VENTANA®

Roche

PAS Staining Kit

REF 860-014

05279291001

IVD Σ 75

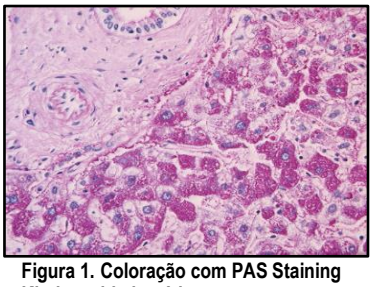

Figura 1. Coloração com PAS Staining Kit de tecido hepático.

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

PAS Staining Kit destina-se a ser utilizado no laboratório como corante histológico qualitativo para evidenciar a presença de glicogénio, da membrana basal e de organismos fúngicos através de microscopia ótica em secções de tecido fixado em formol e impregnado em parafina (FFPE) coradas num instrumento BenchMark Special Stains.

Este produto deverá ser interpretado por um patologista qualificado, em conjunto com um exame histológico, a informação clínica relevante e os controlos adequados.

Este produto destina-se a utilização em diagnóstico in vitro (IVD).

RESUMO E EXPLICAÇÃO

PAS Staining Kit é uma modificação da técnica descrita originalmente por McManus em 1946, que permite visualizar mucinas, glicogénio, membranas basais e organismos fúngicos através da combinação da oxidação de polissacáridos com ácido periódico e da coloração com o reagente Schiff.[1]

O PAS é um corante de hidratos de carbono versátil que pode ser utilizado para detetar estruturas que contenham uma elevada proporção de macromoléculas de hidratos de carbono, incluindo polissacáridos.[1] O principal polissacárido identificado através de coloração histológica em secções de tecido humano é o glicogénio.[1]

A coloração com PAS permite a visualização ao microscópio e a avaliação dos níveis de glicogénio no tecido.[2] A perturbação das vias metabólicas que convertem a glucose em glicogénio e vice-versa pode levar à acumulação de glicogénio.[2] As características clínicas do excesso de glicogénio podem variar consoante o órgão/tecido onde ocorre a acumulação.[2]

O corante PAS é também utilizado no exame das membranas basais e é tipicamente utilizado para inspecionar a membrana basal glomerular em biopsias renais em que existe suspeita de doença glomerular.[3,4] A doença glomerular ocorre quando se dá uma rotura da barreira de filtração glomerular, o que pode permitir que os glóbulos vermelhos ou as proteínas plasmáticas atravessem essa barreira.[5] As características patológicas podem variar, mas podem incluir ondulação, colapso, espessamento e afinamento da membrana basal.[4]

O corante PAS também pode ser utilizado para detetar o glicogénio presente nas paredes celulares dos fungos como auxiliar no diagnóstico da infeção fúngica.6 O conteúdo de glicogénio da parede celular dos fungos é semelhante em muitos fungos, pelo que a coloração PAS é um método fiável para confirmar ou eliminar a possibilidade de infeção fúngica.[1,6]

PAS Staining Kit é utilizado para ajudar o patologista na avaliação dos níveis de glicogénio e para auxiliar a fazer o diagnóstico de doença glomerular em tecido renal e a infeção por organismos fúngicos.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

PAS Staining Kit utiliza reagente Periodic Acid para oxidar os glicóis em aldeídos.[1] O reagente de Schiff reage com os aldeídos para formar um composto dialdeído incolor, que é transformado na coloração magenta dos componentes celulares que contêm glicol. Aplica-se uma modificação da hematoxilina de Mayer para obter uma coloração nuclear azul a púrpura.

Este kit foi otimizado para ser utilizado em instrumentos BenchMark Special Stains. Os reagentes são aplicados no tecido em lâminas de microscópio e homogeneizados sobre toda a amostra.

MATERIAIS FORNECIDOS

Os frascos de reagentes são fornecidos em transportadoras marcadas com códigos de barras para serem inseridos no tabuleiro de reagentes do instrumento. Cada kit contém reagentes suficientes para 75 testes:

Um frasco de 22 mL de Periodic Acid contém aproximadamente 1% de ácido periódico.

Três frascos de 22 mL de Schiff's Reagent contêm aproximadamente 4% de bissulfito de sódio, aproximadamente 2% de ácido clorídrico diluído e aproximadamente 1% de cloreto de pararosanilina.

Um frasco de 22 mL de Neutralizer contém aproximadamente 1% de bissulfito de sódio.

Um frasco de 22 mL de Hematoxylin Counterstain contém hematoxilina de Mayer modificada.

