COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU

Finalidade:

Conjunto para coloração de Papanicolau em materiais citológicos ou histológicos.

Registro ANVISA:

10097010104

Apresentação:

LB 170106
Rev. 13 – 08/2024

620503 - HEMATOXILINA HARRIS COR PAPAN FR500mL
620505 - E A 36 CORANTE PAPANICOLAOU FR 500mL
620507 - ORANGE G 6 CORANTE PAPANICOLAOU FR 500mL

1. INTRODUÇÃO

A citopatologia é uma técnica de diagnóstico que examina células de vários locais do corpo para determinar a causa ou a natureza de doenças. Os espécimes de células são processados em lâminas e examinados microscopicamente para o diagnóstico de câncer, condições pré-cancerosas, tumores benignos e algumas doenças infecciosas.
As células para análise citopatológica podem ser obtidas a partir de esfregaços, raspados, aspirações e centrifugação de líquidos para detecção de alterações celulares.
O primeiro teste de citopatologia desenvolvido foi o teste de Papanicolaou, conhecido também como colpocitologia oncótica ou citologia cervical. Essa técnica é a mais utilizada para rastreamento das lesões precursoras do câncer do colo do útero.
A coloração de Papanicolau ou segundo Papanicolau é uma técnica de coloração multicromática desenvolvida por Geórgios Papanicolau, o "pai" da citopatologia.
Esta técnica utiliza três soluções corantes: a Hematoxilina de Gill (substituída também pela Hematoxilina de Harris), OG-6 e EA-36 ou EA-65.
É um sistema de coloração utilizado para células colhidas por raspagem em cavidades como a vagina, a mucosa bucal, etc, e fluídos com células a partir de derrames de outras cavidades. Deve ser apenas usada *in vitro*.
O mecanismo pelos quais as células são coloridas ainda não é completamente entendido, mas são importantes duas hipóteses: a adsorção e as características de afinidades químicas na coloração. Em ambos os casos, a concentração dos corantes nas soluções e a forma iônica sob as quais se encontram são importantes. Considera-se que as estruturas celulares ácidas tendem a atrair cátions, tanto por adsorção como em reações químicas e as básicas com os radicais aniônicos dos corantes.
O citoplasma, sendo formado por estruturas ácidas e básicas, atrairia combinações de corantes, enquanto o núcleo celular, possuindo ácidos nucléicos, seria predominantemente ácido.
A hematoxilina no método reage com os ácidos nucléicos, resultando em uma coloração azulada nesta estrutura. O segundo corante empregado é o orange G, denominado na técnica de Papanicolau como OG-6. Com este corante ácido com dois grupamentos sulfônicos os esfregaços, nos citoplasmas presentes, são coloridos em seus componentes básicos. A etapa final é efetuada com uma de três variações de soluções corantes desenvolvidas por Papanicolau: EA-36, EA-50 e EA-65.
A solução EA-50 tem sido abandonada, passando a ser aplicada apenas as colorações com EA-36 ou o EA-65. Estas soluções corantes apresentam formulações similares, apenas variando a concentração do corante Light Green. A concentração deste corante na solução EA-36 é o maior do que na solução corante EA-65 em 50%.
Como o Light Green é um corante ácido, possuindo também dois radicais sulfônicos, se fixa predominantemente nos componentes básicos do citoplasma. O segundo corante presente nas soluções corantes EA-36 ou EA-65 é a Eosina amarelada, a qual é uma tetrabromo fluoresceína. Este corante tem como finalidade a coloração de grânulos oxifílicos do citoplasma, que têm alta afinidade por corantes ácidos.
O uso dos corantes escarlate de Biebrich e pardo Bismark fica restrito à área da citologia, pois coram pouco as estruturas básicas do citoplasma e o resultado final da coloração passa a ser o produto conjunto destes corantes. No caso do escarlate de Biebrich, este possui certa afinidade pelas estruturas do núcleo, entretanto, torna-se pouco significativo quando usado conjuntamente com a hematoxilina.
A coloração de Papanicolaou é considerada como padrão internacional de coloração cérvico-vaginal, podendo ser usada igualmente em outros materiais. No esfregaço cérvico-vaginal permite uma boa avaliação dos padrões inflamatórios, hormonais e oncológicos.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação da Hematoxina de Harris*	**Concentração/ L**
Álcool Etílico Anidro	50mL
Hematoxilina	7,0g
Oxido de Mercúrio Vermelho	2,5g
Sulfato de Alumínio e Potássio	100g
Água Deionizada	1000mL

