

EA 36**FINALIDADE**

Corante para citologia esfoliativa (coloração citológica humana).

APRESENTAÇÃO

Frasco com 1000 mL – Cód. PA194

Frasco com 500 mL – Cód. PA195

COMPOSIÇÃO

Formulação	g/L
EA 36	
Eosina Amarelada	2,5
Verde Claro Amarelado	2,5
Marrom de Bismarck	0,5
Ácido fosfotúngstico	2
Solução Saturada de Carbonato de Lítio	0,5 mL/L
Água purificada	100 mL/L
Ácido Acético	1 mL/L
Álcool etílico a 95° q.s.p.	1000 mL

REGISTRO ANVISA:

10287910052

ARMAZENAMENTO

Conservar o produto em temperatura ambiente (10 a 30° C).

Válido por 720 dias após a fabricação.

Verificar o prazo de validade na embalagem.

Nunca utilizar produtos com validade expirada.

TRANSPORTE

Não aplicável.

CUIDADOS ANTES DO USO

Por tratar-se de material biológico, manusear o produto utilizando equipamentos de

proteção individual (luvas, avental e máscara).

Não usar materiais com selo de qualidade rompido ou violado.

Verificar o prazo de validade na embalagem.

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS COM O PRODUTO

- PA241 - Citoprov Spray frasco c/ 100mL (o líquido fixador além de preservar os detalhes celulares forma uma camada protetora sobre o esfregaço, permitindo que o mesmo seja corado posteriormente, facilitando, deste modo, o encaminhamento a distância);

- Cubas de Coplin ou similares;

- Etanol absoluto 50%, 70%, 80% e 96%;

- Xilol;

- Água destilada ou deionizada;

- Bálsamo do Canadá;

- Microscópio;

- Lâmina e lamínula de microscopia.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS**- PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO**

A citopatologia é uma técnica diagnóstica que avalia células provenientes de diferentes regiões do corpo para determinar a causa ou natureza de doenças. Os espécimes celulares são preparados em lâminas e examinados microscopicamente, permitindo o diagnóstico de câncer, condições pré-cancerosas, tumores benignos e algumas infecções.

As amostras podem ser obtidas por esfregaços, raspados, aspirações ou centrifugação de líquidos biológicos, possibilitando a detecção de alterações morfológicas nas células.

O primeiro teste citopatológico desenvolvido foi o teste de Papanicolaou, também conhecido como citologia cervical ou colpocitologia oncológica. Essa técnica é amplamente utilizada no rastreamento de lesões precursoras do câncer do colo do útero.

A coloração de Papanicolaou foi criada pelo médico Geórgios Papanicolaou, considerado o pai da citopatologia. Ele desenvolveu um método multicromático em 1942, que permanece em uso até hoje para a citologia esfoliativa.

Trata-se de uma técnica simples e econômica, empregada para detectar células cancerosas, especialmente em amostras do colo uterino (secreção vaginal) e dos brônquios (escarro). Também é utilizada em líquidos biológicos, como pleural, pericárdico e peritoneal, na pesquisa de células metastáticas.

Além da detecção de células neoplásicas, o método é aplicado para avaliar o equilíbrio hormonal do ciclo menstrual (citologia hormonal), identificar a cromatina sexual em esfregaços da mucosa oral e diagnosticar agentes infecciosos, principalmente fungos.

O princípio básico da citopatologia é identificar alterações na morfologia celular, observando o citoplasma e o núcleo das células coletadas. O citoplasma indica o grau de diferenciação celular, e mudanças em sua forma, coloração ou volume podem sinalizar alterações. O núcleo revela se a célula está normal, inflamada, pré-neoplásica ou neoplásica.

O mecanismo de coloração das células ainda é parcialmente controverso, mas duas hipóteses se destacam: adsorção física do corante à estrutura celular e interações químicas entre grupos aniônicos e catiônicos.

De forma geral, componentes celulares com pH ácido combinam-se com corantes

básicos (catiônicos), enquanto componentes básicos se ligam a corantes ácidos (aniônicos). O citoplasma contém elementos de ambas as naturezas, enquanto o núcleo é predominantemente ácido devido à presença de ácidos nucleicos.

A coloração de Papanicolaou é composta por três corantes principais: Hematoxilina de Harris, que cora o núcleo; Orange G6, que evidencia o citoplasma de células queratinizadas; e EA 36, um corante policromático que confere diferentes tonalidades ao citoplasma das demais células.

