

TINCIÓN DE HEMATOXILINA

PRINCIPIO

La prueba de Papanicolaou, que debe su nombre al Dr. Georgios Papanicolaou, pionero en citología y cáncer, se realiza para diagnosticar el cáncer cervicouterino y de otros órganos. Permite detectar cambios de las células que pueden ser precursores de cáncer. En ésta técnica, el primer paso es la tinción de núcleos, con hematoxilinas. El segundo paso es la tinción de citoplasmas con una solución anaranjada, que tiñe las células maduras y queratinizadas con diferente intensidad. En el tercer paso de tinción se usa la llamada solución polícroma, que es una mezcla de eosina, verde luz SF y pardo de Bismarck. Con la solución polícroma se muestra la diferenciación del epitelio escamoso simple. La tinción de Hematoxilina -Eosina es la más utilizada en histología.

Los colorantes de Hematoxilina están formados básicamente por lacas metálicas de hematoxilina oxidada con iones divalentes o trivalentes. El mecanismo de tinción se realiza mediante uniones covalentes del complejo metal-hematoxilina con radicales aniónicos del tejido. En el caso del material nuclear en la reacción intervendrían los grupos aniónicos del ácido fosfórico del ADN. La selectividad de la tinción se incrementa con el medio ácido del colorante, ya que dificulta la coloración de elementos de carácter anfótero, como son los aminoácidos de las proteínas. Los núcleos aparecen azul a violeta oscuro.

Con la hematoxilina se puede realizar la tinción progresiva y la regresiva. En la tinción regresiva las estructuras del núcleo se presentan más diferenciadas y se pueden ver mejor.

USO PREVISTO

Familia de productos sanitarios para diagnóstico in vitro destinado a la tinción de núcleos para histocitología.

Son colorantes cualitativos que dan información sobre el estado fisiológico o patológico de la muestra de tejido cuando la tinción obtenida es interpretada por profesional cualificado. Para obtener un diagnóstico, los resultados se han de evaluar en el contexto de los antecedentes médicos, el estado físico y el resto de datos clínicos y de laboratorio obtenidos.

Para uso profesional de laboratorio.

REACTIVOS Y COMPOSICIÓN

Hematoxilina de Harris

1 x 500 mL	Ref. 99 22 32
1 x 1000 mL	Ref. 99 59 60
1 x 5000 mL	Ref. 99 12 97
1 x 1000 mL (STAINER)	Ref. 99 71 60

Composición	
Hematoxilina, CI nº 75 290	0,5 %
Sulfato de Aluminio	6 %
Etilenglicol	15 %

Hematoxilina de Carazzi

1 x 1000 mL	Ref. 99 16 43
1 x 5000 mL	Ref. 99 41 75
1 x 1000 mL (STAINER)	Ref. 99 41 46

Composición	
Hematoxilina, CI nº 75 290	0,1 %
Sulfato de Aluminio/Potasio	6 %
Glicerina	20 %

Hematoxilina de Mayer

1 x 1000 mL	Ref. 99 77 50
1 x 5000 mL	Ref. 99 06 38

Composición	
Hematoxilina, CI nº 75 290	0,5 %
Sulfato de Aluminio y Amonio	5 %
Glicerina	30 %

Hematoxilina de Weigert A

1 x 500 mL	Ref. 99 38 01
------------	---------------

Composición	
Hematoxilina, CI nº 75 290	1 %
Etanol 99	0.1%

Para uso en la Tinción Tricrómica de Masson (Ref. 995700).

Hematoxilina de Weigert B

1 x 500 mL	Ref. 99 38 13
------------	---------------

Composición	
Tricloruro de hierro	2 %
HCl	< 0.01 %

Para uso en la Tinción Tricrómica de Masson (Ref. 995700)

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Los reactivos almacenados a 10-35°C y protegidos de la luz, son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Los envases deben mantenerse siempre bien cerrados.

El paso del tiempo y temperaturas inferiores a 10°C, pueden provocar la aparición de un ligero precipitado en algún reactivo, que no afecta a la funcionalidad del producto. Se aconseja atemperar el reactivo a 15-30°C, agitar y filtrar el colorante antes de su uso.

La estabilidad en uso debe ser determinada por cada usuario según su criterio

MATERIAL NO SUMINISTRADO

Material de uso general de laboratorio de anatomía patológica
 Colorante de Hematoxilina (consultar referencias QCA disponibles en la web)
 Etanol, de diferentes concentraciones (consultar referencias QCA disponibles en la web)
 Xileno o Sustituto de Xileno (consultar referencias QCA disponibles en la web).
 Medio de montaje
 Microscopio

Las tinciones se pueden usar con un método de tinción manual o con equipos automáticos de tinción (consultar teñidores QCA disponibles en la web). Seguir las instrucciones de uso de los equipos automáticos suministradas por el fabricante.

PRECAUCIONES

Los reactivos se deben manipular con precaución. Las indicaciones de seguridad se encuentran en la etiqueta de los productos. Se aconseja consultar la ficha de datos de seguridad antes de la manipulación del reactivo. La eliminación de residuos debe hacerse según la normativa local vigente.

