

**MANUAL
DE BOAS PRÁTICAS
EM PATOLOGIA**

MANUAL DE BOAS PRÁTICAS EM PATOLOGIA

EDITOR
EMILIO ASSIS



Sociedade
Brasileira de
PATOLOGIA

Copyright©2021 Sociedade Brasileira de Patologia

Todos os direitos Reservados e protegidos pela Lei 9.610 de 16/02/1998.

Nenhuma parte deste livro, sem autorização prévia por escrito da editora (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA) responsável e/ou detentora desta obra, poderá ser reproduzida ou transmitida sejam quais forem os meios empregados: eletrônicos, mecânicos, fotográficos, gravação ou quaisquer outros.

Obra: Manual de Boas Práticas em Patologia

ISBN Impresso: 978-65-88327-01-2

ISBN Digital: 978-65-88327-00-5

Produzido por:

Livraria e Editora Livromed Paulista Eirelli

Rua Mons. vitorino G. Mendes, 84

CEP: 02563080

Atendimento ao cliente:

(11)5575-3194/(11)9.4506-3769

livromed@livromedpaulista.com.br

Revisão, diagramação e capa:

Thaty Furtado | Primeira Edição Soluções Editoriais

AS848m Assis, Emilio

Manual de Boas Práticas em Patologia / Emilio Assis. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 2020.

92 p.; il. ; 24 cm.

ISBN 978-65-88327-01-2

1. Medicina. 2. Patologia. 3. Doenças, patologias e treinamentos. I. Assis, Emilio. II. Título.

CDD 616

CDU 616

Elaborada pela Bibliotecária Clarissa Padovani Mussoi CRB 10/1775

Índice para catálogo sistemático:

1. Patologia: 616

Sociedade Brasileira de Patologia

Endereço: R. Topázio, 980 - Vila Mariana, São Paulo - SP, 04105-063

Telefone: (11) 5080-5298

www.sbp.org.br

DIRETORIA

2020-2022 – Consolidando o caminho da nova Patologia

Presidente	Katia Ramos Moreira Leite
Vice-Presidente p/ Assuntos Acadêmicos	Isabela Werneck da Cunha
Vice-Presidente p/ Assuntos Profissionais	Emilio Augusto C. P. de Assis
Secretária Geral	Marina De Brot
Secretário Adjunto	Romulo Loss Mattedi
Tesoureiro	Carlos Augusto Moreira Silva

Coordenadores dos Departamentos

Comunicação Social	Gerusa Biagione Tiburzio
Especialidades	Igor Campos da Silva
Científica	Maria Dirlei F.S. Begnami
Ensino	Felipe D'Almeida Costa
Informática	Fábio Daniel Molinari
Defesa Profissional	Thiago Barreto Frederigue
Controle de Qualidade	Larissa Cardoso Marinho
Relações Internacionais	Fábio Rocha Fernandes Távora

2020-2022 – Transparência

Conselho Fiscal	Daniel Cury Ogata Valquíria de Araújo Verônica Resende Lima
------------------------	---

Conselho Fiscal: Suplente	Raquel Silva Araujo
----------------------------------	---------------------

Conselho Consultivo	Clóvis Klock Fernando Augusto Soares Renato Lima de Moraes Jr.
----------------------------	--

Assessorias Especiais:

AMB	Denis Itiro Kobayashi
CFM	Clóvis Klock
Comunicação Social	Aline Caldart Tregnago
Mídias Sociais	Raimundo Gerônimo da Silva Jr.
Graduação	Monique Freire Santana
Ligas Acadêmicas	Juliana Arôxa Pereira Barbosa
SUS	Clóvis Klock
PICQ	Maurício Barcelos Costa
Coordenador Acreditação	Renato Lima de Moraes Jr.
CNRM	Fernando Augusto Soares
Pós Graduação	Antônio Hugo José F. M. Campos
ANS	Ellen Caroline T. do Nascimento
S.V.O.	Rosemary Nascimento
Relações Internacionais	Regina de Paula Xavier Gomes
Representantes dos residentes	Luciana Schultz Amorim
	Glícia Campanharo Malheiros

Surgical and Experimental Pathology

Editor Chefe	Fernando Augusto Soares
Comissão de Título de Especialista	Aloísio Souza Felipe da Silva Ângela Cristina GouvêaCarvalho Daniel Cury Ogata Felipe D’Almeida Costa Giuliano Stefanello Bublitz Mariana Petaccia de Macêdo Nathalie Henriques Silva Canedo
Comissão PACQ	Comissão PICQ
Larissa Cardoso Marinho	Maurício Barcelos Costa
Renato Lima de Moraes Jr	Daniel Cury Ogata
Alex Moisés Pimenta	Giuliano Stefanello Bublitz
Celina Santaella Rosa	Jefferson Crespigio
Emilio Augusto C. P. de Assis	Karla Patrícia Casemiro
Beatriz Hornburg	Luiz Guilherme C. A. de Lima
Carlos Augusto Moreira Silva	Raimundo Geronimo da Silva Jr.
Denis Itiro Kobayashi	Siderley Araújo

Agradecimento aos patrocinadores

Astrazeneca do Brasil Ltda.

Bristol Myers Squibb Farmacêutica S/A



Dedicatória

Dedicamos esta publicação aos nossos pacientes, agradecemos por confiar em nós, vamos honrar esta confiança fazendo o nosso melhor.

Autores

Emilio Assis - Editor

Professor da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora, MG.

Isabela Werneck da Cunha

Coordenadora Médica da Patologia da Rede D'OR-São Luiz, SP.

Clóvis Klock

Diretor Médico do Grupo Infolaudo - Medicina Diagnóstica - RS e SC

Fernando Augusto Soares

Diretor Médico da Anatomia Patológica - Rede D'Or São Luiz e Professor Titular de Patologia Geral FOU SP

Katia Ramos Moreira Leite

Professora Livre-docente da Disciplina de Urologia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Patologista Responsável do Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Urologia da FMUSP.

Mariana Petaccia de Macedo

Patologista no Laboratório de Patologia do Hospital Sírio Libanês

Renato Lima de Moraes Jr.

Médico patologista

Membro do conselho consultivo da SBP

Membro da Comissão de Acreditação do PACQ

Prefácio

Divulgar as boas práticas em Anatomia patológica e Citopatologia, sempre foi uma constante da Sociedade Brasileira de Patologia mediante seus pareceres e participação na elaboração de normas e resoluções junto aos diversos órgãos federais, agências e autarquias.

Ao lado do PICQ (programa de proficiência); do PACQ (programa de acreditação para laboratórios) e de suas publicações como o Manual de Laudos e da Cartilha de Instruções para a CHPM, após um árduo trabalho, é publicado esse Manual de Boas Práticas em Patologia.

Vários colegas participaram desse Manual, dando horas de seu tempo para sua execução. Muitos documentos foram consultados e sua bibliografia é extensa. Dentre esses, um grande trabalho foi realizado em conjunto com o Centro de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo para a elaboração de uma norma para os Laboratórios de Patologia, que aguarda publicação. Uma excelente publicação foi feita pelo Dr. Jorge Michalany. Seu livro Técnica Histológica em Anatomia Patológica (1980), já mostra uma grande preocupação com a área pré-analítica.

Essa publicação da Sociedade Brasileira de Patologia, com o apoio da Astrazeneca do Brasil e Bristol Myers Squibb Farmacêutica, vem suprir uma grande lacuna na orientação aos médicos em geral e em particular aos patologistas e a todos os colaboradores que trabalham na patologia, sobre as melhores práticas tanto na área pré-analítica, onde imprescindível a relação com os colegas médicos de outras especialidades, como nas áreas analíticas e pós-analíticas, onde as amostras são processadas e é emitido o laudo do procedimento diagnóstico orientando os médicos solicitantes quanto à melhor conduta para o paciente.

Um dos grandes focos de discussão é sobre a guarda de amostras processadas, (blocos e lâminas) e o descarte dos resíduos, tratado com destaque nesse manual.

A preocupação com o paciente é o foco da Patologia, o Manual de Boas Práticas foi elaborado visando em todos os processos a segurança para o patologista e principalmente ao paciente, para que tenha um diagnóstico seguro, correto e no tempo adequado, propiciando a melhor conduta terapêutica.

Além dos muitos colegas patologistas que participaram da elaboração deste Manual, cabe uma menção de agradecimento a todos os colaboradores da Sociedade Brasileira de patologia, que com seu trabalho, dão suporte a todas as realizações da diretoria.

A Sociedade Brasileira de Patologia cumpre com esse Manual mais um de seus propósitos estatutários, oferecendo aos médicos e demais profissionais de saúde, uma excelente ferramenta para incrementar a qualidade nos laboratórios de patologia, além de criar a cultura das boas práticas na execução dos procedimentos diagnósticos.

Renato Lima Moraes Jr.

Sumário

■ INTRODUÇÃO AO LABORATÓRIO.....	13
GLOSSÁRIO E CONCEITOS BÁSICOS.....	14
SETORES DO LABORATÓRIO.....	17
■ CAPÍTULO I - FASE PRÉ-ANALÍTICA.....	23
FORMOL E FIXAÇÃO.....	24
INCLUSÃO E CORTE.....	28
COLORAÇÃO DE ROTINA.....	30
COLORAÇÕES HISTOQUÍMICAS.....	32
TÉCNICAS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	32
TÉCNICAS PARA PATOLOGIA MOLECULAR.....	34
■ CAPÍTULO II - FASE ANALÍTICA.....	43
■ CAPÍTULO III - PÓS-ANALÍTICA.....	49
■ CAPÍTULO IV - DESCARTE.....	57
■ ANEXOS.....	65
■ SOLUÇÕES E REAGENTES.....	73



INTRODUÇÃO

Glossário

- **AMOSTRA** – Material coletado do paciente com intuito de análise, para emissão de laudo.
- **BIÓPSIA** – Amostra de parte de órgão ou lesão com intuito de diagnóstico e definição de conduta.
- **BLOCO DE PARAFINA** – Bloco de parafina que contém amostra biológica após processamento histológico.
- **CITOLOGIA** – Amostra de órgão ou lesão com intuito de melhor análise morfológica.
- **CLIVAGEM** – Ato de seleção e corte das amostras macroscópicas que serão encaminhadas para processamento histológico.
- **COLORAÇÃO DE ROTINA** – Coloração empregada para melhor análise do material rotineiro. Em amostras histológicas (biópsias e peça cirúrgicas), utiliza-se a coloração de Hematoxilina e Eosina (H.E.); em Citologia, a Papanicolaou.
- **COLORAÇÃO ESPECIAL** – São colorações histoquímicas, corantes diferentes da rotina que interagem com a amostra revelando componentes ultraestruturais dela, de maneira que complementem a análise morfológica usual.
- **DIAGNÓSTICO CRÍTICO** – São situações em que não se pode esperar o tempo habitual do laudo chegar até o médico assistente, devendo o patologista entrar em contato imediatamente.
- **FORMALINA** – É o formol 37% diluído em proporção de 9:1, de modo a melhor interagir sem agredir em demasia a amostra biológica do paciente. Ela deve ser tamponada para melhor preservação da amostra.
- **FORMOL** – É um aldeído (formaldeído) que pode ser empregado de diversas formas; na patologia é utilizado como fixador universal. Pode ser encontrado em diversas con-

centrações comerciais, normalmente a 37% (considerado formol concentrado).

