

ALCIAN BLUE (método de Lendrun para amiloide)

Soluções:

a) Álcool-Ácético

Álcool 95%	45ml
H ₂ O destilada	45ml
Ac. acético glacial	10ml

b) Solução de estoque: Alcian Blue a 1%

Alcian Blue 86x	1g
Álcool 95%	100ml

c) Sulfato de Sódio a 1%

Sulfato de Sódio	1g
H ₂ O destilada	100ml

d) Solução de uso

Alcian Blue	45ml
Sulfato de sódio	45ml

Misturar as duas soluções e deixar descansar 30 minutos antes do uso . Estável por 3 dias.

Método:

- 1 - Desparafinar, hidratar até H₂O destilada
- 2 - Lavar em Álcool-ácido
- 3-Corar pela solução de Alcian Blue 2 horas à temperatura ambiente
- 4 - Lavar em Álcool-Ácido e em H₂O
- 5 - alcalinizar em solução saturada de Borax 30'
- 6 - Lavar em H₂O corrente
- 7 - Coloração nuclear para Hematoxilina de Carazzi 5'
- 8 - Contracorar com solução de Van Gilson 3'
- 9 - Secar em papel de filtro
- 10 - Desidratar clarear e montar

Resultados:

amiloide recente, granulos de mastocitos, mucinas e coloides
amiloide velho
colageno
músculo

verde brilhante
verde pálido
vermelho
amarelo

ALCIAN BLUE (para mucopolissacarides)

Fixação - formalina

Soluções

1 - Alcian Blue pH 2,5

Alcian Blue	1g
Ácido acético 3%	100ml

2 - Alcian Blue pH 1.0

Alcian Blue	1g
Ácido clorídrico 0,1N	100ml

3 - Alcian Blue pH 0,5

Alcian Blue	1g
Ácido clorídrico 0,5	100ml

Nota: filtrar antes do uso. Estas soluções são estáveis por 2 semanas

Método:

1 - Secções até H₂O destilada

2 - Alcian Blue - 30 minutos

3 - Se usar Alcian Blue pH 2,5, lavar em H₂O destilada
Se usar pH 1,0 ou 5,0, secar em papel de filtro

4 - Desidratar rapidamente, clarear e montar

ALCIAN BLUE pH 0,5

Soluções

Ácido Clorídrico 0,5N

Alcian Blue 1g

Ácido clorídrico 0,5N 100ml

Duração 1 a 2 meses guardado em geladeira

Método:

- 1 - Desparafinar e levar até H₂O corrente
- 2 - Passar em H₂O destilada
- 3 - Ácido clorídrico 0,5N - 2 minutos
- 4 - Alcian Blue pH0,5 - 20 minutos, lavar rapidamente e em HCl 0,5N
- 5 - Secar em papel de filtro
- 6 - Lavar em H₂O corrente
- 7 - Desidratar, diafanizar e montar

ALCIAN BLUE pH 1.0

Soluções:

- 1 - Ácido clorídrico 0,1N
- 2 - Alcian Blue

Alcian Blue	1g
Ácido clorídrico 0,1N	100ml

Método:

- 1 - Secções desparafinadas levadas até a H₂O corrente.
- 2 - Passar em H₂O destilada.
- 3 - Corar pelo Alcian Blue pH 1.0 - 30 minutos
- 4 - Secar em papel de filtro
- 5 - Desidratar rapidamente, clarear e montar

ALCIAN BLUE pH 2,5

Soluções:

1 - Ácido acético a 3%

Ácido acético	3ml
H ₂ O destilada	100ml

2 – Alcian Blue

Alcian Blue	1g
Ácido acetico 3%	100ml

Método:

- 1 - Desparafinar e levar até H₂O corrente
- 2 - Passar em H₂O destilada
- 3 - Ácido acético a 3% durante 2 minutos
- 4 - Corar para solução Alcian Blue pH 2,5 10 a 20 minutos
- 5 - Lavar em H₂O corrente - 2 minutos
- 6 - Desidratar diafanizar e montar

ATPASE (para biopsia muscular)

- **Coleta de material:** Biópsia colocada em gaze sobre gelo em isopor congelar no isopentano e nitrogênio
- Cortes 10 μ
- Montar a cortiça no porta objeto do criostato com H₂O
- Aparar o bloco
- Recolher em lâminas (temp. amb.) e ir guardando dentro do criostato
- Lâminas cortadas e geladeira
- Obs.: O material é coletado em lamínulas 24x32 . A seguir colocado em suporte ou cubas de coloração com as seguintes medidas:

3 cm de largura com ranhuras
3,5 de comp. com 5 ranhuras

Soluções

1 - Cloreto de cálcio 0,18 M

Cloreto de cálcio	1,323g
H ₂ O destilada	50 ml

2 - Sódio Barbital 0,1 M

Dietilbarbiturato Sódio	1,03094g
H ₂ O destilada	50 ml

3 - Solução pré-incubação pH 9,4

H ₂ O destilada	56 ml
Cloreto de Cálcio 0,18 M	8 ml
Sódio Barbital 0,1 M	16 ml

Obs.: Retirar 30 ml e acrescentar 25 mg de adenosina-5-Trifosfato. Acertar o pH9,4 com Ácido clorídrico 0,1M

4- Ácido clorídrico 0,1N

ácido clorídrico	0,8324 ml
H ₂ O destilada	100 ml

5-NaOH 0,1 N

NaOH	0,4 g
H ₂ O destilada	100 ml

6 - Cloreto de cobalto 2%

Cobalto II 6-hidrato	2g
H ₂ O destilada	100 ml

7 - Solução pré-incubação pH 4,35	
ácido acético de 0,5 M	27 ml
acetato de Sódio 0,5 M	27 ml

8 - Acetato de sódio 0,5 M	
Acetato	3.402g
H ₂ O	50 ml

9 - Ácido Acético 0,5 M	
Ácido acético	1,43 ml
H ₂ O destilada	50,0 ml

Método:

Em temperatura ambiente

1 lâmina pH 9,4	15 minutos
1 lâmina pH 4,35	15 minutos

- Lavar em H₂O destilada
- Incubar na estufa 37°

- o pH 9,4 - 30' em atpase pH 9,4
- pH 4,35 - 40' em atpase pH 9,4

- Lavar em H₂O destilada
- Cloreto de cobalto 2% - 7 minutos
- Lavar em H₂O destilada
- Sulfeto de Amônio 1%, lavar rapidamente
- Lavar em H₂O destilada, álcool, xilol montar.

- ATPase
- 1 pH 9,4- 15 minutos
- 1 pH 4,35- 15 minutos
- H₂O destilada

- 37° C pH 9,4 - 30' ATPase 9,4
- 37° C pH 4,35 - 40' ATPase 9,4

- H₂O destilada
- Cloreto de Cobalto 2% - 7'
- H₂O destilada
- Sulfato de Amônio 1% (Preparar no exato instante do uso)
- H₂O destilada, Desidratar e montar

AZUL DE TOLUIDINA (mucopolissacarídes ácidos)

Fixação: formalina 10% neutra, formol-álcool

Soluções:

1- Azul de Toluidina em tampão Veronal	0,25%	pH = 4,5
Azul de Toluidina (CI 52040)	0,25g	
Tampão Veronal, pH = 4,5	100ml	

2-Tampão Veronal Michaelis pH = 4,5		
acetato de sódio	19,43g	
Barbiturado de sódio	29,43g	
H ₂ O destilada	1000ml	

Para uso pH = 4,5 misturar		
Solução de acetato veronal	5ml	
HCl M100	11ml	
H ₂ O destilada	9ml	

Método:

- 1-Secções até H₂O destilada
- 2-Soluções azul Toluidina 10 segundos
- 3- H₂O destilada
- 4-Secar com papel filtro
- 5 Clarear em xilol e montar

Resultados:

Mucopolissacárides ácidos	rosa a púrpura
outras substâncias metacrom.	rosa a púrpura
núcleo	azul

AZUL DE TOLUIDINA (para muco)

Soluções:

Azul de Toluidina	0,5%	ou	1%
Azul de Toluidina	0,5g		1g.
H ₂ O destilada	100ml		100ml

Método

- 1- Desparafinar e Hidratar até H₂O destilada
- 2) Corar na solução aquosa de azul de Toluidina 0,5% ou 1% - 2 minutos
- 3) Álcool absoluto rapidamente
- 4) Enxugar e secar com papel de filtro
- 5) Xilol e montar.

Resultados:

Muco	roxo
Núcleos	azul
Fundo tecido	azul pálido

Nota: Controle PAS

Obs: Usar preferencialmente como fixador.

AZUL DE TOLUIDINA **(para *Pneumocystis carinii*)**

Soluções:

1) **Sulfatação:** colocam-se 45 ml de ácido acético glacial numa cuba de coplin que foi, previamente introduzida num recipiente plástico (de ~11 cm de altura como uma garrafa plástica) contendo água da torneira fria a 10°. C (não menos).

Ao ácido acético juntar 15 ml de ácido sulfúrico concentrado (cuidadosamente, com ajuda de uma pipeta, para não explodir) mexer gentilmente com uma vareta de vidro.

Guardar muito bem vedado à temperatura ambiente. Duração 1 semana

2) **Corante** azul de Toluidina

Dissolver 0,3g de azul de Toluidina 0 em 60ml de água destilada, a qual junta-se 2 ml de HCl (ácido Clorídrico) concentrado acrescentar 140 ml de álcool etílico absoluto.

Guardar a temperatura ambiente duração de 1 ano.

Método

Pode ser usado para esfregaços e cortes de parafina.

1-Desparafinação em xilol e levar até H₂O destilada

2-Enxugar em papel de filtro

3- Introduzir as lâminas com os cortes no reagente de sulfatação (cuba) durante 10 minutos, mexendo com vareta antes da introdução e após 5 minutos.

4- Lavar cuidadosamente em H₂O corrente, 5 minutos

5- Secar em papel filtro

6- Pingar em excesso o azul de Toluidina 0 em cima dos cortes e tapar, durante 3 minutos

7- Lavar e diferenciar com intervalos de 10 segundos cada em: 2 cubas de álcool etílico a 100, 2 cubas de xilol; montar com Permount. (não deixar ficar o corte no xilol).

Obs: Não é necessário mudar os álcoois e xilol sempre que usar, apenas quando apresentarem o azul acentuado.

Resultado: Vermelho arroxeados (*Pneumocystis*)

Referência: modificado por Linda L. Cosey (Journal of Clinical Microbiology, , 22(5) : 803 - 807 ,nov. 1985)

**BROWN BRENN
(GRAM MODIFICADO)**
(para bactérias em geral, ótimo para fungos do gênero Nocardia e Actinomyces).

Fixação: formalina tamponada neutra a 10%

Soluções:

1) Violeta cristal 1%

Violeta cristal	1g.
H ₂ O destilada	100g

2) Solução de Bicarbonato de sódio 5%

Bicarbonato de Sódio	5g
H ₂ O destilada	100ml

Na hora do uso :misturar 1 ml de violeta cristal (20 gotas)+ 5 gotas de Bicarbonato de Sódio

3) Lugol

Iodo	1gr.
Iodeto de Potássio	2grs.
H ₂ O destilada	300cc

4) Éter / Acetona (partes iguais)

5) Fucsina básica 1%

Fucsina básica	1gr.
H ₂ O destilada	100ml

6) Solução de ácido pícrico + acetona

Ácido pícrico	0,1gr.
Acetona	100 ml

7) Acetona / Xilol (partes iguais)

Método:

- 1-Desparafinar , hidratar
- 2) Lavar em H₂O corrente
- 3) Corar para Hematoxilina de Harris 5 minutos
- 4) Diferenciar em álcool clorídrico 70°. a 1%
- 5) Lavar em água corrente
- 6) Azular na H₂O amoniacal 1%
- 7) Lavar bem em H₂O corrente e H₂O destilada
- 8) Cobrir a lâmina com violeta cristal + Bicarbonato de Sódio 2 minutos
- 9) Lavar em H₂O destilada
- 10) Cobrir a lâmina com lugol
- 12) Lavar em H₂O destilada
- 13) acetona ir pingando até cessar a cor
- 14) Fucsina básica 3 minutos.
- 15) H₂O destilada
- 16) Acetona
- 17) Solução de ácido pícrico + acetona até amarelo avermelhado
- 18) Xilol- acetona
- 20)clarear em xilol
- 21) montar

Resultados:

Gram +	azul escuro
Gram -	vermelho vivo
Fungos -	entre violeta e azul; muitas formas não se coram

BROWN –BRENN (modificado pelo AFIP)

Soluções: igual ao método original exceto:

1-Solução Estoque
Fucsina a 0,25 %

2-Solução de trabalho
Fucsina básica estoque

Fucsina básica estoque	10 ml
água destilada	90 ml-

Método:

- 1) Desparafinar e hidratar até água destilada
- 2) Colocar na solução de violeta+ bicarbonato
- 3) Lavar na água corrente
- 4) Solução de iodo de Gram por 1 minuto
- 5) Lavar em água corrente
- 6) Descorar na acetona
- 7) Lavar na água corrente
- 8) Colocar na solução de fucsina por 1 minuto. Lavar
- 9) Acetona
- 10) Acetona-acido pícrico até rosa amarelado
- 11) Acetona
- 12) Acetona-xilol
- 13) Clarear em xilol
- 14) montar

resultados : bacteria gram positiva –azul
bacteria gram-negativo- vermelho
Filamentos de Nocardia e actinomicetes- azul
Núcleo- vermelho
Outros elementos tissulares- amarelo

Ref. Brown JH, Brenn, L. Bulletin Johns Hospital. 1931; 48:69

BROWN HOPPS (modificado pelo AFIP)

Fixação: formalina tamponada neutra a 10%

Soluções:

1) Acetona - ácido pícrico	
Ácido pícrico	0,25g
Acetona	1 litro
2) Iodo de Gram	
Iodo	1gr
Iodeto de potássio	2,0gr
H ₂ O destilada	300ml
3) Soluções de GallegoH ₂ O destilada	1000ml
Formalina (37-40%)	20ml
Ácido acético glacial	10ml
4) Fucsina basica - 1%	
Fucsina basica	1gr
H ₂ O destilada	100ml
5) Violeta cristal 1%	
Violeta cristal	1gr
H ₂ O destilada	100ml
6) Acetona / Xilol	
Acetona-	500ml
Xilol	500ml