O material fixado em lâmina é submetido a diluições progressivas de etanol, de absoluto até 70%, seguido da ação sequencial dos corantes. Primeiro, aplica-se a Hematoxilina de Harris para corar o núcleo. Em seguida, o Orange G6 é usado para realçar o citoplasma de células queratinizadas. Por fim, o EA 36 diferencia o citoplasma das demais células.

As lâminas são então lavadas e clarificadas com álcool a 96% e xilol, resultando em coloração nítida e contraste adequado para a avaliação microscópica.

- USUÁRIO PRETENDIDO

Profissionais de laboratório de pesquisa ou análise clínica que realizam estudos ou serviços em citopatologia.

- AMOSTRA

Amostras de material cérvico-vaginal fixadas em lâminas com PA241 – Citoprov Spray (líquido fixador que deve ser eliminado do esfregaço antes da coloração por meio de imersão em álcool etílico).

- TÉCNICA DE USO**Coloração de Papanicolaou Clássica**

Imergir as lâminas em cubas de coloração contendo as soluções descritas na sequência abaixo, devidamente identificadas, respeitando o tempo de permanência estabelecido para cada etapa.

CUBA Nº	REATIVO	TEMPO
1	Etanol a 80%	2 minutos
2	Etanol a 70%	2 minutos
3	Etanol a 50%	2 minutos
4	Água destilada	2 minutos
5	HEMATOXILINA DE HARRIS (Nº 1)	45 segundos (tempo a ser ajustado)
6	Água corrente	10 minutos
7	Etanol a 50%	2 minutos
8	Etanol a 70%	2 minutos
9	Etanol a 80%	2 minutos
10	Etanol a 99,5°GL	2 minutos
11	ORANGE G6 (Nº 2)	2 minutos
12	Etanol a 99,5°GL	2 minutos
13	Etanol a 99,5°GL	2 minutos
14	EA 36 (Nº 3)	2 minutos
15	Etanol a 99,5°GL	2 minutos
16	Etanol a 99,5°GL	2 minutos
17	Etanol a 99,5°GL	2 minutos
18	Xilol	2 minutos
19	Xilol	2 minutos
20	Montagem com Bálsamo do Canadá	N.A.

Considerações:

- O tempo da Hematoxilina de Harris de 45 segundos, nem sempre dá resultado satisfatório, portanto quando necessário, deverá ser ajustado.

- Deve-se eliminar os excessos das soluções quando se passa de uma cuba para outra, menos na passagem da Hematoxilina para água corrente que deve ser imediata.

- Os corantes devem ser renovados mensalmente.

- Os corantes devem ser filtrados regularmente.

- As soluções alcoólicas devem ser renovadas semanalmente (evaporam e se turvam facilmente).

- Tempo maior no Xilol (que age como clarificador) pode alterar a coloração dos nucléolos. Seguindo os princípios técnicos de Masson (O Tricrômico de Masson (TM) é uma coloração especial usada principalmente para caracterizar e discriminar diferentes tecidos conjuntivos e componentes de tecidos moles), as passagens pelo álcool podem ser feitas diretamente pelo álcool absoluto, para hidratação e desidratação dos esfregaços. Eliminando as passagens pelos álcoois de concentração mais baixa, o que torna a coloração mais rápida.

- O Bálsamo do Canadá possui a finalidade de conservação a lâmina por 5 anos.

Coloração de Papanicolaou Modificada

A coloração original de Papanicolaou passou por diversas modificações ao longo do tempo, com reduções no número de lavagens e substituições de solventes, visando diminuir custos, tempo de execução e impacto ambiental, sem comprometer os critérios de qualidade e mantendo as características morfológicas esperadas.

- Para citologia convencional

Imergir as lâminas em cubas de coloração contendo as soluções descritas na sequência abaixo, devidamente identificadas, respeitando o tempo de permanência estabelecido para cada etapa.

CUBA Nº	REATIVO	TEMPO
1	Água	1 minuto

2	HEMATOXILINA DE HARRIS (Nº 1)	3 minutos
3	Água corrente	10 mergulhos (2 vezes)
4	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
5	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
6	ORANGE G6 (Nº 2)	2 minutos
7	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
8	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
9	EA 36 (Nº 3)	3 minutos 00 segundos
10	Água corrente	5 mergulhos (2 vezes)
11	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
12	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
13	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
14	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
15	Etanol a 99,5%GL	20 mergulhos
16	Etanol a 99,5%GL	20 mergulhos
17	Líquido de montagem: resina sintética	Diluir 1/42 (14 pipetas de Pasteur) com xilol

