

Congo Red Staining Kit

REF

860-026

05279429001

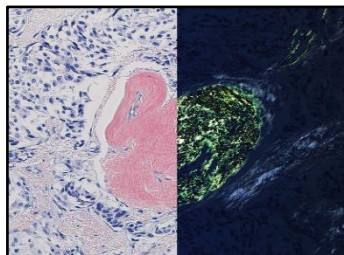
IVD
 40


Figura 1. Tinción con Congo Red Staining Kit de amiloide en tejido de pulmón, campo brillante (izquierda) y luz polarizada (derecha).

USO PREVISTO

Congo Red Staining Kit está destinado a su uso en laboratorio como tinción histológica cualitativa para detectar la presencia de amiloides en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina (FFPE) teñido con un instrumento BenchMark Special Stains.

La interpretación de este producto debe correr a cargo de un anatomopatólogo cualificado junto con un examen histológico, la información clínica pertinente y los controles adecuados.

Este producto está destinado para uso diagnóstico in vitro (IVD).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Congo Red Staining Kit es una modificación del método de Highman.¹

En 1922, Bennhold descubrió que el uso del colorante rojo Congo servía para detectar los amiloides.² El colorante se une mediante enlaces de hidrógeno a las láminas plegadas β del amiloide y ha demostrado unirse a cualquier forma de amiloide.² Los amiloides desarrollados contienen miofibrillas cuyo tamaño oscila entre 0.1 y 10 μ m de largo que se agrupan para formar placas insolubles resistentes frente a la degradación.³

La acumulación de las miofibrillas insolubles del amiloide en los espacios extracelulares puede dar lugar a la amiloidosis.^{4,5} Existen varios tipos de amiloidosis y cada uno de ellos se caracteriza por la presencia de placas y/o masas insolubles amiloides, que pueden dañar las células y deteriorar la función normal del órgano.^{2,4}

Congo Red Staining Kit detecta la presencia de amiloides para ayudar al anatomopatólogo en el diagnóstico de la amiloidosis.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

La reacción de tinción se fundamenta en la aplicación de Congo Red Stain, que tiñe los patrones de proteínas anómalas (amiloide) de color rosa a color salmón. Es necesario aplicar Congo Red Buffer para distinguir la tinción. Congo Red Hematoxylin, una solución de hematoxilina de Mayer, sirve para proporcionar la tinción nuclear en contraste de color azul a morado. Las láminas plegadas β del amiloide tiene el tamaño y la forma adecuados para albergar las moléculas rojas Congo, que se mantienen en el entramado de las láminas plegadas β .⁶ La birrefringencia es una de las propiedades intrínsecas del complejo de miofibrilla de amiloide y rojo Congo.^{7,8}

El kit se ha optimizado para su uso con los instrumentos BenchMark Special Stains. Los reactivos se aplican en el tejido en portaobjetos para microscopio y se mezclan con toda la muestra.

MATERIAL SUMINISTRADO

Los viales de reactivo se suministran en transportadores con etiquetas de código de barras para que puedan introducirse en la bandeja de reactivos del instrumento. Cada kit contiene reactivo suficiente para 40 pruebas.

Un vial de 19 mL de Congo Red Stain contiene, aproximadamente, un 0.1 % de rojo Congo y alrededor de un 70 % de isopropanol.

Un vial de 13 mL del reactivo Congo Red Buffer contiene, aproximadamente, un 0.5 % de glicina y un 2.0 % de cloruro sódico.

Un vial de 19 mL de Congo Red Hematoxylin contiene hematoxilina de Mayer modificada. Tres inserciones de viales con cañas de aspiración.

Reconstitución, mezcla, dilución y titulación

No son necesarias la reconstitución, la mezcla, la dilución ni la titulación. Una mayor dilución de cualquiera de los reactivos puede dar lugar a una tinción no satisfactoria. Los reactivos del kit se han diluido de forma óptima para su uso con los instrumentos BenchMark Special Stains.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

No todos los productos que aparecen en la hoja de datos están disponibles en todos los lugares. Consulte al representante local de asistencia técnica de Roche.

No se suministran los reactivos y materiales siguientes, pero pueden ser necesarios para la tinción:

1. Tejido de control recomendado
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Instrumento BenchMark Special Stains
4. BenchMark Special Stains Deparaffinization Solution (10X) (n.º cat. 860-036 / 06523102001)
5. BenchMark Special Stains Liquid Coverslip (n.º de cat. 860-034 / 06523072001)
6. BenchMark Special Stains Wash II (n.º de cat. 860-041 / 08309817001)
7. Equipo de laboratorio de uso general

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Congo Red Staining Kit se debe conservar a una temperatura de entre 2 y 8 °C. Los componentes del kit que se encuentran refrigerados deben estar a temperatura ambiente antes de utilizarlos.

Si se almacenan correctamente, los reactivos se mantendrán estables hasta la fecha indicada en la etiqueta, ya se encuentren abiertos o cerrados. No utilice el reactivo después de la fecha de caducidad que se indica en el kit.