Seis inserções de frasco com tubos de imersão.

Reconstituição, homogeneização, diluição, titulação

Não é necessária qualquer reconstituição, homogeneização, diluição ou titulação dos reagentes do kit. A diluição adicional de qualquer um dos reagentes poderá resultar numa coloração não satisfatória.

Os reagentes deste kit foram diluídos de forma otimizada para serem utilizados em instrumentos BenchMark Special Stains.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Os produtos indicados na folha de métodos podem não estar todos disponíveis em todas as regiões. Consulte o seu representante de assistência local.

Os seguintes reagentes e materiais podem ser necessários para a coloração, mas não são fornecidos:

1. Tecido de controlo recomendado
2. Lâminas de microscópio carregadas positivamente
3. Instrumento BenchMark Special Stains
4. BenchMark Special Stains Deparaffinization Solution (10X) (Ref. 860-036 / 06523102001)
5. BenchMark Special Stains Liquid Coverslip (Ref. 860-034 / 06523072001)
6. BenchMark Special Stains Wash II (Ref. 860-041 / 08309817001)
7. Equipamento de laboratório de uso genérico

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

PAS Staining Kit deve ser conservado a 2-8 °C. Os componentes do kit refrigerados devem estar à temperatura ambiente antes de utilizar.

Quando corretamente conservados, os reagentes fechados permanecem estáveis até à data indicada na etiqueta. Não utilizar o reagente depois de ultrapassada a data de validade indicada no kit.

Nota: Schiff's Reagent permanece estável durante um mês após a abertura. Coloque uma etiqueta no frasco de Schiff com a data correspondente quando o abrir pela primeira vez. O kit contém dois frascos extra de Schiff's Reagent, para permitir que o kit seja utilizado integralmente. Utilize apenas um frasco de Schiff's Reagent de cada vez.

Schiff's Reagent é conhecido por conter precipitado tipo agulha. Em níveis esperados, este precipitado não deverá afetar o desempenho do ensaio. Os controlos devem ser executados em simultâneo com amostras desconhecidas. Contacte o representante de assistência local se o material de controlo positivo apresentar uma diminuição da coloração, porque isso pode indicar instabilidade do reagente.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

São necessários tecidos FFPE processados regularmente para utilização com este produto e instrumentos BenchMark Special Stains. O fixador de tecido recomendado é o formol neutro tamponado a 10%.[7]

Realize a colheita e o armazenamento das amostras de acordo com o documento Histotechnology: A Self Instructional Text.[7] Corte secções com a espessura apropriada, que é aproximadamente 4 µm, e coloque as secções sobre lâminas de vidro carregadas positivamente.

1. Seque as lâminas.[7]
2. Imprima a(s) etiqueta(s) de código(s) de barras apropriada(s).

3. Aplique as etiquetas de códigos de barras na extremidade fosca das lâminas antes de carregar as lâminas no instrumento (consulte o Manual do utilizador do instrumento para saber como aplicar corretamente as etiquetas).

Consulte a secção Instruções de utilização para saber qual é o protocolo recomendado para o instrumento BenchMark Special Stains.

AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Para utilização em diagnóstico in vitro (IVD).
2. Apenas para utilização profissional.
3. Não utilizar num número de testes superior ao especificado.
4. As lâminas carregadas positivamente podem ser suscetíveis a pressões ambientais que podem ter como consequência uma coloração inadequada. Contacte o representante da Roche para mais informações sobre como utilizar estes tipos de lâminas.
5. Os materiais de origem humana ou animal devem ser manuseados como materiais que envolvem risco de contaminação e eliminados adotando as devidas precauções. Em caso de exposição, devem ser seguidas as diretivas de saúde das autoridades responsáveis.[8,9]
6. Evite o contacto dos reagentes com os olhos e as membranas mucosas. Se os reagentes entrarem em contacto com áreas sensíveis, lave com água em abundância.
7. Evite a contaminação microbiana dos reagentes, pois tal poderá dar origem a resultados incorretos.
8. Para mais informações acerca da utilização deste dispositivo, consulte o Manual do utilizador do instrumento BenchMark Special Stains, bem como as instruções de utilização de todos os componentes necessários em navifyportal.roche.com.
9. Consulte as autoridades locais e/ou estatais no que se refere ao método de eliminação recomendado.
10. A etiquetagem de segurança do produto segue principalmente as diretrizes do GHS da UE. Ficha de dados de segurança disponível para utilizadores profissionais a pedido.
11. Para reportar situações graves suspeitas relacionadas com este dispositivo, contacte o representante local da Roche e a autoridade competente do Estado-Membro ou do País onde o utilizador está estabelecido.