Cualquier incidente grave relacionado con el producto deberá comunicarse a QCA y a la autoridad competente del estado en el que esté establecido el usuario.

MUESTRA

Muestras citológicas e histológicas de distintos orígenes: ginecológicas, esputos, líquidos de biopsias.

La manipulación de las muestras debe realizarse de acuerdo con los protocolos establecidos en cada laboratorio para la preparación de muestras, siguiendo el estado del arte vigente.

Manipular las muestras con precaución por su capacidad potencialmente infecciosa.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda seguir las prácticas de control de calidad marcadas por los organismos internacionales y realizar tinciones de forma periódica con preparaciones de control de calidad que contengan muestras procesadas de forma similar a las muestras a evaluar.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE TRABAJO:

El colorante está listo para su uso, para tinción manual y para su uso en el QCA STAINER.

PROCEDIMIENTO

TINCIÓN DE PAPANICOLAOU MANUAL

1. Las extensiones que se hayan fijado con "spray" deben sumergirse en agua durante 5-10 minutos para que la carboximetilcelulosa (CMC) que contiene se disuelva completamente
2. Inmersión durante 1 minuto en Hematoxilina de Harris
3. Lavado con agua 15 segundos
4. Lavado con etanol-HCl (0,25%) 10 segundos
5. Lavado con agua 15 segundos
6. Lavado con agua amoniacal (0,05% en NH₃) 5 segundos
7. Lavado con agua 15 segundos
8. Inmersión en etanol de 96° 10 segundos (dos veces, distinto contenedor)
9. Inmersión en el colorante OG-6, 3 minutos
10. Lavado en etanol de 96° 15 segundos (dos veces, distinto contenedor)
11. Inmersión en el colorante EA 50 ó EA 36 ó EA 65, 3 minutos
12. Lavado en etanol de 96° 15 segundos (dos veces, distinto contenedor)
13. Inmersión en etanol absoluto 15 segundos (dos veces, distinto contenedor)
14. Inmersión en etanol / xilol (50%) 15 segundos
15. Inmersión en xilol 15 segundos
16. Inmersión en xilol durante 2 minutos
17. Montar la preparación

ES - HEMATOXILINA DE HARRIS

—

ES - HEMATOXILINA DE CARAZZI

—

ES - HEMATOXILINA DE MAYER

—

TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

1. Desparafinar la preparación.
2. Después de la última inmersión en etanol lavar con agua destilada durante 1 minuto
3. Inmersión durante 8 minutos en Hematoxilina
4. Lavado con agua 1 minuto
5. Lavado con etanol-HCl (0,5%) 13 segundos
6. Lavado con agua 15 segundos
7. Lavado con agua amoniacal (0,05% en NH₃) 30 segundos
8. Lavado con agua 1 minuto
9. Inmersión durante 30 segundos en Eosina al 1%
10. Inmersión en etanol de 96° 6 segundos (dos veces, distinto contenedor)
11. Inmersión en etanol absoluto 6 segundos (tres veces, distinto contenedor)
12. Inmersión en xilol/eucaliptol 6 segundos (dos veces, distinto contenedor)
13. Montar la preparación

TINCIÓN HEMATOXILINA MAYER-EOSINA

1. Desparafinar la preparación.
2. Después de la última inmersión en etanol lavar con agua destilada durante 5 minutos
3. Inmersión durante 10 minutos en Hematoxilina de Mayer
4. Lavado con agua 5 minutos
5. Inmersión durante 2 minutos en Eosina alcohólica al 1%
6. Inmersión en etanol de 96° 10-15 segundos (dos veces, distinto contenedor)
7. Inmersión en etanol absoluto 10-15 segundos (dos veces, distinto contenedor)
8. Inmersión en xilol (tres veces, distinto contenedor)
9. Montar la preparación

Para el QCA STAINER, las distintas metodicas se encuentran en el software del sistema.

Cada usuario debe validar este procedimiento en su laboratorio para ajustarlo a su metodología estándar, aplicando las diversas variantes de este procedimiento, tanto manual como automático, que le permita optimizar los resultados. Se debe tener en cuenta que la intensidad de la coloración es proporcional al tiempo de tinción.

RESULTADOS

Núcleos: azul violeta

Citoplasma acidófilo: rojizo

Citoplasma basófilo: azul

Citoplasma queratinizado: anaranjado

Para la Tinción Tricrómica de Masson ver Ref. 995700

NOTAS

El resultado de la tinción es orientativo y debe confirmarse con pruebas adicionales adecuadas.

Los resultados de coloración indicados son orientativos ya que la intensidad y la tonalidad del color pueden ser influenciados por diferentes factores como son la fijación o el tiempo de tinción (la intensidad de la coloración es proporcional al tiempo de tinción).

BIBLIOGRAFÍA

Marshall, P.N., Galbrait, W., Bacus, J.W., (1979). Anal. Quant. Cytology, 1, 169-178.

Baker, J.R., (1962), Quart. J. Micr. Sci., 103, 493-517.

Boon, M.E., Drijver, J.S., Routine Cytological staining techniques, 1st. ed (1986)

Allison, D. B., P. J. Simmer, and S. Z. Ali. (2018). Cancer Cytopathol., vol. 126, no. S8, pp. 643-653.

