

UTILIZAÇÃO PREVISTA

Os reagentes para o ácido de Schiff (PAS) destinam-se à "utilização em diagnóstico *in vitro*".

O procedimento de coloração de PAS da Sigma-Aldrich oferece procedimentos normalizados e de microondas para a demonstração dos linfócitos e mucopolissacarídeos. O padrão de coloração dos linfócitos é útil para a tomada de decisões terapêuticas no estabelecimento de casos de leucemia linfocítica. A reação PAS nas secções de tecido é útil para a demonstração dos mucopolissacarídeos. O processo de digestão por diastase (α -amilase), seguido da coloração PAS é útil como auxiliar no diagnóstico da doença de acumulação de glicogénio.

O procedimento de coloração PAS também pode ser utilizado para demonstrar organismos fúngicos em secções tecidulares.²

Quando tratados com ácido periódico, os glicóis são oxidados em aldeídos. Após a reação com o reagente de Schiff (uma mistura de pararrosanilina e metabissulfito de sódio), é libertada uma adução de pararrosanilina que vai colorar os componentes celulares que contêm glicol.¹ Esta reação pode ser provocada em esfregaços sanguíneos ou de medula óssea, em preparações de tecido duro ou em secções tecidulares.^{2,3} Quando utilizado em esfregaços de sangue ou de medula óssea, este teste pode ser útil para o reconhecimento de alguns casos de eritroleucemia e leucemia linfoblástica aguda.⁴

A digestão por diastase (α -amilase), pode ser utilizada como auxiliar no diagnóstico da doença de acumulação de glicogénio. A diastase hidrolisa o amido, o glicogénio e os produtos de degradação precedentes destes polissacarídeos presentes no tecido. Os subprodutos resultantes do processo de digestão são lavados antes da coloração PAS.⁵

Os procedimentos da Sigma-Aldrich incluem as técnicas PAS para coloração rápida em fornos microondas.^{6,9}

REAGENTES

SOLUÇÃO DE ÁCIDO PERIÓDICO, N.º de Catálogo 395-1

Ácido periódico, 1 g/dL.

REAGENTE DE SCHIFF, N.º de Catálogo 395-2

Pararrosanilina HCl, 1%, e metabissulfito de sódio, 4%, em ácido clorídrico, 0,25 mol/L.

SOLUÇÃO DE HEMATOXILINA, N.º 3 DE GILL, N.º de Catálogo GHS-3

Hematoxilina certificada, 6 g/L, iodato de sódio, 0,6 g/L, sulfato de alumínio, 52,8 g/L e estabilizador.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE:

Armazenar a solução de ácido periódico e o reagente de Schiff no frigorífico (2–8°C). Armazenar a solução de hematoxilina N.º 3 de Gill à temperatura ambiente (18–26°C). Os reagentes permanecem estáveis até ao final do prazo de validade indicado nos rótulos.

DETERIORAÇÃO:

Eliminar a solução de hematoxilina N.º 3 de Gill se a solução ficar castanha (oxidação excessiva pelo ar) ou púrpura (perda de acidez) ou quando o tempo necessário para a coloração adequada exceder em mais de 5 minutos o tempo recomendado no procedimento.

PREPARAÇÃO:

A solução de ácido periódico, o reagente de Schiff e a solução de hematoxilina N.º 3 de Gill são fornecidos prontos a utilizar.

A SOLUÇÃO DE FIXADOR DE FORMALINA-ETANOL é preparada misturando-se 5 mL de formaldeído com 45 mL de etanol a 95% (álcool de reagente). Preparar uma solução fresca diariamente e manter devidamente tapada.

PRECAUÇÕES:

Deverão ser aplicadas as precauções normais relativamente ao manuseamento de reagentes laboratoriais. Eliminar os resíduos de acordo com todos os regulamentos locais, estaduais, regionais ou nacionais. Consultar a ficha de dados de segurança dos materiais para obter informações mais actualizadas sobre os riscos, perigos ou segurança.

As lâminas de controlo PAS TISSUE-TROL são lâminas de tecido humano embebidas em parafina e que contêm PAS, pelo que devem ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Declarações de riscos e segurança dos EUA

A solução de ácido periódico é CORROSIVA. Provoca queimaduras. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Despir imediatamente todo o vestuário contaminado. Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento de protecção para os olhos/face adequados.