No existen indicios absolutamente precisos de la inestabilidad de estos reactivos, por tanto, es necesario analizar simultáneamente los controles con las muestras desconocidas. Póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche si el material de control positivo presenta una reducción de la tinción, dado que podría indicar la inestabilidad del reactivo.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los tejidos FFPE que se procesan de forma habitual son necesarios para el uso de este producto y de los instrumentos BenchMark Special Stains. El fijador de tejido recomendado es formol tamponado neutro al 10 %¹.

Lleve a cabo la recogida de muestras y su conservación según se recoge en el documento M29-T2 de CLSI.⁹ Corte las secciones con el grosor adecuado, aproximadamente de a 8 μ m, y colóquelas en portaobjetos de vidrio con carga positiva.

1. Seque los portaobjetos.¹
2. Imprima las etiquetas con código de barras correspondientes.
3. Coloque las etiquetas de código de barras en el extremo congelado de los portaobjetos antes de cargarlos en el instrumento (consulte el Manual del usuario del instrumento para obtener información sobre la correcta aplicación de las etiquetas).

Consulte la sección Instrucciones de uso para obtener información sobre el protocolo recomendado para el instrumento BenchMark Special Stains.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro (IVD).
2. Solo para uso profesional.
3. **PRECAUCIÓN:** En Estados Unidos, las normas nacionales restringen la venta de este dispositivo a médicos autorizados o por orden de estos. (Rx Only)
4. No utilizar por encima del número especificado de ensayos.
5. Los portaobjetos con carga positiva pueden verse afectados por presiones ambientales, dando lugar a una tinción incorrecta. Póngase en contacto con su representante de servicio de Roche para obtener más información sobre el uso de este tipo de portaobjetos.
6. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos para el medio ambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables.^{10,11}

7. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, enjuáguelas con agua abundante.
8. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
9. Para obtener más información sobre el uso de este dispositivo, consulte el Manual del usuario del instrumento BenchMark Special Stains y las instrucciones de uso de todos los componentes necesarios, que puede encontrar en navifyportal.roche.com.
10. Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
11. El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directrices del SGA de la UE. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
12. Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con las autoridades competentes del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

Este producto contiene componentes clasificados como sigue de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 1272/2008:

Tabla 1. Información de riesgos.

Riesgo	Código	Declaración
  	H225	El vapor y el líquido son altamente inflamables.
	H315	Provoca irritación en la piel.
	H319	Provoca irritación grave en los ojos.
	H336	Puede provocar somnolencia o mareos.
	H350	Puede provocar cáncer.
	H373	Puede provocar daños en determinados órganos debido a la exposición prolongada o recurrente.
	P201	Antes de utilizarlo, obtenga cualquier tipo de instrucción especial.
	P210	Mantener alejado de fuentes de calor, superficies a elevada temperatura, chispas o llamas y otros focos de ignición. No fumar.
	P260	No inhale la niebla o los vapores.
	P280	Lleve guantes y prendas de protección, así como protección auditiva y para el rostro.
	P308+P313	Si se sufre una exposición importante: Consultar a un médico.
	P370+P378	En caso de incendio: Trate de apagarlo con arena seca, productos químicos secos o espuma resistente al alcohol.

EUH208: Este producto contiene yodato sódico. Es posible que provoque reacciones alérgicas.

INSTRUCCIONES DE USO

Preparación del vial de reactivo

Antes de utilizarlo por primera vez, es necesario colocar una inserción de vial y la caña de aspiración en el vial del reactivo.

Quite el tapón con el que se suministra el vial y coloque en el vial la inserción y la caña. La inserción y la caña de aspiración deben permanecer en el vial una vez que esté abierto.

Procedimiento de tinción

1. Cargue los reactivos y los portaobjetos en el instrumento.
2. Coloque el tapón blando en la ranura del soporte de reactivo cuando se esté utilizando el reactivo.
3. Lleve a cabo la sesión de tinción según el protocolo recomendado en la Tabla 2 y las instrucciones que recoge el Manual del usuario.
4. Cuando haya finalizado la sesión, retire los portaobjetos del instrumento.
5. Cubra el vial de reactivo con el tapón blando cuando no se utilice.

Protocolo recomendado

Los parámetros de los procedimientos automatizados se pueden mostrar, imprimir y editar según el procedimiento descrito en el Manual del usuario de los instrumentos.

Los siguientes procedimientos son flexibles para adaptarse a las preferencias del usuario. Este producto se ha optimizado para su uso con los instrumentos BenchMark Special Stains, pero es necesario que el usuario valide los resultados que obtenga con ellos.

Tabla 2. Protocolo de tinción recomendado para Congo Red Staining Kit en un instrumento BenchMark Special Stains.