Este produto contém componentes classificados da seguinte forma, nos termos do disposto no Regulamento (CE) N.º 1272/2008:

Tabela 1. Informações sobre os perigos.

Perigo	Código	Advertência
Perigo	H290	Pode ser corrosivo para os metais.
	H314	Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.
	H350	Pode provocar cancro.
	H373	Pode afetar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.
	P201	Pedir instruções específicas antes da utilização.
	P260	Não respirar névoas ou vapores.
	P280	Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial/proteção auditiva.
	P303 + P361 + P353	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): Despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água.
	P304 + P340 + P310	EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.
	P305 + P351 + P338 + P310	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.
	P308 + P313	EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Consulte um médico.

EUH208: Contém iodato de sódio. Pode provocar uma reação alérgica.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Preparar frasco de reagente

Antes da primeira utilização, deverá ser colocada no frasco de reagente uma inserção com tubo de imersão para frasco.

Retire a tampa de proteção do frasco e coloque a inserção e o tubo de imersão no frasco. A inserção e o tubo de imersão deverão ser deixados dentro do frasco depois de este ser aberto.

Procedimento de coloração

1. Carregue os reagentes e as lâminas no instrumento.
2. Introduza a tampa mole na ranhura existente no suporte de reagentes quando o reagente estiver a ser utilizado.
3. Execute o processo de coloração de acordo com o protocolo recomendado na Tabela 2 e as instruções do Manual do utilizador.
4. Quando o ensaio estiver concluído, remova as lâminas do instrumento.
5. Utilize a tampa mole para cobrir o frasco de reagente quando o reagente não estiver a ser utilizado.
6. Após a utilização, conserve os reagentes de acordo com as condições de conservação recomendadas.

Protocolo recomendado

Os parâmetros para os procedimentos automáticos podem ser apresentados, impressos e editados de acordo com o procedimento contido no Manual do utilizador do instrumento.

Os procedimentos que se seguem são suficientemente flexíveis para permitir que sejam aplicadas as preferências do utilizador. Este produto foi otimizado para utilização com instrumentos BenchMark Special Stains, mas o utilizador tem de validar os resultados obtidos com este produto.

Tabela 2. Protocolo de coloração recomendado para PAS Staining Kit num instrumento BenchMark Special Stains.

Procedimento de coloração	S PAS
Passo do protocolo*	**Método**
Desparafinação	Selecione a remoção automática de parafina.
Cozedura (opcional)	A predefinição é não estar selecionada. Recomendados 75 °C durante 4 minutos.
Otimizar PAS	Selecione para ativar ajustes de PAS Schiff's e Hematoxylin.
Otimizar Schiff's para PAS (PAS Schiff's)	A predefinição são 45 °C durante 20 minutos. Selecione para ativar o ajuste da intensidade da coloração:** Selecione uma temperatura entre 37-60 °C: • 37 °C, intensidade da coloração de Schiff mais clara 60 °C, intensidade da coloração de Schiff mais escura Selecione um tempo de incubação entre 12-20 minutos:

Procedimento de coloração	S PAS
Passo do protocolo*	**Método**
	• 12 minutos, intensidade da coloração de Schiff mais clara 20 minutos, intensidade da coloração de Schiff mais escura.
PAS Hematoxylin	A predefinição são 8 minutos. Selecione para ativar o ajuste do tempo de incubação:** 4 minutos, coloração nuclear mais clara 12 minutos, coloração nuclear mais escura

*Para ajustar as preferências de coloração, aumente a temperatura da coloração e o tempo de incubação um parâmetro de cada vez.

**Para ajustar as preferências de coloração, aumente a temperatura da coloração e o tempo de incubação um parâmetro de cada vez.

Processamento pós-instrumento recomendado

1. Desidrate as lâminas em duas mudas de etanol a 95% para remover a solução restante, seguidas de três mudas de etanol a 100%.
2. Limpe as lâminas em 3 mudas de xileno a 100%.
3. Coverslip com meio de montagem permanente.
4. Compatível com o protocolo de aplicação de coverslips do sistema VENTANA HE 600. Para obter mais instruções, consulte o Manual do utilizador do sistema VENTANA HE 600.

