

HEM DIFF



IVD In vitro dijagnostički medicinski proizvod

Razvrstavanje prema Uredbi (EU) 2017/746 - proizvod **Klase A**

Reagens za diferencijaciju pri HE bojenju modificiranom regresivnom metodom

UPUTA ZA RUKOVANJE

OSNOVNI UDI broj	385889212HPC30799PROCYU		
EMDN kod	W01030799		
REF	Kataloški broj	Volumen	UDI-DI broj
HD-OT-1L		1000 mL	03858888829698
HD-OT-2.5L		2500 mL	03858888829759

Namjena proizvoda i načelo testiranja

BioGnostov Hem Diff je slabi diferencijacijski reagens koji se koristi pri modificiranom regresivnom hematoksilin-eozin (HE) bojenju (koristeći Hematoksin G2, G3, ML), i u automatskom i u ručnom postupku bojenja. Modificirano regresivno bojenje odnosi se na metodu koja uključuje prebojavanje struktura te naknadno uklanjanje viška boje iz citoplazme, diferencijaciju jezgri slabijim diferencijatorom i bolje vezanje eozina. Upotreba slabog diferencijatora u modificiranom regresivnom bojenju potrebna je i zbog uklanjanja viška plave boje sa stakalaca, pojave do koje dolazi najviše zbog okomitog položaja stakalaca tijekom HE bojenja u automatskim bojačima gdje se preparati uranjaju u kadicu s reagensom. Slabiji diferencijacijski reagens omogućava dužu inkubaciju i precizniju diferencijaciju. Bez obzira na fiksativ u kojem je tkivo fiksirano (formalin ili glioksal), Hem Diff daje jasne rezultate. Utrošeno vrijeme potrebno za diferencijaciju Hem Diff reagensom jednako je bez obzira na fiksativ korišten za fiksaciju ispitivanog uzorka.

Opis proizvoda

- **HEM DIFF** - Slabi reagens (otopina slabe kiseline) za diferencijaciju hematoksilina (pH 3.8) prilikom modificiranog regresivnog bojenja histoloških preparata HE metodom

Ostali reagensi i materijali koji mogu biti upotrijebljeni u metodi bojenja:

- 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 52/54, BioWax Plus 56/58, BioWax 56/58, BioWax Blue
- VitroGnost predmetna i pokrovna stakla za primjenu u histopatologiji i citologiji
- BioGnostovi reagensi za HE bojenje poput hematoksilina G2, G3, ML i eozina (vodenih i alkoholnih)
- Sredstvo za plavljenje poput BioGnostovog BioBluing Buffera, Scottove otopine ili Bluing reagensa
- 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 C

Priprema histoloških preparata za bojenje

- Tkivni uzorak fiksirati (Formaldehid NB 4%, Formaldehid NB 10%) i procesirati
- Uklopiti tkivo u parafinski blok (BioWax 52/54, BioWax 56/58, BioWax Plus 56/58, BioWax Blue)
- Parafinski blok narezati na 4-6 mikrona tanke rezove i montirati na VitroGnost predmetno staklo

Postupci automatskog i ručnog bojenja HE metodom, modificirano regresivno (primjeri protokola bojenja s Hematoksinom G2, G3, ML)

Napomene: Ukoliko je došlo do taloženja ili formiranja metalnog sjaja na površini kod hematoksilin reagensa, reagens je potrebno prije upotrebe filtrirati.

Koristiti progresivni protokol za bojenje s Hematoksinima G1 i M, modificirani regresivni za Hematoksiline G2, G3 i ML te regresivni protokol za Hematoksin H. Ukoliko se koristi druga vrsta hematoksilina ili hematoksilin drugog proizvođača, protokole je potrebno optimizirati.