O reagente de Schiff é TÓXICO. Nocivo em caso de ingestão. Provoca queimaduras. Pode causar cancro. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento de protecção para os olhos/face adequados. Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente um médico (mostrar-lhe o rótulo se possível). Limitado aos utilizadores profissionais. Evitar a exposição – obter instruções especiais antes da utilização.

A solução de hematoxilina N.º 3 de Gill é NOCIVA. Muito tóxica por inalação. Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção adequado. Órgãos alvo: Fígado e rins.

O álcool reagente é INFLAMÁVEL e IRRITANTE. Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele. Manter o recipiente adequadamente fechado. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção adequado.

O xilol é INFLAMÁVEL e NOCIVO. Possibilidade de risco de comprometimento da fertilidade. Pode ser prejudicial para o feto. Nocivo por inalação e em contacto com a pele. Irritante para as vias respiratórias e pele. Risco de lesões oculares graves. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento de protecção para os olhos/face adequados. Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente um médico (mostrar-lhe o rótulo se possível).

Declarações de riscos e segurança da UE

A solução de ácido periódico é CORROSIVA. Provoca queimaduras. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Despir imediatamente todo o vestuário contaminado. Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento de protecção para os olhos/face adequados.

O reagente de Schiff é TÓXICO. Provoca queimaduras. Pode causar cancro. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento de protecção para os olhos/face adequados. Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente um médico (mostrar-lhe o rótulo se possível). Limitado aos utilizadores profissionais. Evitar a exposição – obter instruções especiais antes da utilização.

A solução de hematoxilina N.º 3 de Gill é NOCIVA. Muito tóxica por inalação. Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção adequado.

O álcool reagente é ALTAMENTE INFLAMÁVEL e IRRITANTE. Muito inflamável. Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele. Manter o recipiente adequadamente fechado. Conservar longe de qualquer fonte de ignição – não fumar. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um médico. Usar vestuário de protecção adequado.

O xilol é NOCIVO. Inflamável. Nocivo por inalação e em contacto com a pele. Irritante para a pele. Evitar o contacto com os olhos.

PROCEDIMENTO

COLHEITA DE AMOSTRAS:

Recomenda-se que a colheita de amostras seja realizada de acordo com o documento M29-A2 da NCCLS. Nenhum método de teste conhecido poderá garantir totalmente que as amostras sanguíneas ou de tecido não irão transmitir infecções. Por essa razão, todos os derivados sanguíneos ou amostras de tecido deverão ser considerados potencialmente infecciosos.

Poderão utilizar-se esfregaços de sangue total, EDTA ou heparinizado ou de medula óssea preparados em estado fresco. Fixar o mais rapidamente possível.⁴

Para os polissacarídeos pode utilizar-se tecido fixado em formalina tamponada neutra a 10%, Zenker ou Bouin.² Deverá ter-se em consideração que alguns hidratos de carbono são solúveis em água.³ Para a demonstração do glicogénio são recomendados o fluido de Carnoy, o fluido de Gendre ou a formalina alcoólica ácida.² O tempo necessário para a extracção da diastase pode ser prolongado quando o tecido é fixado num ácido púrico contendo fixador.² Cortar as secções de tecido com 5 micrones.

MATERIAIS ESPECIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS:

Solução de formaldeído, 37%

Álcool reagente

Filtro de papel Whatman N.º 4

Os esfregaços de controlo PAS, como o Sigma PAS TISSUE-TROL, N.º de Catálogo P8814, devem ser incluídos em cada execução.

PROCEDIMENTOS APENAS PARA MICROONDAS:

Forno microondas H2100 ACCUMATE™, N.º de Catálogo A 9084 (110 v) ou A 9209 (220 v) Jarra de Coplin com tampas ventiladas

Concentrado de substituto de "água corrente de Scott"

α -amilase, Tipo VI-B, de pâncreas de porcino (apenas para o procedimento de extracção da diastase)

NOTAS:

Se for utilizado o forno microondas H2100 da Sigma-Aldrich, consultar o Manual do Utilizador para obter as instruções.

Podem incluir-se esfregaços sanguíneos preparados a partir de indivíduos clinicamente saudáveis para fins de controlo. Os leucócitos polimorfonucleares apresentarão uma coloração citoplásmica vermelha intensa. As secções de tecido que se sabem ser positivas para PAS e/ou que contêm glicogénio devem ser incluídas sempre que se realizar uma sequência de coloração. A Sigma-Aldrich disponibiliza o PAS TISSUE-TROL™, N.º de Catálogo, P 8814, para este fim.