PROCEDIMENTO DE CONTROLO DE QUALIDADE

Um exemplo de material de controlo positivo seria tecido humano FFPE que se sabe ser rico em glicogénio, como o músculo esquelético ou o fígado. O tecido de controlo deverá ser uma amostra recém-colhida de autópsia, biopsia ou cirurgia, preparada ou fixada o mais cedo possível e de forma idêntica à das secções de teste. Este tipo de tecidos deve servir para monitorizar todas as etapas da análise, desde a preparação do tecido até à coloração.

A utilização de uma secção de tecido fixada ou processada de forma diferente da amostra do teste permite um controlo apropriado de todos os reagentes e etapas do método, excetuando a fixação e o processamento de tecidos. Os componentes celulares de outros elementos tecidulares podem servir de controlo negativo.

A prática laboratorial ideal deve incluir uma secção de controlo positivo na mesma lâmina que contém o tecido de teste. Isto ajuda a identificar quaisquer falhas na aplicação dos reagentes na lâmina. O tecido de controlo poderá conter elementos de coloração positiva e negativa e servir como controlo positivo e negativo.

O tecido de controlo tem de ser testado com cada ensaio.

Os controlos tecidulares positivos conhecidos devem ser utilizados apenas para monitorizar o correto desempenho de tecidos processados e de reagentes de teste e não para auxiliar na formulação de um diagnóstico específico de amostras de pacientes.

Se os componentes tecidulares positivos não demonstrarem uma coloração positiva, os resultados das amostras de teste deverão ser considerados inválidos. Se os componentes negativos demonstrarem coloração positiva, os resultados obtidos com as amostras de pacientes deverão também ser considerados inválidos.

Quaisquer discrepâncias inexplicáveis nos resultados dos controlos deverão ser imediatamente comunicadas ao representante de assistência local. Se os resultados do controlo de qualidade não estiverem em conformidade com as especificações, os resultados dos pacientes são inválidos. A causa desta situação terá de ser identificada e corrigida, e as amostras de pacientes repetidas.

INTERPRETAÇÃO DA COLORAÇÃO/RESULTADOS PREVISTOS

PAS Staining Kit é testado para evidenciar glicogénio, fungos e membranas basais.

- Glicogénio: magenta
- Mucinas:[7] magenta
- Membrana basal: magenta
- Fungos: magenta
- Núcleos: azul a púrpura
- Fundo: rosa

LIMITAÇÕES ESPECÍFICAS

Foram utilizadas e validadas para este ensaio apenas lâminas de microscópio carregadas positivamente.

Schiff's Reagent é conhecido por conter precipitado tipo agulha. Em níveis esperados, este precipitado não deverá afetar o desempenho do ensaio.

Tem sido observado precipitado com formas cúbicas, rosa a vermelho, em lâminas coradas com PAS Staining Kit. Em níveis previstos, este precipitado não interfere com a interpretação do ensaio.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

DESEMPENHO ANALÍTICO

Foram realizados testes de coloração para sensibilidade, especificidade e precisão e os resultados estão listados abaixo.

Sensibilidade e especificidade

Foram avaliadas a sensibilidade e especificidade analíticas de casos de tecidos normais e patológicos. Todos os casos de tecidos avaliados (61/61) passaram no que diz respeito à coloração aceitável, como se pode ver na Tabela 3 e na Tabela 4.

Tabela 3. A sensibilidade/especificidade de PAS Staining Kit foi determinada testando os seguintes tecidos normais FFPE.

Tecido	N.º de casos que passaram/N.º testados
Rim	5 / 5
Fígado	5 / 5
Intestino delgado	5 / 5
Músculo esquelético	10 / 10

Tabela 4. A sensibilidade/especificidade de PAS Staining Kit foi determinada testando os seguintes tecidos FFPE patológicos.

Tecido	N.º de casos que passaram/N.º testados
Candida (vários tipos de tecidos)	8 / 8
Aspergillus (vários tipos de tecidos)	10 / 10
Glomeruloesclerose segmental focal (rim)	4 / 4
Doença glomerular (rim)	5 / 5
Glomerulonefrite membranosa (rim)	1 / 1
Glomerulonefrite membranoproliferativa (rim)	2 / 2
Nefropatia lúpica (rim)	4 / 4
Glomeruloesclerose diabética (rim)	2 / 2

Precisão

A precisão de PAS Staining Kit foi determinada em vários ensaios, dias, instrumentos e lotes de reagentes, utilizando várias lâminas com cortes de 3 casos de tecido de fígado normal e 3 casos de tecido de rim normal. Todos os critérios de aceitação foram cumpridos integralmente. Foram realizados estudos de precisão de PAS Staining Kit de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5. Estudos de precisão das lâminas do PAS Staining Kit.