Cronjé, H. S. (2011). Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol., vol. 25, no. 5, pp. 575-584.

Feldman, A. T. and D. Wolfe (2014). Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining', in Histopathology

PRINCIPLE

The Papanicolaou test, which owes its name to Dr Georgios Papanicolaou, a pioneer in cytology and cancer, is performed to diagnose cervical cancer or cancer in other organs. It makes it possible to detect changes in cells which may be cancer precursors. The first step in this technique is the staining of nuclei with haematoxylin. The second step is the staining of cytoplasm with an orange solution, which stains the mature cells and the keratinised cells with different intensities. The so-called polychrome solution, which is a mixture of eosin, light green SF and Bismarck brown, is used in the third step. The differentiation of simple squamous epithelium is shown with the polychrome solution. The Haematoxylin and Eosin stain is the most commonly used stain in histology.

Haematoxylin stains are basically formed from metallic complexes of oxidised haematoxylin with divalent and trivalent ions. The mechanism of staining is carried out between the covalent bonds of the metal-haematoxylin compound and the anionic radicals of the tissue. The anionic groups of phosphoric acid in DNA will intervene if there is nuclear material in the reaction. The selectivity of the stain increases with the acid medium of the dye, since it hinders the staining of amphoteric elements, such as the amino acids of proteins. The nuclei appear blue to dark violet.

Progressive and regressive staining can be performed with haematoxylin. The structures of the nuclei show greater differentiation in regressive staining and are more easily seen.

INTENDED USE

Family of in vitro diagnostic medical devices intended for nuclear staining in histocytology.

They are qualitative stains that provide information on the physiological or pathological state of the tissue sample when the staining obtained is interpreted by a trained professional. To obtain a diagnosis, the result is utilized alongside other information such as the patient's medical history, physical status as well as other clinical and laboratory data obtained.

For trained and specialized personnel

REAGENTS AND COMPOSITION

Harris's Haematoxylin

1 x 500 mL	Ref. 99 22 32
1 x 1000 mL	Ref. 99 59 60
1 x 5000 mL	Ref. 99 12 97
1 x 1000 mL (STAINER)	Ref. 99 71 60

Composition

Haematoxylin C.I. No. 75 290	0.5%
Aluminium Sulphate	6%
Ethylene glycol	15%

Carazzi's Haematoxylin

1 x 1000 mL	Ref. 99 16 43
1 x 5000 mL	Ref. 99 41 75
1 x 1000 mL (STAINER)	Ref. 99 41 46

Composition

Haematoxylin C.I. No. 75 290	0.1%
Aluminium/Potassium Sulphate	6%
Glycerin	20%

Mayer's Haematoxylin

1 x 1000 mL	Ref. 99 77 50
1 x 5000 mL	Ref. 99 06 38

Composition

Haematoxylin C.I. No. 75 290	0.5%
Aluminium Ammonium Sulphate	5%
Glycerin	30%

Weigert's Haematoxylin A

1 x 500 mL	Ref. 99 38 01
------------	---------------

Composition

Haematoxylin C.I. No. 75 290	1 %
Ethanol 99	0.1%

For use in Masson's Trichrome Stain (Ref. 995700).

Weigert's Haematoxylin B

1 x 500 mL	Ref. 99 38 13
------------	---------------

Composition

Iron trichloride	2 %
HCl	< 0.01 %

For use in Masson's Trichrome Stain (Ref. 995700).

STORAGE AND STABILITY

Reagents which are stored at 10-35°C and protected from light are stable until the expiry date stated on the label. Containers must always be kept tightly closed.

Over time and temperatures below 10°C could lead to the formation of light precipitate in some reagents. This does not affect their functionality. The stain should be filtered before use. It is recommended to bring the reagent to room temperature (15-30°C), agitate and filter before using.

in Use stability should be determined by each user discretion.

MATERIAL NOT SUPPLIED

General-purpose pathology laboratory material.

Haematoxylin stain. (See QCA referencies available on the website)

Different concentrations of ethanol. (See QCA referencies available on the website)

Xylene or Xylene Substitute. (See QCA referencies available on the website)

Mounting medium

Microscope

Papanicolaou stains can be used with a manual staining method or with automatic staining equipment (see QCA stainers available on the website). It is recommended to follow the instructions for use of the automatic equipment supplied by the manufacturer.

PRECAUTIONS

All reagents must be handled with care by trained technicians. Safety instructions are on the product label. The safety data sheet should be consulted before using the reagents. Waste disposal must be carried out according to the local regulations in force.

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to QCA and the competent authority of the member state in which the user is established.

SAMPLE

Cytological and histological samples of different origins: gynaecological, sputum, liquid biopsies.

Handling of the samples must be carried out in accordance with the established protocols in each laboratory for the preparation of samples for staining using state-of-the-art technology.

Handle the samples with care due to their potentially infectious nature.

QUALITY CONTROL

It is recommended to follow the quality control practices defined by the international organisms and periodic staining with routine quality control slide containing tissue processed in a similar manner to the test specimens should be performed.

PREPARATION OF THE WORKING REAGENT:

The stain is ready for use, for manual staining and for use in the QCA STAINER.