Formulação do EA-36*	**Concentração/L**
Ácido Fosfotungstico	2g
Álcool Etilico Anidro	900mL
Eosina amarelada	2,25g
Light Green	2,25g
Marron Bismark Y	0,5g
Água Deionizada	100mL
Sol. Sat. Carbonato de Lítio	0,5mL

Formulação do Orange G-6*	**Concentração/ L**
Ácido Fosfotungstico	0,15g
Álcool Etílico	800mL
Orange G	5g
Águe Deionizada	200mL

* A formulação pode ser ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho do produto.

3. AMOSTRA

a- Tipos de amostras
- Amostras de material cérvico-vaginal em lâminas fixadas em álcool etílico 70-90%, isopropílico a 70-90% ou polietilenoglicol (este deve ser eliminado do esfregaço antes da coloração por meio de imersão em álcool etílico).

- O laboratório deve estabelecer critérios de coleta, rejeição e conservação das amostras, conforme sua política da qualidade.

b- Critérios de rejeição
Recusar as amostras entregues sem estarem fixadas ou que não disponham de identificação da lâmina e/ou data de coleta.

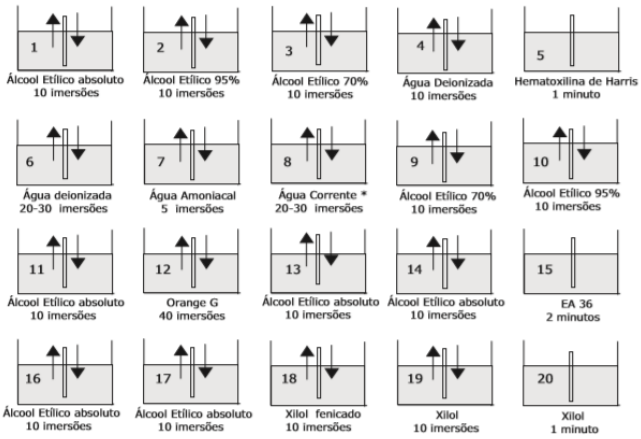
4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO
a- Princípio
O material fixado em lâmina é submetido a ação de uma série de diluições de etanol (absoluto até 70%), submetido a ação de um corante nuclear (Hematoxilina de Harris) posteriormente a ação de álcoois, e corantes citoplasmáticos (orange G e EA36) e finalmente a ação desidratante de álcool e xilol.

b- Armazenamento e estabilidade
Para fins de transporte e armazenamento, o produto pode permanecer em temperatura ambiente.
Recomenda-se manter o produto protegido de incidência direta de luz (natural ou artificial) e evitar grandes variações de temperatura até a utilização.

c- Precauções e cuidados especiais
- É comum aos corantes, com o tempo, formarem precipitados, neste caso, recomenda-se a filtração dos mesmos sempre que se perceber tal situação.
- Evitar deixar os frascos abertos desnecessariamente, pois pode haver evaporação de solventes e consequentes alterações na concentração dos componentes.
- O produto é destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;
- Uso restrito por profissionais;
- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não inalar ou ingerir;
- Não utilizar produto com sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para “Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A” para o manuseio seguro;
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121ºC por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos Detrilab;
- Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, de 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)
- Bico de Bunsen;
- Lâminas e lamínulas;
- Cubas de Coplin ou similares;
- Etanol absoluto, 96 e 70%;
- Xilol ou similar;
- Água amoniacal (5 gotas de amoníaco para cada 500 mL de água deionizada);
- Água destilada ou deionizada com condutividade inferior a 0,5 mS/cm;
- Xilol fenicado (10 mL de fenol para cada litro de xilol) ou xilol-etanol absoluto a 1:1;
- Bálsamo do Canadá ou resina sintética similar;
- Microscópio.