Método:

- 1-Desparafinar e hidratar até H₂O destilada
- 2- Solução de violeta cristal 1% - 1 minuto
- 3-Lavar em H₂O corrente
- 4- iodo de Gram (lugol fraco) - 1 minuto
- 5- lavar em H₂O corrente
- 6- Descolorir em acetona até o fundo ficar claro
- 7- Lavar em agua corrente imediatamente
- 8- Fucsina básica 1% - 5 minutos
- 9- Lavar em H₂O corrente

- 10- Diferenciador de Gallego - 2 mudanças de 1 minuto cada
- 11- Água corrente
- 12- Transferir as laminas para o disco de coloração
- 13- Tratar as lâminas com acetona 30 segundos
- 14- Acetona - ácido pícrico 2-3 minutos
- 15- Acetona -xilol - 2 trocas
- 16- clarear em xilol - 2 trocas
- 17- Montar em resina

Obs.: Usar controle positivo

Resultados:

bactéria gram positiva	azul
Bactéria gram negativa	vermelha
Fundo	amarelo

Ref. –Brown RC, Hopps HC. Staining of bacteria in tissue sections: Reliable Gram stain method. Am J Clin Pathol. 1973; 60:234

LAVADO BRONCO-ALVEOLAR (Contagem quantitativa)

- 1-Homogeneizar (arrolhar e agitar)
- 2) Medir o volume em um tubo cônico graduado
- 3) Tirar uma amostra +/- 3ml
- 4) O restante centrifugar e ter o procedimento normal para Papanicolau e Leishman
- 5) Da amostra retirada. Fazer a contagem na câmara de Neubauer (puro ou diluído)
- 6) O que sobrou dessa amostra guardar na geladeira em separado até sair o resultado

LAVADO BRONCO-ALVEOLAR PARA TRANSPLANTADOS

- Centrifugar por 10 minutos a 1400 RPM (usar a citocentrífuga Shandon)
- lâminas SILANISADAS para Leishman
- lâminas para imuno
- Papanicolau (4)
- Específicas (Grocotti, BH, Ziehl, Azul de toluidina)
- Fazer umas 3 lâminas a mais de reserva
- Fixar em álcool 95 por no mínimo 1 hora para fazer as específicas. Para Papanicolau pode ficar somente os 30 minutos
- Para fazer as específicas tirar as lâminas do álcool, deixar secar ao ar para depois fazer as específicas.

Continuar cada um sua rotina normal.

Obs.: O Grocotti é feito com controle de *P. carinii*.

SCHULTZ **(para colesterol)**

Fixação formalina neutra 10% cortes congelação 10 μ

Soluções:

1) Sulfato férrico amoniacal

Sulfato férrico amoniacal	2,5gr.
H ₂ O destilada	100

2) Misturar ácido acético glacial/ácido sulfúrico

Ácido acético glacial	5ml
Ácido sulfúrico concentrado	5ml

Adicionar ácido sulfúrico ao ácido acético vagorosamente e com agitação constante. Preparar imediatamente na hora do uso.

PREPARO DOS ESFREGAÇOS DE LÍQUIDOS

Ao receber a amostra verificar o tipo de líquido.

1. -Se for escarro, já preparar a lâmina para Papanicolau sem centrifugar. Não precisa fazer leishmann
2. Se o líquido for hemorrágico centrifugar, preparar os esfregaços para Papanicolau e Leishmam; o de Leishmann deixar secar ao ar; o de Papanicolau colocar no Carnoy 3 minutos e depois álcool 95%
3. Se o líquido for límpido separar um pouquinho +/- 3ml e centrifugar, o restante concentrar na câmara de concentração o centrifugado despejar o sobrenadante também na câmara de concentraçãõ e do sedimento fazer a lâmina para Leishmann
4. Não se esquecer de albuminar a lâmina para concentrar. Usar uma esponja
5. Tratar os cortes durante 1 minuto em permanganato de potássio
6. Diferenciar em solução a 5% de bissulfito de sódio
7. Lavar em H₂O corrente
8. Corar com hematoxilina cromica por 10 minutos ou menos (checar no microscópio até as células (Beta) ficarem de coloração azulada.
9. Diferenciar em solução de ácido clorídrico a 1% - 1 minuto
10. Lavar em H₂O de torneira até que os cortes fiquem azuis claro.
11. Contracorar com solução de floxina B por 5 minutos
12. Mergulhar em H₂O destilada
13. Mergulhar em solução a 5% de ácido fosfotungstico 1 minuto

14. Lavar em H₂O de torneira por 5 minutos
15. corte deve ganhar novamente a cor ver
16. melha

17. Diferenciar em álcool 95%. Se estiver muito vermelho e as células alfa não estão bem claras (15 segundos em alc. 80%)

18. Transferir para álcool absoluto, clarear, xilol e montar.

Resultado:

Células alfa	vermelhas
Células beta	azuis
Células delta	de bem vermelho a vermelho claro.

Ref.: Am. J. Pathology. 17:398, 1941

CROMALUMEM DE GOMORI

Fixação: Os tecidos podem ser fixados em formalina ou Bouin
Se fixados em formalina, os cortes de parafina devem ser refixados em Bouin por 12 a 24 horas antes de corar

Solução:

1- Solução de permanganato de potássio

Permanganato de potássio	0,3g
H ₂ O destilada	100ml
Ácido Sulfúrico	0,3ml

b) Solução de bissulfito de Sódio

Bissulfeto de Sódio	5g
H ₂ O destilada	100ml

c) Solução de cromo-hematoxilina

Hematoxilina,, solução aquosa a 1%	50ml
Alumem cromico, solução aquosa a 3%	50ml

A 100 ml de Hematoxilina cromica adiciona 0,1gr de iodato de potássio.

Ferver até adquirir coloração azul escura.

A mistura estará madura imediatamente e pode ser usada quando existir um filme metálico na superfície

Filtrar antes de usar.

d) Solução de Floxina

Floxina B	0,5%
H ₂ O destilada	100ml

e) Solução de ácido fosfotungstico

Ácido fosfotungstico	5gr
H ₂ O destilada	100ml

MÉTODO:

1. Preparados desparafinados e levados até H₂O
2. Refixar em Bouin de 12 a 24 horas
3. Lavar em H₂O de torneira até remover o ácido pícrico

DESCALCIFICADORES

A- EDTA (para medula ossea)

EDTA 0,7gr (ácido Etilenodiamino tetracético)

Tartarato de Sódio e Potássio 8,0gr

Ácido Hidroclorídrico 99,2ml

H₂O destilada 1000ml

Para medula óssea fixar por 2 horas no Zenker e descalcificar no Edta por 2 horas. Se ficar mais tempo no Zenker reduzir o tempo do Edta.

B- ácido fórmico (para ossos em geral)

Solução A

Citrato de sódio a 20%	200gr.
H ₂ O destilada	1 litro

Solução B

Ácido Formico a 50%	500ml
H ₂ O destilada	500ml

MÉTODO

1-Na hora do uso misturar partes iguais de A e B

2-Colocar o fragmento

A descalcificação é mais lenta, porém preserva melhor as estruturas. Após a descalcificação lavar o tecido pelo menos durante as 24 horas em H₂O corrente para eliminar totalmente o ácido, depois seguir normalmente

C- ÁCIDO NITRICO a 5 %

Ácido nítrico 5% em H₂O de torneira

Fixar e passar direto para o descalcificador por umas horas ou dias.

Sulfato de sódio a 5% algumas horas

Lavar em H₂O corrente e processar.

EDTA 1%

(Anticoagulante para Citológicos)

EDTA	1gr.
H ₂ O destilada	100ml

Em cada tubo de ensaio de 10ml colocar 0,5ml da mistura de EDTA 1%, deixar secar os tubos em estufa 57% de um dia para o outro. Tampar e etiquetar.

ESCARLATE R OU SUDAN (para gorduras/cortes)

Soluções:

Sudan IV ou Sudan VI ou escarlate R	
Sudan IV ou Sudan VI ou escarlate R	1gr
Álcool 70%	50ml
Acetona	50ml

Misturar e guardar bem fechado. Filtrar antes de usar.

Método:

- 1-Fixar em formalina neutra a 10%
- 2-Fazer cortes em congelação a 10 micras
- 3-Coletar as secções de congelação em H₂O destilada.
- 4-Lavar em álcool 70%
- 5-Corar por 5 minutos. Tampado
- 6-Passar em álcool 70 por 1 minuto
- 7- Lavar em H₂O destilada
- 8-Hematoxilina de Harris ou carazzi
- 9-Lavar em H₂O comum
- 10- Lavar em H₂O destilada
- 11- Montar com Glicerol/gelatina ou outro meio de montagem aquoso
- 12-Passar esmalte em torno da lamínula

Preparo do meio de montagem

H ₂ O destilada	52ml
Gelatina	8,0gr
Gliceros	50ml

Misturar a água quente a gelatina, dissolver, misturar a glicerol.
Conservar em geladeira e aquecer a 37°.C na hora do uso

Resultado:

Núcleo	azul
Gordura neutra	vermelho

ESCARLATE R **(para gordura /Peça)**

Soluções:

Sudan IV ou Sudan IV ou escarlate R	1gr.
Álcool 70%	50ml
Acetona	50ml

Filtrar antes de usar.

Método:

- 1-Fixar em formalina neutra a 10%
- 2- Lavar em H₂O destilada
- 3-Lavar em álcool 70%
- 4- Corar por 5 minutos em frasco tampado
- 5-Passar em álcool 70% 1 minuto
- 6- Lavar em H₂O destilada

EOSINAS

A- ALCOÓLICA 1%

Soluções Estoque

Eosina Y.	1,0gr.
H ₂ O destilada	20ml

Dissolver e adicionar

Álcool 95	80ml
-----------	------

Solução de uso

Solução Estoque	1 parte ou 25ml
Álcool 80%	3 partes ou 75ml

Antes do uso, adicionar 0,5ml de ácido acético glacial para cada 100ml de solução.

B-AQUOSA 0,1%

Eosina Y	2gr.
H ₂ O destilada	2 litros.

Misturar aos poucos com a água

Cobrir com gaze e deixar ao sol durante 1 mês

Passado 1 mês, filtrar

Colocar 2 gotas de ácido acético 1% para cada 300 - 500ml.

FIXADORES

A- FIXADOR CARNOY

Fixador bom para rim
Fixa entre ½ a 3 horas
Segue direto para álcool 100

1-Solução

álcool 100	6 partes
cloroformio	3 partes
ácido acético	1 parte

B- FIXADOR BASE - B5 (Biópsia de medula)

Cloreto de mercúrio	6gr.
Acetato de sódio amnido	1,25gr.
H ₂ O destilada (quente)	90ml

No momento de usar, adicionar 10ml de formoldeido 40%

A fixação é feita idealmente por 2 horas; se for mais demorado tornará a espécime difícil de cortar ao microtomo. Se o posterior processamento for retardado, o espécime deve ser guardado em álcool 70 - 80%

C- BOUIN ALCCÓLICO OU DUBOSQ BRASIL

Bom para glicogênio e tecidos duros

Álcool 80°	150CC
Formol do comércio	60CC
Ácido acético crist.	15grs.
Ácido pícrico	1gr.

Fixar até 3 horas. Seguir direto para álcool 100°

D- FORMOL TAMPONADO

Formol 37 - 40%	400ml
H ₂ O destilada	3.600ml
Fosfato de Sódio monobásico	16,0gr.
Fosfato de Sódio Bibásico (amido)	26,0gr.

Dissolver os sais em H₂O destilada, depois acrescentar o formol.

E-KLOTZ I

Para 10 litros:	
Hidrato de Cloral	250gr.

Bicarbonato de Sódio	50gr.
Sal (cloreto de Sódio)	90gr.
Sulfato de Sódio Na ₂ SO ₄	110gr.
Formol puro	1 litro
H ₂ O destilada	10 litros

Dissolver em H₂O quente
 Obs.: O Sulfato de Sódio e o bicarbonato de sódio devem ser dissolvidos em H₂O morna.
 A fixação ocorre em 4 a 6 dias

F- HELLY

Bicromato de Potássio	2,5gr.
Sulfato de Sódio	1,0gr.
Cloreto de mercúrio sublimado	5,0gr.
H ₂ O destilada	100ml

No momento de usar, juntar 5ml de formol 40%

G-BOUIN (Bom para citologia (formol picro acético))

Formol de comércio	5 partes
Soluto aquoso saturado de ácido pícrico	15 partes
Ácido acético glacial	1 parte

24 horas de fixação ou mais (de 3 a 8 dias). Passa-se direto para o álcool 70% litinado, até não sair cor amarela. Este líquido conserva-se infinitamente, junta-se o ácido acético no momento de usar.

Obs.: PARA REFIXAÇÃO DE LÂMINAS, usar Bouin sem ácido acético.
 PARA FIXAÇÃO DE MATERIAL, adicionar ácido acético no momento de usar.

H- GENDRE

Solução alcoólica (95% ou 90%) saturada de ácido pícrico (geralmente 7% de ácido pícrico)	80ml
Formaldrido 40%	15ml
Ácido acético glacial	5ml

Nota: O fluido de Gendre é composto de 80 volumes de álcool 90% saturado com ácido pícrico, 15 volumes de solução de formaldeído 40% e 5 volumes de ácido acético glacial

Fixa de 1 a 4 horas. Lavar várias vezes em álcool 80 ou 90%.

É visto que em 4 horas a 25°C dará excelente fixação de glicogênio no tecido hepático.

Lava-se duas vezes em álcool 80%, 95% e 100% dando uma lavagem adequada e desidratação

I- ZENKER

Dicromato de potássio	2,5gr
Sulfato de sódio	1,0gr
Sublimado de HgCl ₂	100,0ml

No momento de usar adicionar 5ml de ácido acético para 100,0 ml de Zenker.

Os cortes podem ficar 2 horas para fixar.
De 12 a 24 horas no Zenker descalcifica. Para medula óssea o ideal é fixar por 2 horas no Zenker e descalcificar no Edta.