PROCEDURE

PAPANICOLAOU STAIN (MANUAL)

1. The smears which have been spray-fixed should be immersed in water for 5-10 minutes so that the carboxymethyl cellulose (CMC) that they contain is completely dissolved
2. Immerse in Harris's Haematoxylin for 1 minute
3. Rinse with water for 15 seconds
4. Rinse with ethanol-HCl (0.25%) for 10 seconds
5. Rinse with water for 15 seconds
6. Rinse with ammonia water (0.05% in NH₃) for 5 seconds
7. Rinse with water for 15 seconds
8. Immerse in ethanol 96° for 10 seconds (twice, using a different container each time)
9. Immerse in OG-6 stain for 3 minutes
10. Rinse in ethanol 96° for 15 seconds (twice, using a different container each time)
11. Immerse in EA 50, EA 36 or EA 65 stain for 3 minutes
12. Rinse in ethanol 96° for 15 seconds (twice, using a different container each time)
13. Immerse in absolute ethanol for 15 seconds (twice, using a different container each time)
14. Immerse in ethanol/xylol (50%) for 15 seconds
15. Immerse in xylol for 15 seconds
16. Immerse in xylol for 2 minutes. Mount the preparation

HAEMATOXYLIN AND EOSIN STAIN

1. Dewax the preparation
2. Rinse with distilled water for 1 minute after the last immersion in ethanol
3. Immerse in Haematoxylin for 8 minutes
4. Rinse with water for 1 minute
5. Rinse with ethanol-HCl (0.5%) for 13 seconds
6. Rinse with water for 15 seconds
7. Rinse with ammonia water (0.05% in NH₃) for 30 seconds
8. Rinse with water for 1 minute
9. Immerse in Eosin 1% for 30 seconds
10. Immerse in ethanol 96° for 6 seconds (twice, using a different container each time)
11. Immerse in absolute ethanol for 6 seconds (three times, using a different container each time)
12. Immerse in xylol/eucalyptol for 6 seconds (twice, using a different container each time)
13. Mount the preparation

MAYER'S HAEMATOXYLIN AND EOSIN STAIN

1. Dewax the preparation
2. Rinse with distilled water for 5 minutes after the last immersion in ethanol
3. Immerse in Mayer's Haematoxylin for 10 minutes
4. Rinse with water for 5 minutes
5. Immerse in alcoholic Eosin 1% for 2 minutes
6. Immerse in ethanol 96° for 10-15 seconds (twice, using a different container each time)
7. Immerse in absolute ethanol for 10-15 seconds (twice, using a different container each time)
8. Immerse in xylol (three times, using a different container each time)
9. Mount the preparation

GB - HARRIS'S HEMATOXYLIN

—

GB - CARAZZI'S HEMATOXYLIN

—

GB - MAYER'S HAEMATOXYLIN

—

For the QCA STAINER, the different methods are found in the system software.

Each user must validate this procedure in his laboratory in order to adjust it to his own standard method, applying the various variants of this procedure, both manual and automatic, allowing him to optimize the results. It must be taken into account that the intensity of the staining is proportional to the staining time.

RESULTS

Nuclei: blue-violet

Acidophilic cytoplasm: reddish

Basophilic cytoplasm: blue

Keratinised cytoplasm: orange

For Masson's Trichrome Stain see Ref. 995700

NOTES

The result of the staining should be treated as a guide and must be confirmed with additional tests.

The colour results indicated should be treated as a guideline as the intensity and shade of the colour may be influenced by several factors, such as the fixation and the staining time (the staining intensity is proportional to the staining time).

REFERENCES

- Marshall, P.N., Galbrait, W., Bacus, J.W., (1979). Anal. Quant. Cytology, 1, 169-178.
 Baker, J.R., (1962), Quart. J. Micr. Sci., 103, 493-517.
 Boon, M.E., Drijver, J.S., Routine Cytological staining techniques, 1st. ed (1986)
 Allison, D. B., P. J. Simner, and S. Z. Ali. (2018). Cancer Cytopathol., vol. 126, no. S8, pp. 643-653.
 Cronjé, H. S. (2011). Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol., vol. 25, no. 5, pp. 575-584.
 Feldman, A. T. and D. Wolfe (2014). Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining', in Histopathology

PRINCÍPIO

O teste de Papanicolaou, que deve o seu nome ao Dr. Georgios Papanicolaou, pioneiro em citologia e cancro, é realizado para diagnosticar o cancro do colo do útero e de outros órgãos. Permite detetar alterações das células que podem ser precursores de cancro. Nesta técnica, o primeiro passo é a coloração de núcleos, com hematoxilinas. O segundo passo é a coloração de citoplasmas com uma solução alaranjada, que cora as células maduras e queratinizadas com uma intensidade diferente. No terceiro passo da coloração é usada a chamada solução policroma, que é uma mistura de eosina, verde luz SF e pardo de Bismarck. Com a solução policroma é mostrada a diferenciação do epitélio escamoso simples. A coloração de hematoxilina-eosina é a mais utilizada em histologia.