Os dados obtidos com este procedimento servem apenas para auxiliar o diagnóstico e deverão ser analisados em conjunto com outros testes de diagnóstico ou informações clínicas.

PROCEDIMENTO:

I. PREPARAÇÕES DE SANGUE, MEDULA ÓSSEA OU TECIDO DURO

Procedimento standard:

1. Fixar os esfregaços secos ao ar durante **1 minuto à temperatura ambiente** em solução de fixador de formalina-etanol.
2. Lavar as lâminas durante **1 minuto** num fluxo lento de água corrente.
3. Imergir as lâminas em solução de ácido periódico, N.º de Catálogo 395-1, durante **5 minutos à temperatura ambiente**.
4. Lavar as lâminas em diversos banhos de água destilada.
5. Imergir as lâminas em reagente de Schiff, N.º de Catálogo 395-2, durante **15 minutos à temperatura ambiente**.

NOTA: Imediatamente após a utilização, fechar o reagente de Schiff e voltar a colocá-lo no frigorífico (2–8°C).

6. Lavar as lâminas em água corrente durante **5 minutos**.

7. Realizar uma contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina N.º 3 de Gill, N.º de Catálogo GHS-3, durante **90 segundos**.
8. Lavar as lâminas em água corrente durante **15–30 segundos**, deixá-las secar ao ar e examinar microscopicamente com lentes de imersão em óleo (900x). As lâminas podem estar montadas num meio de montagem à base de tolueno ou xilol.

Procedimento para microondas:

1. Fixar os esfregaços sobre ao ar à **temperatura ambiente** durante **1 minuto** em fixador de formalina-etanol.
2. Lavar as lâminas durante **1 minuto** num fluxo lento de água corrente.
3. Colocar as lâminas em **40 mL** de solução de ácido periódico contida numa jarra de Coplin plástica.
4. Colocar no microondas a **800 watts** durante **10 segundos**.
5. Lavar bem em diversos banhos de água desionizada.
6. Colocar as lâminas em **40 mL** de reagente de Schiff contido numa jarra de Coplin plástica.
7. Colocar no microondas a **800 watts** durante **15 segundos**. Misturar a solução com uma pipeta de beral ou haste aplicadora e deixar incubar durante **1 minuto**.
8. Lavar num fluxo lento de água corrente, morna, durante **5 minutos**.
9. Colocar as lâminas em **40 mL** de solução de hematoxilina n.º 3 de Gill contida numa jarra de Coplin plástica.
10. Colocar no microondas a **800 watts** durante **10 segundos**.
11. Lavar em água corrente durante **1–2 minutos** e, em seguida, em substituto de “água corrente de Scott” à **temperatura ambiente**.
12. Lavar em água corrente. Secar ao ar.
13. As lâminas podem estar montadas num meio de montagem à base de tolueno ou xilol.

II. SECÇÕES TECIDULARES

Procedimento standard:

1. Desparafinar e hidratar as secções em água desionizada.
2. Imergir as lâminas em solução de ácido periódico, N.º de Catálogo 395-1, durante **5 minutos** à **temperatura ambiente** (18–26°C).
3. Lavar a lâmina em diversos banhos de água destilada.
4. Imergir as lâminas em reagente de Schiff, N.º de Catálogo 395-2, durante **15 minutos** à **temperatura ambiente** (18–26°C).
5. Lavar as lâminas em água corrente durante **5 minutos**.
6. Realizar uma contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina N.º 3 de Gill, N.º de Catálogo GHS-3, durante **90 segundos**.
7. Lavar as lâminas em água corrente.
8. Desidratar, limpar e montar as secções num meio de montagem à base de tolueno ou xilol.