- Para citologia em meio líquido

A citologia em meio líquido apresenta diferenças nos tempos de exposição aos corantes em comparação à citologia convencional devido às características do preparo da amostra. Nessa metodologia, as células são suspensas em um preservativo líquido, o que pode alterar sua permeabilidade e afinidade pelos corantes, além de ser influenciada pela técnica de preparo da lâmina. Essas diferenças na interação celular com os corantes exigem ajustes nos tempos de coloração para garantir contraste adequado entre núcleo e citoplasma, preservar a morfologia celular e permitir a detecção confiável de alterações citopatológicas. Imergir as lâminas em cubas de coloração contendo as soluções descritas na sequência abaixo, devidamente identificadas, respeitando o tempo de permanência estabelecido para cada etapa.

CUBA Nº	REATIVO	TEMPO
1	Água	20 mergulhos (3x)
2	HEMATOXILINA DE HARRIS (Nº 1)	6 minutos
3	Lavar em água corrente	10 mergulhos
4	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
5	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
6	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
7	ORANGE G6 (Nº 2)	4 minutos
8	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
9	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
10	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
11	EA 36 (Nº 3)	4 minutos
12	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
13	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
14	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
15	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
16	Etanol a 99,5%GL	10 mergulhos
17	Estufa 60°C	15 minutos
18	Líquido de montagem: resina sintética	Diluir 1/42 (14 pipetas de Pasteur) com xilol

- LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A coloração adequada no método de Papanicolaou deve evidenciar o núcleo em tom azul (pela ação da Hematoxilina de Harris), o citoplasma das células superficiais em tonalidade rósea ou alaranjada (pela ação do Orange G6) e o citoplasma das células intermediárias, parabasais e basais em tons verde-azulados (pela ação do EA 36).

INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES

Algumas situações poderão comprometer a execução dos testes e gerar interferências analíticas, como:

- Esfregaços excessivamente finos ou espessos prejudicam a uniformidade e a qualidade da coloração;
- Problemas recorrentes também podem estar relacionados à fixação inadequada do material;
- Alteração na coloração provocada pelo uso de sprays fixadores à base de polietilenoglicol;
- Qualquer indício de hidratação do álcool etílico absoluto ou do xilol requer substituição imediata desses reagentes;
- De acordo com a rotina do laboratório, deve-se manter um cronograma de troca dos corantes, geralmente necessário quando as colorações se tornam visivelmente mais fracas;

- Após abertos, os componentes tornam-se suscetíveis a contaminações químicas ou microbianas que podem inviabilizar sua utilização;
- 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;
- 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.

REAÇÕES ADVERSAS

Não aplicável.

CARACTERÍSTICA DE DESEMPENHO DO PRODUTO

- ESPECIFICIDADE

Não aplicável.

- LIMITE DE DETECÇÃO

Não aplicável.

RISCOS RESIDUAIS

Não aplicável.

INTERVALO DE REFERÊNCIA

Não aplicável.

REQUISITOS DE INSTALAÇÃO, TREINAMENTO OU QUALIFICAÇÕES ESPECIAIS

Não aplicável.

DESCARTE DO PRODUTO E DA AMOSTRA

Descartar o produto e a amostra de acordo com o programa de gerenciamento de resíduos do laboratório.

* Para o produto sem contato com a amostra seguir o plano de gerenciamento de resíduos químicos.

* Para a amostra e produto com amostra seguir plano de gerenciamento de resíduos infectantes ou possivelmente infectantes.

* Após incubação o produto deverá ser autoclavado a 121° C por 30 minutos e descartado em lixo apropriado.

CONTROLE DE QUALIDADE

COMPONENTE	AÇÃO/FUNÇÃO	RESULTADO ESPERADO
Hematoxilina de Harris	Corante básico com afinidade pelo núcleo	Núcleo azul, bem evidente
Orange G6	Corante ácido que evidencia o citoplasma de células queratinizadas	Citoplasma das células superficiais em tonalidade rósea ou alaranjada
EA 36	Corante policromático que diferencia o citoplasma das demais células	Citoplasma das células intermediárias, parabasais e basais em tons verde-azulados

GARANTIA DA QUALIDADE

Este produto é fabricado e liberado para venda após testes de controle de qualidade para cada lote, conforme normas das Boas Práticas de Fabricação e Controle de produtos para diagnóstico de uso *in vitro*.