- **IMUNO-HISTOQUÍMICA** – Procedimento diagnóstico complementar à análise morfológica de rotina, que revela expressão (ou ausência) de determinados antígenos no órgão ou tumor determinando ou contraindicando tratamento específico.
- **INCLUSÃO** – Ato de incluir a amostra biológica após processamento histológico em parafina.
- **MACROSCOPIA** – Ato de análise macroscópica de amostra, que percebe e relata as características iniciais da amostra e seleciona o que deve ser processado para análise microscópica.
- **MICROSCOPIA** – Análise microscópica da amostra.
- **PARAFINA** – Derivado do petróleo que possui dureza e maleabilidade a temperaturas relativamente baixas, que permite a sua manipulação e a preservação da amostra biológica. A parafina deve ser o mais pura possível. Se sua produção contém impureza, seu uso fica prejudicado e por vezes é necessário utilizar-se de espessantes para compensar isso; nessas situações, é proibitivo usar espessantes biológicos (como cera de abelha), pois estes contém DNA exógeno que influencia procedimentos de patologia molecular.
- **PATOLOGIA MOLECULAR** – Procedimento diagnóstico complementar à análise morfológica de rotina, que revela a presença (ou ausência) de alterações em moléculas de DNA e/ou RNA no sangue ou tecido, determinando ou contraindicando conduta médica específica.
- **PEÇA CIRÚRGICA** – Amostra de parte do órgão, ou o órgão inteiro, retirado de maneira íntegra, permitindo análise da lesão que contém e sua relação com os limites desta.
- **PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO** – Série de banhos de imersão em substâncias desidratantes (de rotina emprega-se etanol) e diafanizantes (de rotina emprega-se xilol), que permitem que a parafina permeie a amostra e a coloração interaja de maneira adequada.

CHECK-LIST RESUMIDO DE BOAS PRÁTICAS

- ✓ **AMBIENTE DE TRABALHO**
- ✓ **IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL**
- ✓ **ORIENTAR MÉDICOS E ENFERMEIRAS QUANTO A COLETA, PRÉ-CLIVAGEM E FIXAÇÃO**
- ✓ **QUALIDADE DAS LÂMINAS E LAMÍNULAS**
- ✓ **QUALIDADE DO CORTE E DA COLORAÇÃO**
- ✓ **QUALIDADE DOS INSUMOS**
- ✓ **QUANTIDADE DE PROFISSIONAIS ADEQUADA À CARGA DE SERVIÇO**
- ✓ **TEMPERATURA DA PARAFINA**
- ✓ **TEMPO DE LIBERAÇÃO DO LAUDO**
- ✓ **TEMPO DE PROCESSAMENTO**
- ✓ **USO DE FORMOL TAMPONADO**
- ✓ **VIGIAR O TEMPO DE FIXAÇÃO**
- ✓ **CONTEÚDO DO LAUDO (PROTOSCOLOS E MANUAIS ADEQUADOS A CADA DIAGNÓSTICO)**
- ✓ **CLAREZA DO LAUDO**

1. SETORES DO LABORATÓRIO

1.1 - ÁREA FÍSICA

Um laudo de patologia é resultado da interação dos diversos setores do laboratório atuando em conjunto. Essa atuação deve ser:

- 1- Sinérgica;
- 2- Complementar;
- 3- Segura;
- 4- Padronizada;
- 5- Checada.

Cada conjunto de ações é executado por um setor. Para que esses setores sejam capazes de executar de maneira adequada, deve-se primeiro dispor de área física apropriada, de modo a possibilitar que as tarefas sejam empenhadas a contento, e uma orientação administrativa consciente e comprometida com a ação exercida.

Existe divergência sobre a área física mínima para um laboratório. Entretanto, em nossa opinião, para um laboratório que processa até 50.000 procedimentos diagnósticos anuais, sua área é estimada em torno de 100m². Essa área total deve ser redistribuída em razão do tipo de atividade a ser desenvolvida em cada setor, como:

Recepção de material	6m ²
Área técnica (inclui macroscopia)	30m ²
Área médica	20m ²
Administração	9m ²
Secretaria/expedição	9m ²
Arquivo	9m ²
Almoxarifado	9m ²
Sanitário (para ambos os sexos)	8m ²
Total	100m ²

É importante ressaltar que essa estimativa de área não é regra, deve ser adaptada a cada realidade de acordo com o volume de trabalho, composição de pessoal e projeto arquitetônico.

Como regra geral, deve-se ter as seguintes preocupações ambientais:

- Iluminação suficiente;
- Higienização;
- Ventilação/renovação do ar;
- Segurança.

Ao se planejar a instalação do laboratório, é de fundamental importância considerar os seguintes aspectos:

- Área disponível;
- Distribuição das áreas em função dos demais setores;
- Capacidade operacional;
- Recursos humanos, por nível profissional e administrativo;
- Recursos materiais;
- Manutenção e conservação.

Além desses aspectos, devem ser consideradas as seguintes características específicas:

- Local de acordo com o fluxograma do laboratório;
- A área física deve manter correlação com o número de profissionais que trabalharão no setor;
- Quanto às condições ambientais:
 - O laboratório deve ser agradável, confortável e, de preferência, distante de locais barulhentos;
 - Deve haver uma boa ventilação e iluminação difusa de moderada intensidade;
 - Com relação aos móveis (mesa, bancada, cadeira, bancos, sólidos e nivelados), o revestimento da mesa ou da bancada deve ser lavável, de cor cinza

ou verde (a fim de reduzir a fadiga visual). Deve haver espaço suficiente para permitir ao usuário dispor com facilidade do material de apoio necessário.

Toda equipe deve ter conhecimento básico de como proceder frente às situações de emergência surgidas no laboratório, bem como estar familiarizada com o manejo e a localização de equipamentos, como extintores de incêndio, sistemas de alarme e alerta para a concentração de substâncias químicas permitida no ar atmosférico e os sintomas que indiquem intoxicações e ou envenenamentos.

O laboratório é composto dos seguintes setores:

a) Recepção das amostras

Nesse setor, as amostras devem ser identificadas e acompanhadas das correspondentes requisições corretamente preenchidas (identificação completa do paciente, procedência do material, dados clínicos e tipo de exame solicitado).

b) Macroscopia

Nesse setor, as biópsias e peças cirúrgicas são novamente identificadas, descritas e clivadas, sendo posteriormente encaminhadas ao setor de processamento técnico, após adequada fixação em solução de formalina tamponada.

c) Processamento técnico

Nesse setor, o auxiliar ou técnico de laboratório verificará, antes de efetuar o processamento necessário das amostras, a correspondência de cada amostra com a respectiva requisição. Em seguida, realizará o processamento técnico propriamente dito para então encaminhar as lâminas e requisições para o diagnóstico microscópico.

d) Microscopia

Nesse setor, procede-se a visualização das lâminas e sua análise dentro do contexto médico para então emissão do laudo.

e) Arquivos

Para esse setor, recomenda-se que as lâminas de citologia que apresentem resultado positivo, bem como as de histopatologia, independente do diagnóstico, sejam arquivadas por no mínimo 5 (cinco) anos; para as lâminas de citologia negativa, basta que se archive apenas a última; os blocos de parafina, por no mínimo 10 (dez) anos. As requisições e os resultados dos exames histopatológicos devem ser arquivados segundo as técnicas preconizadas para arquivos de laudos.

f) Secretaria

Nesse setor, executa-se a digitação dos resultados dos exames (caso não tenham sido digitados diretamente pelo patologista) e a expedição dos diagnósticos, assim como a digitação referente ao laboratório.

Recursos humanos:

a) Composição do pessoal

- Por nível profissional:
 - Auxiliar técnico;
 - Técnico de histologia;
 - Citotécnico (técnico de citologia)*;
 - Citopatologista;Patologista.*

*Recomenda-se que para cada três citotécnicos haja um citopatologista, entretanto, essa relação de 1:3 entre o citopatologista e o citotécnico poderá sofrer modificações na medida em que o pessoal técnico desenvolver maior

capacitação. Assim, naqueles laboratórios que possuem em seus quadros profissionais com maior experiência, é de esperar que tanto a produtividade quanto a qualidade se aprimorem.

- Por nível administrativo:
- Responsável pelo laboratório (gerente);
- Auxiliar administrativo. Cabe ao auxiliar técnico, ao técnico e ao citotécnico:
- Verificar a correspondência de cada amostra com a respectiva requisição;
- Verificar a qualidade do material a ser processado;
- Processar as amostras citológicas e histológicas;
- Encaminhar as lâminas para diagnóstico microscópico;
- Preparar as soluções e reagentes;
- Executar outras tarefas correlatas.

Cabe exclusivamente ao citotécnico:

- Realizar a leitura de todas as preparações citopatológicas e encaminhar os casos positivos, os casos que tenham alteração ao exame físico ou colposcopia, ou que traga dúvida ao citopatologista, com os campos devidamente assinalados;
- Solicitar, sempre que se fizer necessária, a orientação do citopatologista;
- Participar ativamente da rotina do laboratório nos setores de recepção, processamento técnico, arquivo e documentação.

O citotécnico deverá, ainda, estar capacitado para a leitura de acordo com sua jornada de trabalho:

Jornada diária	Volume de trabalho
8 horas	100 lâminas
6 horas	80 lâminas
4 horas	60 lâminas

O citopatologista é responsável pelo diagnóstico de todos os casos, contudo, a leitura inicial das amostras é realizada pelo citotécnico.

Cabe ao citopatologista (como responsável pelos diagnósticos citopatológicos):

- Verificar, no mínimo, 10% dos casos negativos e se os diagnósticos estão corretos;
- Diagnosticar os casos de citologia positiva previamente triados pelos citotécnicos;
- Esclarecer as dúvidas dos citotécnicos;
- Separar os casos de interesse científico para estudo com a equipe do laboratório;
- Supervisionar o trabalho dos técnicos e auxiliares.

Cabe ao patologista (como responsável pelos diagnósticos histopatológicos):

- Executar e supervisionar a descrição macroscópica e clivagem das biópsias e peças cirúrgicas e elaborar os laudos microscópicos;
- Fazer a correlação cito-histopatológica das lesões cervicouterinas e de outras localizações;
- Separar os casos de interesse científico para estudo conjunto com o *staff* do laboratório;
- Supervisionar o trabalho dos técnicos e auxiliares.



CAPÍTULO I

FASE PRÉ-ANALÍTICA

FIXAÇÃO

É pré-requisito a fixação dos esfregaços, biópsias ou peças cirúrgicas, visando à preservação da estrutura celular e conservação dos detalhes, com um mínimo de distorção e artefatos.

As soluções empregadas com essa finalidade recebem o nome de “fixadores”, e sua escolha depende do material a ser examinado, do que se pretende estudar e da técnica de coloração a ser utilizada.

a) Para os exames citológicos:

- Álcool absoluto ou álcool a 95%;
- Solução fixadora líquida à base de polietilenoglicol e álcool a 95%, sob a forma líquida, para uso em “gotas” ou *spray*.

Recomenda-se que:

- A fixação seja realizada de forma rápida e apropriada, a fim de evitar dessecação com distorção celular e perda da afinidade tintorial. O tempo de fixação varia, em média, de 10 a 60 minutos. Entretanto, a amostra poderá permanecer na solução fixadora durante alguns dias sem que haja prejuízo;
- Os fixadores devem ser filtrados e renovados periodicamente;
- Use, de preferência, etanol;
- Os esfregaços fiquem totalmente imersos no recipiente que contém as soluções fixadoras.

Quando os esfregaços apresentarem defeito de fixação, por exemplo, dessecados, a correção deve ser feita seguindo-se orientações abaixo:

- Colocar a lâmina em um recipiente contendo glicerina e água destilada durante 3 minutos; a seguir, banhar em álcool a 95% e em água por 15 minutos e, finalmente,

fixar em álcool a 95% por 10 minutos. Encaminhar para coloração.

b) Para os exames histológicos:

A solução fixadora de rotina para a histopatologia, biópsia e peça cirúrgica é a formalina tamponada (formol tamponado a 10%). A amostra deve ser, imediatamente após sua retirada, submersa em recipiente contendo o agente fixador. O tempo médio ideal de fixação é de 6 a 48 horas, variando de acordo com o índice de fixação. Em geral recomenda-se que as amostras com 1mm de espessura permaneçam 8 horas no fixador.

A fixação tem como objetivo:

1. *Preservação da morfologia do tecido;*
2. *Preservação dos antígenos do tecido.*

Para que isso ocorra, o melhor fixador é a formalina (formaldeído 37% diluído em proporção 9:1).