Procedimento de microondas para a digestão por diastase (α -amilase):

1. Utilizar lâminas de teste duplicadas. Marcar uma para a digestão com diastase e uma para coloração PAS.
NOTA: Recomendamos lâminas revestidas com adesivo tecidual.
Não colocar as secções em celoidina quando se está a realizar a digestão por diastase.º
2. Desparafinar e hidratar as lâminas em água desionizada.
3. Preparar a solução de trabalho de diastase (α -amilase) dissolvendo **0,2 g** de α -amilase, N.º de Catálogo A 3176, em **40 mL** de água desionizada. Misturar bem e colocar numa jarra Coplin plástica. Preparar imediatamente antes de utilizar.
4. Colocar no microondas a **600 watts** durante **25 segundos**.
5. Remover as lâminas da jarra de Coplin e lavar a lâmina digerida em água corrente durante **5 minutos**.
6. Utilizando as duas lâminas, a digerida e a não digerida, prosseguir com o procedimento para microondas para tecido, Passo 2.

Procedimento para microondas:

1. Desparafinar e hidratar em água desionizada.
2. Colocar as lâminas em **40 mL** de solução de ácido periódico contida numa jarra de Coplin plástica. Cobrir folgadoamente a jarra com a tampa ou utilizar tampas com orifícios perfurados.
3. Colocar no microondas a **800 watts** durante **10 segundos**.
4. Lavar bem em diversos banhos de água desionizada.
5. Colocar as lâminas em **40 mL** de reagente de Schiff contido numa jarra de Coplin plástica.
6. Colocar no microondas a **800 watts** durante **15 segundos**. Misturar a solução com uma pipeta de beral ou haste aplicadora e deixar incubar durante **1 minuto**.
7. Lavar num fluxo lento de água corrente, morna, durante **5 minutos**.
8. Colocar as lâminas em hematoxilina, n.º 3 de Gill, ou em solução verde clara contida numa jarra de Coplin plástica.
9. Colocar no microondas a **800 watts** durante **10 segundos**.

10. a. Se utilizar hematoxilina de Gill, lavar em água corrente durante **1–2 minutos** e, em seguida, em substituto de “água corrente de Scott” à **temperatura ambiente**. Lavar em água corrente. Desidratar, limpar e montar.
- b. Se utilizar solução verde clara, lavar rapidamente em água desionizada, desidratar rapidamente, limpar e montar.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

As substâncias positivas para PAS apresentam uma coloração rosa a vermelho com núcleo azul. Uma lâmina de extração da diastase (α -amilase) não apresentará coloração PAS visível do glicogénio quando comparada com a lâmina de controlo positivo de glicogénio não digerido.

Se os resultados observados forem diferentes dos esperados, contactar a Assistência Técnica da Sigma-Aldrich para mais informações.

BIBLIOGRAFIA

1. Hotchkiss RD: A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Arch Biochem 16:131, 1948
2. Sheehan DC, Hrapchak BB: Theory and Practice Histotechnology, 2nd ed. CV Mosby, St. Louis, (MO), pp 52, 164–167, 1980
3. Culling CFA, Allison RT, Barr WT: Cellular Pathology Technique, 4th ed. Butterworths, pp 216–220, 1985
4. Davey FR, Nelson DA: Periodic Acid Schiff (PAS) Stain. IN Hematology, 2nd ed. WJ Williams, E Buetler, AJ Erslev, RW Rundles, McGraw-Hill, New York, pp 1630–1632, 1977
5. Thompson SW: Selected Histochemical and Histopathological Methods, CC Thomas, Springfield, (IL), pp 520–539, 1966
6. Leong AS-Y, Milios J: Rapid immunoperoxidase staining of lymphocyte antigens using microwave irradiation. J Pathol 148:183, 1986
7. Brinn NT: Rapid metallic histologic staining using the microwave oven. J Histotechnol 6:125, 1983
8. Valle S: Special stains in the microwave oven. J. Histotechnol 9:237, 1986

A Sigma-Aldrich, Inc. garante que os seus produtos estão em conformidade com as informações contidas nesta e em outras publicações da Sigma-Aldrich. O comprador deverá determinar a adequação do(s) produto(s) ao fim particular a que se destinam. Poderão aplicar-se termos e condições adicionais. Consultar o verso da factura ou carta de porte para mais informações sobre os termos e condições de venda adicionais.

Procedimento N.º 395
Revisão Anterior: 2003-02
Revisto: 2003-09

  **AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse**
Egham, TW20 9BD Reino Unido

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA +1 314 771 5765
Assistência Técnica: chamada paga no destino +1 314 771 3122
ou endereço de correio electrónico: clintech@sial.com
Para encomendar: chamada paga no destino +1 314 771 5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Alemanha 49-7329-970