Os corantes de hematoxilina são formados basicamente por lacas metálicas de hematoxilina oxidada com iões divalentes ou trivalentes. O mecanismo de coloração é realizado através de uniões covalentes do complexo metal-hematoxilina com radicais aniônicos do tecido. No caso do material nuclear, na reação intervêm os grupos aniônicos do ácido fosfórico do ADN. A seletividade da coloração aumenta com o meio ácido do corante, pois dificulta a coloração de elementos de carácter anfótero, como os aminoácidos das proteínas. Os núcleos aparecem a azul a violeta escuro.

Com a hematoxilina pode-se realizar a coloração progressiva e a regressiva. Na coloração regressiva, as estruturas do núcleo são apresentadas de forma mais diferenciada e podem ver-se melhor.

USO PRETENDIDO

Família de dispositivos médicos de diagnóstico in vitro para coloração de núcleos para histocitologia.

São corantes qualitativos que fornecem informações sobre o estado fisiológico ou patológico da amostra de tecido quando a coloração obtida é interpretada por um profissional habilitado. Para obter um diagnóstico, os resultados devem ser avaliados no contexto da história médica, estado físico e outros dados clínicos e laboratoriais obtidos.

Para uso laboratorial profissional.

REAGENTES E COMPOSIÇÃO

Hematoxilina de Harris

1 x 500 mL	Ref. 99 22 32
1 x 1000 mL	Ref. 99 59 60
1 x 5000 mL	Ref. 99 12 97
1 x 1000 mL (STAINER)	Ref. 99 71 60

Composição

Hematoxilina, CI n.º 75 290	0,5%
Sulfato de alumínio	6%
Etilenoglicol	15%

Hematoxilina de Carazzi

1 x 1000 mL	Ref. 99 16 43
1 x 5000 mL	Ref. 99 41 75
1 x 1000 mL (STAINER)	Ref. 99 41 46

Composição

Hematoxilina, CI n.º 75 290	0,1%
Sulfato de alumínio/potássio	6%
Glicerina	20%

Hematoxilina de Mayer

1 x 1000 mL	Ref. 99 77 50
1 x 5000 mL	Ref. 99 06 38

Composição

Hematoxilina, CI n.º 75 290	0,5%
Sulfato de alumínio e amónio	5%
Glicerina	30%

Hematoxilina de Weigert A

1 x 500 mL	Ref. 99 38 01
------------	---------------

Composição

Hematoxilina, CI n.º 75 290	1 %
Etanol 99	0.1%

Para uso em Coloração Tricromo de Masson (Ref. 995700).

Hematoxilina de Weigert B

1 x 500 mL	Ref. 99 38 13
------------	---------------

Composição

Tricloreto de ferro	2 %
HCl	< 0.01 %

Para uso em Coloração Tricromo de Masson (Ref. 995700).

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Os reagentes armazenados a 10-35°C e protegidos da luz são estáveis até a data de validade indicada no rótulo. Os recipientes devem ser mantidos sempre bem fechados.

A passagem do tempo e temperaturas abaixo de 10°C podem causar o aparecimento de um leve precipitado em alguns dos reagentes, o que não afeta a funcionalidade do produto. Recomenda-se temperar o reagente a 15-30°C, agitar e filtrar o corante antes de usar.

A estabilidade em uso deve ser determinada por cada usuário a seu critério

MATERIAL NÃO FORNECIDO

Material para uso geral em laboratórios de anatomia patológica
Corante hematoxilina (ver referências QCA disponíveis na web)
Etanol, de diferentes concentrações (ver referências de QCA disponíveis na web)
Xileno ou Substituto de Xileno (consulte as referências QCA disponíveis na web).
meio de montagem
Microscópio

Os corantes de Papanicolaou podem ser usados com um método de coloração manual ou com equipamento de coloração automático (consulte os corantes QCA disponíveis na web). Siga as instruções de uso dos equipamentos automáticos fornecidas pelo fabricante.

PRECAUÇÕES

Os reagentes devem ser manuseados com cuidado. As instruções de segurança encontram-se na etiqueta do produto. É aconselhável consultar a ficha de dados de segurança antes de manusear o reagente. A eliminação de resíduos deve ser feita de acordo com os regulamentos locais em vigor.

Qualquer incidente grave relacionado ao produto deve ser relatado ao QCA e à autoridade competente do estado em que o usuário está estabelecido.

AMOSTRA

Amostras citológicas e histológicas de diferentes origens: ginecológicas, escarro, fluidos de biópsia.

O manuseio das amostras deve ser realizado de acordo com os protocolos estabelecidos em cada laboratório para o preparo das amostras a serem coradas seguindo o estado da arte atual.

Manuseie as amostras com cuidado devido à sua capacidade potencialmente infecciosa.

CONTROLO DE QUALIDADE

Recomenda-se seguir as práticas de controle de qualidade estabelecidas por organizações internacionais e realizar coloração periódica com preparações de controle de qualidade que contenham amostras processadas de forma semelhante às amostras a serem avaliadas.

PREPARAÇÃO DO REAGENTE DE TRABALHO:

O corante está pronto para uso, para coloração manual e para uso no QCA STAINER.