O formaldeído com o tempo vai oxidando e se torna ácido fórmico, que vai corroendo os antígenos do tecido, por isso a necessidade de o formol ser tamponado, que preserva o PH entre 7-7,3 e não agride o tecido.

O tempo de fixação também influi no resultado. Para que os antígenos se preservem, a fixação deve ser, no mínimo, de 6 horas e, no máximo, de 72 horas; menos do que isso não fixará de maneira apropriada, e mais do que isso alterará os resultados de coloração histoquímica, imuno-histoquímica e de eventuais pesquisas genéticas ou moleculares.

Tempo de fixação	Status	O que fazer
Menos que 6 horas	Não fixado	Aguardar fixar
De 6 a 12 horas	Fixado, mas não ótimo	Se possível, aguardar; se for urgente, processar
12 a 24 horas	Fixação ótima	Processar assim que possível
24 a 36 horas	Fixação ótima	Processar assim que possível
36 a 48 horas	Fixação ótima	<u>Processar imediatamente</u>
48 a 60 horas	Fixado, mas não ótimo	<u>Processar imediatamente</u>
60 a 72 horas	Fixado, mas não ótimo	<u>Processar imediatamente</u>
Mais de 72 horas	Super fixado	<u>Processar imediatamente</u>

É fácil então perceber o impacto de a coleta ser correta e da fixação apropriada. A etapa pré-analítica (como todas as etapas) pode definir e influenciar o resultado com impacto e alterar o diagnóstico, o prognóstico e o tratamento do paciente. Por conta disso, recomenda-se que o laboratório entre em contato com as unidades clínico-cirúrgicas com as quais habitualmente tenham relação e oriente a maneira correta de acondicionar, em vistas de evitar artefatos pré-analíticos que podem por vezes não ser possíveis de corrigir ou minimizar.

a) Recepção

As amostras, fragmentos e peças cirúrgicas são recebidas, fixadas em formalina tamponada e acompanhadas da “Requisição de exame”, esta devidamente preenchida nos campos:

- Nome do(a) paciente*;
- Idade/Data de nascimento*;
- Gênero (M/F)*;

- Nome da mãe, quando possível;
- Documento de identificação/Número de prontuário;
- Material a examinar*;
- Tipo de exame solicitado (AP, CP, IHQ, IF, PM) *;
- Hipótese diagnóstica clínica, quando relevante*;
- Dados de exames complementares;
- Data e hora da coleta; Nome do médico solicitante e CRM*;
- Número de frascos.

Registros das amostras:

As amostras devem ser registradas. Sugere-se que esse registro indique qual procedimento diagnóstico será efetuado. (Colocar antes do número do registro as letras B ou PC [biópsia ou peça cirúrgica]. B- 142/85; PC- 148/85, por exemplo). O registro só deve ser feito após a checagem das condições do material a ser examinado.

b) Macroscopia

Descrição/seleção das amostras:

Deve ser realizada em ambiente apropriado, com material de apoio específico: luvas, pinça, tesoura, bisturi, régua, vidros com soluções fixadoras, lápis etc. Essa é uma tarefa médica, mas eventualmente pode ser desempenhada por técnico devidamente treinado, entretanto, a responsabilidade fica a cargo do médico patologista.

O material é descrito em relação ao seu tamanho, peso, espessura, dimensão, consistência, coloração e características macroscópicas relevantes. O manuseio do material deve ser firme, mas efetuado com delicadeza.

Acondicionamento dos fragmentos:

Cumprida a etapa anterior, o material é acondicionado em cassetes apropriados com orifícios que permitam a entrada das soluções e vedado com uma tampa. O material então é encaminhado para o processamento histológico.

c) Processamento histológico

O processamento histológico desidrata e diafaniza a amostra. Seu tempo pode variar de acordo com o tamanho do material, tipo do material, equipamento e insumos utilizados. É fundamental que haja padronização no laboratório para garantir que as diferentes amostras cheguem todas com o mesmo perfil para o corte e coloração.

INCLUSÃO E CORTE

INCLUSÃO

Após o processamento histológico, o técnico recolhe as amostras e então as inclui em parafina para que se possa realizar os cortes histológicos. A inclusão deve ser feita de acordo com os protocolos de cada amostra e intuito diagnóstico, de maneira que permita ao patologista avaliar microscopicamente as características necessárias para o laudo.

Importante observar alguns pontos:

- Temperatura da parafina
 - Recomenda-se que esta seja constantemente monitorada e não ultrapasse 68°.
- Pureza e qualidade da parafina
 - Parafinas impuras podem ser muito maleáveis ou muito duras, o que dificulta seu manuseio sem empregar agentes espessantes; caso seja necessário o uso destes, evitar os que contenham DNA exógeno (cera de abelha).

- Identificação da amostra
 - A inclusão deve ser feita com extremo cuidado e atenção de maneira que não ocorra troca de identificação, e que seja possível manter a rastreabilidade da amostra.
- Quantidade de fragmentos por bloco
 - Deve-se ter atenção à quantidade de fragmentos por bloco para que se consiga recortar de maneira que seja possível analisar toda a amostra, sem que haja perda de alguma área.
 - Em biópsias por agulha (pulmão, próstatas e mama por ex.), recomenda-se não mais que 3 fragmentos por bloco.

CORTES HISTOLÓGICOS:

Os blocos são submetidos ao corte, necessitando de micrótomo e jogo de navalhas. O bloco é colocado no suporte e, para o corte, deve obedecer a um adequado ângulo de inclinação. O conjunto bloco/micrótomo é submetido ao corte, inicialmente para desbastar e nivelar sua superfície, de modo que fique alinhado e se permita cortar uma sequencias de blocos todos com o mesmo ângulo, de maneira que se poupe a amostra.

Após o nivelamento dos blocos, com outra navalha são realizados os cortes histológicos. A espessura média de cada corte é de cerca de 3 micrômetros. Os cortes, uma vez espalhados, são “pescados” em lâminas previamente limpas e identificadas. Após essa etapa, procede-se à secagem dos cortes e, em seguida, desparafinização.

A espessura do corte pode variar de acordo com a coloração a ser realizada, a espessura de 3um acima se refere à coloração de rotina (HE), mas para Vermelho Congo, por exemplo, é necessário ser mais espesso, em torno de 10um.

COLORAÇÃO DE ROTINA

Um laboratório de patologia utiliza múltiplos métodos de coloração, cada qual destinado a uma função. A chamada coloração de rotina é a mais frequentemente utilizada, sendo para procedimentos histológicos, a coloração baseada em Hematoxilina e Eosina e, para citologia, a coloração de Papanicolaou.

Citopatologia

As amostras são processadas segundo a técnica de Papanicolaou:

- Álcool etílico a 80%;
- Álcool etílico a 70% - 6 a 8 imersões em cada recipiente;
- Álcool etílico a 50%;
- Água destilada - 20 a 30 segundos (até a água escorrer naturalmente da lâmina);
- Hematoxilina de Harris - 1 a 3 minutos (corante nuclear);
- Água - remover o excesso de corante;
- Solução saturada de carbonato de lítio;
- Solução de HCl a 1% - 6 a 8 imersões em cada recipiente;
- Água corrente - 6 minutos;
- Álcool etílico a 50%;
- Álcool etílico a 70% - 6 a 8 imersões em cada recipiente;
- Álcool etílico a 80%;
- Álcool etílico a 95%;
- Orange G 6 - 1 minuto e 30 segundos;
- Álcool etílico a 95% - 1 minuto;
- Álcool etílico a 95% - 1 minuto;
- EA – 26;
- Álcool etílico a 95% - 1 minuto;
- Álcool etílico a 95% - 1 minuto;
- Álcool etílico a 100% - 1 minuto;
- Xilol - 1 minuto;

- Xilol - 1 minuto;
- Xilol - 1 minuto;
- Montagem das lâminas.

Outra opção é a técnica de Shorr “modificada”:

- Álcool etílico a 80%;
- Álcool etílico a 70% - 6 a 8 imersões em cada recipiente;
- Álcool etílico a 50%;
- Água destilada - 20 a 30 segundos (até a água escorrer naturalmente da lâmina);
- Hematoxilina de Harris - 6 a 10 minutos (corante nuclear);
- Água - remover o excesso do corante;
- Corante “Shorr” - 1 minuto;
- Álcool etílico a 95% - 1 minuto;
- Álcool etílico a 95% - 1 minuto;
- Xilol - 1 minuto;
- Xilol - 1 minuto;
- Montagem das preparações.

Histologia

A técnica de coloração rotineira é a de HE (Hematoxilina - Eosina). A lâmina contendo o corte já desparafinado e identificada deve ser submetida ao seguinte processo:

- Água destilada - 6 a 8 minutos; Hematoxilina - 10 minutos;
- Água - remoção do excesso de corante;
- Solução de HCl a 1% - 6 a 8 imersões;
- Água corrente (controle da coloração núcleo/microscópio);
- Eosina - 1 a 2 minutos;
- Álcool etílico a 95% - 6 a 8 imersões;
- Xilol;
- Xilol – Montagem.

Após o processo de coloração, em qualquer uma das técnicas, as lâminas são enxugadas, imersas no xilol, clarificadas e diafanizadas. Procede-se à montagem utilizando bálsamo do Canadá ou similar e xilol.

Etiquetar com o número do registro do laboratório após a conferência da preparação com a requisição do caso.

COLORAÇÕES HISTOQUÍMICAS (ESPECIAIS)

Existe um sem-número de possíveis colorações especiais; é impossível listarmos todas, cada coloração tem uma finalidade específica: pesquisa de agentes infectocontagiosos (fungos, B.A.A.R., bactérias etc.), pesquisa de metais e íons (Perls, Rodanina para ferro e cobre, por exemplo), pesquisa de glicogênio (PAS, por exemplo).

No fim do manual temos um compilado de como preparar a maior parte das colorações (de rotina e especiais) em um laboratório, sendo que se recomenda dar preferência ao uso de kits prontos, pela facilidade de sua padronização. Caso a coloração seja feita *in house*, será necessária sua validação antes do uso, bem como conferência de tempos de imersão antes da rotina.

TÉCNICAS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica de imuno-histoquímica quando surgiu, sendo em seguida difundida, revolucionou a patologia. Mas ela nada mais revela do que a expressão proteica do tecido, o que permitiu aprofundar o conhecimento das neoplasias, refinar suas subclassificações e, com isso, cada vez mais personalizar os tratamentos com resultados cada vez melhores. Existem várias técnicas de imuno-histoquímica, com pequenas variações de uma para outra, todavia, suas etapas básicas envolvem:

1. Fixação adequada;
 - a. A amostra deve ser fixada em formol tamponado 10%, por um tempo não inferior a 6 horas e que idealmente que não ultrapasse 72 horas;

- b. A amostra não deve ter isquemia fria superior a uma hora;
 - c. A amostra deve ser processada assim que possível.
2. Processamento histopatológico adequado;
 - a. A amostra, estando bem fixada, passará pela desidratação e diafanização; caso esta não seja adequada, a preservação do tecido posteriormente **não é adequada e pode prejudicar a amostra armazenada no bloco de parafina.**
3. Seleção de anticorpos;
 - a. A imuno-histoquímica é uma ferramenta de precisão e não uma metralhadora giratória, há que se ter o objetivo do procedimento claro e seguir as etapas e protocolos, e muitas vezes são várias reações, uma a seguir da outra, de acordo com o direcionamento do fluxograma.
4. Desparafinização e recuperação antigênica;
 - a. Há que se permitir o íntimo contato do anticorpo para com o antígeno que se está pesquisando, e para isso o antígeno deve estar preservado (fixação) e exposto. O processo de fixação “esconde” os epítomos antigênicos, e a recuperação antigênica tem como intuito sua exposição, permitindo que ocorra a reação antígeno-anticorpo.
5. Incubação do anticorpo;
 - a. Com o antígeno preservado e exposto, o anticorpo é incubado para que ocorra a reação com o antígeno;
 - b. Seu excesso é retirado e então se adiciona o polímero para amplificar a revelação do cromógeno; os excessos também são retirados.
6. A amostra é então contracorada por Hematoxilina e a lâmina é montada de maneira habitual para sua leitura.