PROCEDIMENTO PARA MEDULA OSSEA

FIXAÇÃO:

FIXADOR BASE - B5 (Biópsia de medula)

Cloreto de mercúrio	6gr.
Acetato de sódio amnido	1,25gr.
H ₂ O destilada (quente)	90ml

No momento de usar, adicionar 10ml de formoldeido 40%

A fixação é feita idealmente por 2 horas; se for mais demorado tornará a espécime difícil de cortar ao microtomo. Se o posterior processamento for retardado, o espécime deve ser guardado em álcool 70 - 80%

Descalcificação:

Como o tecido é delicado deve ser utilizado uma solução descalcificante especial, onde o material permanece por 2 horas sendo então transferido a uma solução de álcool etílico 80% álcool absoluto, xilol parafina

Solução descalcificante	
Ácido etilenodiaminotetracético tresetasódio (edta)	0,7gr.
Tartarato de sódio e potássio	8gr.
Ácido hidrolórico	99,2ml
H ₂ O destilada qsp	1000ml

COLORAÇÃO : Giemsa para tecido

Solução estoque Jenner	
Jenner	0,25gr.
Álcool metílico	100ml

Solução uso Jenner	
Jenner sol. estoque	25ml
H ₂ O destilada	25ml

Na hora do uso

18 ml

12 ml

FONTANA MASSON

Reagentes:

A - Solução de Prata Amoniacal: para aproximadamente 50ml de Nitrato de Prata 10% adicionar, gota a gota, Hidroxido de Amônio até o precipitado resultante estar dissolvido. Adicionar algumas gotas de nitrato de prata até a solução turvar. Descansar “overnight” em geladeira e filtrar antes do uso. Para usar diluir 1 parte para 3 partes de água destilada.

B - Cloreto de ouro 0,2%

C - Tiosulfato de Sódio 5%

Método:

1 - Desparafinar e hidratar em

2 - Solução de Prata Amoniacal “overnight” no escuro à temperatura ambiente ou por 1 hora à 60°.C, até os cortes ficarem caramelo

3 - Lavar em água destilada

4 - Cloreto de ouro 0,2% por 10 minutos

5 - Lavar em água destilada

6 - Tiosulfato de sódio 5% por 5 minutos

7 - Lavar em água corrente por 5 minutos

8 - Desidratar, diafanizar e montar

Resultados:

Granulos “argentafin”

preto

Melanina

preto

FONTANA MASSON

(para melanina)

Fixação: Formol 10%

Reagentes:

Solução Fontana de Prata Amoniacal: em Nitrato de Prata 5% adicionar Hidróxido de Amônio, gota a gota, até o precipitado resultante dissolver. Adicionar algumas gotas de nitrato de prata 5% até a solução se tornar opaca. /Filtrar antes de usar.

Cloreto de Ouro 0,2%
Tiosulfato de Sódio 5%
Vermelho Neutro Aquoso 1%

Método :

- 1 - Água destilada, 4 trocas de 30 minutos cada
- 2 - Solução de Prata Amonical de 12 a 18 horas no escuro
- 3 - Lavar várias vezes em água destilada
- 4 - Cloreto de Ouro 0,2% por 10 minutos
- 5 - Lavar em água destilada
- 6 - Tiosulfato de Sódio 5% por 5 minutos
- 7 - Lavar em água corrente por 5 minutos
- 8 - Vermelho neutro aquoso 1% por 1 a 2 minutos
- 9 - Lavar em água
- 10 - Desidratar rapidamente, diafanizar e montar

Resultados:

Núcleos	vermelho
Melanina	preto

FUCSINORRAGIA

(para detectar areas isquêmicas)

Método: da hematoxilina básica, ácido pícrico e fucsina.

Solução A: Sulfato de alumínio e amônio 6gr.

Hematoxilina	0,5gr.
Óxido de mercúrio amarelo	0,25gr.
H ₂ O destilada	70ml

Ferver por 10 minutos. Esfriar e adicionar 30ml de glicerina e 4ml de ácido acético glacial. Filtrar antes de usar

Obs.: O óxido de mercúrio amarelo pode ser substituído para óxido de mercúrio vermelho

Solução B: Fucsina Básica a 1%

Fucsina básica	1gr.
H ₂ O destilada	100ml

Solução C: Ácido pícrico a 0,1 % em acetona

Ácido pícrico	0,1gr.
---------------	--------

Acetona absoluta	100ml
------------------	-------

Nota: Todas as etapas são feitas a temperatura ambiente.

A solução C e todos os líquidos de lavagem são descartados após seu uso.

Método:

- 1 - Desparafinar e hidratar até H₂O destilada
- 2 - Corar na solução A por 10 segundos
- 3 - Lavar em H₂O corrente 5 minutos
- 4 - Corar na solução B por 3 minutos
- 5 - Lavar rapidamente (5-10") em H₂O destilada
- 6 - Lavar rapidamente (5-10") em acetona absoluta
- 7 - Diferenciar na solução C até a cor vermelha (Fucsina básica) cessar de correr do corte. Usualmente cerca de 20 segundos para tecidos humanos e 15 segundos para tecido de animais.
- 8 - Lavar rapidamente (5-10") em acetona absoluta.
- 9 - Clarear em xilol e monta

SISTEMA DE CONDUÇÃO DO CORAÇÃO : FIXAÇÃO E CORTES SERIADOS

1-Ligar todos os vasos e injetar formol, logo após mergulhar no formol por mais 48 horas

2-Maneira de fazer os cortes

3-Coração fechado em posição anatômica

4-Identificar veia cava superior e crista da aurícula ,na junção deve estar o nodo SINO ATRIAL, fazer uns 5 cortes.

5-Depois abrir o coração de modo habitual no VD identificar o seio coronariano e o septo membranoso. Cortar um fragmento que vai do ponto mediano do seio ao septo até a última cordoalha da inserção da valvula tricúspide.

6-Dar um cm de margem acima e 2cm de margem abaixo.

Processamento do material para cortes seriados

O material deve ser processado a vácuo (25 mm Hg)

1 - Fixação mínima de 24 horas em formoldeído a 10%

2 - Lavar em H₂O corrente

3 – Desidratação

Álcool 70% 5 minutos no vácuo e deixar a noite

Álcool 80% 5 minutos no vácuo e mais 2 horas

Álcool 90% 5 minutos no vácuo e mais 2 horas

Álcool 100% 5 minutos no vácuo e mais 2 horas

Álcool 100% minutos no vácuo e mais 2 horas

4 - Diafanização

Xilol I 5 minutos no vácuo + 2 horas ou passara noite

Xilol II 5 minutos no vácuo e +2 horas

5 - Embebição

Parafina 5 minutos no vácuo e mais 3 horas

Parafina II 5 minutos no vácuo e mais 3 horas

6 – Incluir

7 – Cortar

8 - Pescar nas fitas

9 - Coloração HE ou tricromico de masson

Tricomico de Masson

(Coloração dos Rolos de filmes com cortes seriados)

- 1 - Desparafinar e lavar até H₂O
- 2 - Fixar em Bouin 1 hora a 56°.C
- 3 - Lavar bem em H₂O corrente
- 4 - Hematocilina de Weigert 1 a 5 minutos, lavar em H₂O corrente
- 5 - Escarlate de Briebich 5 minutos, H₂O destilada até clarear
- 6 - Diferenciador de Masson 10 minutos, H₂O destilada
- 7 - Azul de anilina 5 a 10 minutos, H₂O destilada (só passar)
- 8 - Água acética a 1% 1 a 3 minutos
- 9 - Álcool 95% 100% xilol
- 10 - Plástico 24 horas
- 11 - Tirar o plástico e deixar suspenso 1 hora
- 12 - Tirar do rolo pendurar para secar 24 horas
- 13 - Emendar com durex na ordem certa

Papanicolau

Soluções

EA 65 - Estoque

Solução aquosa a 10% de light green, Bismarck Brown e eosina amarela

Preparar as 3 soluções alcoólicas em álcool 95%

A light green	0,05%
B Bismarck Brown	0,5%
C Eosina	0,5%

EA 65: A	150ml
B	40ml
C	180ml

Ácido fosfotungstico - 2,4gr. Filtrar e guardar em frasco escuro

Bateria de coloração para papanicolau

- 1 - álcool 95
- 2 - Álcool 50%
- 3 - H₂O corrente
- 4 - Hematoxilina de Harris 3 minutos
- 5 - H₂O corrente
- 6 - Diferenciar
- 7 - H₂O corrente
- 8 - Azular na água amoniacal
- 9 - H₂O corrente 10 minutos
- 10 Álcool 80%
- 11 - Álcool 95%
- 12 - OG6 2 minutos
- 13 - Álcool 95%

14 - Álcool 95%

15 - EA 36 3 minutos

16 - Álcool 95%

17 - Álcool 95%

18 - Álcool 95%

19 - Álcool 100%

20 - Álcool 100%

21 - Álcool 100%

22 – Xilol

23 – Xilol

24 – Xilol

25 - Montar

FEUGEN **(para D.N.A (núcleos))**

Soluções:

1 - Álcool clorídrico 1N	
Ácido clorídrico concentrado	83,5ml (SP 1,19)
H ₂ O destilada	1000 ml
Nota: Sp 1,18	85ml

2 - Reagentes de Schiff - (o mesmo do Pas)	
3 - Água Sulfurosa (o mesmo do Pas)	
4 - Verde luz 0,5%	
H ₂ O destilada	100ml

Método:

- 1 - Secções até H₂O destilada
- 2 - Lavar em ácido clorídrico 1N
- 3 - Hidrolizar em ácido clorídrico 1N pré-aquecido a 60°C por um tempo dependente do fixador

Carnoy	6 - 8'
Formalina	8'
Newcomer	6 - 8'
Zenker	5'

Nota: Colocar o controle a partir do 3º. eten

- 4 - Lavar em H₂O destilada
- 5 - Reagente de Schiff 30 -90'
- 6 - Água Sulfurosa - 1 minuto
- 7 - Lavar em 2 trocas de H₂O Sulfurosa por 2 minutos cada
- 8 - Lavar em H₂O destilada
- 9 - Verde-luz 30-60"
- 10 - Desidratar clarear e montar

Resultados:

DNA	vermelho
outros constituintes	verde

GIEMSA para Medula óssea

Bouin	13 segundos POT.10
-------	-----------------------

GIEMSA	13 segundos POT. 10 3:00 min POT 1
--------	---

1 - Solução de GIEMSA 5%

GIEMSA estoque	2,5ml
H ₂ O destilada	47,5ml

2 - Solução de ácido acético a 0,05%

0,05ml de ácido acético	100ml H ₂ O
-------------------------	------------------------

3 - Bateria de diferenciação

1 - ácido acético a 0,5%

2 - álcool 95 com 3 gotas de ácido acético para cada 100ml de álcool 95

3 - álcool 100 com 2 gotas de ácido acético para cada 100ml de álcool 100

Resultados:

Núcleos	azuis
Citoplasma	rosa
Granulos eosinofilos	vermelhos

Método:

1 - Desparafinar e levar até água corrente

2 - Refixar em Bouin a 60°.C na estufa 1 hora

3 - Lavar bem em H₂O corrente (até sair todo o amarelo do Bouin)

4 - Passar em H₂O destilada

5 - Corar pela solução de GIEMSA a 5% por 1 hora

6 - Diferenciar em ácido acético 0,025% (1 mergulho)

7 - Passar em álcool 95% (1 mergulho cada), álcool 100% (1 mergulho cada), Xilol e montar.

Obs.: Na diferenciação olhar no microscópio

Giemsa (tumores)

1 - Desparafinar e levar até a água destilada

2 - Colocar na seguinte solução: 1 hora

Água destilada	80ml
Solução de GIEMSA (merck)	20ml

3 - Colocar em 100ml de água destilada a qual se adicionou 3 a 4 gotas de ácido acético glacial puro, agitar as lâminas nesta solução por 2 a 3 segundos

4 - Álcool 95o. - contole ao microscópio

5 - Mergulhar 3 vezes em isopropanol, 2 minutos cada vez

6 - Xilol 3 vezes e montar.

Nota: Talvez seja interessante refixar os cortes após desparafinados em Bouin ou Zenker.

Os cortes de ganglio devem ser finos.

Solução de GIEMSA para lâminas com pouco azul

GIEMSA	1,5ml
H2O destilada	50ml
Bicarbonato de sódio 0,5%	2 gotas
Álcool metílico	1,5ml

Giemsa solução estoque

Giemsa (pó)	1gr.
Álcool metílico	66ml
Glicerina	66ml

Coloque glicerina e o Giemsa em um frasco a 50°.C por +/- 45 minutos agitando ocasionalmente. Quando o pó estiver bem misturado junte o álcool metílico. Misture bem. Filtre e use o filtrado.

Giemsa (sol. uso)	
Giemsa solução estoque	50 gotas
H ₂ O destilada	50 ml

Método:

- 1 - Álcool metílico 5 minutos
- 2 - Jenner 5 minutos
- 3 - Solução Giemsa 30 minutos
- 4 - Lavar em H₂O destilada
- 5 - Passar rapidamente na H₂O acética a 1%
- 6 - Desidratar xilol, montar

Resultado:

azul

vermelha rosa

núcleo, granulações basófilas e bacterianas
citoplasma e granulações acidófilas

Jenner

Eosina Y solução aquosa 1% 1000ml

Azul de metileno sol. aquosa 1% 1000ml

Misture e deixe por vários dias.