a) Postupak automatskog bojenja HE metodom, modificirano regresivno

KORAK	REAGENS	VRIJEME	TOČNOST	SEKUNDE CIJEĐENJA	BROJ URONA
1	Otpanje parafina (60°C)	0:10:00	/	/	/
2	Deparafinacija u supstitutu ksilena (BioClear New)	0:10:00	NE	10	0
3	Deparafinacija u supstitutu ksilena (BioClear New)	0:10:00	NE	10	0
4	Deparafinacija u supstitutu ksilena (BioClear New)	0:10:00	NE	10	0
5	Rehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	0:03:00	NE	10	0
6	Rehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	0:02:00	NE	10	0
7	Rehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	0:02:00	NE	10	0
8	Rehidracija u 70%-tnom alkoholu (Histanol 70)	0:02:00	NE	10	0
9	Ispiranje tekućom vodovodnom vodom	0:02:00	NE	10	0
10	Rehidracija u destiliranoj/demineraliziranoj vodi	0:01:00	NE	10	0
11	Bojenje Hematoksinom G2/G3/ML	0:04:00/0:02:00/0:06:00	DA	10	0
12	Ispiranje tekućom vodovodnom vodom	0:01:00	DA	10	0
13	Diferencijacija sa Hem Diff reagensom	0:00:20 (G2,ML)/0:01:00 (G3)	DA	0	0
14	Ispiranje tekućom vodovodnom vodom	0:01:00	NE	10	0
15	Plavljenje jezgri BioBluing puferom	0:03:00	NE	10	0
16	Ispiranje tekućom vodovodnom vodom	0:01:00	NE	10	0
17	Dehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	0:00:30	NE	10	0
18	Bojenje Eozinom 1% alkoholnim	0:01:00	DA	10	0
19	Dehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	0:00:30	DA	10	0
20	Dehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	0:00:30	DA	10	0
21	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	0:01:00	DA	10	0
22	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	0:01:00	DA	10	0
23	Bistrenje u supstitutu ksilena (BioClear New)	0:05:00	NE	10	0
24	Bistrenje u supstitutu ksilena (BioClear New)	0:05:00	NE	10	0
25	Bistrenje u supstitutu ksilena (BioClear New)	0:05:00	NE	10	0

Odmah nakon bistrenja, na preparat nanijeti odgovarajuću vrstu BioMount sredstva za prekrivanje/montiranje pokrovnog stakla. Ako je korišten BioClear ksilena, 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) Postupak ručnog bojenja HE metodom, modificirano regresivno

1.	Deparafinacija u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	2 izmjene u trajanju od 3 minute (BioClear) ili 3 izmjene u trajanju od 10 minuta (BioClear New)
2.	Rehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	2 izmjene u trajanju od 3 i 2 minute
3.	Rehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	2 minute
4.	Rehidracija u 70%-tnom alkoholu (Histanol 70)	2 minute
5.	Ispiranje tekućom vodovodnom vodom	2 minute

6.	Rehidracija u destiliranoj/demineraliziranoj vodi	1 minuta
7.	Bojenje Hematoksilinom G2, G3, ML	4 minute (G2), 2 minute (G3) ili 6 minuta (ML)
8.	Ispiranje tekućom vodovodnom vodom	1 minuta
9.	Diferencijacija sa Hem Diff reagensom	20 sekundi (G2, ML) ili 1 minuta (G3)
10.	Ispiranje tekućom vodovodnom vodom	1 minuta
11.	Plavljenje jezgri BioBluing puferom	3 minute
12.	Ispiranje tekućom vodovodnom vodom	1 minuta
13.	Ukoliko se koristi alkoholna otopina eozina uroniti preparate u 95%-tni alkohol (Histanol 95). Ukoliko se koristi vodena otopina eozina ovaj korak preskočiti.	30 sekundi
14.	Bojenje Eozinom 1% alkoholnim ili Eozinom 1% vodenim	1 minuta (alkoholni eozin) ili 2 minute (vodeni eozin)
	Napomena: Ukoliko se koristi hematoksilin G3, za kontrastno bojenje koristiti Eozin 2% alkoholni ili 2% vodeni	2 minute
15.	Ispiranje tekućom vodovodnom vodom	15 sekundi
	Napomena: Ukoliko se koristi alkoholna otopina eozina kao kontrastno bojenje, ovaj korak preskočiti	
16.	Dehidracija u 95%-tnom alkoholu (Histanol 95)	2 izmjene u trajanju od 30 sekundi
17.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu (Histanol 100)	2 izmjene u trajanju od 1 minute
18.	Bistrenje u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena (BioClear New)	2 izmjene u trajanju od 2 minute (BioClear) ili 3 izmjene u trajanju od 5 minuta (BioClear New)