É importante ressaltar a padronização das reações. Apesar de hoje a maioria dos anticorpos serem *ready to use*, isso não significa que a padronização é igual. Múltiplos fatores influenciam e impactam nisso, para citar alguns:

- Temperatura;
- Umidade;
- Pressão atmosférica;
- Tempo de incubação;
- Qualidade da água;
- Inclinação da bancada;
- Armazenamento dos insumos;
- Fixação da amostra;
- Processamento da amostra;
- Qualidade da parafina da amostra;
- Armazenamento dos blocos;
- ...

Como dito, a imuno-histoquímica é uma continuação do procedimento habitual, portanto, a qualidade deste impacta diretamente em seu resultado.

TÉCNICAS PARA PATOLOGIA MOLECULAR

Objetivo:

- Boas práticas para laboratórios incorporarem ao seu fluxo de trabalho de anatomia patológica na rotina usual em todos os casos, considerando que o material será utilizado para teste molecular;
- Conceitos para seleção de material pelo patologista para teste molecular;
- Não tem como objetivo descrever as técnicas moleculares.

Conceitos:

- A maior parte dos testes moleculares em oncologia são realizados em tecido fixado em formalina e embebido em parafina, portanto, são necessários cuidados especiais em todas as fases que envolvem o processamento de um espécime anatomopatológico para garantir a qualidade e viabilidade de realizar um teste molecular;
- Como teste molecular considera-se aqueles que utilizam as moléculas de DNA e/ou RNA por meio de técnicas de sequenciamento, PCR e suas variantes, metilação, expressão gênica, hibridizações *in situ* de DNA e/ou de RNA. Inclui também biomarcadores pesquisados em estudo imunoistoquímico e, portanto, proteínas;
- Considerar que todo espécime pode ser potencialmente indicado a ser utilizado em teste molecular, em momento atual ou futuro, no cenário de rotina diagnóstica para fins de tratamento ou de pesquisa, com consentimento do paciente, e é de responsabilidade do laboratório que processou o espécime garantir a integridade das moléculas de DNA/RNA e proteína;
- O fluxo somente será incorporado por todos os setores do laboratório se os funcionários forem engajados nos conceitos mínimos básicos de patologia molecular, importância e suas aplicações;
- Alguns conceitos foram abordados previamente dentro de cada tópico específico deste manual (ex.: fixação, corte etc.), mas será reforçado e complementado aqui para o contexto específico de teste molecular;
- Os cuidados relacionados ao teste molecular incluem tanto o fluxo do laboratório, visando a preservação/integridade das moléculas, como também o conceito de contaminação entre espécimes, que no cenário molecular pode ser muito mais microscópico do que no cenário de rotina de avaliação de H&E.

Cuidados pré-analíticos com o espécime visando utilização para teste molecular

Tempo de isquemia (tempo entre retirada do espécime do paciente e sua inserção em fixador):

- Após retirada, o material deve ser colocado imediatamente em formalina tamponada, sendo o tempo ideal em até 10 min e aceitável em até 1 hora.

Fixação:

- Uso de formalina tamponada a 10% com pH entre 6,9 e 7,1.
 - Obedecer às recomendações gerais acerca do volume do fixador para volume de tecido de no mínimo 5:1 e preferível 10:1;
 - Submergir o tecido inteiramente no fixador;
 - Estabelecer fluxo nos centros cirúrgicos e/ou laboratórios de clivagem dos espécimes grandes para fixação se a macroscopia não for ser realizada imediatamente;
 - Tempo de fixação: mínimo 6 horas, máximo 24-48 horas a depender do tipo de tecido.

Macroscopia:

- Atentar para possibilidades de contaminação cruzada em espécimes na macroscopia, incluindo biópsias pequenas e peças grandes. Cuidados em usar pinças e navalhas limpas entre os casos e reforço de limpeza da bancada de trabalho;
- Espessura dos cortes de peças cirúrgicas para permitir fixação adequada e processamento histológico adequado. Em geral, máximo de 4-5mm de espessura;
- Protocolo de separação de fragmentos de biópsias na macroscopia em mais de um bloco para otimizar a utilização da amostra entre as diversas necessidades de estudos complementares.

Descalcificação:

- Para teste molecular, o ideal é evitar a descalcificação sempre que possível, uma vez que as soluções descalcificantes sabidamente agredem os tecidos, causando maior degradação das moléculas. Na tentativa de se evitar lesão tecidual, procurar fazer antes da descalcificação:
 - Raspagem/esfregaço/“*imprinting*” de biópsias ósseas no momento do procedimento para obtenção de amostra celular citológica sem descalcificação para uso em teste molecular. Estes podem ser fixados em álcool;
 - Separação na macroscopia da parte amolecida da parte endurecida do material para inclusão em blocos distintos com e sem descalcificação.
- Antes de ser submetido a qualquer processo de descalcificação, o material deve ser previamente fixado;
- Na necessidade de descalcificação, a utilização de EDTA é mais indicada que outros tipos de ácidos. Atentar para:
 - Evitar exposição prolongada desnecessária. Individualizar tempo de exposição à solução de descalcificação com checagens frequentes e não apenas obedecendo o tempo padrão;
 - Lavagem adequada do fragmento após descalcificação antes do processamento.

Processamento histológico:

- Se processamento manual, possuir mecanismos de controle para garantir os intervalos de tempos de cada etapa;
- Se automático de “sistema aberto”, possuir mecanismos de segurança para casos de falha do aparelho, como, por exemplo, apenas usar o aparelho em momentos em que existam pessoas no laboratório;
- Se automático de “sistema fechado”, garantir adequação de manutenções preventivas e troca de reagentes segundo indicações do fabricante;
- Controlar qualidade, pureza e frequência de troca dos reagentes.

Inclusão:

- Uso de parafina de alta qualidade (baixa temperatura de derretimento, recomendado menor que 60°C) para evitar submeter o tecido a altas temperaturas e consequente degradação de moléculas;
- Não misturar ou adicionar outros tipos de substância à parafina;
- Não reutilizar parafina (risco de contaminação de amostras);
- Atentar para eliminar possibilidade de contaminação no processo de inclusão, como cuidados com a pinça e com a bancada do inclusor, entre outros.

Microtomia:

Aqui vamos considerar especificidades da rotina de microtomia para cortes que serão usados com finalidade molecular.

- Contaminação:
 - Necessidade de cuidado intenso para eliminar possibilidade de contaminação entre casos. Ideal que haja treinamento de um técnico para essa rotina específica, separar um momento da rotina e um micrótomo específico para uso dos cortes com finalidade molecular;
 - Recomenda-se para casos nos quais será feita extração de moléculas (DNA e/ou RNA), se possível:
 - Evitar uso de água corrente e substituir por água destilada e/ou outros tipos de água purificada;
 - Uso de cuba separada de banho-maria em relação ao da rotina geral, com troca de água entre casos;
 - Uso de navalha individual para cada caso;
 - Uso de luvas por parte do técnico para manipular o material;
 - Uso de soluções contendo DNases e RNases para limpar o micrótomo e superfícies entre os casos.

- Tipos de lâminas e/ou tubos:
 - Testes de hibridização *in situ*: lâminas com carga;
 - Uso para extração de DNA e/ou RNA: lâminas sem carga. Tubo eppendorf estéril.

- Espessura do corte:
 - A espessura do corte dependerá do tipo de teste que será realizado e da sinalização prévia do patologista acerca do tipo de corte a ser feito:
 - Testes de hibridização *in situ* (FISH/CISH/SISH):
 - FISH: cortes de 3-7 micra dependendo do tecido.
 - Para posterior extração de DNA e/ou RNA:
 - Se após sinalização do patologista que será necessário enriquecimento da área do bloco com dissecação manual (“scrapping”), fazer cortes em lâminas sem carga com espessura de 5 a 10um, a depender de experiência e validação do laboratório. Ideal inserir apenas um corte de tecido por lâmina;
 - Se após sinalização do patologista de que não será necessário enriquecimento da área do bloco, e sim será usada a área total do tecido, fazer cortes de 5 a 10um (“rolinho”) e colocar diretamente em tubo estéril de eppendorf:
 - Necessário atentar para volume excessivo de parafina no tubo.

- Armazenamento de lâminas e/ou tubos após corte:
 - Lâminas para testes de hibridização *in situ*: até a realização da reação, o cuidado de armazenamento da lâmina deverá seguir o mesmo das lâminas para estudo imunoistoquímico. Poderá ser guardada em temperatura ambiente e com banho de parafina;
 - Lâminas para uso de extração de DNA e/ou RNA: deixar secar. Após seca, pode ser acondicionada em temperatura ambiente por alguns dias;

- Em ambas as situações, o ideal é tentar cortar as lâminas apenas já com previsão de uso.

Arquivo/Armazenamento de blocos:

- Os blocos de parafina devem garantir ser acondicionados em locais:
 - Sem umidade;
 - Sem exposição direta à luz solar;
 - Livre de possibilidade de contaminação por agentes biológicos externos, como fungos e bactérias;
 - Temperatura ambiente (18°C - 25°C).

Seleção de caso para teste molecular pelo patologista

- Escolha do espécime a ser testado:
 - Deve ser em conjunto com entendimento do teste solicitado e com o médico solicitante e considerar os seguintes itens:
 - Biópsia ou peça cirúrgica;
 - Pré ou pós-determinado tratamento (quimioterapia, tratamento com droga alvo, radioterapia);
 - Primário ou metástase;
 - Tumores sincrônicos;
 - Idade dos espécimes e condição de armazenamento do material.
- Escolha do bloco a ser testado dentro de um espécime:
 - Deve ser em conjunto com o entendimento do teste. Para os casos em que se deseja amostra tumoral para extração de DNA e/ou RNA, considerar:
 - Amostra com combinação de maior volume tumoral e pureza tumoral (celularidade tumoral). Para este item, considerar a porcentagem de núcleos tumorais em relação aos núcleos não tumorais (linfócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais, vasos, estroma etc.). Erro frequente é con-

- considerar a área ocupada pelo tumor em detrimento ao conteúdo daquela área;
- Evitar áreas de necrose, pigmentação intensa, excesso de mucina e áreas com artefato de fixação.
- Escolha da forma de corte a ser realizada para extração de DNA e/ou RNA:
 - Há possibilidade de usar o corte total do bloco (tubo) para fins de extração ou cortes em lâminas histológicas (*scrapping*) para fins de dissecação manual quando é necessário enriquecimento da celularidade tumoral na amostra:
 - Corte total pode ser feito quando a celularidade tumoral obedece à necessidade mínima estabelecida para o teste molecular a ser realizado. Cada teste molecular possui uma necessidade específica de porcentagem de celularidade tumoral. Técnicas mais modernas, como sequenciamento de nova geração (NGS), em geral são validadas para testar casos com mínimo de celularidade tumoral de até 20%;
 - Lâminas para dissecação manual são realizadas quando considerado que o uso do corte total do bloco não obedece à quantidade mínima de pureza tumoral necessária para o teste, ou acarretaria na inclusão de muitas áreas de necrose, mucina, pigmento, entre outros. Para isso, o patologista seleciona na lâmina de H&E a área que deve ser dissecada pelo técnico no laboratório de patologia molecular.



CAPÍTULO II

FASE ANALÍTICA

FASE ANALÍTICA

A fase analítica tem como objetivo tornar concreto o produto da análise pelo patologista. A medicina é uma arte que se baseia na estatística e em modelos matemáticos, a porção subjetiva dela é a interpretação dos sinais e sintomas que o paciente apresenta e relata, e transformar isso em dados brutos e em diagnóstico.