Filtre em filtro de Buchiner, lave o pre

GROCOTT PARA FUNGOS

Soluções:

a) óxido crômico 5%		
óxido crômico	5gr.	
H ₂ O destilada	100ml	
b) Bissulfito de Sódio 1%		
Bissulfito ou dissulfito de Sódio	1gr.	
H ₂ O destilada	100ml	
c) Nitrato de Prata 5%		
Nitrato de Prata (AgNO ₃)	5gr.	
H ₂ O destilada	100ml	
Guardar em geladeira		
d) Metanamina 3%		
Hexametilenotetramina	3gr.	
H ₂ O destilada	100ml	
Guardar em geladeira		
e) Solução de Borax a 5%		
Borato de Sódio	5gr.	
H ₂ O destilada	100ml	
f) Na hora do uso preparar:		
Metanamina	25ml	
H ₂ O destilada	25ml	
Solução de prata	2ml	
Solução de Borax	2ml	
Colocar na estufa para aquecer um pouco antes de usar		
g) Cloreto de ouro 0,2%		
Cloreto de ouro 0,5%	1 parte	1ml
H ₂ O destilada	4 partes	4ml
h) Hipossulfito de sódio 2%		
Hipossulfito ou tiosulfato de sódio	2gr.	
H ₂ O destilada	100ml	
i) verde luz (solução estoque)		
Verde luz	2gr.	
H ₂ O destilada	100ml	

Acrescentar 0,2ml de ácido acético

j) Verde luz (solução de uso)

10ml da solução estoque

50ml de H₂O destilada

Método:

1-Desparafinar e hidratar

2-Oxidar no ácido crômico 10 minutos

3-Lavar em H₂O corrente

4-Descorar pelo bissulfito de sódio 1% 1 minuto

5-Lavar em H₂O corrente 10 minutos

6-Passar em H₂O destilada 3 vezes ou mais

7-Colocar na solução de prata e levar à estufa a 60°. C. por 1 hora (controlar até adquirir a cor caramelo)

7-Lavar em H₂O destilada de 3 a 6 vezes

8-Colocar o cloreto de ouro sobre a lâmina e observar até que chegue a cor cinza lavar em H₂O destilada

9-Hipossulfito de sódio 2% até 5 minutos

10-Lavar em H₂O destilada

11-Contracorar com verde luz 30 segundos

12-Passar em H₂O rapidamente

Desidratar

Clarear

Montar com resina sintética

Ref. : Grocott RG. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori methanamine silver nitrate technique. Am. J Clin Pathol. 1955; 25: 975

GRAM
(para esfregaços)

Soluções:

1) Violeta cristal

Violeta cristal	25gr.
Álcool etílico	250ml

2) Oxalato de amonio

Oxalato de amonio	10gr.
H ₂ O destilada	1000ml

Preparar as soluções 1 e 2 separadamente e depois misturar. Esperar 24 horas e filtrar. A seguir diluir a 1:4 em H₂O destilada.

3) Lugol

Hidroxido de Sódio	4gr.
H ₂ O destilada	25ml

4) Iodo metálico 20gr.

Iodeto de potássio	1gr.
H ₂ O destilada	975ml

Preparar as soluções 3 e 4 separadamente. A seguir juntar as duas e ir aos poucos colocando H₂O

5) Álcool acetona

Acetona	1000ml
Álcool	3000ml

6) Safranina

Safranina	2,5gr.
Álcool	100,0ml
H ₂ O destilada	900,0ml

Triturar a safranina em álcool e depois misturar em H₂O

GROCOTT PARA FUNGOS (modificado para microondas)

FIXAÇÃO: formalina neutra tamponada

SEÇÕES: parafina : 4-6 micrometros

Soluções :

1-ácido crômico a 10 %

2-nitrato de prata a 5%

3-metanamina a 3%

4-bórax a 5%

5-bissulfito de sódio a 1 %

6-cloreto de ouro a 1%

7-verde luz a 0,2%

8-Solução de prata:

Solução estoque de nitrato de prata-metanamina

Nitrato de prata a 5 %	5ml
Metanamina a 3%	100ml

solução de trabalho de nitrato de prata- metanamina

solução estoque nitrato de prata-metanamina	25 ml
agua destilada	25 ml
bórax a 5 %	2 ml

Preparar antes do uso. Não usar se estiver turva.

Método:

1-desparafinar e hidratar até H₂O destilada

2-ácido crômico a 10 %- 20 segundos no microondas - potência máxima

3-deixar 10 segundos na solução quente

4-lavar em água corrente

5-bisulfito de sódio a 1 %- 60 segundos

6-lavar na água corrente

7-lavar 3X em água destilada

8-solução de prata - 20 segundos no microondas na potência máxima

9-deixar as lâminas permanecer na solução quente dentro de um becker com água a 60 graus

10- lavar 3X em água destilada

11- tonalisar em cloreto de ouro a 1 % por 10 segundos

12-lavar em água destilada

13- tiosulfato de sódio a 2 % - 1 minuto

14- lavar na água corrente- 2 minutos

15-verde luz 0,2 % por 30 segundos

16- lavar em água destilada, desidratar, clarear e montar

Resultado

fungos: forma do fungo delineado em negro

muco: cinza -claro

fundo : verde

Referência: Brinn, NT. Rapid metallic histological staining using the microwave oven. J Histotechnil. 1983; 6;125

GALLEGO
(Substitui o Giemsa)

Soluções:

1 - Fucsina de Ziehl acética

- | | |
|-------------------------------|----------|
| a) H ₂ O destilada | 10ml |
| b) Fucsina Ziehl fênica | 10 gotas |
| c) Ácido acético | 1 gota |

2 - Fixador diferenciador

- | | |
|-------------------------------|---------|
| a) H ₂ O destilada | 10ml |
| b) Formol comercial | 3 gotas |
| c) Ácido acético | 3 gotas |

3 - Solução Indigo Carmin

- | | |
|-------------------------------|-------|
| a) Indigo carmin | 1gr. |
| b) H ₂ O destilada | 100ml |

4 - Picro indigo

- | | |
|-----------------------------|----------|
| a) Solução de índigo carmin | 1 parte |
| b) Ácido pícrico aquoso | 4 partes |

Método:

1 - Desparafinar e levar até H₂O destilada

2 - Fucsina de Ziehl 10 - 15'

3 - H₂O destilada

4 - Fixador diferenciador 5'

5 - H₂O destilada

6 - Indigo carmin 5'

7 - H₂O destilada

8 - Álcool 95, 100, xilol e montar

HEMATOXILINA FOSFOTÚNGSTICA

(Boa para demonstração de Fibrina)

- 1 - Desparafinar e hidratar até água destilada.
- 2 - Fixar no mordente de Zenker com 5% de ácido acético por 3 ½ horas, na estufa.
- 3 - Tirar da estufa e deixar esfriando por 30 minutos.
- 4 - Lavar
- 5 - Remover cristais de cloreto de mercúrio com lugol (iodo de gram), por 15 minutos
- 6 - Lavar em água corrente
- 7 - Solução aquosa de hipossulfito de sódio 5% 3 minutos
- 8 - Lavar em água corrente por 10 minutos
- 9 - Corar na Hematoxilina Fosfotúngstica por 90 minutos na estufa
- 10 - Deixar esfriando por 15 minutos
- 11 - Desidratar rapidamente em álcool 95%, álcool absoluto clarear em xilol e montar.

Resultados:

Músculo	azul, com estrias transversais bem definidas.
Colágeno	vermelho
Núcleos	azuis
Fibrina	azul

HEMATOXILINA FOSFOTUNGSTICA

Soluções:

1 - Permanganato de potássio 0,25%

Permanganato de potássio	0,25%
H ₂ O destilada	100ml

2 - Ácido oxálico 5%

Ácido oxálico	5gr.
H ₂ O destilada	100ml

3 - Hematoxilina fosfotungstica

Hematoxilina	5gr.
H ₂ O destilada	400ml
Ácido fosfotungstico a 20%	20ml

Fazer a solução de Hematoxilina e água destilada, acrescentar sempre mexendo a solução aquosa de ácido fosfotungstico, dissolver com aquecimento brando. Deixar amadurecer durante 6 meses.

4 - Ácido fosfotungstico a 10%

Ácido fosfotungstico	10gr.
H ₂ O destilada	100ml

Método:

1 - Desparafinar e levar até água

2 - Bouin 60 minutos na estufa, 20' micro

3 - Lavar bem em H₂O corrente

4 - Permanganato de potássio, 10 minutos

5 - Lavar em H₂O corrente

6 - Ácido oxálico, 10 minutos

7 - Lavar em H₂O corrente

8 - Hematoxilina fosfotungstica 12 a 24 horas

9 - Álcool 95, 100, xilol, montar

HEMATOXILINA FOSFOTUNGSTICA ÁCIDA (para fibras gerais)

1 - Fixação
10%

formol neutro

2 – Permanganato de potássio

Permanganato de potássio	0,3gr.
Ácido sulfúrico concentrado	0,1ml
H ₂ O destilada	100ml

3 - Ácido oxálico 5%

Ácido oxálico	5gr.
H ₂ O destilado	100ml

4 - Sulfato ferrico amoniacal 4%

Sulfato ferrico amoniacal	4gr.
H ₂ O destilada	100ml

5 - Hematoxilina fosfotungstica ácida

Hematoxilina 1gr.

Ácido fosfotungstico

Ácido fosfotungstico	20gr.
H ₂ O destilada	1000ml

Dissolver os sólidos em porções separadas de água destilada, amadurecer por diversas semanas.

O amadurecimento espontâneo pode ser obtido adicionando 0,177 gr de permanganato de potássio. Esta solução pode ser usada imediatamente.

Método:

- 1 - Desparafinar até H₂O destilada
- 2 - Oxidar em permanganato de potássio acidificado por 15 minutos
- 3 - Lavar em água corrente 5 minutos
- 4 - Diferenciar em ácido oxálico 5% até a cor desaparecer
- 5 - Lavar 3 vezes em H₂O corrente
- 6 - Lavar em H₂O destilada
- 7 - Mordente em sulfato férrico amoniacal a 4% por 2 horas.
- 8 - Lavar em H₂O destilada por 3 horas
- 9 - Corar pela Hematoxilina pTAH por 2 horas
- 11 - Desidratar em álcool absoluto, clarear e montar.

Resultados:

Neuroglia	azul/preto
Miofibrilas	azul p/ preto
Oxônio	azul pálido p/ preto
Colageno	vermelho
Astrócitos	vermelho pálido
RBCS	azul/preto

CARBOL FUCSINA
(para *helicobacter pylori* e do *g. hominis* na mucosa gástrica)

- 1 – espécimes fixados em formalina ou Bouin
- 2 – Desparafinar, hidratar e levar até H₂O destilada
- 3 - Corar com carbol-fucsina 5'
- 4 - Lavar em H₂O corrente
- 5 - Diferenciar rapidamente em acetona
- 6 – Desidratar, diafanizar e montar em resina sintética

Solução requerida: Carbol – Fucsina

Fucsina - básica	0,4gr.
Cristais de fenol	2gr.
Álcool absoluto	4ml
H ₂ O destilada	100ml

Referência J. Clinical Pathology 42: 1004 - 1005, 1989

HEMATOXILINA DE CARAZZI

Hematoxilina pura	1,0gr.
Alumen de Potássio	50,0gr.
Iodato de Potássio	0,2gr.
Glicerina pura	200,0ml
H ₂ O destilada	800,0ml

Dissolver os ingredientes na glicerina e só depois juntar água.
Pode-se usar passada uma hora, logo que esteja azul escuro. Em
regra cora em 5 minutos e despensa diferenciação.

HEMATOXILINA DE HARRIS

1 - Solução de Hematoxilina a 10%

Hematoxilina	10gr.
Álcool 95%	100ml

2 - Hematoxilina de Harris

Hematoxilina a 10% em álcool	10ml	50ml
H ₂ O destilada	200ml	1000ml
Alume de amonio e potássio	20g	100g
Óxido de mercúrio	0,5g	2,5g

Dissolver o alumen em água quente, juntar a hematoxilina até levantar fervura, rapidamente adicionar o óxido de mercúrio, retirar da chama e esfriar o mais rápido possível, filtrar.

Obs.: A hematoxilina dissolve-se primeiro no álcool, melhor quente.

Método:

- 1-Desparafinar e levar até a água corrente
- 2-Corar pela Hematoxilina de Harris 5-10 minutos
- 3-Lavar bem em H₂O corrente
- 4-Diferenciar em ácido clorídrico a 1% em álcool 70% (+ ou - 5 mergulhos)
- 5-Lavar bem em H₂O corrente
- 6-Passar em água amoniacal até azular
- 7-Lavar bem em H₂O corrente
- 8-Passar álcool 80%
- 9-Corar pela eosina alcóolica 1 minuto.
- 10-Desidratar em álcool 70%, 95%, 100%
- 11-Clarear em xilol.
- 12-Montar com resina de sintética.

Resultado:

núcleo	azul escuro
Citoplasma	rosa

CONGELAÇÃO

HEMATOXILINA E EOSINA

- 1 - Se o fragmento estiver fixado em formol a 10% ou 15% lavar em H₂O corrente.
- 2 - Colocar no microtomo e congelar
- 3 - Cortar , pescar em lâminas silanizadas Se estiver sem fixação, fixar os cortes em formol acético
- 4 - Corar pela hematoxilina 30"
- 5 - Lavar bem em água
- 6 - Corar pela eosina 30"
- 7 - Passar em álcool 70, 95, 100, xilol e montar.

HEMATOXILINA DE HEIDENHAIN

Soluções:

1 - Sulfato de amonio férrico a 5%

2 - Hematoxilina de Heidenhain

Hematoxilina	1g
Álcool etílico absoluto	20ml
H ₂ O destilada	180ml

Dissolva com leve aquecimento em uma placa elétrica quente e deixe amadurecer por 3 a 4 semanas. Filtre antes de usar.

3 - Sulfato de amonio e férrico a 1%

Método:

1 - Desparafinar e levar até H₂O corrente

2 - Colocar no sulfato de amonio férrico a 5% por 3 horas ou overnight (mordente)

3 - Enxague em H₂O destilada

4 - Hematoxilina de Heidenhain por 1 a 6 horas. Nota coloração por 45 minutos a 45°C também dá bons resultados.

5 - Lave em H₂O corrente por 2 a 5 minutos

6 - Enxague em H₂O destilada

7 - Diferenciar em sulfato amoniférrico a 1%. Controle ao microscópio

8 - Lave em H₂O corrente por 10 a 20 minutos

9 - Contra core se desejar

10 - Passar em H₂O destilada

11 - Desidratar, clarear e montar.

Resultado:

Núcleo	preto
Mitocondria	preto
figuras metóticas	preto
estriações musculares	preto

CONGELAÇÃO

HEMATOXILINA E EOSINA

- 1 - Se o fragmento estiver fixado em formol a 10% ou 15% lavar em H₂O corrente.
- 2 - Congelar com isopentano e nitrogênio
- 3 - Cortar pescar em lâminas silanizadas
- 4 - Fixar os cortes em formol acético (sómente os fragmentos que não foram fixados anteriormente no formol)
- 5 - Corar pela hematoxilina 30"
- 6 - Lavar bem em água
- 7 - Corar pela eosina 30"
- 8 - Passar em álcool 70, 95, 100, xilol e montar.