PROCEDIMENTO

COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU (MANUAL)

1. Os esfregaços fixados com «spray» devem ser mergulhados em água durante 5–10 minutos para que a carboximetilcelulose (CMC) que contém se dissolva completamente
2. Imersão durante 1 minuto em hematoxilina de Harris
3. Lavagem com água 15 segundos
4. Lavagem com etanol-HCl (0,25%) 10 segundos
5. Lavagem com água 15 segundos
6. Lavagem com água amoniacal (NH₃ a 0,05%) 5 segundos
7. Lavagem com água 15 segundos
8. Imersão em etanol a 96% 10 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
9. Imersão no corante OG-6, 3 minutos
10. Lavagem em etanol a 96% 15 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
11. Imersão no corante EA 50 ou EA 36 ou EA 65, 3 minutos
12. Lavagem em etanol a 96% 15 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
13. Imersão em etanol absoluto 15 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
14. Imersão em etanol/xilol (50%) 15 segundos
15. Imersão em xilol 15 segundos
16. Imersão em xilol durante 2 minutos
17. Montar a preparação

COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA

1. Desparafinar a preparação.
2. Depois da última imersão em etanol, lavar com água destilada durante 1 minuto
3. Imersão durante 8 minutos em hematoxilina
4. Lavagem com água 1 minuto
5. Lavagem com etanol-HCl (0,5%) 13 segundos
6. Lavagem com água 15 segundos
7. Lavagem com água amoniacal (NH₃ a 0,05%) 30 segundos
8. Lavagem com água 1 minuto
9. Imersão durante 30 segundos em eosina a 1%
10. Imersão em etanol a 96% 6 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
11. Imersão em etanol absoluto 6 segundos (três vezes, recipiente diferente)
12. Imersão em xilol/eucalipto 6 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
13. Montar a preparação

COLORAÇÃO HEMATOXILINA MAYER-EOSINA

1. Desparafinar a preparação.
2. Depois da última imersão em etanol, lavar com água destilada durante 5 minutos
3. Imersão durante 10 minutos em hematoxilina de Mayer
4. Lavagem com água 5 minutos
5. Imersão durante 2 minutos em eosina alcoólica a 1%
6. Imersão em etanol a 96% 10–15 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
7. Imersão em etanol absoluto 10–15 segundos (duas vezes, recipiente diferente)
8. Imersão em xilol (três vezes, recipiente diferente)
9. Montar a preparação

PT - HEMATOXILINA DE HARRIS

—

PT - HEMATOXILINA DE CARAZZI

—

PT - HEMATOXILINA DE MAYER

—

Para o QCA STAINER, os diferentes métodos são encontrados no software do sistema.

Cada utilizador deve validar este procedimento no seu laboratório para o ajustar ao seu método padrão, aplicando as várias variantes deste procedimento, tanto manuais como automáticas, que lhe permitem otimizar os resultados. Deve-se levar em consideração que a intensidade da coloração é proporcional ao tempo de coloração.

RESULTADOS

Núcleos: azul-violeta

Citoplasma acidófilo: avermelhado

Citoplasma basófilo: azul

Citoplasma queratinizado: alaranjado

Para coloração Tricromo de Masson ver Ref. 995700

NOTAS

O resultado da coloração é indicativo e deve ser confirmado com testes adicionais apropriados.

Os resultados de coloração indicados são indicativos, pois a intensidade e a tonalidade da cor podem ser influenciadas por diversos fatores como fixação e tempo de coloração (a intensidade da coloração é proporcional ao tempo de coloração).

BIBLIOGRAFIA

Marshall, P.N., Galbrait, W., Bacus, J.W., (1979). Anal. Quant. Cytology, 1, 169-178.

Baker, J.R., (1962), Quart. J. Micr. Sci., 103, 493-517.

Boon, M.E., Drijver, J.S., Routine Cytological staining techniques, 1st. ed (1986)

Allison, D. B., P. J. Simner, and S. Z. Ali. (2018). Cancer Cytopathol., vol. 126, no. S8, pp. 643–653.

Cronjé, H. S. (2011). Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol., vol. 25, no. 5, pp. 575–584.

Feldman, A. T. and D. Wolfe (2014). Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining, in Histopathology

PRINCIPE

Le test de Papanicolaou, qui doit son nom au Dr Georgios Papanicolaou, pionnier de la recherche cytologique et sur le cancer, est réalisé pour diagnostiquer le cancer du col de l'utérus et d'autres organes. Il permet de détecter des changements dans les cellules qui peuvent être des signes précurseurs du cancer. Dans cette technique, la première étape est la coloration des noyaux à l'aide d'hématoxylines. La deuxième étape est la coloration des cytoplasmes à l'aide d'une solution orangée, qui colore les cellules matures et kératinisées avec différentes intensités. La troisième étape emploie la solution appelée solution polychrome, qui est un mélange d'éosine, de vert lumière SF et de brun de Bismarck. La solution polychrome permet de différencier l'épithélium pavimenteux simple. La coloration à l'hématoxyline-éosine est la plus employée en histologie.