A patologia mais, do que as outras especialidades, apoia-se nisso e sofre com isso. Muitas das nossas avaliações têm um grande viés de subjetividade e, portanto, podem sofrer grandes variações. Por conta disso, há recomendação de alguns cuidados universais:

- Cada amostra deve ter uma identificação única, que permita sua identificação e localização ao longo de todo o processo;
- Há que se correlacionar sempre toda amostra com os diagnósticos prévios;
- Sempre que possível (principalmente em diagnósticos que envolvam neoplasias malignas), haja conferência no diagnóstico;
- Que antes de iniciar a rotina de coloração esta seja checada e, se necessário, ajustada;
- Toda leitura de lâmina deve ser efetuada dentro dos limites da instituição:
 - Limite físico, da estrutura convencional do laboratório;
 - Limite virtual; com o advindo da telepatologia, os limites foram ampliados para além do físico, mas atenção, não é permitido que a leitura seja feita em qualquer computador em qualquer lugar. A telepatologia nada mais é do que uma nova ferramenta para se fazer a mesma especialidade, portanto, cabe os mesmos cuidados que se têm de rotina (adicionados de outros ligados especificamente ao ambiente digital/virtual), o ambiente deve ter alvará sanitário, ser um ambiente tranquilo e que possibilite consulta a referências bibliográficas.

- Os procedimentos do laboratório devem ser organizados e formalizados (a nomenclatura padrão para esses documentos são POP – Procedimentos Operacionais Padrão);
- Há que se ter vigília e cuidado sobre a carga de trabalho dos colaboradores, para que estes não fiquem sobrecarregados e possam se dedicar de maneira primorosa;
- Há que se utilizar a padronização de laudos da OMS, podendo ser complementada com protocolos específicos (SBP, CAP, RCP etc.).
- Diagnósticos críticos. É uma das poucas situações de urgência na patologia. Uma situação de risco de morte ao paciente ou uma situação em que seja preciso uma ação deve ser tomada assim que possível. Abaixo estão algumas situações possíveis e considerações sobre seu peso, impacto e sugestões de ação a se tomar.

Diagnóstico crítico

Diagnóstico crítico é definido como toda situação que:

- Possa indicar risco de morte ao paciente;
- Achados não esperados em condições triviais;
- Achados discrepantes em relação a exames anteriores ou diagnósticos prévios, com possível alteração em conduta clínica.

<i>Condição</i>	<i>Descrição</i>
Casos com consequências clínicas imediatas	Material de vísceras em punções de cavidades ocas
	Gordura em espécimes de curetagem
	Células mesoteliais em biópsia cardíaca
	Gordura em mucossectomias
	Sinais de rejeição aguda em transplantes
	Glomerulopatia crescêntica
	Vasculites leucocitoclásticas
	Curetagem de abortamento sem vilosidades ou células trofoblásticas
	Neoplasias malignas em síndromes de veia cava superior
	Infiltrações neoplásicas causando paralisias
Inflamatórias ou infecciosas	Neoplasias hematopoéticas de alto grau de malignidade
	Microrganismos em líquido cefalorraquidiano
	Microrganismos em lavados bronco-alveolares
	Fungos em punção de agulha fina
	Colônias bacterianas em valvas cardíacas
	Herpesvírus em citologia cervicovaginal
	Material abscedido não esperado
Achados inesperados ou discrepantes	Doença granulomatosa crônica não suspeitada
	Corpos estranhos em peças cirúrgicas
	Discordância maior entre o exame de congelação e exame definitivo
	Discordância maior entre achados citológicos de punção aspirativa e material tecidual
	Discordância maior entre avaliação <i>in situ</i> e resultado definitivo em procedimentos intervencionistas
	Neoplasias em locais incomuns (sacos herniários, disco intervertebral, produtos de hemorroidectomia, amidalectomias ou apendicectomias etc.)
	Ausência de material anatômico referido no pedido de exame
	Frascos sem o respectivo material detectável
Não confirmação do diagnóstico em paciente com cirurgia agendada e que implique em conduta cirúrgica diferente	

Neoplasias

Achado ou confirmação de neoplasias em procedimentos diagnósticos

Discordância entre a impressão clínica de neoplasia e a ausência desta no material histopatológico

Presença de neoplasia maligna em casos de diagnóstico clínico de neoplasia benigna

Procedimentos para confirmação de metástases

Discordância entre diagnóstico original e da revisão do caso, interna ou externa.



CAPÍTULO III

FASE PÓS-ANALÍTICA

FASE PÓS-ANALÍTICA

Fase pós analítica são os cuidados que se tem após a liberação do laudo, como, por exemplo:

- Laudo liberado dentro do prazo acordado;
- Caso veja que haverá atraso, avisar em tempo hábil o paciente;
- Entrega de resultado deve ser feita mediante protocolo de entrega;
- Conteúdo do laudo adequado, trazendo pelo menos:
 - Nome do paciente, idade, gênero e seu registro de identificação na instituição (número operacional) e outro parâmetro identificador sempre que possível;
 - Nome do médico/profissional requisitante do exame;
 - Legível, em língua portuguesa, datado e assinado por patologista ou citopatologista responsável;
 - Conter a identificação da instituição, com endereço completo e telefone em área visível;
 - Nome e registro no CRM do Responsável Técnico pela instituição;
 - Conter a data de coleta (quando registrada na requisição médica) e da entrada do espécime na instituição;
 - Conter a data de emissão do laudo;
 - Especificação do tipo de exame realizado, sítio anatômico de onde foi obtido o espécime;
 - Metodologia utilizada para realização do exame, quando aplicável;
 - Descrição da macroscopia, com designações específicas de blocos de acordo com a clivagem nas peças em que haja mais de uma região/sítio anatômico (obrigatória), descrição da microscopia (opcional);
 - Conclusão diagnóstica;
 - Observações pertinentes à interpretação do laudo, quando aplicável.
- Caso seja necessária retificação, e esta seja em área crítica, não pode ser alterado. O dado anterior deve ser

preservado e deve ser feita uma complementação que permita sua rastreabilidade e identificação;

- Rastreabilidade e controle de acesso e segurança de usuários de TI.

APOIO

A patologia é um ramo da medicina singular e único. Além de toda sua complexidade técnica e de conhecimento (que todas as áreas têm), por necessidade das etapas e de processo, é obrigatoriamente uma atividade multidisciplinar e multiprofissional. É, portanto, obrigatoriamente uma empresa.

E, como toda empresa, há que se ter o que se chama área de apoio. Áreas de apoio são todas as áreas e setores da empresa que não são ligadas à atividade fim diretamente, como, por exemplo:

- Faturamento;
- Controle de qualidade;
- Digitação (caso haja);
- Gerência;
- RH;
- Limpeza;
- Contabilidade;
- TI;
- Descarte de materiais;
- Jurídico;
- Etc.

Apesar de todas as áreas serem necessárias ao desenvolvimento, algumas podem ser terceirizadas e executadas fora da empresa (contabilidade e jurídico, por exemplo).

Existem diversos modelos e maneiras de se gerir uma empresa; a que recomendamos para obtenção de melhor sistema organi-

zacional é a Balanced Score Card (BSC, ou algo equivalente).

O BSC é uma metodologia que demonstra a interligação dos setores da empresa e seu impacto. Sua definição é obtida pelo mapa estratégico da empresa.

O mapa estratégico é desenhado da seguinte maneira. Antes de tudo, **há que se ter** um objetivo claro de aonde se quer chegar, uma visão de futuro pela qual deseje ser reconhecida. Essa visão delinea, portanto, a missão, a sua razão de existir, que é parametrizada pelos valores (individuais dos fundadores e do coletivo dos colaboradores), a empresa funciona inserida em um contexto e há, portanto, que se analisar o ambiente em que ela se encontra inserida e, a partir disso, imaginar possíveis cenários futuros. Com os cenários futuros estabelecidos, traça-se objetivos estratégicos que direcionam a empresa à sua visão prévia estabelecida, e cada objetivo estratégico é atingido por um (ou mais) planos de ação.

- Visão;
- Missão;
- Valores;
- Análise do ambiente (S.W.O.T.);
- Cenários;
- Objetivos estratégicos;
- Plano de ação:
 - Planejado;
 - Desenvolvido;
 - Checado;
 - Agir.

Um plano de ação, para que possa ser planejado, executado e mensurado, deve seguir algumas premissas básicas, deve ter seu objetivo claro e estabelecido, um local de execução, um prazo para ser executado, um responsável por sua execução, e este responsável deve ter o ferramental adequado, um

orçamento estabelecido e um motivo (que é alinhado com os objetivos estratégicos):

O quê?	Onde?	Prazo?	Quem?	Como?	Quanto?	Por quê?
Iniciativa!	Local!	Período!	Responsável!	Ferramenta	Custo!	Objetivos estratégicos

Os objetivos estratégicos podem variar de laboratório para laboratório, mas, como regra geral, **são 4 áreas de atuação**:

1. Financeiro 4;
2. Clientes 3;
3. Processos 2;
4. Pessoal 1.

Não existe um que seja mais importante que o outro, todos são interligados e codependentes. Para que haja lucro, os médicos e pacientes devem confiar e procurar o laboratório, e para que estes confiem, os processos devem estar atualizados e bem executados, e para isso se depende de pessoal capacitado, trabalhando com ferramental adequado, em um ambiente harmônico e decente.

Com os objetivos estratégicos definidos, orientados pela visão e com planos de ação traçados, temos o mapa estratégico

Mapa estratégico		
<i>Foco</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Ação (dos planos de ação traçados)</i>
<i>Financeiro</i>		
<i>Clientes</i>		
<i>Processos internos</i>		
<i>Gestão de pessoas</i>		

E com o mapa estratégico e os planos de ação, temos o BSC da empresa:

Balanced Scorecard					
<i>Foco</i>	<i>Objetivo</i>	<i>Indicadores</i>	<i>Meta</i>	<i>Iniciativas</i>	<i>Atual</i>
<i>Financeiro</i>					
<i>Clientes</i>					
<i>Processos internos</i>					
<i>Gestão de pessoas</i>					

Vejam que no BSC surgiu um termo que já devem ter ouvido falar: indicadores. Eles são a maneira de acompanharmos como os planos de ação estão se desenvolvendo, se as ações tomadas estão satisfatórias ou se precisam de alinhamento.

A seguir temos algumas sugestões de indicadores em patologia.

Indicadores do processo:

- Tempo de liberação do exame:
 - Estabelecer meta;
 - Estabelecer parâmetro aceitável.
- Relação de número de blocos/dia:
 - Estabelecer unidade temporal.
- Relação de concordância em revisões;
- Relação de concordância em citologia:
 - Interna;
 - Comparar com esperado de Bethesda.
- Proficiência no PICQ:
 - Externa (SBP);
 - Interna – mínimo de 80%.
- Número de exames de dupla checagem:
 - Meta (40% reanalisar);
 - Parâmetro aceitável.

Indicadores da imagem:

- Número de reclamações de clientes:
 - Internos;
 - Externos.
- Pesquisa com clientes:
 - Médicos;
 - Pacientes;
 - Hospitais e clínicas;
 - Operadoras.
- Número de exames por médico.

Indicadores econômicos:

- Custo por exame;
- Valor de compra de papel;
- Números de segundas vias;
- Números de glossa.



CAPÍTULO IV

DESCARTE

Tempo de armazenamento de cada tipo de material:

- 10 anos para blocos de parafina e citologias cervicovaginais positivas;
- 3 meses para resíduos de peças cirúrgicas (a contar da liberação do laudo);
- 5 anos para lâminas (biópsias/peças cirúrgicas/imunohistoquímica e citologia);
- 5 anos para lâminas de citologia cervicovaginal negativas (podendo guardar apenas a última citologia da paciente e descartar as demais);
- Após o envio do laudo impresso para o paciente/clínica/hospital em que o paciente é atendido, não há mais obrigação de reter cópia impressa, entretanto, a cópia virtual/digital deve ser arquivada de forma permanente;
- Se não há digitalização de documentos, os pedidos devem ser guardados por vinte (20) anos;
- Havendo digitalização de documentos, com nível de segurança nível 2, os documentos podem ser descartados imediatamente após seu uso. Entretanto, recomendamos que a guarda seja de 5 anos.