Parâmetros testados	N.º de condições	N.º de lâminas que passaram/ N.º testadas
De ensaio para ensaio	3 ensaios, mesmo dia	54 / 54
De dia para dia	5 dias	88 / 90

Parâmetros testados	N.º de condições	N.º de lâminas que passaram/ N.º testadas
De instrumento para instrumento	3 instrumentos	52 / 54
Intraensaio	mesmo dia, mesmo instrumento	53 / 54
De lote para lote	3 lotes	54 / 54

DESEMPENHO CLÍNICO

As características de sensibilidade e especificidade relevantes para a utilização prevista deste dispositivo são reportadas na secção de desempenho analítico. Adicionalmente, os dados publicados relevantes para o dispositivo foram avaliados através de uma revisão sistemática da literatura, e corroboram também a utilização do dispositivo de acordo com a respetiva utilização prevista.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

1. A espessura da secção pode afetar a qualidade e a intensidade da coloração. Se a coloração não for a apropriada, contacte o representante de assistência local para obter assistência.
2. O tecido necrótico ou autolisado poderá exibir uma coloração não específica.
3. Se o controlo positivo for negativo, o tecido pode ter sido colhido, fixado ou desparafinado de forma incorreta. Siga o procedimento correto de colheita, conservação e fixação.
4. Se o controlo positivo for negativo, verifique se a lâmina tem a etiqueta de código de barras correta. Se a lâmina estiver etiquetada de forma correta, verifique os outros controlos positivos do mesmo ensaio, para determinar se foram corados corretamente.
5. Se ocorrer coloração de fundo excessiva: a remoção incompleta da parafina pode causar artefactos de coloração ou ausência de coloração. Se a parafina não for toda removida da lâmina, repita o processo de coloração utilizando a opção de desparafinação alargada, caso esteja disponível.
6. Se as secções de tecido saírem da lâmina, verifique se as lâminas estão carregadas positivamente.
7. A estadia prolongada das lâminas no instrumento depois da conclusão do ensaio pode afetar a qualidade e a intensidade da coloração. Se a coloração não for a apropriada, retire prontamente as lâminas no final do ensaio e avance para o processamento pós-instrumento.
8. Para aplicar uma ação corretiva, consulte a secção Instruções de utilização, o Manual do utilizador do instrumento ou contacte o representante de assistência local.

REFERÊNCIAS

1. Layton C, Bancroft JD. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. In: Elsevier; 2019. Accessed 02/15/2021.
2. Kanungo S, Wells K, Tribett T, et al. Glycogen Metabolism and Glycogen Storage Disorders. Ann Transl Med. 2018;6(24):474.
3. McManus JFA. The Periodic Acid Routine Applied to the Kidney. Am J Pathol. 1948:643-653.
4. Cathro HP, Shen SS, Truong LD. Diagnostic Histochemistry in Medical Diseases of the Kidney. Semin Diagn Pathol. 2018;35(6):360-369.
5. Hebert LA, Parikh S, Prosek J, et al. Differential Diagnosis of Glomerular Disease: A Systematic and Inclusive Approach. Am J Nephrol. 2013;38(3):253-266.
6. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century. Clin Microbiol Rev. 2011;24(2):247-280.
7. Carson FL, Cappellano C. Histotechnology; A Self-Instructional Text, 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2020, 2022.
8. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
9. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.

NOTA: Neste documento, é sempre utilizado o ponto como separador decimal para marcar o limite entre a parte inteira e as partes fracionais de um número decimal. Não são utilizados separadores de milhares.

Símbolos

Ventana utiliza os seguintes símbolos e sinais, além dos listados na norma ISO 15223-1 (para os EUA: consultar elabdoc.roche.com/symbols para mais informações).

GTIN	Número Global de Item Comercial
Rx only	Para os EUA: Advertência: A Lei Federal dos EUA restringe a venda deste dispositivo a um médico ou mediante receita médica.

HISTÓRICO DE REVISÕES

Rev	Atualizações
K	Foram feitas atualizações nas secções Avisos e precauções, e foi feita a atualização para o modelo atual.

PROPRIEDADE INTELECTUAL

VENTANA, BENCHMARK e VENTANA HE são marcas comerciais da Roche. Todos os restantes nomes de produtos e marcas comerciais são propriedade dos respetivos titulares.

© 2024 Ventana Medical Systems, Inc.

For USA: Rx only

INFORMAÇÕES DE CONTACTO

Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, AZ 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)

www.roche.com

EC REP

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim
Germany
+800 5505 6606

CE