Les colorants à l'hématoxyline sont essentiellement formés de vernis métalliques d'hématoxyline oxydée avec des ions bivalents et trivalents. Le mécanisme de coloration est constitué d'unions covalentes du complexe métal-hémoxyline avec les radicaux anioniques du tissu. En ce qui concerne le matériau du noyau, les groupes anioniques de l'acide phosphorique de l'ADN sont susceptibles d'intervenir dans la réaction. Le caractère sélectif de la coloration augmente avec le milieu acide du colorant, car il rend plus difficile la coloration d'éléments à caractère amphotère, comme par exemple les acides aminés des protéines. Les noyaux apparaissent bleu à violet foncé.

Avec l'hématoxyline, il est possible de réaliser une coloration progressive et régressive. En cas de coloration régressive, les structures du noyau apparaissent plus différenciées et sont plus facilement visibles.

USAGE PRÉVU

Famille de dispositifs médicaux de diagnostic in vitro pour la coloration des noyaux pour l'histocytologie.

Ce sont des colorants qualitatifs qui renseignent sur l'état physiologique ou pathologique de l'échantillon de tissu lorsque la coloration obtenue est interprétée par un professionnel qualifié. Pour obtenir un diagnostic, les résultats doivent être évalués dans le contexte des antécédents médicaux, de l'état physique et des autres données cliniques et de laboratoire obtenues.

Pour une utilisation professionnelle en laboratoire.

RÉACTIFS ET COMPOSITION

Hématoxyline de Harris

1 x 500 mL	Réf. 99 22 32
1 x 1000 mL	Réf. 99 59 60
1 x 5000 mL	Réf. 99 12 97
1 x 1000 mL (STAINER)	Réf. 99 71 60

Composition

Hématoxyline, CI n° 75 290	0,5 %
Sulfate d'aluminium	6 %
Éthylène glycol	15 %

Hématoxyline de Carazzi

1 x 1000 mL	Réf. 99 16 43
1 x 5000 mL	Réf. 99 41 75
1 x 1000 mL (STAINER)	Réf. 99 41 46

Composition

Hématoxyline, CI n° 75 290	0,1 %
Sulfate d'aluminium/Potassium	6 %
Glycérine	20 %

Hématoxyline de Mayer

1 x 1000 mL	Réf. 99 77 50
1 x 5000 mL	Réf. 99 06 38

Composition

Hématoxyline, CI n° 75 290	0,5 %
Sulfate d'aluminium et d'ammonium	5 %
Glycérine	30 %

Hématoxyline de Weigert A

1 x 500 mL	Ref. 99 38 01
------------	---------------

Composition

Hématoxyline, CI n° 75 290	1 %
Éthanol 99	0.1%

À utiliser dans la teinture trichrome de Masson (Réf. 995700).

Hématoxyline de Weigert B

1 x 500 mL	Ref. 99 38 13
------------	---------------

Composition

Trichlorure de fer	2 %
HCl	< 0.01 %

À utiliser dans la teinture trichrome de Masson (Réf. 995700).

CONSERVATION ET STABILITÉ

Les réactifs conservés à 10-35°C et à l'abri de la lumière sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Les conteneurs doivent toujours être maintenus hermétiquement fermés.

Le passage du temps et des températures inférieures à 10°C peut provoquer l'apparition d'un léger précipité dans certains des réactifs, ce qui n'affecte pas la fonctionnalité du produit. Il est recommandé de tempérer le réactif à 15-30°C, d'agiter et de filtrer le colorant avant utilisation.

La stabilité d'utilisation doit être déterminée par chaque utilisateur à sa discrétion.

MATÉRIEL NON FOURNI

Matériel à usage général dans les laboratoires d'anatomopathologie
Colorant hématoxyline (voir références QCA disponibles sur le web)
Éthanol, de différentes concentrations (voir références QCA disponibles sur le web)
Xylène ou substitut de xylène (voir les références QCA disponibles sur le Web).
milieu de montage
Microscope

Les colorations de Papanicolaou peuvent être utilisées avec une méthode de coloration manuelle ou avec un équipement de coloration automatique (voir les colorations QCA disponibles sur le Web). Suivez les instructions d'utilisation des équipements automatiques fournies par le fabricant.

PRÉCAUTIONS

Les réactifs doivent être manipulés avec précaution. Les consignes de sécurité se trouvent sur l'étiquette du produit. Il est conseillé de consulter la fiche de données de sécurité avant de manipuler le réactif. L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.

Tout incident grave lié au produit doit être signalé à QCA et à l'autorité compétente de l'État dans lequel l'utilisateur est établi.

ÉCHANTILLON

Échantillons histologiques et cytologiques de différentes origines: gynécologiques, expectorations, liquides de biopsies.

La manipulation des échantillons doit être effectuée conformément aux protocoles établis dans chaque laboratoire pour la préparation des échantillons à colorer selon l'état actuel de l'art.

Manipulez les échantillons avec prudence en raison de leur capacité potentiellement infectieuse.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Il est recommandé de suivre les pratiques de contrôle de qualité établies par les organisations internationales et d'effectuer une coloration périodique avec des préparations de contrôle de qualité contenant des échantillons traités de la même manière que les échantillons à évaluer.

PRÉPARATION DU RÉACTIF DE TRAVAIL :

Le colorant est prêt à l'emploi, pour la coloration manuelle et pour une utilisation dans le QCA STAINER.