Ao final da atividade, suas sobras devem ter um destino, pode-se optar por reuso e reciclagem do que for possível (como xilol, por exemplo), revenda (do xilol para empresas de tinta, por exemplo) ou descarte.

Cada resíduo tem regras próprias de armazenamento e descarte, que devem ser contempladas do PGRS do laboratório, seguindo a legislação nacional, estadual e municipal. É, portanto, impossível se listar normas aqui se funcionem e aplicam de maneira literal difusamente. É, no entanto, possível dar as orientações e cuidados básicos:

- **Lixo administrativo:**
 - Descartar conforme lixo comum e seguir as orientações, rotinas e fluxos definidos pelo PGRSS, considerando as cores preconizadas pela coleta seletiva.

- **Lixo hospitalar:**
 - Eliminar em sacos plásticos de cor branca, nos quais deve estar impresso o símbolo de risco biológico; deve ser preenchido somente até a metade e fechado de forma a evitar o derramamento de seu conteúdo. Esses sacos devem ser descartados no local apropriado definido para isso contemplado no PGRS.
- **Resíduos perfurocortantes:**
 - Concentram-se neste grupo as navalhas inteiras, quebradas, lâminas e outros objetos perfurocortantes, que devem ser descartados em coletor rígido (Descartex). O coletor deve ser colocado próximo ao local onde existe a maior probabilidade de quebra de lâminas;
 - O coletor, ao atingir seu limite de carga (linha tracejada de cor preta próxima à borda superior da caixa), deve ser descartado, junto ao sistema de coleta;
 - Lâminas que contenham amostras que foram analisadas devem ser guardadas por no mínimo 5 (cinco) anos.
- **Resíduos sólidos:**
 - Descartar em saco plástico branco leitoso, contendo símbolo de risco biológico; quando possível, utilizar caixas rijas para evitar que o saco rasgue e ocorra derramamento;
 - Cada caixa deve ser identificada de maneira que se consiga localizar o resíduo da amostra biológica até o seu descarte:
 - *Ano referente às peças analisadas;*
 - *Responsável pelo encaixotamento;*
 - *Data em que o material está sendo levado para o arquivo (armazenamento secundário);*
 - *Período de entrada das peças no laboratório;*
 - *Previsão para o descarte (sempre após 90 dias).*

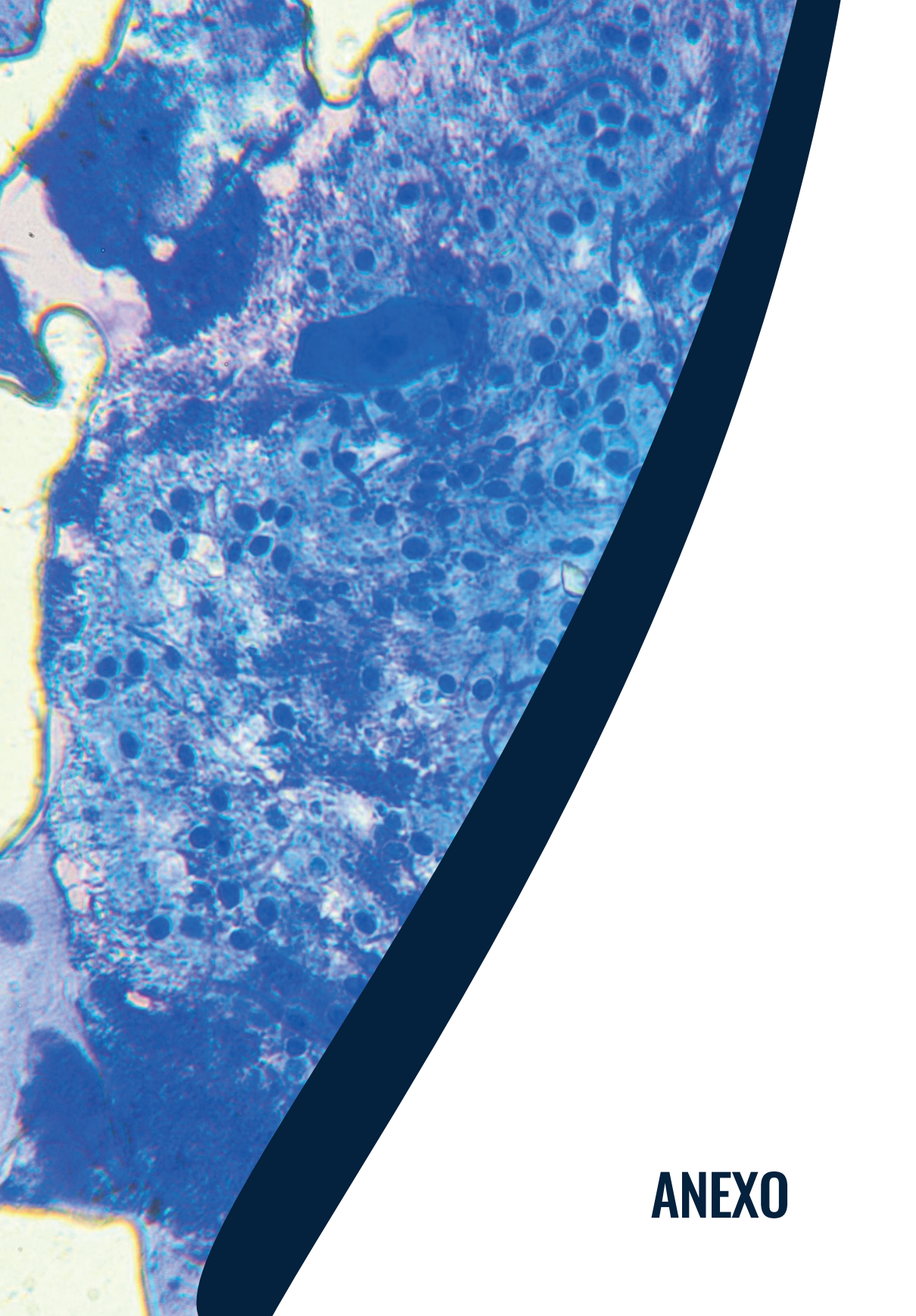
- **Resíduos líquidos:**
 - Descartar em galões vazios, identificar o tipo de produto (xilol, formol etc.), mantendo sempre tampado. Não encher completamente a embalagem, deixando um espaço para acúmulo de gases;
 - Manter ciclo de recolhimento conforme cronograma acertado com a empresa responsável pelo recolhimento, conforme especificado no PGRS.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ANVISA. RDC 50, DE 21 DE FEVEREIRO DE 2002. Disponível em: [https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao?task=cal-lelement&format=raw&item_id=337&element=f-85c494b-2b32-4109-b8c1-083cca2b7db6&method=download&args\[0\]=47a423c23b39f942eb3f171b9e71aeb8](https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao?task=cal-lelement&format=raw&item_id=337&element=f-85c494b-2b32-4109-b8c1-083cca2b7db6&method=download&args[0]=47a423c23b39f942eb3f171b9e71aeb8). Acesso em: 21 fev. 2002.
- ANVISA. RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 302, DE 13 DE OUTUBRO DE 2005. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_302_2005_COMP.pdf/7038e853-afae-4729-948b-e6eb3931b19. Acesso em: 14 out. 2005.
- DAKO. Immunohistochemical Staining Methods. Disponível em: https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08002_ihc_staining_methods.pdf. Acesso em: 7 abr. 2013.
- LEICA. Difficult Blocks and Reprocessing. Disponível em: https://www.leicabiosystems.com/fileadmin/biosystems/PDF/95.9890_Rev_C_Difficult_Blocks_and_Reprocessing.pdf. Acesso em: 20 ago. 2015.
- MICHALANY, Jorge. Técnica histológica em Anatomia Patológica: Com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 1. ed. São Paulo: EPU, 1980. p. 1-277.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Apoio diagnóstico e terapia. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/apoio_diagnostico_terapia_anatomia_patologica.pdf. Acesso em: 30 dez. 2005.
- GONÇALVES, Dalton. “Física”. Livro Técnico. 4ª edição/1967.
- EÇAK, Maria Luiza. “Biologia Moderna”. Nobel S.A. 2ª edição/1975.
- DE ROBERTIS, Nowinski e Saez. “Biologia Celular”. El Ateneo do Brasil. 2ª edição/1974.
- LUNA, Lee G.: “Manual of Histologic Staining Methods”-MC Graw Hill Book Company-3ª edição/1968.

- SERAPIÃO, C. J.; SILVA, P. F. O. Demonstração de Treponemas em Tecidos.
- CONN, H. J.; DARROW, Mary A.; EMMEL, Victor M. "Staining Procedures". The William & Wilkins Company. 2ª edição/1960.
- KRAJIAN, Aran A.; GRADWOHL, R. B. H. "Histopathological technic". The C.V. Mosby Company. 2º edition/1952.
- SERAPIÃO, C. J.; SERAPIÃO, M. J.; SANTANA, L. L. Curso Intensivo de Histotecnologia, Manaus, 1976. Div.Nac.Câncer.
- COMPTON, C. C.; ROBB, J. A.; ANDERSON, M. W. et al. Preanalytics and Precision Pathology: Pathology Practices to Ensure Molecular Integrity of Cancer Patient Biospecimens for Precision Medicine. Arch Pathol Lab Med. 2019;143(11):1346-1363. doi:10.5858/arpa.2019-0009-as.
- CREE, I. A.; DEANS, Z.; LIGTENBERG, M. J. et al. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. J Clin Pathol. 2014;67(11):923-931. doi:10.1136/jclinpath-2014-202404.
- ENGEL, K. B.; MOORE, H. M. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Arch Pathol Lab Med. 2011;135(5):537-543. doi:10.1043/2010-0702-RAIR.
- GROENEN, P. J.; BLOKX, W. A.; DIEPENBROEK, C. et al. Preparing pathology for personalized medicine: possibilities for improvement of the pre-analytical phase. Histopathology. 2011;59(1):1-7. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03711.x
- HEWITT, S. M.; LEWIS, F. A.; CAO, Y. et al. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Arch Pathol Lab Med. 2008;132(12):1929-1935. doi:10.1043/1543-2165-132.12.1929
- Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Critical Diagnoses (Critical Values) in Anatomic Pathology. Am J Clin Pathol 2006; 125:815-7.

- NAKHLEH, R. E. et al. Consensus Statement on effective communication of urgent diagnosis and significant, unexpected diagnoses in surgical pathology and cytopathology and Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Arch Pathol Lab Med 2012; 136:148-154.



ANEXO

MICROSCÓPIO

A escolha do microscópio é fundamental. Se por um lado se recomenda cuidado na escolha do aparelho, por outro também merece atenção a área destinada à macroscopia, para que seja adequadamente planejada.

Do microscópio

O microscópio é um instrumento óptico, mono ou binocular, constituído de vários componentes, quer da parte mecânica, quer da óptica, os quais se agrupam em quatro sistemas, a saber:

- De suporte;
- De aumento;
- De iluminação;
- De ajuste.

a) Sistema de suporte

Compõe-se de:

- Base ou pé: sustenta o aparelho propriamente dito;
- Coluna ou haste: sustenta o tubo e a fonte de iluminação nas partes superior e inferior, respectivamente;
- Revólver: é uma peça móvel onde ficam localizadas as objetivas;
- Platina: destina-se a receber o objeto de estudo, é munida de presilhas ou parafusos Charriot, o que permite a movimentação do objeto de forma lenta e regular nos sentidos horizontal e transversal;
- Tubo: traz na parte superior as lentes oculares e na inferior as objetivas localizadas no revólver.

Além disso, o sistema possui dois parafusos (macrométrico e micrométrico) que permitem a focalização do objeto; o primeiro de movimento rápido e o segundo de movimento lento. O prisma

localizado no interior do tubo trabalha os raios emanados da fonte luminosa.