5. PROCEDIMENTO TÉCNICO
a- Técnica sugerida



b- Montagem - Montar as lâminas com bálsamo do Canadá ou resina sintética para fixar a lamínula, procurando evitar a formação de bolhas de ar entre lâmina e lamínula.

c- Precauções e cuidados especiais
- Esfregaços muito delgados ou muito espessos dificultam o processo de coloração;
- Problemas frequentes decorrem da má fixação do material.
- Outro problema frequentemente encontrado é a alteração da coloração pela utilização de sprays de polietilenoglicol para fixação. Estes problemas podem ser resolvidos imergindo as lâminas por 15 minutos em álcool 96ºC, mergulhando as lâminas a cada 5 minutos. Repetir esta operação em nova cuba com álcool 96ºC.
- Quaisquer sinais de hidratação do álcool etílico absoluto ou xilol implicam em substituição destes componentes;
- Conforme a rotina diária, estabelecer cronograma de troca dos corantes, normalmente ocorrendo quando as colorações começam a ficarem mais fracas.

6. RESULTADOS
As células são inspecionadas usando microscopia de luz para identificar anormalidades, como alterações de características morfológicas ou nucleares**.**

7. LIMITAÇÕES DO MÉTODO
(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 830/2023)
Os resultados falsamente aumentados ou diminuídos, riscos associados à instabilidade, que poderiam levar a resultados errôneos, danos relacionados ao usuário, podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:
- Após abertos, os componentes tornam-se suscetíveis a contaminações químicas ou microbianas que podem inviabilizar sua utilização.
- Manter os frascos dos padrões sempre fechados de maneira a evitar alterações em concentrações.
- Os reagentes se destinam ao uso diagnóstico in vitro, não devendo ser ingeridos ou entrar em contato com a pele e mucosas;
- Utilização de reagente vencido, contaminado ou em condições inadequadas.
- Não utilizar água tamponada adequada para a realização da coloração.
- Erro na conservação dos reagentes.
- Deve-se evitar o uso de materiais que possam contaminar os reagentes, tais como ponteiras plásticas de micropipetador reaproveitadas.
- Deve-se evitar o uso de materiais que possam contaminar os reagentes, tais como tubos para a reação.
- Interpretação equivocada de resultados.
- Tempo excessivo ou insuficiente de coloração.
- Armazenamento ou transporte de amostra inadequado.
- Não utilizar a proporção amostra reagente sugerida na técnica.

- Todas as amostras devem ser manipuladas com extrema cautela, pois podem veicular diversas doenças infectocontagiosas (hepatite, SIDA etc.).

8. CONTROLE DA QUALIDADE

- Materiais necessários

Cepas padrão: ATCC® (*American Type Culture Collection)* ou derivadas).

- Controle de qualidade recomendado:

Parâmetro	Resultado esperado
Células superficiais	Citoplasma rosa, núcleo piquinóticoescuro
Células intermediárias e profundas	Citoplasma azul, núcleo róseo
Células glandulares	Células arredondadas com citoplasma azul e núcleo róseo
Hemácias	Vermelhas
Polimorfonucleares	Azuis com núcleo visível
Flora normal	Bacilos e cocos azuis a roxos
Corantes não utilizados	Hematoxilina de Harris: cor púrpura intenso EA36: cor violeta Orange G6: cor Laranja

9. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário que:

- O usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
- Os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;
- Os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site www.laborclin.com.br. Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, entrar em contato com o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail sac@laborclin.com.br. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

