

ORANGE II REAGENS, PAPA 2B

IVD *In vitro* dijagnostički medicinski proizvod CE

Reagens za bojenje citoplazme po Papanicolaou metodi Kontrastna boja za monokromatsko bojenje uzoraka u citologiji

UPUTA ZA RUKOVANJE

REF Kataloški broj: OR2-OT-100 (100 mL) OR2-OT-500 (500 mL) OR2-OT-1L (1000 mL) OR2-OT-2.5L (2500 mL)

Uvod

Orange II reagens, Papa 2B alkoholna je otopina Orange II boje uz dodatak fosfovolframove kiseline (PTA). Prvi korak bojenja metodom po Papanicolaou podrazumijeva bojenje jezgre otopinom hematoksilina, a sljedeća dva koraka kontrastno bojenje monokromatskim OG-6 ili Orange II i jednom od formulacija polikromatskih EA reagensa koje se sastoje od dvije kisele boje, Eosin Y i Light Green SF. Orange II molekula boji citoplazmu, pri čemu se daljnjim postupkom rada zadržava samo u zrelih, keratiniziranim stanicama koje poprimaju različit intenzitet crvenkaste boje. U trećem koraku koristi se jedna od polikromatskih EA otopina koja boji neobojene dijelove stanice poput pločastih stanica, nukleola, trepetljika i eritrocita. Uzorci za ispitivanje mogu biti ginekološki i neginekološki, kao što su ispljuvak, urin, uzorci dobiveni citološkom punkcijom. U cilju dobivanja optimalnih rezultata bojenja, Orange II reagens, Papa 2B je karakteristikama u potpunosti usklađen s ostalim BioGnostovim reagensima za citološko bojanje po Papanicolaou metodi - Hematoksilini HP, Papa 1A i 1B reagensi, EA 31 reagens, Papa 3A i EA 50 reagensom, Papa 3B, kao i alternativnim kontrastnim polikromatskim bojama kao što su EA 65 reagens, Papa 3C i 3D.

Opis proizvoda

ORANGE II REAGENS, PAPA 2B - Kontrastna boja za monokromatsko bojenje uzoraka u eksfolijativnoj citologiji. Sadrži BSC certificiranu boju Orange II s fosfovolframovom kiselinom i potrebnim stabilizatorima.

Priprema citološkog razmaza za bojenje

Postoje dva načina uzimanja i pripreme citoloških uzoraka:

1. Citološki uzorak nakon uzimanja brisa nanijeti na predmetno staklo (VitoGnost), odmah fiksirati sredstvom za fiksaciju u bočici s raspršivačem (CitoSpray), osušiti i čuvati do postupka bojenja. Citološki uzorak se također može fiksirati i čuvati do bojenja i uranjanjem u 95%-tnu alkoholnu otopinu (Histanol 95) na minimalno 30 minuta.
2. Metodom tekuće citologije (LBC, Liquid-Based Cytology) pomoću četkice za uzimanje citoloških uzoraka, uzorak odmah fiksirati (CitoFix, CitoFix u transportnim posudama) odvajanjem glave četkice i uranjanjem u fiksacijsko sredstvo. Na početku obrade citološkog uzorka, stanice izdvojiti iz fiksacijske tekućine (jedan od načina jest centrifugiranje fiksacijske tekućine) te ih nanijeti na predmetno staklo i to tako da su stanice jednoliko raspoređene u jednom sloju. Ovako pripremljeni citološki uzorak spreman je za bojenje.

Postupak bojenja po Papanicolaou metodi, **PROGRESIVNO**

Početak postupka bojenja ovisi o načinu na koji je citološki uzorak prikupljen i fiksiran na mikroskopsko predmetno staklo.