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 - tamno plava boja

Citoplazma, kolagen, elastin, eritrociti – nijanse ružičaste boje

Vrčaste stanice (mucini), matriks hrskavice – plavo-ljubičasta boja



Kliknuti na sliku za prikaz cijelog skena!

Slika 1. Ljudska koža obojena Hematoksilinom G2 i Eozinom 1% alkoholnim (modificirano regresivno bojenje).



Kliknuti na sliku za prikaz cijelog skena!

Slika 2. Ljudska arterija obojena Hematoksilinom G2 i Eozinom 1% alkoholnim (modificirano regresivno bojenje).

Ograničenja

Ovaj proizvod namijenjen je samo za profesionalnu laboratorijsku upotrebu u dijagnostičke svrhe. Odstupanja od opisanog postupka bojenja u ovoj Uputi za rukovanje mogu uzrokovati razlike u rezultatima obojenja.

Priprema uzorka i dijagnostika

Za uzimanje i pripremu uzoraka koristiti prikladne instrumente. Uzorke obraditi suvremenom tehnologijom te ih jasno obilježiti. Obavezno slijediti upute proizvođača za rukovanje. Kako bi se izbjegle pogreške, histološku obradu uzoraka i postavljanje dijagnoze može provoditi samo kvalificirano osoblje. Koristiti mikroskop opremljen prema standardima medicinskog dijagnostičkog laboratorija.

Ukoliko tijekom upotrebe ili kao posljedica njegove upotrebe, dođe do ozbiljnog incidenta, molimo prijavite ga proizvođaču i/ili ovlaštenom predstavniku ili nadležnom tijelu.

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. Reagensi korišteni 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, uputi za rukovanje te u sigurnosno-tehničkom listu koji je dostupan na zahtjev.

Skladištenje, stabilnost i rok valjanosti

Po primitku, proizvod skladištiti i čuvati na suhom, u dobro zatvorenoj originalnoj ambalaži na temperaturi od +15 °C do +25 °C. Ne zamrzavati i ne izlagati direktnoj sunčevoj svjetlosti. Nakon prvog otvaranja, proizvod se može upotrebljavati do navedenog roka trajanja, ukoliko je pravilno skladišten. Datum proizvodnje i rok valjanosti otisnuti su na etiketi proizvoda.

Literatura

1. Bancroft JD, Gamble M: Theory and Practice of Histological Techniques. 6th Ed., Churchill-Livingstone Elsevier, Nottingham, UK, 2008.
2. Carson FL, Hladik C: Histotechnology A Self-Instructional Text. 3rd Ed., ASCP Press, Dallas, TX, 2009.
3. Guidelines for hematoxylin & eosin staining: National Society for Histotechnology

Upozorenja i mjere opreza u vezi s materijalima sadržanima u proizvodu:		
	H225	Lako zapaljiva tekućina i para.
	P210	Čuvati odvojeno od topline, vrućih površina, iskri, otvorenih plamena i ostalih izvora paljenja. Ne pušiti.
	P233	Čuvati u dobro zatvorenom spremniku.
	P280	Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.

HD-IFU HRV1, 11.07.2024., SB/ŠP

	Proizvođač		Broj serije		Pročitati priloženu uputu		Europska sukladnost
	Datum proizvodnje		Kataloški broj		Oprez		Jedinstvena identifikacija proizvoda
	Rok uporabe		Temperaturno ograničenje		Samo za <i>in vitro</i> dijagnostičku primjenu		

BioGnost d.o.o.
Medugorska 59, 10040 Zagreb, Hrvatska, www.biognost.com

Verzija	Opis / razlog izmjene	Datum
1	Prva verzija upute za rukovanje	11.07.2024.