba kontrastno bojiti, ove korake preskočiti

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 – crveno ljubičasta (magenta) boja

Citoplazma i pozadina - neobojeni ukoliko nije korišten Fast Green F.C.F. kontrastni reagens, zeleno obojeni pri korištenju kontrastnog reagensa

Napomena

Vremenski periodi postupka bojanja nisu u potpunosti standardizirani te okvirno odgovaraju dugogodišnjoj kliničkoj i laboratorijskoj praksi. Intenzitet obojenja ovisi o duljini izlaganja preparata reagensima. Realni protokol bojanja 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 pratiti 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. 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 dostupnim na zahtjev.

Skladištenje, stabilnost i rok valjanosti

Feulgen komplet čuvati u dobro zatvorenoj originalnoj ambalaži na sobnoj temperaturi. Kako bi produžili valjanost BioShift reagensa, preporučamo da ga nakon prve upotrebe čuvate na temperaturi od 2-8°C. Valjana otopina BioSchiff reagensa je bezbojna, nakon što počne poprimati boju zbog gubitka SO₂ otopinu baciti. Držati na suhom, ne zamrzavati i ne izlagati direktnoj sunčevoj svjetlosti. Datum proizvodnje i rok valjanosti otisnuti su na etiketi proizvoda.

Literatura

- Kasten, F. H. (2003): Robert Feulgen and his histochemical reaction for DNA, *Biotechnic & Histochemistry*, 78 (1); str. 45-49.
- Millett, J. A. et al. (1982): Feulgen-hydrolysis profiles in cells exfoliated from the cervix uteri: a potential aid in the diagnosis of malignancy, *J. Clin. Pathol.* 35 (3); str. 345-349.
- Pearse, A. G. E. (1972): Histochemistry: Theoretical and Applied, 3rd ed., London, Churchill Livingstone.
- Schulte, E. et Wittekind, D. (1989): Standardization of the Feulgen-Schiff technique, *Histochemistry and Cell Biology*, 91 (4); str. 321-331.

FE-X, V12, 10.08.2022., KB/ 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