Nota: Nos HE de congelação quando a suspeita é tumor corar também **Tionina**

1 - Solução de Hematoxilina a 10%

Hematoxilina	10gr.
Álcool 95%	100ml

2 - Hematoxilina de Harris

Hematoxilina a 10% em álcool	10ml	50ml
H ₂ O destilada	200ml	1000ml
Alume de amonio e potássio	20g	100g
Óxido de mercúrio	0,5g	2,5g

Dissolver o alumen em água quente, juntar a hematoxilina até levantar fervura, rapidamente adicionar o óxido de mercúrio, retirar da chama e esfriar o mais rápido possível, filtrar.

Obs.: A hematoxilina dissolve-se primeiro no álcool, melhor quente.

3- Eosinas

Eosina Y.	1,0gr.
H ₂ O destilada	20ml

Dissolver e adicionar

Álcool 95	80ml
-----------	------

Solução de uso

Solução Estoque	1 parte ou 25ml
Álcool 80%	3 partes ou 75ml

Antes do uso, adicionar 0,5ml de ácido acético glacial para cada 100ml de solução.

TIONINA

Preparo da solução de Metil tionina
azul de metil tionina 5 gramas
agua destilada 1000 ml

MÉTODO

(cortes de congelação)

1-Passar a lâmina por alguns segundos em formol 10%, tamponado

2-Lavar em água corrente

3-Corar pela Tionina (só passar)

4-Desidratar em álcool 95^o, 100^o, xilol e montar

**IMPRINT
H.E**

Álcool 100º	20 segundos
Hematoxilina	40 segundos
Eosina.	só passar
Bateria com 70 ⁰ , 95 ⁰ , 100 ⁰ , xilol e montar	

IMUNOFLUORESCÊNCIA

Cortes de congelação fixados em acetona 10'

Solução

Tampão PBS pH 7,2 0,01M

Na Cl	8,2
Na ₂ H PO ₄ 12H ₂ O	2,65g
Na H ₂ PO ₄ H ₂ O	0,35g

Dissolver em 1000ml de H₂O destilada

Método:

1-Secar as lâminas atrás e em volta do corte e circular com esmalte.

2-Lavar 30 minutos 3 trocas de 10'cada PBS

3- Secar as lâminas e pingar os conjugados

4-Diluir os conjugados em azul de evans 20% em PBS:

IGG 1:20	IGA 1:20	IGM 1:30	C3 1:20	Fibrinogênio 1:20
-------------	-------------	-------------	------------	----------------------

5- Lavar em tampão PBS 3 vezes 10' cada

6- Montar em meio próprio. Colocar esmalte nas bordas

KOSSA
Revelador de cálcio

Soluções:

1 - Nitrato de prata 5% recente

Nitrato de prata	5g
H ₂ O destilada	100ml

2 - Hipossulfito de sódio a 5%

Tiosulfato de sódio	5g.
H ₂ O destilada	100ml

Método:

1 - Desparafinar e hidratar até H₂O destilada

2 - Pingar o nitrato de prata 5% e expor à luz intensa (sol ou lâmpada) 35 minutos

3 - Lavar em H₂O destilada

4 - Hipossulfito de sódio a 5% - 3 minutos

5 - H₂O destilada 2 vezes

6 - Contracorar com eosina 30 segundos ou vermelho neutro - 5 minutos

LEISHMANN

Azul de metileno	0,2g
Álcool metílico	100ml
Guardar em frasco escuro	

Método:

Fazer o esfregaço deixar secar e corar pelo leishmann 3 minutos cobrindo o esfregaço, pingar H₂O tamponada até cobrir a lâmina e deixar mais 10 minutos. Lavar em H₂O de torneira.

ÁGUA DESTILADA TAMPONADA PARA LEISHMANN

Solução 1: Hidrogênio fosfato de sódio primário

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ 10,35g

Solução 2: Fosfato dissódio

Na_2HPO_4 1,0625g

H_2O destilada 500ml

3 - Tampão fosfato: misturar:

solução 1 2,4 ml

solução 2. 7,6ml da

H_2O destilada 2.000ml

4 - H_2O destilada tamponada

Tampão fosfato 50ml

H_2O destilada 1000ml

MOVAT

Fixação: Usar formalina neutra tamponada a 10% ou formol acético
Cortes em parafina até 6 μ

Soluções:

1 - Solução de alcian Blue a 1%

Alcian Blue 8GS	1,0g
H ₂ O destilada	100ml
Ácido acético Glacial	1,0ml

2 - Solução álcool - alcalina

Hidroxido de amonio	10,0ml
Álcool 95%	90,0ml

3 - Solução de hematoxilina 5% em álcool

Hematoxilina	5g
Álcool absoluto	100ml

b) Cloreto ferrico aquoso 10%

Cloreto ferrico	10g
H ₂ O destilada	100,0ml

Solução de Iodine (iodo) (lugol forte)

Iodo	2g
Iodeto de Potássio	4g
H ₂ O destilada	100ml

Na hora do uso juntar :

Hematoxilina 5%	25ml
Cloreto ferrico 10%	12ml
Lugol forti	12ml

4 - Solução de Tiosulfato 5%

Tiosulfato de sódio	5,0g
H ₂ O destilada	100,0ml

5 - Solução croceina Scarlat-fucsina ácida

Solução estoque	
Croceina brilhante moo	1gr.
Completar H ₂ O destilada	100ml
Ácido acético glacial	5ml

b) Solução estoque

Fucsina ácida 1g
H₂O destilada 100ml - completar

Ácido acético glacial

Na hora do uso misturar de solução A com a solução B

Solução A	Solução B
4 partes	1 parte
400ml de solução	100ml de solução B

6 - Solução de Safran alcólico

Safran du Gatinais 6g

Álcool absoluto 100ml

Obs.: Manter bem fechado para prevenir hidratação

Método:

- 1 - Desparafinar e hidratar até H₂O destilada
- 2 - Corar pelo alcian blue - 20 minutos
- 3 - Lavar bem em H₂O corrente - 5 minutos
- 4 - Álcool-alcálico - 1 hora
- 5 - Lavar em H₂O corrente por 10 minutos
- 6 - Lavar em H₂O destilada
- 7 - Corar na solução de Hematoxilina por 15 minutos
- 8 - Corar diversas vezes em H₂O destilada
- 9 - Diferenciar em cloreto ferrico 2% (1 minuto); lavar em H₂O destilada
- 10 - Tioissulfato de sódio - 1 minuto
- 11 - Lavar em H₂O corrente por 5 minutos
- 12 - Lavar em H₂O destilada
- 13 - Prepara na hora, corar pela croceina escarlata fucsina ácida 1 ½ minuto
- 14 - Lavar diversas vezes em H₂O destilada
- 15 - Passar na solução ácido acético 0,5%
- 16 - Passar as lâminas em solução ácido fosfotungstico 5% duas passagem de 5 minutos cada

17 - Lavar em água acética 0.5%

18 - Lavar em duas passagem de álcool absoluto

19 - Corar no safran por 10 minutos

20 - Lavar em uma passgem de álcool absoluto e duas vezes xilol e montar.

Resultados:

Núcleos e fibras elásticas

preto

Colágeno e fibras reticulares

amarelo

Mucina e fundo

azul

fibrina e músculo

vermelho

Ácido clorídrico 0,1N

$$N = \frac{n^{\circ} \cdot E_q}{V(L)}$$

N = normalidade da solução
V + volume da solução em litros
 $n^{\circ} \cdot E_q = n^{\circ}$ de equivalentes - grama do soluto.

$$N = \frac{m}{E \cdot V(L)}$$

m = massa do soluto em grs
E = valor em gramas de um equivalente da substância de massa "m"

Hcl concentrado (36% d = 1,19 g/cm³)

$$0,1 = \frac{m}{36,65 \cdot 0,25} \Rightarrow m = 0,9125 \text{g de HCL puro}$$

Como não dispomos de HCL puro então 36%

100g contém 36g HCL

X contém 0,9125g HCL

$$X = 2,53 \text{g}$$

HCL 36%

Passando para volume teremos:

$$D = \frac{M}{V} \therefore V = \frac{M}{d} \quad V = \frac{2,53 \text{g}}{1,198/\text{cm}^3}$$

$$V = 2,1 \text{cm}^3$$

HCL 1N = 250H₂O destilada + 2,1ml HCL concentrado

MUCOPOLISSACÁRIDES

Classificação:

1 - **Neutros** : PAS +

2 - **Ácidos**:
simples ou não sulfatados tecido epitelial :PAS + AB pH2,5
tecido conjuntivo: PAS +AB pH2,5
complexos ou sulfatados tecido epitelial: PAS + AB pH1,0
gl. sal., duodeno ,. colon
tecido conjuntivo: - PAS+AB pH0,5
cartilhagem, coração
valvula, . aorta , pele

MILLER

(Para fibras elásticas)

Fixação formol tamponado 10%, formol sublimado, Heidenheim's Susa. Helly, Zenker, Clacker's e Bouin

Soluções

Preparação do corante:

Victoria Blue 4R	1g.
New Fucsina	1g
Violeta cristal	1g

Dissolver em 200ml de H₂O destilada quente e então adicionar na seguinte ordem.

Resorcina	4g
Dextrin	1g

1-30ml de cloreto ferrico a 30% (preparado na hora)

2-Ferver por 5 minutos, filtrar enquanto quente

3-Tranferir o precipitado mais o papel de filtro para o becker original e redissolver com 200 cm³ de álcool 95%. Ferver em placa quente; ou em banho de água por 15 a 20 minutos

4-Filtrar e acertar para 200 cm³ com álcool 95

5-Finalmente adicionar 2 cm³ de ácido hidroclicorido concentrado.

Método:

1-Retirar os pigmentos de mercúrio se fixado por fixadores mercuriais

2-Colocar no permanganato de potássio 0,5% - 5 minutos

3-Lavar em H₂O destilada

4-Lavar em álcool 95%

5-Corar em uma cuba de Koplín por 1 a 3 horas

6-Alternativamente diluir o corante a 50% com álcool 95 e corar overnight

7-Lavar com álcool 95 para remover o excesso de corante

8-Lavar em H₂O

9-Contracorar com Van Gieson ou Tricromico de Masson

MILLER (ELÁSTICAS)

Método

1-Xilol 5 minutos

2-Xilol 1 minutos

3-Álcool 100 - 30 segundos

4-Álcool 70 - 30 segundos

5-Corante de Miller 35 minutos. Quando for pulmão inflado deixar 1 hora

6-Lavar em água corrente

7-Remover o excesso

8-Cloreto férrico 30% - 10 minutos

9-Lavar em H₂O corrente - 5 minutos

10-Álcool 70 - 10 minutos

11-Lavar em H₂O corrente

12-Contra corar com Van Gieson - 3 minutos

Álcool 100, xilol e montar

Müller

1 hora - Corante de Müller

1 minuto - Cloreto Fe 30%

30 segundos - Álcool 70%

3 minutos - Van Gieson

Secar no papel de filtro

1 Álcool 100%

Xilol

MASSIGNANI Malferrani
(para Corpúsculos de Negri)

Fixação: formalina neutra tamponada a 10%
Cortes em parafina - secções a 4 micrans

Soluções:

1 - Hematoxilina de Harris sem ácido acético.

2 - Solução de ácido Hdroclorídrico a 0,5%

Ácido Hidroclorídrico

0,5ml

H₂O destilada

100,0ml

3 - Solução de carbonato de lítio

Solução aquosa saturada de carbonato de lítio

1ml

água destilada

200ml

4 - Solução de eosina - ácido fosfotungstico

eosina

1g

ácido fosfotungstico

0,7g

Adicionar 10ml de H₂O destilada, completar com 190ml de álcool absoluto, adicionar 2 gotas de sol. saturada de lítio e agitar por 10 minutos. Esta suspensão é filtrada. Para melhor resultado é necessário que as 2 substâncias sejam trituradas no estado sólido.

Método:

1-Desparafinar e hidratar até H₂O destilada

2- Hematoxilina de Harris - 2 minutos

3- Lavar em H₂O corrente por 5 minutos

4- Mergulhar 8 vezes em sol. de ácido clorídrico e lavar 5 minutos em H₂O corrente

5- Solução de Carbonato de Lítio por 1 minuto

6- Lavar em H₂O corrente por 10 minutos e desidratar em alc 50, 70, 80, 90, 95, 100 (10 mergulhos em cada)

7- Corar por 8 minutos na solução de eosina. Lavar em H₂O 5 minutos

8- Desidratar com mergulhos rápidos em álcool 50, 70, 80, 90 e longos mergulhos no 95%

9- Fazer 2 ou 3 trocas de álcool 100, 4 minutos cada

10- Secar em papel de filtro

11- Clarear com 2 trocas de xilol, 4 minutos cada

12- Montar com Permout ou Histoclad.

Resultados:

Corpusculos de Negri
Núcleos

vermelho profundo
azul claro

Referência: Massignani, A.M. e Malferrari, R. Satain Tech. 36/5-8, 1961

METIL GREEN PIRONINA (para células plasmáticas)

Soluções:

1- Tampão de ácido acético pH 4,8 - 0,1 N	
ácido acético	0,8ml
água destilada	100ml
2- Acetato de sódio 0,1 N	
acetato de sódio	1,36g
água destilada	100ml
3- Acido acético 0,1 N	
ácido acético	40ml
acetato de sódio 0,1 N	60ml
4: Metil Green 2%	
Solução de Metil Green	0,2g
água destilada	10ml
4: Pironina 5%	
Pironina	0,5g
água destilada	10ml
5: Misturar	
pironina	3,5ml
metil green 2%	2,0ml
água destilada	50,0ml

Solução de uso
Na hora de usar diluir em partes iguais com tampão de acetato

Método:

- 1-Desparafinar e levar até água destilada
- 2- Metil Green Pironina de 15 a 60 minutos
- 3- Lavar em água destilada
- 4- Secar com papel de filtro
- 5- Lavar rapidamente com 2 mudnças de acetona 1 a 2 segundos
- 6- Acetona-Xilol
- 7- Clarear em xilol e montar

Resultado:

Núcleo	Verde
Citoplasma	Rosado
DNA	Verde
RNA	Rosado

MAXIMOV

Para medula óssea e outras

Soluções:

1 - Maximov

eosina y	0,5g
H ₂ O destilada	375ml

Obs: Funciona melhor quando amadurecida pelo tempo

2 - Azur II

- Azur II	0,5g
H ₂ O destilada	500ml

3 - No momento do uso misturar:

H ₂ O destilada	50ml
eosina y	5ml
Azur II	5ml

Método:

- 1 - Desparafinar e levar até H₂O destilada
- 2 - Coloração nuclear com Hematoxilina de Carazzi 5 minutos
- 3 - Lavar bem em H₂O corrente e depois destilada
- 4 - Coloração pelo Azur II - eosina 18 horas +/-
- 5 - Diferenciação pelo álcool 95% até as células ficarem bem distintas
- 6 - Desidratar em álcool absoluto xilol e montar.