10. REFERÊNCIAS

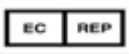
1. BERKAN TK, Reeder JE, Lopez PA Jr, Gorman KM, Wheeless LL Jr. A protocol for Papanicolaou staining of cytologic specimens following flow analysis. Cytometry. 1986.
2. BIBBO M, Wilbur D. Comprehensive Cytopathology. 3ª Edição. Elsevier Editora, 2010.
3. DACIE, J. V., *et al*. Practical haematology; Churchill Livingstone, 1995.
4. DAVID, H. Bacteriology of the mycobacteriosis. US Public Health Serv. 76-8316. CDC, Atlanta-Ga, 1970.
5. DERGOVICS, FL, Moura TPS, Shirata NK, Pereira SMM. Avaliação do desempenho da mistura verniz/xilol na diafanização de lâminas de citopatologia coradas com a técnica de Papanicolaou. Rev Bras Anál Clín. 2012.
6. ELEUTÉRIO, J. Noções Básicas de Citologia Ginecológica. Livraria Santos Editora Ltda, São Paulo, 2003.
7. IZHAR, S, Kaur R, Masih K. Efficacy of rapid, economical, acetic acid, Papanicolaou stain in cervical smears as an alternative to conventional Papanicolaou stain. J Cytol. 2014.
8. JOHNSON, PL, Klein MN: Application of Papanicolaou stain to paraffin sections. Stain Technol 31:223, 1956.
9. KONEMAN, Elmer; et al. Diagnostic Microbiology. Lippincott, USA, 5 ed., 1997.
10. KOSS, LG, Gompel C. Citopatologia Ginecológica com Correlações Histológicas e Clínicas. São Paulo, SP. Editora Roca, 2006.
11. LIMA, O. A.; Soares J.B; Greco J.B. Galizzi; Cançado J.R: Métodos de laboratório aplicados à clínica; 1992.
12. LIU, W: A simplified cytologic staining technic. Am J Clin Pathol 54:767, 1970
13. MAHON, Connie, Manuselis, George Jr. Diagnostic Microbiology. Saunders, USA, 1995.
14. MOOSA, NY, Khattak N, Alam MI, Sher A, Shah W, Mobashar S, et al. Comparison of cervical cell morphology using two different cytology techniques for early detection of pre-cancerous lesions. Asian Pac J Cancer Prev. 2014.
15. MURRAY, P. R. *et al*. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington, DC: ASM Press, 2007.
16. OPLUSTIL, C. P. *et al*. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 3. ed. São Paulo, 2010.
17. QUEIRO, C, Lima D. O Laboratório de Citopatologia: Aspectos Técnicos e Operacionais. Editora Universitária UFPE, Recife, 222p, 2000.
18. RUNYON, E.H. *et al*. Manual of clinical microbiology, p.141-174, Washington DC, Am. Soc. Mic., 1974.
19. STANLEY S. Raphael: Lynch: Técnicas de laboratório; 1986.
20. Street CM: Papanicolaou Techniques in Exfoliative Cytology. IN Laboratory Technique in Biology and Medicine, 3rd ed. EV Cowdry Editor, Williams & Wilkins, Baltimore, 1952, p 253.
21. TRABULSI, L. R; *et al*. Microbiologia. 3ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
22. WAESSNER: Técnicas de citologia hematológica; 1990.

Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda
CNPJ 76.619.113/0001-31
Insc. Estadual 1370012926
Rua Casimiro de Abreu, 521
Pinhais/PR CEP 83.321-210

Telefone (41) 3661-9000
www.laborclin.com.br
Responsável Técnico:
Maire Wakamori – CRF/PR-20176

Serviço de Assessoria ao Cliente
SAC 0800-0410027
sac@laborclin.com.br

ANEXO 1 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico in vitro.
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Européia
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas asséptica de processamento		Esterilização utilizando óxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso.
	Controle		Controle Negativo
	Controle Positivo		Manter seco
	Manter afastado da luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho
	Não utilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2022)