

# BIO-DIFF 2 REAGENS

IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod



## Crvena komponenta Bio-Diff kompleta

### UPUTA ZA RUKOVANJE

REF Kataloški broj: BD2-OT-100 (100 mL)

BD2-OT-500 (500 mL)

BD2-OT-1L (1000 mL)

BD2-OT-2.5L (2500 mL)

#### Uvod

Bio-Diff 2 reagens sastavni je dio BioGnostovog Bio-Diff kompleta. Sadrži eozin Y boju u fosfatnom puferu. Ostali reagensi koji čine komplet su Bio-Diff 1 reagens (fiksacijska komponenta kompleta), Bio-Diff 3 reagens (plava komponenta kompleta) i puferske tablete pH 6,8 i 7,2. Bio-Diff 1 reagens sadrži metilni alkohol, dok Bio-Diff 3 reagens sadrži azurne boje. 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 2 REAGENS** – otopina eozin Y boje u fosfatnom puferu

#### Primjena Bio-Diff 2 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 3 reagens (kat.br. BD3-OT-100, BD3-OT-500, BD3-OT-1L, BD3-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

Pozadina – 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 u diferencirani 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 2 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*, 4<sup>th</sup> 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*, 4<sup>th</sup> 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.

BD2-X, V1, 24.07.2020., KB/IŠP

 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