PROCÉDURE

COLORATION DE PAPANICOLAOU

1. Les frottis fixés par pulvérisation doivent être immergés dans l'eau pendant 5 à 10 minutes pour que la carboxyméthylcellulose (CMC) qu'ils contiennent se dissolve complètement.
2. Immersion pendant 1 minute dans l'hématoxyline de Harris
3. Lavage à l'eau pendant 15 secondes
4. Lavage à l'éthanol-HCl (0,25 %) pendant 10 secondes
5. Lavage à l'eau pendant 15 secondes
6. Lavage à l'eau ammoniacale (0,05 % de teneur en NH₃) pendant 5 secondes
7. Lavage à l'eau pendant 15 secondes
8. Immersion dans l'éthanol à 96° pendant 10 secondes (deux fois, différent conteneur)
9. Immersion dans le colorant OG-6 pendant 3 minutes
10. Lavage à l'éthanol à 96° pendant 15 secondes (deux fois, différent conteneur)
11. Immersion dans le colorant EA 50 ou EA 36 ou EA 65 pendant 3 minutes
12. Lavage à l'éthanol à 96° pendant 15 secondes (deux fois, différent conteneur)
13. Immersion dans l'éthanol absolu pendant 15 secondes (deux fois, différent conteneur)
14. Immersion dans l'éthanol/xylol (50 %) pendant 15 secondes
15. Immersion dans le xylol pendant 15 secondes
16. Immersion dans le xylol pendant 2 minutes. Monter la préparation

COLORATION HÉMATOXYLINE-ÉOSINE

1. Déparaffiner la préparation.
2. Après la dernière immersion dans l'éthanol, laver à l'eau distillée pendant 1 minute
3. Immersion pendant 8 minutes dans l'hématoxyline
4. Lavage à l'eau pendant 1 minute
5. Lavage à l'éthanol-HCl (0,5 %) pendant 13 s
6. Lavage à l'eau pendant 15 s
7. Lavage à l'eau ammoniacale (0,05 % de teneur en NH₃) pendant 30 s
8. Lavage à l'eau pendant 1 minute
9. Immersion pendant 30 secondes dans l'éosine à 1 %
10. Immersion dans l'éthanol à 96° pendant 6 s (deux fois, différent conteneur)
11. Immersion dans l'éthanol absolu pendant 6 s (trois fois, différent conteneur)
12. Immersion dans le xylol/eucalyptol pendant 6 s (deux fois, différent conteneur)
13. Monter la préparation

COLORATION HÉMATOXYLINE DE MAYER-ÉOSINE

1. Déparaffiner la préparation.
2. Après la dernière immersion dans l'éthanol, laver à l'eau distillée pendant 5 minutes
3. Immersion pendant 10 minutes dans l'hématoxyline de Mayer
4. Lavage à l'eau pendant 5 minutes
5. Immersion pendant 2 minutes dans l'éosine alcoolisée à 1 %
6. Immersion dans l'éthanol à 96° pendant 10 à 15 s (deux fois, différent conteneur)
7. Immersion dans l'éthanol absolu pendant 10 à 15 s (deux fois, différent conteneur)
8. Immersion dans le xylol (trois fois, différent conteneur)
9. Monter la préparation

FR - HÉMATOXYLINE DE HARRIS

—

FR - HÉMATOXYLINE DE CARAZZI

—

FR - HÉMATOXYLIN SELON MAYER

—

Pour le QCA STAINER, les différentes méthodes se trouvent dans le logiciel système.

Chaque utilisateur doit valider cette procédure dans son laboratoire pour l'ajuster à sa méthode standard, en appliquant les différentes variantes de cette procédure, manuelles et automatiques, qui lui permettent d'optimiser les résultats. Il faut tenir compte du fait que l'intensité de la coloration est proportionnelle au temps de coloration

RÉSULTATS

Noyaux : bleu-violet

Cytoplasme acidophile : rougeâtre

Cytoplasme basophile : bleu

Cytoplasme kératinisé : orangé

Pour la teinture trichrome de Masson, voir la référence 995700.

REMARQUES

Le résultat de la coloration est indicatif et doit être confirmé par des tests supplémentaires appropriés.

Les résultats de coloration indiqués sont indicatifs puisque l'intensité et la tonalité de la couleur peuvent être influencées par différents facteurs tels que la fixation et le temps de coloration (l'intensité de la coloration est proportionnelle au temps de coloration).

BIBLIOGRAPHIE

Marshall, P.N., Galbraith, W., Bacus, J.W., (1979). Anal. Quant. Cytology, 1, 169-178.

Baker, J.R., (1962), Quart. J. Micr. Sci., 103, 493-517.

Boon, M.E., Drijver, J.S., Routine Cytological staining techniques, 1st. ed (1986)

Allison, D. B., P. J. Simner, and S. Z. Ali. (2018). Cancer Cytopathol., vol. 126, no. S8, pp. 643-653.

Cronjé, H. S.(2011). Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol., vol. 25, no. 5, pp. 575-584.

Feldman, A. T. and D. Wolfe (2014). Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining', in Histopathology