MÉTODO DO N.B.T

Reativos:

1-Fosfato do Sódio Monobásico 0,1m - ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

Fosfato de sódio mono 13,8g

H_2O q.s.p. 1000ml

2-Fosfato de Sódio Bibásico 0,1M - ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

Fosfato de sódio biba 35,814g

H_2O q.s.p. 1000ml

USO

Fosfato de sódio mono 32ml

Fosfato de sódio biba q.s.p. 200ml (ou 168ml)

Adicionar 0,1g ou 100mg N.B.T.

Misturar bem e colocar no B.M. a 37°C por 20 ou 30 min.

1 Preparo do tampão:

Pesar 13,8gr. do fosfato monobásico

Pesar 35,8gr. do fosfato bibásico

Diluir cada um em 1 litro de água destilada (de preferência fervida).

Na hora do uso: misturar 32ml do monobásico + 168ml do bibásico

Perfazendo um total de 200ml

2 - Adicionar 0,1gr de NBT

3 - Pesar se necessário 5,403g de succinato de sódio (+ 6 horas de óbito)

4 - Misturar bem

5 - Colocar no banho-maria a 37°C por 20 - 30 minutos.

PERLS
(para demonstração de ferro)

Soluções:

1 - Ferrocianeto de potássio a 10%

Ferrocianeto de potássio	10g
H ₂ O destilada	100ml

2 - Solução de ácido clorídrico a 10%

Ácido clorídrico	10ml
H ₂ O destilada	100ml

3 - Vermelho neutro 1% ou vermelho rápido

Vermelho neutro	1g
H ₂ O destilada	100,0ml

4 - Na hora do uso preparar:

Ferrocianeto de potássio a 10%	7ml
Ácido clorídrico a 10%	3ml

Método: Cortes a 5 micros, desparafinados e levados até H₂O destilada

1 - Solução de Ferrocianeto de potássio 10% - 1,5 minutos

2 - Escorrer e pingar a mistura ferrocianeto + ácido clorídrico - 5 minutos

3 - Lavar bem em H₂O destilada

4 - Corar os núcleos com vermelho neutro - 5 minutos

5 - Lavar em H₂O destilada, desidratar, xilol e montar.

Obs.: Na falta de vermelho neutro usar carmalumen de mayer ou fucsina 5 segundos. Se usar carmalumen de Mayer, corar 5 minutos no ferrocianeto de potássio

Resultado:

Ferro em verde vivo e núcleos em rosa avermelhado

PAS/ ALCIAN BLUE

Método:

- 1 - Desparafinar e levar até H₂O destilada
- 2 - Colocar na solução de Alcian Blue por 30 minutos - pH=2,5
- 3 - Se o Alcian Blue usado for pH 2,5 lavar em H₂O destilada
- 4 - Ácido periódico 0,5% por 5 minutos
- 5 - Lavar em H₂O destilada
- 6 - Reagente de Schiff por 15 minutos
- 7 - Água sulfurosa (3 banhos de 40 segundos cada)
- 8 - Lavar em H₂O corrente 5 minutos
- 9 - Hematoxilina de harris 1 a 4 minutos
- 10 - Lavar em H₂O corrente, desidratar, clarear e montar.

Nota: O ácido periódico, reagente de Schiff e água sulfurosa são do PAS.

Colocar Z, controles — PAS
 └ Alcian Blue

ATENÇÃO: PAS com DIASTASE
 ALCIAN BLUE pH=2,5

PAMS

(Para membranas basais dos glomérulos renais)

soluções:

1 - Ácido periódico 0,5%

Ácido periódico	0,5g
H ₂ O destilada	100ml

2 - Metanamina a 3%

Hexametilenotetiamina	3g
H ₂ O destilada	100ml

3 - Nitrato de prata a 5%

Nitrato de prata	5g
H ₂ O destilada	100ml

4 - Cloreto de ouro 0,1%

5 - Hiposulfito de sódio 2%

Tiosulfato de sódio	2g
H ₂ O destilada	100,0ml

6 - Na hora do uso preparar:

Metanamina a 3%	25ml
H ₂ O destilada	25ml
Nitrato de Prata a 5%	2ml
Borax a 5%	2ml

7 - Borato de sódio a 5% (Borax)

Borato de sódio	5g
H ₂ O destilada	100ml

Método:

1 - Desparafinar e levar até H₂O corrente

2 - Refixar em Bouin 1 hora a 56°C

3 - Lavar bem em H₂O corrente

4 - Ácido periódico a 0,5% - 10 minutos

5 - H₂O corrente 10 minutos. H₂O destilada 3 vezes ou mais

6 - Solução de prata + metanamina + borax 1 hora a 60°C

7 - H₂O destilada 3 vezes ou mais

8 - Cloreto de ouro a 0,1% até ficar cinza

9 - H₂O destilada

10 - Hipossulfito de sódio a 2% até 5 minutos

11 - H₂O corrente

12 - Contracorar com eosina ou tricromico de masson (consultar o médico)

13 Desidratar, clarear e montar

Resultado:

Núcleos e Basais

Negro

Fibras intercelulares

vermelho

Colágeno e muco

azul

PRATA AMONÍACAL

(Melanina)

1 - Desparafinar os corte até a água

2 - Em 5ml de Nitrato de Prata 10% adicionar 15 ou mais gotas de Hidróxido de sódio a 10%. Produz-se precipitado enegrecido. Pingar amoníaco até dissolver o precipitado (usar 20ml). Pingar nitrato de prata 10% até conseguir uma aparência persistente (castanho claro). Completar com água destilada para obter 100ml. Deixar repousar 1 hora, filtrar no momento de usar, colocar na estufa, seguir como o Grocott.

3 - Lavar em água destilada

4 - Contracorar com carmalumen durante 30 minutos

Lavar em água destilada

Álcool 95, absoluto, xilol.

P.S.: **Método** da patologia da Dermatologia,

PAS/ ALCIAN BLUE
(PARA MUCOSUBSTÂNCIAS)
pH 2,5 ou 1,0

Método

- 1 - Desparafinar e hidratar
- 2 - Solução de Alcian Blue (pH 2,5 ou 1,0) 30 minutos
- 3 - Diferente segundo o PH
 - a) para pH 1,0 secar em papel de filtro
 - b) para pH 2,5 lavar em H₂O por 5 minutos
- 4 - Oxidar em ácido periódico 10 minutos
- 5 - Lavar em H₂O corrente 5 minutos
- 6 - Reativo de Schiff - 10 minutos
- 7 - Lavar em metabissulfito de sódio, 2 trocas de 2 minutos cada
- 8 - Lavar em H₂O corrente 10 minutos
- 9 - Desidratar em álcool 95, absoluto, xilol, montar

Soluções

- 1 - Ácido - periódico a 1%

Ácido - periódico	1g
H ₂ O	100ml

- 2 - Reativo de Schiff (ver ficha PAS)

- 3 - Alcian Blue pH 2,5 ou pH 1,0 (ver ficha Alcian Blue)

- 4 - Metabissulfito de sódio a 0,5%

Metabissulfito de sódio	0,5g
H ₂ O	100 ml

MÉTODO DE PREPARO DE PARAFINA

Parafina	5kgs
Estearina	125g
Vaselina	100ml
Cera de abelha	150grs

PRATA METANAMINA (PARA PNEUMOCITE CARINII E FUNGOS)

Soluções :

- 1 - Ácido crômico 10% (CrO_3)
- 2 - Nitrato de prata 5% (AgNO_3)
- 3 - Metanamina aquosa 3% (Hexametilenotetramina - $\text{CH}_2\text{I}_6\text{N}_4$)
- 4 - Borax aquoso 5% (Borato de sódio $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)
- 5 - Solução de cloreto de ouro 1% ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
- 6 - Metabisulfito de sódio 1% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3^4$)
- 7 - Tiosulfato de Sódio 5% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

8 - Solução de uso:

metanamina 3%	40ml
nitrato de prata 5%	2ml

O precipitado branco pode desaparecer agitando

Adicionar 3ml de borax a 5% e completar o volume com H_2O para o total de 80ml.

Essa solução deve ser usada quente até chegar a marron dourado profundo. Deve-se ter cuidado para que o super aquecimento não precipite toda a prata na lâmina.

Método:

- 1 - Desparafinar e levar as secções até H_2O destilada. Quando esfregações, secar ao ar.
- 2 - Ácido crômico 10% - 10 minutos (despreza depois do uso)
- 3 - Lavar em H_2O corrente por alguns segundos
- 4 - Metabisulfito 1% - 1 minuto
- 5 - Lavar em H_2O corrente quente 1 minuto (até que a cuba es quente)
- 6 - Colocar na mistura prata/metanamina até ficar marron dourado. Isto será em aproximadamente 2 minutos se a solução estiver suficientemente quente.
- 7 - Lavar em H_2O torneira quente e esfriar gradativamente para não quebrar a cuba.

8 - Lavar em H₂O destilada

9 - Colocar o cloreto de ouro 1% aproximadamente 10 segundos.
Essa solução pode ser reaproveitada.

10 - Lavar em H₂O destilada

11 - Colocar em tiosulfato sódico 5% - 3 minutos

12 - Lavar em H₂O corrente

13 - As lâminas podem ser contracoradas com H.E light Green ou outro corante.

14 - Desidratar em álcool 95, absoluto, xilol e montar.

Resultado:

A especificidade e sensibilidade deste método é a mesma do Grocott. Pode ser usado para secções de parafina, secções congeladas, citológicos e imprints.

A coloração é característica e morfológica para *P. Carinii* e fungos, incluindo *Aspergillus*, *Apiospermum* e *Louloopsis* *Glahata*.

PROCEDIMENTO PARA O USO DA CITOCENTRÍFUGA - CYTOSPIN

USAR LÂMINAS SILANISADAS

SET TIME	10	ENTER
ENTER	SET SPEED 1.400	ENTER
ACCEL	HIGH	
START		

Líquido Pleural:

- 3 lâminas no álcool 95%
- 1 lâmina a seco
- Corar: 2 PAPAS e 1 LEISHMAN

Líquido Ascítico e de Diálise:

- 1 lâmina no álcool 95%
- 1 lâmina a seco
- Corar: 1 PAPA e 1 LEISHMAN

Urina

- 7 lâminas no álcool 95%
- 1 lâmina a seco
- 4 lâminas com POLY ou ORGANO no álcool 95%
- Corar: 2 PAPAS, 1 LEISHMAN, 1BH, 1 ZIEHL, 1 GROCOTT

O restante da urina entregar para a Eletrônica

OKAMOTO E UTAMURA (para cobre)

Soluções:

1 - Solução Estoque saturada de Rodanina	
Rodanina (5 p.dimetilaminobenziledene)	0,2g
Álcool absoluto	100ml
2 - Solução de Rodanina para uso	
Solução saturada de Rodanina	6ml
H ₂ O destilada	94ml
Nota: Agitar bem antes de misturar a solução estoque	
3 - Solução diluída de Hematoxilina de mayer	
Hematoxilina de mayer	50ml
H ₂ O destilada	50ml
4 - Solução a 0,5% de borax	
Borato de sódio	0,5g
H ₂ O destilada	100ml

Coloração:

- 1 - Material fixado em formalina neutra
- 2 - Desparafinar e ir até H₂O destilada
- 3 - Incluir na solução de uso de Rodanina a 37°C por 18 horas
- 4 - Lavar bem em múltiplas mudas de H₂O destilada
- 5 - Corar na solução diluída de Hematoxilina de mayer por 10 minutos
- 7 - Mergulho rápido na solução 0,5% de Borato de sódio
- 8 - Mergulhar bem em H₂O destilada
- 9 - Álcool 95%
- 10 - Duas mudas de álcool absoluto, 1 minuto cada
- 11 - Clarear em três mudas de xilol
- 12 - Montar em Permount ou em resina sintética.

Resultados:

Cobre	vermelho vivo
Fundo	azul claro

Ref.: Arch. of Parth. 87: 370-379, 1969. Procedência da Roanina: Catálogo nO 2748 da Eastman Organic Chemicals Distillation Products Industries, Rochester, N.Y.

GOMORI
(para reticulos)

Soluções:

1 - Nitrato de prata 10%

Nitrato de prata	10g
H ₂ O destilada	100ml

2 - Hidroxido de potássio 10%

Hidroxido de potássio	10g
H ₂ O destilada	100ml

3 - Solução de prata amoniacal

Nitrato de prata 10%	10ml
Hidroxido de potássio 10%	2,5ml

Adicionar gota a gota sol. de Hidroxido de amonio a 28%, agitando o frasco continuamente, até a dissolução completa do precipitado. Juntar outra vez, cuidadosamente, gotas de nitrato de prata (10%) até que o precipitado que se forma desapareça facilmente com a agitação.

Completar com H₂O destilada até dobrar o volume

Guardar a solução em vidro limpo escuro. Duração 7 dias.