Ukoliko je uzorak suh i prethodno fiksiran CitoSpray sredstvom, prije bojenja potrebno ga je držati 10 minuta u 95% alkoholu (Histanol 95) radi uklanjanja poliglikola. Ukoliko je preparat fiksiran 95%-tnom alkoholnom otopinom (Histanol 95), ovaj korak je suvišan. Prilikom postupka bojenja citoloških uzoraka pripremljenih metodom tekuće citologije (LBC) koji sadrže nisku koncentraciju alkohola, rehidracija silaznim nizom alkoholnih otopina nije potrebna. Postupak započinje ispiranjem preparata destiliranom (demi) vodom, te se nastavlja postupkom bojenja Hematoksilin HP, Papa 1A/1B reagensom.

1.	Rehidracija u silaznom nizu alkohola (Histanol 95 i Histanol 70) i u destiliranoj (demi) vodi	10 urona u svakoj od 3 izmjene
2.	Bojenje Hematoksilin HP, Papa 1A reagensom	30 sekundi
	Napomena: Duže izlaganje preparata Hematoksilin HP, Papa 1A reagensu može osim jezgre obojiti i citoplazmu.	
3.	Ispiranje u destiliranoj ili vodovodnoj vodi	30 sekundi
4.	Plavljenje Scottovom otopinom ili Bluing reagensom	1 minuta
	Napomena: U nedostatku navedenih reagensa, preparat plaviti pod indirektnim mlazom tekuće vode	3-5 minuta
5.	Dehidracija u uzlaznom nizu alkohola (Histanol 70 i Histanol 95)	10 urona u svakoj od 2 izmjene
6.	Bojenje OG-6 reagensom, Papa 2A ili Orange II reagensom, Papa 2B	2 minute
7.	Ispiranje u 95%-tnom alkoholu kroz dvije izmjene (Histanol 95)	30 sekundi u svakoj od 2 izmjene
8.	Bojenje EA 31, Papa 3A reagensom ili EA 50, Papa 3B reagensom	4 minute
9.	Ispiranje i dehidracija u 95%-tnom alkoholu kroz dvije izmjene (Histanol 95)	1 minuta u svakoj od 2 izmjene
10.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu kroz dvije izmjene (Histanol 100)	1 minuta u svakoj od 2 izmjene
11.	Bistrenje u ksileni (BioClear) ili supstitutu ksilena kroz dvije izmjene (BioClear New)	2 minute u svakoj od 2 izmjene

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 VitoGnost pokrovnim staklom.

Postupak bojenja po Papanicolaou metodi, **REGRESIVNO**

Regresivnom metodom bojenja u pravilu se postiže bolja diferenciranost uzorka i jasnija vidljivost jezgrinih struktura.

Početak postupka bojenja ovisi o načinu na koji je citološki uzorak prikupljen i fiksiran na mikroskopsko predmetno staklo.

Ukoliko je uzorak suh i prethodno fiksiran CitoSpray sredstvom, prije bojenja potrebno ga je držati 10 minuta u 95% alkoholu (Histanol 95) radi uklanjanja poliglikola. Ukoliko je preparat fiksiran 95%-tnom alkoholnom otopinom (Histanol 95), ovaj korak je suvišan. Prilikom postupka bojenja citoloških uzoraka pripremljenih metodom tekuće citologije (LBC) koji sadrže nisku koncentraciju alkohola, rehidracija silaznim nizom alkoholnih otopina nije potrebna. Postupak započinje ispiranjem preparata destiliranom (demi) vodom, te se nastavlja postupkom bojenja Hematoksilin HP, Papa 1A/1B reagensom.