Com referência ao tubo, recomenda-se 160mm como a distância ideal entre a ocular e a objetiva. Vale lembrar que a espessura do “porta-objeto” é de 17mm.

b) Sistema de aumento

Constituído de lentes oculares e objetivas:

- Lentes oculares: destinam-se ao observador e têm aumentos de 4x, 6x e 10x;
- Lentes objetivas: destinam-se ao objetivo e têm vários aumentos:
 - Entre 1x e 2,5x – lupa;
 - 4x – menor aumento;
 - 10x – pequeno aumento;
 - 40x – grande aumento;
 - 100x – de imersão.

Cada objetiva deve vir assinalada com a NA (abertura numérica), que apresenta as seguintes variações (por ex.):

- 0,30 na objetiva de 10x;
- 0,65 na objetiva de 40x;
- 130 na objetiva de 100x.

A maior medida que a NA pode aumentar é chamada de PR (poder de resolução). O poder de resolução* máxima ideal na rotina laboratorial é de 0,25 mm.

c) Sistema de iluminação

- Fonte de luz;
- Condensador: localiza-se entre a fonte de luz e a platina; serve para captar os raios luminosos na direção de determinado foco do objeto a ser examinado. Seu ajuste e

localização central, ao ser elevado, permite ao observador obter o máximo de iluminação, ocorrendo o inverso ao ser abaixado;

- Diafragma: amplia ou reduz o ângulo, regula a entrada de luz no condensador. Quanto mais aberto, maior a ampliação do ângulo e maior a abertura numérica; consequentemente, os mínimos detalhes serão observados, desde que o contraste seja reduzido;
- Filtro: quando presentes, são normalmente azuis. Seu uso é opcional.

d) Sistema de ajuste

Constitui-se de:

- Cremalheira (ou macrométrico), de avanço rápido, para aproximação do foco;
- Micrométrico, de avanço lento, completa a focalização;
- Parafuso para ajuste do condensador;
- Parafuso para centralização do condensador à frente, esquerda ou direita. A centralização é feita em relação à objetiva;
- Elevador do diafragma, fixo ao condensador, fecha e abre o diafragma, reduz e amplia o ângulo e a intensidade luminosa;
- Regulador de “platina mecânica”, destina-se a movimentar o objeto. Seu uso é essencial na leitura dos preparados microscópicos;
- O condensador é ajustado até que o círculo luminoso fique exatamente no centro do campo microscópico.

Cuidados básicos com o microscópio.

A manutenção e conservação do equipamento é fundamental, tanto para manter um bom nível de diagnóstico como para reduzir o desgaste do aparelho, dando-lhe maior tempo útil de uso. É recomendável uma revisão técnica semestral, assim como manutenção e conservação diárias, feitas pelo microscopista.

Cabe a este, ainda, ao término da jornada de trabalho diário:

- Desligar a fonte luminosa;
- Girar o revólver, deixando as objetivas livres e limpas (remover o óleo de imersão);
- Baixar o suporte mecânico da platina;
- Cobrir o aparelho com uma capa protetora.

Deve-se reforçar esses cuidados básicos alertando-se o patologista para:

- **Não** limpar a parte óptica com etanol;
- **Não** colocar objetivas submersas no xilol;
- **Não** utilizar cotonetes ou algodão para fazer a limpeza;
- **Não** usar xilol na platina.

BALANÇA DE PRECISÃO

A sensibilidade de uma balança é indicada pela menor massa que pode ser pesada com precisão.

Uma balança de precisão clássica constitui-se de:

- Eixo central/eixo de suspensão, fixado na base da balança;
- Travessão, com os dois braços da balança apoiados no cutelo ou prisma;
- Fiel: é a agulha ou ponteiro que indica o verdadeiro equilíbrio de uma balança, situa-se perpendicularmente à linha do travessão e ao eixo da oscilação;
- Cutelos (2), com arestas voltadas para cima, sobre as quais ficam os ganchos que sustentam os pratos;
- Pratos (2), um para material e outro para peso;
- Vários parafusos reguladores.

Procedimentos para pesagem:

- A substância que vai ser pesada deve ser colocada à esquerda da balança, papel ou recipiente;

- À direita ficam os pesos necessários para a adequada equivalência com o peso do recipiente ou papel e a substância a ser pesada.

Técnica de pesagem:

- Com a mão esquerda, levantar o recipiente, iniciando-o para baixo (o rótulo deve ficar virado para cima);
- Com a mão direita, impulsionar o depósito para baixo (o rótulo deve ficar virado para cima);
- Com a mão direita, impulsionar o depósito, fazendo com que a substância (pó ou cristal) caia lentamente;
- A espátula, devidamente limpa, ajuda na pesagem de pequenas quantidades.

Cuidados necessários:

- **Não** pesar quantidades de substâncias com peso acima da carga máxima da balança;
- **Não** pesar substâncias colocadas diretamente no prato;
- **Não** pegar os pesos com as mãos (usar pinça);
- **Não** deixar a balança destravada, só o fazer no momento da pesagem.

É necessário sistematizar os seguintes dados:

- As substâncias que vão ser pesadas ficam à direita da balança;
- As que não forem pesadas, à esquerda;
- Ao pesar, conferir a substância antes de retirar o recipiente;
- Ao pesar, verificar a etiqueta;
- Após a pesagem, feche o recipiente, colocando-o à direita.

ESTUFA

A estufa é provida de um termostato (que regula a temperatura), uma lâmpada-piloto (de alerta) e um termômetro.

É atribuição do técnico manter a estufa regulada. Para tal, deve estar plenamente identificado com os passos necessários para se obter a estabilização da temperatura desejada, quais sejam:

- Girar o botão do termostato até a temperatura máxima da estufa;
- Verificar, em duas horas, aproximadamente, se a temperatura registrada no termostato está corretamente mantida;
- Verificar se a lâmpada-piloto apaga ou acende conforme a elevação ou baixa temperatura;
- Com a estufa regulada na temperatura máxima, girar o botão do termostato para a temperatura desejada;

Lembramos que uma estufa do tipo simples e tamanho médio satisfaz plenamente qualquer laboratório de cito-histopatologia.

CENTRÍFUGA

A centrifugação é constituída de um eixo central, de grande velocidade, uma cabeça fixa e tubos coletores.

Existem vários tipos de centrífugas, desde as mais simples, do tipo manual — de uso limitado, requerendo muita atenção por parte do técnico, a fim de evitar danos —, até as elétricas, que, em geral, podem apresentar dois tipos de cabeças: a oscilante e a oblíqua.

As centrífugas são munidas de um cronômetro, que regula o tempo estimado para o movimento centrifugador, e um tacômetro, que marca a velocidade de rotação por minuto.

Procedimentos para a centrifugação convencional:

- Colocar os tubos, um defronte ao outro (exemplo: 1:2, 3:4, 5:6, e assim por diante);

- Ligar e gradualmente aumentar a velocidade até alcançar o grau desejado;
- Proceder da mesma forma para interromper a centrifugação, isto é, diminuir gradualmente no sentido inverso;
- Retirar os tubos, cuidadosamente, e decantar o sobrenadante;
- Inverter o sedimento no centro da lâmina (previamente limpa, alburnizada ou não) e, com auxílio do próprio tubo, preparar o esfregaço no sentido da porção central para a extremidade, ocupando uma área de 2,4cm x 3,2cm;
- Dessecar rapidamente as preparações em temperatura ambiente e fixá-las em álcool a 95%.

Centrífuga em camada única.

Esse aparelho dispõe de cronômetro e tacômetro automáticos e permite o processamento simultâneo de 12 (doze) amostras.

A concentração celular em cada camada única é obtida por meio da citocentrífuga destinada a separar as células e outros elementos suspensos no meio líquido, os quais são levados para a superfície de uma lâmina durante a rotação do aparelho. A parte líquida é absorvida por um papel de filtro que se amolda perfeitamente entre o tubo coletor de polietileno e a lâmina. O coletor possui, lateralmente, um orifício de 0,6cm de diâmetro, que corresponde a idêntico orifício existente no papel de filtro, fazendo com que a parte líquida seja absorvida pelo papel de filtro e o concentrado celular seja disposto na lâmina. Após esse processo, as preparações devem ser dessecadas rapidamente, em temperatura ambiente, e em seguida fixadas em álcool a 95%.

Recomendações gerais

Ao término da centrifugação, por qualquer uma das técnicas, deve-se limpar os tubos dos resíduos, manter o equipamento lubrificado, desligado e convenientemente protegido por uma coberta.



**SOLUÇÕES
E REAGENTES**

1. TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU

- Hematoxilina de Harris:
 - Hematoxilina (cristal) 5g;
 - Álcool etílico a 95% 100ml;
 - Alúmen de potássio 100g;
 - Óxido de mercúrio 2,5 a 3g;
 - Água destilada 1.000ml;

Preparação (solução - estoque):

- Dissolver a hematoxilina no álcool (solução 1);
- Dissolver o sulfato de alúmen de potássio em água aquecida (solução 2);
- Misturar as soluções 1 e 2. Levar para ebulição;
- Colocar rapidamente o óxido de mercúrio;
- Misturar a solução até que adquira a cor vermelho-escuro;
- Deixar esfriar em água ou na geladeira;
- Colocar em vidros de cor escura, rotular e datar;
- Quando esfriar, adicionar 8ml de ácido acético;

Preparação da solução de bateria:

- Juntar partes iguais da solução- estoque e água destilada;
- Orange G-6 (solução aquosa de Orange G a 10%):
 - Deixar em repouso por vários dias (solução 1);
 - Preparo para solução Orange G-6:
 - Solução 1: 50ml;
 - Álcool etílico a 95% 950ml;
 - Ácido fosfotúngstico 0,015g.

Após preparada a solução, colocar em vidro escuro, rotular, datar e guardar para uso oportuno.

2. TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE SHORR “MODIFICADA”

- Hematoxilina de Harris.
Solução corante de Shorr:
 - Álcool etílico a 95% 100ml;
 - Bierbrich Scarlat, solução aquosa 0,5g;
 - Orange G 0,25g;
 - Fast Green 0,075g;
 - Ácido fosfotúngstico 0,5g;
 - Ácido fosfomolibdico 0,5g;
 - Ácido acético 1ml;

Resultados:

- Núcleo: azul;
- Citoplasma: vermelho ou verde.

3. TÉCNICA DE COLORAÇÃO: HEMATOXILINA E EOSINA

- Hematoxilina de Harris:
 - Solução de Eosina 0,5g;
 - Água destilada 10,0ml;
 - Álcool a 95% 90ml;
 - Ácido acético (optativo) 1 gota.
- Solução diferenciadora:
 - Álcool a 95% 100ml;
 - Ácido clorídrico 5 gotas.

Resultados

- Núcleo: azul;
- Citoplasma: róseo.

EA-36 OU EA-65

EA-36

- 0,5% de Light Green SF em álcool a 95% 45ml;
- 0,5% de Bismark Brown em álcool a 95% 10ml;
- 0,5% de Eosina em álcool a 95% 45ml;
- Ácido fosfotúngstico 0,2g;
- Solução aquosa de carbonato de lítio (saturada) 1 gota.

EA-65

Para preparar essa solução, basta reduzir na solução EA-36 o percentual de Light Green para 0,25ml.

2. Eosina (solução mãe)

➤ Solução:

Eosina.....	5g
Água.....	200ml
Álcool absoluto.....	800ml

➤ Método de preparo:

Dissolver a eosina na água e completar com álcool.

Obs.: No momento de uso, diluir 50ml da solução mãe em 150ml de álcool e adicionar 1ml de ácido acético.

3. Verde Luz

➤ Solução:

Eosina.....	2,25g
Verde-claro amarelado.....	2,25g
Vesuvina.....	0,5g
Ácido fosfotúngstico.....	2g

➤ **Método de preparo:**

Dissolver a eosina em 450ml de álcool; dissolver o verde-claro amarelado em 100ml de água e completar com 350ml de álcool; dissolver a vesuvina em 100ml de álcool. Misturar na seguinte ordem: verde, vesuvina, eosina. Adicionar 10 gotas de carbonato de lítio saturado e 2g de ácido fosfotúngstico.