4 - Solução de permanganato de Potássio a 0,5%

Permanganato de potássio	0,5g
H ₂ O destilada	100ml

5 - Solução de metabissulfito de Potássio a 2%

Metabissulfito de Potássio	2g
H ₂ O destilada	100ml

6 - Solução de sulfato férrico amoniacal 2%

Sulfato ferrico amoniacal	2g
H ₂ O destilada	100ml

7 - Solução de formalina a 20%

Folmaldeido 37 - 40%	20ml
H ₂ O destilada	80ml

8 - Solução de cloreto de ouro 0,2%

Cloreto de ouro a 1%	10ml
H ₂ O destilada	40ml

9 - Solução de tiosulfato de sódio a 2%

Tiosulfato de sódio	2g
H ₂ O destilada	100ml

Método:

- 1 - Fixar em formalina tamponada neutra 10%
- 2 - Desparafinar hidratar e levar as lâminas até a água destilada
- 3 - Oxidar em permanganato de potássio a 5% - 1 minuto
- 4 - Lavar em H₂O corrente 2 minutos
- 5 - Diferenciar em solução de metabissulfito de K a 2% - 1 minuto
- 6 - Lavar em H₂O corrente 2 minutos
- 7 - Passar na solução de sulfato ferrico amoniacal - 1 minuto
- 8 - Lavar em H₂O corrente
- 9 - Lavar em H₂O destilada (dias passagens de 30 segundos)
- 10 - Impregnar na solução de prata amoniacal, 1 minuto
- 11 - Lavar em H₂O destilada por 20 segundos
- 12 - Reduzir na solução de formaldeido a 20% por 3 minutos
- 13 - Lavar em H₂O corrente 3 minutos
- 14 - Matizar em cloreto de ouro até ficar cinza
- 15 - Lavar em H₂O destilada
- 16 - Reduzir na solução de metabissulfito de K a 3% - 1 minuto
80ml
- 17 - Fixar em solução de tiosulfato de sódio a 2% - 1 minuto
- 18 - Desidratar em 2 álcoois 95, 2 absolutos, 2 xilois montar.

Resultado:

Fibras Reticulinas	negro
Coloração de fundo	cinza

Nota: Esse **Método** é muito bom para demonstrar reticulina do SNC

SIRIUS RED

Soluções

1- Hematoxilina de Harris

2-Sirius Red

Sirius Red

0,2g

Ac. pícrico saturado

100ml

3- Solução ácida pH 2,9

HCL 1N

55 gotas

H₂O destilada

100ml

Método:

1 - Desparafinar e levar até H₂O

2 - Corar para Hematoxilina de Harris 5 minutos

3 - Corar durante 1 hora na Pícro sirius

4 - Lavar as lâminas em solução ácida pH 2,0 - 10 minutos

5 - Desidratar e montar

Obs.: Troca o corante uma vez por mês se este for muito usado

SUDAN BLACK

Soluções:

1-Sudan black (Cl. 26150)	
Sudan black	0,5g
Propileno Glicol	100,0ml

Cortes a 10 μ em material congelado

Método:

- 1 - Secções congeladas em H₂O destilada ou desparafinar e levar até H₂O destilada
- 2 - Propileno Glicol 100% - 3 minutos
- 3 - Corar no Sudan Black, se em cortes congelação, 5 minutos, se em cortes parafinar, 8-16 horas.
- 4 - Propileno Glicol 85% - 2 minutos
- 5 - Lavar em H₂O destilada
- 6 - Solução aquosa de vermelho neutro a 1% 30 a 60 segundos.
- 7 - Lavar em H₂O destilada
- 8 - Montar em gelatina - glicerina

Resultados:

Núcleos	vermelho
Lípides	azul/preto
Mielina	preto

TIOFLANINA T

Soluções:

1 – Tioflanina T
Tioflanina T 1 grama
H₂O destilada 100ml

Filtrar em papel de filtro nº 1. Aquecer até 50 –60

Obs.: Essa solução é estável por 10 dias no refrigerador

Método:

- 1 - Fixar em formalina neutra 10%
- 2 - Lavar as lâminas até H₂O destilada
- 3 - Corar pela Hematoxilina de Harris por 2 minutos
- 4 - Lavar bem em H₂O corrente 5 minutos
- 5 - Solução de Tioflavina T 3-8 minutos
- 6 - Lavar em H₂O
- 7 - Diferenciar em ácido acético 1% por 5 minutos
- 8 - Lavar em 2 mudanças de H₂O destilada de 1 minuto cada.
- 9 - Montar no meio de Apaty

Resultados:

A fluorescência é melhor visualizada com filtro BG-12 em combinação com OG-2.

Amiloide verde brilhante

Fundo verde pálido

TRICROMICO DE GOMORI

Solução

1-Solução A - Weigert:

Hematoxilina	1g
Álcool 95	100ml

2-Solução B - Weigert:

Percloro de ferro 30%	8ml
Ácido clorídrico	2ml
H ₂ O destilada	190ml

Na hora do uso juntar partes iguais de solução A e B

3-Solução Tricromica

Chromatope 2R	1,8g
Verde Luz	0,9g
Ácido Acético	3cc
Ácido fosfotungstico	2,4g
H ₂ O destilada	300cc

Obs.: O verde luz pode ser substituído pelo azul de anelina.

Método:

- 1 - Desparafinar e levar até H₂O corrente
- 2 - Refixar em Bouin na estufa 56°, 1 hora
- 3 - Lavar bem em H₂O corrente
- 4 - Corar pela Hematoxilina de Weigert 10 minutos ou Harris 5 minutos
- 5 - diferenciar se necessário
- 6 - Lavar em água corrente
- 7 - Solução Tricromica 15 a 20 minutos
- 8 - Diferenciar em água acética a 1%. Álcool 95-100-xilol e montar

Resultado:

Fibras musculares	vermelho
Núcleo	verde a preto
Colageno	verde

TRICROMICO DE MASSON

Soluções:

1- Solução A de Weigert

Hematoxilina	1g
Álcool 95%	100ml

Obs.: Pode ser usada amadurecida ou não

2- Solução B de Weigert

Percloroeto de ferro 30%	8ml
Ácido clorídrico	2ml
H ₂ O destilada	190ml

Na hora do uso juntar partes iguais de soluções A e B.

3- Percloroeto de ferro 30%

Cloreto de ferro	30g
H ₂ O destilada	100ml

4- Escarlate de Briebrich

Escarlate de Briebrich a 1% aquosa	90cc
Fucsina S a 1% aquosa (fucsina ácida)	10cc
Ácido acético glacial	1cc

5- Diferenciador de masson

Ácido fosfomolibdico	5g
Ácido fosfotungstico	5g
H ₂ O destilada	200ml

6-Azul de anilina

Azul de anilina	2,5g
H ₂ O destilada	100ml
Ácido acético	2 gotas

OU

6-Verde Luz a 2%

verde luz SF	2 gramas
ácido acético glacial	1 ml
agua destilada	99 ml

Método:

1 - Desparafinar e hidratar normalmente

- 2 - Fixar em Bouin ou refixar em Bouin no mínimo 1 hora a 55°
- 3 - Lavar em H₂O corrente até sair o amarelo
- 4 - Corar pela hematoxilina de Weigert 10 -15 minutos
- 5 - Lavar bem em H₂O corrente. Diferenciar no álcool ácido
- 6 - Passar em H₂O destilada
- 7 - Escarlate de Briebrich 3 -5 minutos
- 8 - H₂O destilada desprezar a 1^a lavada e deixar 5 minutos na 2
- 9 - Diferenciador de Masson 5-10 minutos
- 10- ácido fosfomolibdico 1 % - 5 minutos se for contrscorar com o verde luz depois do diferenciador colocar no ácido fosfomolibdico a 5 %. Lavar em água destilada
- 11-Verde luz de 2 -3 minutos . Lavar em água destilada. Lavar em ácido acetico a 1 % . Este passo remove o excesso de azul ou verde.
- 11 - Azul de anilina 5 minutos
- 12 - Lavar rapidamente em H₂O destilada
- 13 - Passar rapidamente em água acética a 1%
- 14 - Passar nos álcoois clarear e montar.

Resultado:

Núcleos	negro
Citoplasma, queratina, musc, fibras intercelulares	vermelho
Colágeno e muco	azul

TRICROMICO DE WEIGERT

Soluções:

1 - Solução A

Hematoxilina a 1% em álcool 95% amadurecida ou não

2 - Solução B

Percloroeto de ferro a 30%

8ml

Ácido clorídrico

2ml

H₂O destilada

190cc

3 - Van Gieson

Solução aquoso saturado de ácido pícrico

100ml

Soluto aquoso de fucsina ácida a 1%

10ml

Resultado:

Núcleos

negro

Citoplasma

amarelo

Fibras elásticas

amarelas

Cartilagem

azulada

Feixes colagenos e membranas basilares

vermelho

Método:

1 - Desparafinar e levar até H₂O

2 - Hematoxilina de Weigert 20-45 minutos

3 - Lavar bem em H₂O corrente

4 - H₂O destilada

5 - Van Gieson 1 minuto

6 - Secar em papele de filtro

7 - Álcool 100, xilol e montar.

VERHOEFF **(para fibras elásticas)**

Soluções

1 - Hematoxilina a 5%

Hematoxilina	5g
Álcool absoluto	100ml

Deixar amadurecer

2 - Percloroeto de ferro a 10%

Cloreto ferrico	10g
H ₂ O destilada	100ml

3 - Lugol forte

Iodo	2g
Iodeto de Potássio	4g
H ₂ O destilada ou álcool	100ml

4-Cloreto Ferrico 2%

Cloreto de Ferro	2g
H ₂ O destilada	100ml

5- Hiposulfito de sódio 5%

Tiosulfato de sódio	5g
H ₂ O destilada	100ml

6- Hematoxilina de Verhoeff

Na hora do uso misturar:

Hematoxilina amadurecida 5%	30cc
Percloroeto de ferro 10%	12cc
Lugol forte	12cc

Corante de Van Gieson

Solução A

Fucsina ácida	1g
H ₂ O destilada	100ml

Solução B

Solução aquosa de ácido picrico saturado

Para uso: 50ml de solução saturada ácido pícrico 7,5ml de fucsina a 1%

Método:

- 1 - Desparafinar e chegar até H₂O
- 2 - Corrar pela Hematoxilina de Verhoeff 20 minutos
- 3 - Lavar em H₂O corrente
- 4 - Diferenciar em cloreto ferrico a 2% (olhar ao microscopio)
- 5 - Lavar bem em H₂O corrente
- 6 - Hiposulfito de sódio a 5% - 2 minutos
- 7 - Lavar em H₂O corrente
- 8 - Corar o tecido conjuntivo com a solução de Van Gieson 3 minutos. Não lavar
- 9 - Secar levemente em papel de filtro
- 10 - Desidratar em álcool absoluto, xilol, montar.

PUCHTLER (Para vermelho congo)

Fixação: formalina neutra 10% ou álcool absoluto ou carnoy

Soluções

1- Hematoxilina de Harris

2 - Solução estoque

Vermelho congo 1g

Cloreto de sódio (1%) 2g

Álcool 80% 200ml

Dissolver completamente e filtrar. Esta solução é estável por alguns meses. Puchtler e eol usaram o cloretp de sódio saturado e aconselharam que a solução não seja usada antes de 24 horas.

3- Solução de Uso

Solução Estoque de vermelho congo 100ml

Hidróxido de sódio 1% 1ml

Método:

1 - Desparafinar e levar até água

2 - Hematoxilina de Harris 2 minutos

3 - Diferenciar lavar bem em H₂O corrente

4 - Passar em álcool 80%

5 - Solução de vermelho congo por 20 minutos

6 - Desidratar em 3 banhos de álcool absoluto, clarear e montar.

Resultados:

Núcleos

azuis

Amiloides

laranja/vermelho

Fibras elásticas

laranja/vermelho pálido

VERMELHO CONGO **(para amilóide)**

- 1 - Desprafinar em xilol (não passar nos álcoois)
- 2 - Secar e hidratar em água destilada
- 3 - Corar pelo Vermelho congo a 0,5% em álcool 50%, 5 minutos
- 4 - Secar e diferenciar no hidróxido de potássio a 0,2% álcool 80 (passar rapidamente)
- 5 - Água corrente, só passar
- 6 - Hematoxilina de Mayer ou Carazzi, 5 minutos
- 7 - Lavar em H₂O corrente
- 8 - Desidratar em álcool xilol e montar.

VERDE METHYL PERONINA

Soluções

1-Solução de:

Peronina γ 5% aquosa 0,6ml

Metil Green 2% aquosa 3,2ml

Extrair a violeta do metil com 8 passagens em cloroformio. Usar funil de decantação

2-Tampão acetato pH 4,8

Solução A –

ácido acético glacial 4,3ml (2,15ml)

H₂O destilada 500ml (250ml)

Solução B –

acetato de sódio anidro 6,15g (3,075g)

H₂O destilada 500ml (250ml)

Misturar 47ml da solução A e 53ml da solução B

3- Solução de:

Tampão de acetato 50ml

Pironina 0,6ml

V. metil extraído 3,2ml

Obs.: Guardar em vidro escuro na geladeira

Pegar células que produzem anticorpos

ATENÇÃO: Para material fixado em Zenker, modificar as []

Método:

1 - Desparafinar o corte

2 - Colocar na solução de V.M.P. por 1 hora

Nota: O reativo mais velho deixa mais tempo

3 - Água destilada - passar rápido (mergulha e tira)

4 - Acetona pura (comum) - 2 mergulhadas

5 - Acetona xilol (partes iguais) 3 a 4 mergulhadas

6 - Mergulhar no xilol e montar

Acertar concentração para

Soluções

1 - Pironina 0,5%

2 - Verde metil green 0,5%

Usar 37ml das solução 1 e 13ml da 2

Completar o volume a 199ml com tampão pH 4,8

**UNNA PAPPENHEIN
(verde metil pironina)**

Fixação: Carnoy, álcool absoluto, Helly

1 – Desparafinar

2 - Solução de Unna Pappenhein 2 horas

3 - Diferenciar em acetona rapidamente

4 - Xilol (2) - montar

Resultados:

Núcleos
Citoplasma

verde
vermelho forte

VIOLETA DE CRESIL (Nissel)

Soluções:

1 - Violeta de Cresil a 2%

Violeta de cresil	2g
H ₂ O destilada	100ml

2 - Solução tampão I

Ácido acético glacial	0,6ml
H ₂ O destilada	99,4ml

3 - Solução tampão II

Acetato de sódio	1,361g
H ₂ O destilada	100ml

4 - Solução de uso do Corante

Violeta de cresil a 1%	10ml
Tampão I	2ml
Tampão II	8ml

Método:

1 - Hidratar os cortes até H₂O destilada

2 - Corar na solução de violeta, 1 a 2 horas, aquecendo de início até levantar vapores e retirar da chama

3 - Lavar em H₂O destilada

4 - Diferenciar em álcool 70%, 95%, 100%, xilol montar.