Para eficácia do produto é necessário:

- Utilizar amostras clínicas coletadas, transportadas e armazenadas de acordo com a indicação da literatura especializada;
- Seguir rigorosamente todas as etapas descritas nesta instrução de uso.
- Utilizar acessórios e equipamentos adequados e em boa conservação.
- Transportar e armazenar o produto de acordo com as condições indicadas.
- Nunca utilizar produtos com a embalagem original danificada.
- Nunca utilizar produto com prazo de validade expirado.

Caso ocorra qualquer problema na utilização do produto relativo à qualidade intrínseca do mesmo, que tenha ocorrido por falha de fabricação comprovada, a **Newprov** resolverá a questão sem ônus ao cliente, conforme determinado na Lei 8.078/90 – Código de Defesa do Consumidor.

A Newprov disponibiliza, aos seus clientes, assessoria técnica-científica para quaisquer esclarecimentos necessários quanto a utilização deste produto que não estejam contemplados nesta instrução de uso, através de contato com o SAC – Serviço de Atendimento ao Consumidor.

Certificados de análise de cada lote estão disponíveis na empresa e podem ser encaminhados ao cliente sempre que solicitados ao SAC ou acesso pelo site www.newprov.com.br após cadastro no campo de acesso restrito.

Consulte sempre a instrução de uso através do QR code impresso no rótulo do produto para garantir a correlação adequada de versão/revisão do documento frente ao produto adquirido. Na necessidade de versão impressa da instrução de uso solicitar sem custo adicional (inclusive de envio) ao nosso SAC pelo (41) 38881300 ou sac@newprov.com.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CIBAS, E.S. & DUCATMAN, B.S. **Cytology – Diagnostic Principles and Clinical Correlates**. W.B. Saunders Co., 1996.

GRIMALDO, C. **Citologia do Trato Genital Feminino**. 3 ed., Atheneu, Rio de Janeiro, 1993.

HERZBERG, A.J., RASO, D.S., SILVERMAN, J.F. **Color Atlas of Normal Cytology**. Churchill Livingstone, 1999.

BERKAN, T. K.; REEDER, J. E.; LOPEZ, P. A. Jr.; GORMAN, K. M.; WHEELLESS, L. L. Jr. **A protocol for Papanicolaou staining of cytologic specimens following flow analysis**. Cytometry, 1986.

BIBBO, M.; WILBUR, D. **Comprehensive Cytopathology**. 3ª ed. Elsevier, 2010.

DERGOVICS, F. L.; MOURA, T. P. S.; SHIRATA, N. K.; PEREIRA, S. M. M. **Avaliação do desempenho da mistura verniz/xilol na diafanização de lâminas de citopatologia coradas com a técnica de Papanicolaou**. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 2012.

ELEUTÉRIO, J. **Noções Básicas de Citologia Ginecológica**. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2003.

IZHAR, S.; KAUR, R.; MASI, K. **Efficacy of rapid, economical, acetic acid Papanicolaou stain in cervical smears as an alternative to conventional Papanicolaou stain**. Journal of Cytology, 2014.

JOHNSON, P. L.; KLEIN, M. N. **Application of Papanicolaou stain to paraffin sections**. Stain Technology, v. 31, p. 223, 1956.

KOSS, L. G.; GOMPEL, C. **Citopatologia Ginecológica com Correlações Histológicas e Clínicas**. São Paulo: Editora Roca, 2006.

LIU, W. **A simplified cytologic staining technic**. American Journal of Clinical Pathology, v. 54, p. 767, 1970.

MOOSA, N. Y.; KHATTAK, N.; ALAM, M. I.; SHER, A.; SHAH, W.; MOBASHAR, S. **Comparison of cervical cell morphology using two different cytology techniques for early detection of pre-cancerous lesions**. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2014.

QUEIRO, C.; LIMA, D. O **Laboratório de Citopatologia: Aspectos Técnicos e Operacionais**. Recife: Editora Universitária UFPE, 2000.

STREET, C. M. **Papanicolaou Techniques in Exfoliative Cytology**. In: COWDRY, E. V. (Ed.). Laboratory Technique in Biology and Medicine. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1952. p. 253.

WAESSNER. **Técnicas de Citologia Hematológica**. 1990.

PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO DE USO IN VITRO

Fabricado e distribuído por:
Newprov Produtos para Laboratório Ltda
Rua 1ª de Maio, 590/608 - Centro - CEP: 83323-020 - Pinhais - PR
CNPJ: 73.636.391/0001-09
Responsável Técnica:
Bárbara Pereira Albini – CRF/PR 19057
Indústria Brasileira
Serviço de Assessoria e Soluções de excelência em análises laboratoriais
SAC: 41 38881300 – sac@newprov.com.br