4. Orange

➤ **Solução:**

Orange5g
Ácido fosfotúngstico.....0,15g

➤ **Método de preparo:**

Diluir o Orange em 100ml de água e completar com 900ml de álcool absoluto; adicionar 0,15g de ácido fosfotúngstico.

5. Giemsa

➤ **Modo de preparo:** misturar as seguintes soluções:

Solução May grunwald.....50%
Solução Giemsa.....50%

OBS.: Quando o May grunwald for em pó, misturar 5/100ml de álcool.

➤ **Técnica de coloração:**

Hematoxilina.....tempo de biópsia;
Lavar em água corrente;
Solução (may+giemsa).....00:10min;
Lavar em água corrente;
Secar na estufa;
Xilol;
Montar.

6. P. A. S.➤ **Solução:**

Reativo de schiff:

Fucsina básica.....1g

Água destilada.....200ml

Bissulfito de sódio.....2g

Ácido clorídrico normal.....10ml

Carvão vegetal.....1g

OBS.: Diluição para 1 normal: ácido clorídrico concentrado
83/1.000ml de água.

➤ **Método de preparo:**

Dissolver a fucsina na água fervendo; esfriar essa solução até 70°; adicionar bissulfito de sódio; agitar bem até esfriar; adicionar o ácido clorídrico normal; agitar bem. Tampar e aguardar 24h. Adicionar carvão vegetal, agitar e filtrar.

OBS.: Esta solução não deve ficar escura.

➤ **Técnica de coloração:**

Desparafinar e hidratar;

Ácido periódico a 2%.....00:05min;

Lavar em água corrente;

Reativo de shiff.....00:40min;

Lavar bem;

Hematoxilina.....tempo de biópsia;

Lavar bem;

Desidratar, clarear e montar.

7. Alcian Blue

➤ Solução:

Alcian blue.....	1g
Ácido acético glacial.....	3ml
Água destilada.....	97ml

➤ Técnica de coloração:

Desidratar e desparafinar;	
Solução de alcian blue.....	1:00h;
Lavar;	
Hematoxilina.....	tempo de biópsia;
Lavar em água corrente;	
Desidratar, clarear e montar.	

8. Pás Alcian Blue

➤ Técnica de coloração:

Desparafinar e hidratar;	
Solução de alcian blue.....	00:30min;
Lavar;	
Ácido periódico	00:15min;
Lavar;	
Reativo de schiff.....	00:15min;
Lavar;	
Hematoxilina.....	tempo de biópsia;
Lavar;	
Desidratar, clarear e montar.	

9. Vermelho Congo Alcalino

➤ Solução (mãe):

Vermelho congo.....	1g
Cloreto de sódio.....	2g
Álcool.....	200ml
Dissolver e filtrar.	

➤ Solução (uso):

Solução mãe.....	100ml
Hidróxido de sódio 1%.....	1ml

➤ Técnica de coloração

Desparafinar e hidratar;	
Hematoxilina.....	tempo de biópsia;
Lavar;	
Passar em álcool;	
Solução vermelho congo.....	00:20min;
Desidratar em 3 banhos de álcool, clarear e montar.	

10. Gomory

➤ Solução:

Cromotrope 2r.....	0,6g
Verde-claro amarelado.....	0,5g
Ácido acético	1ml
Ácido fosfotúngstico	0,8g
Água destilada.....	1ml

➤ Técnica de coloração:

Solução	00:20min;
Lavar;	

Hematoxilina.....tempo de biópsia;
 Lavar;
 Desidratar, clarear e montar.

11. Sirius Red

➤ Solução ácido:

Ácido clorídrico.....83,5ml
 Água destilada.....916,5ml

➤ Picrossirius

Sirius red.....0,2g
 Ácido pícrico saturada.....100ml

➤ Técnica de coloração:

Solução picrossirius.....01:00h;
 Solução ácido.....00:10min;
 Lavar;
 Hematoxilina.....tempo de biópsia;
 Lavar;
 Desidratar, clarear e montar.

12. Retículo

➤ Solução de prata amoniacal:

Diluir em 10ml de água destilada 1gr de nitrato de prata;
 Diluir em 10ml de água destilada 1gr de hidróxido de potássio;
 Aos 10ml de nitrato de prata a 10%, juntar 2,5ml de hidróxido de potássio a 10% em um erlenmeyer e nessa mistura precipitada adicionar 26 a 28 gotas de hidróxido de amônio, agitando sempre enquanto for gotejando o hidróxido de amônio até que o precipitado desapareça.

- **Solução permanganato de potássio:**
 - Permanganato de potássio.....0,5g
 - Água destilada..... 100ml
- **Solução de metabissulfito de potássio:**
 - Metabissulfito de potássio.....2,0g
 - Água destilada..... 100ml
- **Solução de formol:**
 - Formol 40%.....20ml
 - Água destilada.....80ml
- **Solução de sulfato de amônio férrico:**
 - Sulfato de amônio férrico2g
 - Água destilada..... 100ml
- **Solução de cloreto de ouro:**
 - Solução de cloreto de ouro 1%.....20ml
 - Água destilada.....80ml
- **Técnica de coloração**
 - Desparafinar e hidratar;
 - Oxidar em permanganato de potássio 0,5%.....00:05min;
 - Lavar;
 - Diferenciar em metabissulfito de potássio 2%.....00:05min;
 - Lavar;
 - Sensibilizar em sulfato de amônio férrico 2%.....00:05min;
 - Lavar;
 - Impregnar na solução prata amoniacal.....00:02min;
 - Passar no álcool;Reduzir em formol 20%00:03min;
 - Lavar;
 - Passar em cloreto de ouro 0,2%.....00:00:03seg;

Lavar;
 Passar em metabissulfito de potássio.....00:05min;
 Lavar;
 Passar em tiosulfato de sódio 2%.....00:05min;
 Lavar;
 Corar pela hematoxilina.....tempo de biópsia;
 Lavar;
 Desidratar, clarear e montar.

13. Perl's

➤ **Solução ferrocianeto:**

Ferrocianeto de potássio.....10g
 Água destilada.....100ml

➤ **Solução de ácido clorídrico:**

Ácido clorídrico.....10ml
 Água destilada.....100ml

➤ **Solução de sirius red:**

Sirius red.....0,2g
 Ácido pícrico saturado.....100ml

OBS.: Na hora do uso, preparar:

Ferrocianeto.....50%
 Ácido clorídri.....50%

➤ **Técnica de coloração:**

Solução de sirius red00:05min;
 Lavar;
 Solução ferrocianeto + ácido clorídrico.....00:05min;

Lavar;
Desidratar, clarear e montar.

14. Fite

➤ **Solução:**

Fucsina
Fucsina básica1g
Cristais de fenol.....5g
Água destilada.....100ml
Álcool absoluto.....10ml

➤ **Método de preparo:**

Dissolver lentamente a fucsina na água;
Dissolver o fenol no álcool;
Misturar as duas soluções, filtrar e usar.

Diferenciador

Ácido clorídrico.....1ml
Álcool100ml

Verde

Verde luz1g
Água destilada.....100ml

➤ **Técnica de coloração:**

Desparafinar e hidratar;
Fucsina (filtrar sobre a lâmina).....00:20min;
Lavar;
Passa no álcool;
Diferenciar;

Verde luz.....00:00:15seg;
 Lavar;
 Desidratar, clarear e montar.

15. Verhoeff

➤ Solução hematoxilina:

Hematoxilina.....5g
 Álcool absoluto.....100ml

➤ Solução de percloroeto de ferro:

Cloreto férrico.....10g
 Água destilada.....100ml

➤ Solução de lugol forte:

Iodo.....2g
 Iodeto de potássio.....4g
 Água destilada.....100ml

➤ Solução de cloreto férrico:

Cloreto férrico.....2g
 Água destilada.....100ml

➤ Solução de hipossulfito de sódio:

Tiosulfato de sódio.....5g
 Água destilada.....100ml

➤ Solução de hematoxilina de verhoeff:

Hematoxilina amadurecida.....30ml
 Percloroeto de ferro.....12ml
 Lugol forte.....12ml

➤ **Corante Van Gieson:**

- Solução A

Fucsina ácida1g

Água destilada.....100ml

- Solução B

Solução aquosa de ácido pícrico saturado.

OBS.: Para uso, 50ml da solução saturada ácido pícrico e 7,5ml de fucsina.

➤ **Técnica de coloração:**

Desparafinar e hidratar;

Corar pela hematoxilina de verhoeff.....00:20min;

Lavar;

Diferenciar em cloreto férrico;

Lavar;

Hipossulfito de sódio.....00:05min;

Lavar;

Solução van gienon.....00:03min;

Não lavar;

Secar levemente em papel de filtro;

Desidratar em álcool, clarear e montar.

16. Pasm

- Ácido periódico:

Ácido periódico.....0,5g

Água destilada.....100ml

- Metanamina:

Hexametilanotetramina.....3g

Água destilada.....100ml

- Nitrato de prata:

Nitrato de prata.....5g
 Água destilada..... 100ml

- Cloreto de ouro 0,1%:

Cloreto de ouro.....20ml
 Água destilada..... 100ml

- Hipossulfito de sódio:

Tiossulfato de sódio2g
 Água destilada..... 100ml

- Borato de sódio (Borax):

Borato de sódio.....5g
 Água destilada..... 100ml

➤ **Solução A:**

Na hora do uso, preparar:

Água destilada.....25ml
 Bórax.....2ml
 Metanamina.....25ml
 Nitrato de prata.....2ml

➤ **Técnica de coloração:**

Desparafinar e hidratar;

Ácido periódico.....00:10min;

Lavar;

Solução A na estufa 60° (controlar até ficar na cor caramelo);

Água;

Cloreto de ouro até ficar na cor cinza;

Lavar;

Hipossulfito de sódio.....00:05min;
 Lavar;
 Contracorar com eosina;
 Desidratar, clarear e montar.

17. Grocott

- Ácido crômico:

Ácido crômico.....5g
 Água destilada.....100ml

- Bissulfito de sódio:

Bissulfito ou dissulfito de sódio.....1g
 Água destilada.....100ml

- Nitrato de prata (guardar em geladeira):

Nitrato de prata.....5g
 Água destilada.....100ml

- Metanamina (guardar em geladeira):

Hexametilantetramina.....3g
 Água destilada.....100ml

- Solução de bórax:

Borato de sódio.....5g
 Água destilada.....100ml

- Cloreto de ouro:

Cloreto de ouro 0,5%.....1 parte
 Água destilada.....4 partes

- Hipossulfito de sódio:

Hipossulfito de sódio ou tiosulfato.....2g
 Água destilada..... 100ml

- Solução verde luz:

Verde luz1g
 Água destilada..... 100ml

OBS.: No momento do uso, preparar:

Água destilada.....25ml
 Solução de bórax.....2ml
 Metanamina.....25ml
 Solução de prata.....2ml

➤ **Método de coloração:**

Desparafinar e hidratar;

Oxidar para ácido crômico00:10min;

Lavar;

Descorar para bissulfito de sódio.....00:01min;

Lavar;

Colocar na solução de prata e colocar na estufa (ir controlando até a cor caramelo);

Lavar;

Colocar no cloreto de ouro até chegar à cor cinza;

Hipossulfito de sódio.....00:05min;

Lavar;

Contracorar com verde luz.....00:00:30seg;

Lavar;

Secar na estufa;

Xilol e montar.

18. Fixadores

➤ Solução de formalina:

Solução de formol a 37%	100ml
Água.....	900ml

➤ Solução de formalina neutra:

Solução de formol a 37%	100ml
Água.....	900ml
Fosfato de sódio monobásico	4g
Fosfato de sódio dibásico	6,5g

➤ Fixador de Bouin:

Álcool.....	150ml
Solução de formalina.....	60ml
Ácido pícrico.....	1g