Fixação	Álcool-formol
Cortes	parafina

Soluções:

1 - Tampão acetato pH 3,8 a 4,0

Acetato de sódio 2,721%	1 parte
Ácido acético a 1,201%	4 partes

2 - Cresil violeta rápido

Cresil violeta rápido	0,5g
Tampão acetato	100ml

Método:

1 - Desparafinar, alcoolizar e hidratar

2 - Aesil - violeta rápida - 10 minutos

3 - Lavar em solução tampão de acetato (controlar ao microscópio)

4 - Desidratar diaganizar rapidamente e montar.

Resultados:

Núcleos e substâncias de nissel

azul púrpura

Método usado em casos de lesões centrais ou periféricas dos neurônios:
ganglioneuronios

VAN-GIESON

Soluções

1-Solução aquosa saturada de ácido pícrico 90cc (A)

2-Solução aquosa de fucsina ácida a 1% 10cc (B)

Obs.: deixar amadurecer

Método:

1 - Desparafinar, hidratar

2 - Corar pela hematoxilina de Weight

3 - Corar pelo Va Gieson 1 minuto

4 - Lavar em H₂O corrente (rápido)

5 - Álcool absoluto, xilol, montar

Obs.: Hematoxilina de Weight está na bateria do masson.

Para uso imediato

50ml

7,5ml

solução saturada ácido pícrico
fucsina a 1%

Para tecido nervoso

Solução A

15ml

Solução B

15ml

H₂O destilada

70ml

HEMATOXILINA DE WEIGERT **(para demonstração de tecidos conectivos e músculos).**

Fixação: formol tamponado a 10% é aceitável, mas fixadores que contém cloreto de mercúrio podem dar brilhantes resultados

Soluções:

1 - Solução A: Hematoxilina férrica de Weigert

Hematoxilina	1g
Álcool etílico absoluto	100ml

2- Solução B: Percloroeto de Ferro

Cloreto Ferrico 30%	4ml
Ácido clorídrico	1ml
H ₂ O destilada	100ml

Deixar envelhecer as duas soluções por seis semanas antes de usar.

Na hora do uso misturar:

Solução A	1 parte
Solução B	1 parte

3 - Solução A -Corante de Van Gieson

Fucsina ácida	1g
H ₂ O destilada	100ml

4- Solução B: Solução aquosa de ácido pícrico saturado :

Solução A	10ml
Solução B	90ml

Para uso imediato misturar

50ml	solução B
7,5ml	solução A

Para uso em tecido nervoso misturar:

Solução A	15ml
Solução B	15ml
H ₂ O destilada	70ml

Método:

1-Desparafinar e levar as secções até álcool

2-Corar pela hematoxilina férrica de Weigert por 15 minutos

3-Lavar em H₂O corrente por 5 minutos

4-Lavar em H₂O destilada

5-Corar para Van Gieson por 3 minutos

6-Lavar em H₂O destilada

7-Lavar em álcool 70%

8-Desidratar rapidamente clarear e montar

Resultados:

núcleos	preto, marron ou cinza
Colágeno	vermelho
Músculo liso	amarelo
Células vermelhas do sangue	amarelo
Citoplasma	amarelo
Fibras elásticas	amareladas
Cartilagem	azulada

WEIL
(Para fibras de mielina)

Cortes: 10-15micras

Soluções:

1 - Alumem de ferro amoniacal a 4%

Aluminio de ferro amoniacal	4g
H ₂ O destilada	100ml

2 - Hematoxilia a 10%

Hematoxilina	10g
Álcool 95%	100ml

Deixar amadurecer e não filtrar

3 - Solução de uso

Alumem de ferro amoniacal a 4%	45ml
Hematoxilina a 10%	5,0ml

Obs.: não filtrar e preparar na hora de usar

4 - Solução de ferrocianeto de Potássio

Ferrocianeto de Potássio	12,5g
Borax	10 gramas
H ₂ O destilada	1000ml

Método:

1 – Desparafinar

2 - Lavar bem em H₂O corrente

3 - Corar de 10 a 30 minutos na solução de uso a 60°C

4 - Lavar em água corrente

5 - Diferenciar na solução de alumem de ferro de 2 a 4 minutos (olhar ao microscópio)

6 - Lavar em H₂O corrente

7 - Completar a diferenciação olhando ao microscópio em solução de ferrocianeto de Potássio + Borax

8 - Lavar bem em H₂O corrente

9 - Água amoniacal (100cc de H₂O destilada + 2ml de amoniac do comércio) durante 30 segundos.

10 - Lavar bem em H₂O corrente

11 - Desidratar, clarear e montar

Resultado:

Fibras de mielina e núcleos em negro

WARTHIN STARRY

(para espiroquetas (modificado))

Fixação: formol 10%

Obs.: fixadores contendo cromatos devem ser evitados.

Soluções:

A - Água (tridestilada ou água para injeção) acidificada com 1% de ácido cítrico pH 4,0 - 1000ml

B - Nitrato de prata 1% em água acidulada (impregnação)

C - Nitrato de prata a 2% em água acidulada (revelação)

D - Solução de gelatina a 5% (FMUSP usa a 3%) em H₂O acidulada

E - Solução de Hidroquinone (grau fotográfico) 0,4g em 200ml de H₂O acidulada.

F - Na hora do uso preparar:

Pré-aquecer as soluções C, D e E a 54°C e misturar na seguinte ordem:

Solução C	1,50ml
Solução D	3,75ml
Solução E	2,00ml

Nota: Todo o material utilizado deve ser passado em solução sulfocrômica

Método:

1 - Desparafinar e levar as secções até H₂O tridestilada acidificada

2 - Colocar na solução de Prata 1% - 30 minutos a 43oC (estufa)

3 - Colocar as secções numa cuba de coloração a qual foi deixada sobre um banho maria 60°C. Cobrir as secções com a solução preparada na hora (F) até que as as secções fiquem amareladas ou marron claro (6 à 8 minutos). Olhar o controle positivo ao microscópio. O tempo pode aumentado para demonstração de corpos de Donovan.

4 - Rapidamente colocar num banho de água quente (56°C) e lavar completamente

5 - Lavar em H₂O destilada

6 - Desidratar clarear e montar

Resultados:

Espiroquetas	preto
Corpos de donovan	preto
Fundo	marron dourado

Soluções

1 - Água acidulada (injetável) 1%

Água acidulada (injetável)

Ácido cítrico

5g
500ml

2 - Nitrato de prata 1%

Nitrato de prata

H₂O acidulada

1g
100ml

3 - Nitrato de prata a 2%

Nitrato de prata

H₂O acidulada

2g
100ml

4 - Gelatina a 5% em H₂O acidulada

Gelatina pó

H₂O acidulada

3g
100ml

5 - Hidroquinone

Hidroquinone

H₂O acidulada

0,3g
200ml

6 - X da questão

Na hora do uso misturar na seguinte ordem:

Solução C

Solução D

Solução E

15,0ml
37,5ml
20,0ml

WRIGHT

Solução

1-Corante de Wright 0,3%	
Corante de Wright	0,3g
Álcool metílico	100ml

- 1 - Preparar o esfregaço
- 2 - Deixar secar ao ar
- 3 - Colocar a lâmina em camara úmida
- 4 - Depositar a wright filtrado até cobrir toda a lâmina (+/- 10 gotas)
- 5 - Em seguida colocar igual quantidade de H₂O de coloração (H₂O destilada fervida)
- 6 - Deixar corar pela mistura durante 15 minutos
- 7 - Lavar em H₂O corrente
- 8 - Lavar em H₂O destilada

WEIGERT Unna Tanger

Soluções:

1 - Ácido periacético
15,8ml
1,25ml

ácido glacial
ácido sulfurico

50ml
Deixar em repouso 1 a 3 dias. Guardar em gelatina

H₂O destilada a 30 volumes

2 - Solução de Fucsina - Resorcina

Fucsina básica

2g

Resorcina

4g

H₂O destilada

200ml

Dissolver a fucsina com resorcina em H₂O fervente.

Juntar 30 ml de percloreto ferrico a 30%

Deixar ferver 5 minutos, agitando com uma vareta

Filtrar a quente em papel de filtro

Desprezar o filtrado e conservar o papel de filtro com a borra que contém, deixar secar durante 12 horas ou mais. Na estufa de 1 a 2 horas.

Colocar o papel de filtro com a borra num recipiente contendo 200ml de álcool 90%

Levar à estufa a 56°C, até a dissolução completa do precipitado

Filtrar novamente e após o resfriamento juntar 4ml de ácido clorídrico

A solução conserva-se por 6 semanas no máximo.

Método:

1 - Desparafinar e alcoolizar. Não hidratar

2 - Ácido periacético durante 20 minutos

3 - Lavar em água corrente 5 minutos

4 - Corar pela fucsina - resorcina 60 minutos

5 - Lavar em álcool 90,95,100, xilol e montar.

Resultado:

Fibras elásticas

roxo escuro

Fundo

lilás rosado

ZIEHL – NEELSEN **(para Bactérias ácido resistente)**

Fixação: formol

Solução

1 - fucsina Básica 3%

Fucsina básica	3g
Álcool 95	100ml

2 - Fenol aquoso 5%

fenol	5g
H ₂ O destilada	100ml

3 - Carbol-Fucsina

Solução de fucsina básica 3%	10ml
Solução de fenol aquoso 5%	90ml

Filtrar antes de usar

4 - Diferenciador ácido clorídrico 1% em álcool 70 (diferenciador do HE) ou ácido sulfurico a 1% em H₂O

5 - Solução de azul de metileno aquoso

Azul de metileno	1g
------------------	----

H ₂ O destilada	100ml
----------------------------	-------

Método:

1 - Desparafinar e levar a solução até H₂O destilada

2 - Corar pela carbol-Fucsina - 10'

3 – Lavar bem em água corrente

4 – Diferenciar na solução ácida até a cor rosa pálido (olhar ao microscópio)

5 – Lavar em água corrente

6 - Corar pelo azul de metileno - 5'. Evitar a supercoloração que pode mascarar os bacilos

7 - Lavar rapidamente

8.-álcool 95 %

9- álcool 100 %

10-xilol (4X)

11- montar com resina

Obs.: Usar controle.

Resultado:

Bacilo ácido-resistente

Eritrócitos

Outros elementos tissulares

vermelho brilhante
amarelo alaranjado
azul

ZIEHL - NEELSEN
(para Bactérias ácido resistente)

Modificado pelo AFIP

Solução

1- carbol-fucsina	
Cristais de fenol derretido	2,5 ml
Alcool etílico absoluto	5 ml
Fucsina básica	0,5 ml
Água destilada	50 ml

1-Desparafinar e hidratar até água destilada

2-Corar na solução de carbol-fucsina filtrada- 30 minutos

3-Lavar em água corrente

4-Descolorir em álcool-ácido até rosa

5-Lavar em água corrente por 8 minutos

6-Contracorar com azul de metileno

7-Lavar em água corrente

8-Lavar em água destilada

9-Desidratar- 2X –alcool 95, alcool 1002X xilol

10-Montar em resina

Método para Bactérias ácido resistentes Modificado para microondas(AFIP)

Solução

1- Carbol-fucsina

Cristais de fenol derretido	2,5 ml
Alcool etílico absoluto	5 ml
Fucsina básica	0,5 ml
Água destilada	50 ml

1-Desparafinar

2-Levar até a água destilada

3-Solução de carbol –fucsina no microondas (200° F). Descanso de 5 minutos na solução quente

4-Lavar na água corrente

5-Mergulhar no álcool-ácido

6-Lavar na água corrente repetidamente até rosa claro

7-Azul de metileno por 30 segundos

8-Lavar na água corrente

9-Desidratar, clarear e montar

Referência : Hafiz, S.; Spencer, RC; Lee, M.; gooch 'H;Duerden, Bl. Use of microwaves for acid and alcohol fast staining. J Clin. Pathol. 1985, 38: 1073

PREPARO DE LAMÍNULAS SILICONIZADAS

- 1-Limpar as lamínulas com álcool ácido
2. mergulhar em SIGMACOTE (concentrado) - (sigma , USA)
3. secar (escorrer o excesso)
4. repetir
5. Deixar secar e guardar ao abrigo da poeira.

PRATA METANAMINA **(para pneumociti carinii e fungos)**

Soluções :

- 1 - Ácido crômico 10%
- 2 - Nitrato de prata 5%
- 3 - Metanamina aquosa 3% (Hexametilenotetramina - $\text{CH}_2\text{I}_6\text{N}_4$)
- 4 - Borax aquoso 5%
- 5 - Solução de cloreto de ouro 1%
- 6 - Metabisulfito de sódio 1%
- 7 - Tiosulfato de Sódio 5%

8 - Solução de uso:

metanamina 3%	40ml
nitrato de prata 5%	2ml

O precipitado branco pode desaparecer agitando.

Adicionar 3ml de borax a 5% e completar o volume com H_2O para o total de 80ml.

Essa solução deve ser usada quente até chegar a marron dourado profundo aproximadamente.

Deve-se ter cuidado para que o super aquecimento não precipite toda a prata na lâmina.

Método:

- 1 - Desparafinar e levar as secções até H_2O destilada. Quando esfregaços, secar ao ar.
- 2 - Ácido crômico 10% - 10 minutos (despreza depois do uso)
- 3 - Lavar em H_2) corrente por alguns segundos
- 4 - Metabisulfito 1% - 1 minuto
- 5 - Lavar em H_2O corrente quente 1 minuto (até que a cuba es quente)
- 6 - Colocar na mistura prata/metanamina até ficar marron dourado. Isto será em aproximadamente 2 minutos se a solução estiver sulficientemente quente.

7 - Lavar em H₂O torneira quente e esfriar gradativamente para não quebrar a cuba.

8 - Lavar em H₂O destilada

9 - Colocar o cloreto de ouro 1% aproximadamente 10 segundos.
Essa solução pode ser reaproveitada.

10 - Lavar em H₂O destilada

11 - Colocar em tiosulfato sódio 5% - 3 minutos

12 - Lavar em H₂O corrente

13 - As lâminas podem ser contracoradas com H.E light Green ou outro corante.

14 - Desidratar em álcool 95, absoluto, xilol e montar.

Resultado:

A especificidade e sensibilidade deste método é a mesma do Grocott. Pode ser usado para secções de parafina, secções congeladas, citológicos e imprints. A coloração é característica e morfológica para *P. Carinii* e fungos, incluindo *Aspergillus Apiospermum* e *Louloopsis Glahata*.