1.	Rehidracija u silaznom nizu alkohola (Histanol 95 i Histanol 70) i u destiliranoj (demi) vodi	10 urona u svakoj od 3 izmjene
2.	Bojenje Hematoksilin HP, Papa 1A reagensom	4 minute
3.	Ispiranje u destiliranoj (demineraliziranoj) vodi	6-8 urona
4.	Diferencijacija HCL Papa reagensom ili u 0,1%-tnoj otopini HCl-a	5-10 sekundi
	Napomena: Ovim korakom uklanja se višak hematoksilina iz jezgre i citoplazme. Ako je preparat predugo tretiran sredstvom za diferencijaciju, može doći do obezbojenja jezgri.	
5.	Ispiranje u destiliranoj vodi	10 urona
6.	Plavljenje Scottovom otopinom ili Bluing reagensom	1 minuta
	Napomena: U nedostatku navedenih reagensa, preparat plaviti pod indirektnim mlazom tekuće vode	
7.	Dehidracija u uzlaznom nizu alkohola (Histanol 70 i Histanol 95)	10 urona u svakoj od 2 izmjene
8.	Bojenje OG-6 reagensom, Papa 2A ili Orange II reagensom, Papa 2B	2 minute
9.	Ispiranje u 95%-tnom alkoholu kroz dvije izmjene (Histanol 95)	30 sekundi u svakoj od 2 izmjene
10.	Bojenje EA 31, Papa 3A reagensom ili EA 50, Papa 3B reagensom	4 minute
11.	Ispiranje i dehidracija u 95%-tnom alkoholu kroz dvije izmjene (Histanol 95)	1 minuta u svakoj od 2 izmjene
12.	Dehidracija u 100%-tnom alkoholu kroz dvije izmjene (Histanol 100)	1 minuta u svakoj od 2 izmjene
13.	Bistenje u ksilenu (BioClear) ili supstitutu ksilena kroz dvije izmjene (BioClear New)	2 minute u svakoj od 2 izmjene

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

Ukoliko je došlo do taloženja u otopini Hematoksilin HP, Papa 1A /1B ili formiranja metalnog sjaja na površini, reagens je potrebno prije upotrebe filtrirati. Vremenski periodi regresivnog postupka bojenja nisu u potpunosti standardizirani. Predloženi postupci sukladni su karakteristikama BioGnostovih reagensa te okvirno odgovaraju dugogodišnjoj kliničkoj i laboratorijskoj praksi. Intenzitet obojenja ovisi o duljini izlaganja preparata bojama i reagensima. Postupak bojenja može se mijenjati u skladu s osobnim zahtjevima ako su u skladu s osnovnim načelima citotehnologije.

Rezultat

Sivo-plava boja – mikroorganizmi

Sivo-zelena boja - Trichomonas

Plava do tamno ljubičasta boja – jezgre

Narančasta boja – keratinizirane stanice

Crvena boja – eritrociti

Ružičasta boja – eozinofilne (acidofilne) stanice

Kod bojenja EA 31 reagensom, Papa 3A: Plavo-zelena do zelena boja – citoplazma cijanofilnih (bazofilnih) stanica

Kod bojenja EA 50 reagensom, Papa 3B: Plavo-zelena boja – citoplazma cijanofilnih (bazofilnih) stanica

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, postupak bojenja 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

Orange II reagens, Papa 2B čuvati u dobro zatvorenoj originalnoj ambalaži na sobnoj temperaturi. Držati na suhom, ne zamrzavati i ne izlagati direktnoj sunčevoj svjetlosti. Datum proizvodnje i rok valjanosti otisnuti su na etiketi proizvoda.

Literatura

1. Papanicolaou, G.N. (1941): Some improved methods for staining vaginal smears. J Lab Clin Med.
2. Papanicolaou, G.N. (1942): A new procedure for staining vaginal smears. Science.
3. Carson, F.L., Hladik C. (2009): Histotechnology: A self-instructional text, 3rd ed. ASCP Press.
4. Sherwani, R.K., Khaqn, T. et al. (2007): Conventional Pap Smear and Liquid Based Cytology for Cervical Cancer Screening – A Comparative Study, Journal of Cytology, 24 (4): str. 167-172.

OR2-OT-X_V5_24.04.2023., LO/IŠP

 Obavezno proučiti priloženu dokumentaciju	 Temperaturni raspon čuvanja	 Broj testova u pakovanju	 Kataloški broj
 Pročitati priloženu uputu	 Čuvati od topline i sunčevog svjetla	 Vrijedi do	 Broj serije
 Samo za <i>in vitro</i> dijagnostičku primjenu	 Čuvati na suhom	 Oprez lomljivo	

 Europska sukladnost	 Proizvođač
	

BIOGNOST d.o.o.
Međugorska 59
10040 Zagreb
CROATIA
www.biognost.com