Procedimiento de tinción	S Congo Red
Paso del protocolo	Método
Desparafinado	Seleccionar para automatizar la eliminación de la parafina.
Horneado (opcional)	En los valores predeterminados no se encuentra seleccionado. Se recomienda una temperatura de 75 °C durante 4 minutos.
Opción 1 u Opción 2	La opción predeterminada es la Opción 1. Seleccione la Opción 1 o la Opción 2: - La Opción 1 dispensa Congo Red Stain antes de Hematoxylin y los núcleos se vuelven morados. - La Opción 2 dispensa Hematoxylin antes de Congo Red Stain y los núcleos se vuelven azules.
Opción 1	
Optimización de la intensidad de la tinción (C. Red Stain)	Los valores predeterminados de la Opción 1 son 37 °C durante 24 minutos. Seleccione esta opción para permitir el ajuste de la intensidad de la tinción.* Seleccione una temperatura de entre 37 y 60 °C: 37 °C, tinción más clara del amiloide 60 °C, tinción más oscura del amiloide Seleccione un tiempo de incubación de entre 20 y 32 minutos: 20 minutos, tinción más clara del amiloide 32 minutos, tinción más oscura del amiloide
Optimización de la intensidad de Hematoxylin (C. Red Hematoxylin)	El valor predeterminado de la Opción 1 es de 12 minutos. Seleccione esta opción para optimizar la hematoxilina*: 4 minutos, tinción nuclear más clara 16 minutos, tinción nuclear más oscura

Procedimiento de tinción	S Congo Red
Paso del protocolo	Método
Opción 2	
Optimización de la intensidad de Hematoxylin (C. Red Hematoxylin)	El valor predeterminado de la Opción 2 es de 8 minutos. Seleccione esta opción para optimizar la hematoxilina*: 4 minutos, tinción nuclear más clara 16 minutos, tinción nuclear más oscura
Optimización de la intensidad de Congo Red (C. Red Stain)	El valor predeterminado de la Opción 2 es de 48 minutos. Seleccione esta opción para permitir el ajuste de la intensidad de la tinción.* Seleccione un tiempo de incubación de entre 32 y 48 minutos: 32 minutos, tinción más clara del amiloide 48 minutos, tinción más oscura del amiloide

* Para ajustar las preferencias de la tinción, aumente los parámetros de temperatura de la tinción y de tiempo de incubación de uno en uno.

Procesamiento post-instrumento recomendado

1. Enjuague los portaobjetos en tres cambios de etanol al 100 % de entre 5 y 10 segundos agitándolos levemente para eliminar los restos de la solución.
2. Deshidrate los portaobjetos en tres cambios de xileno al 100 % de entre 5 y 10 segundos agitándolos levemente.
3. Aplique un cubreobjetos con medio de montaje permanente.
4. Compatible con el protocolo de montador mediante el sistema VENTANA HE 600. Si desea obtener instrucciones más detalladas al respecto, consulte el Manual del usuario del sistema VENTANA HE 600.

PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD

Como ejemplo de material de control positivo se encuentra el tejido humano FFPE positivo en amiloide, como el de un paciente que padezca amiloidosis.¹ El tejido de control debe ser una muestra de autopsia reciente, biopsia o cirugía, preparada o fijada con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de la prueba. Estos tejidos se utilizan para hacer un seguimiento de todos los pasos que conlleva el análisis, desde la preparación del tejido hasta la tinción.

El uso de una sección de tejido fijada o procesada de forma diferente a la muestra de la prueba actúa como control en todos los pasos de reactivo y del método, salvo en los de fijación y procesamiento de tejidos. Los componentes celulares de otros elementos del tejido pueden servir como control negativo.

La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que el tejido de la prueba. Esto contribuye a identificar fallos al aplicar los reactivos al portaobjetos. El tejido de control puede contener elementos de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como control positivo y negativo.

El tejido de control se debe analizar en cada una de las sesiones.

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para hacer un seguimiento del comportamiento correcto de los reactivos de la prueba y de los tejidos procesados, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente.

Si los componentes de tejido positivos no muestran una tinción positiva, los resultados de las muestras de la prueba se deben considerar no válidos. Si los componentes de tejido negativos muestran una tinción positiva, los resultados de las muestras del paciente también se deben considerar no válidos.

Las discrepancias no explicadas en los resultados de los controles deberían comunicarse al representante local de asistencia técnica de Roche de forma inmediata. Si los resultados de los controles de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del

paciente no serán válidos. Es necesario identificar la causa y corregir el problema, así como repetir el análisis de las muestras del paciente.

INTERPRETACIÓN DE LAS TINCIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

Congo Red Staining Kit se ha analizado para detectar los amiloides.

- Amiloide (con campo brillante): rosa a salmón
- Amiloide (con luz polarizada): birrefringencia verde manzana
- Núcleos: morados con el protocolo de la Opción 1
- Núcleos: azules con el protocolo de la Opción 2
- Los amiloides pueden presentarse como depósitos circulares de tinción rosa en forma de lazo por todo el tejido. Son propensos a depositarse, concretamente, en las paredes de los vasos sanguíneos y las membranas basales. Las fibras de colágeno con queratina, elásticas y densas, pueden retener el colorante rojo Congo. La birrefringencia es una propiedad intrínseca del complejo formado por las miofibrillas de amiloide y el rojo Congo.^{7,8} Sin la tinción de color rosa a salmón del rojo Congo con campo brillante ni la birrefringencia verde manzana con la luz polarizada no es posible identificar de forma categórica el amiloide.

LIMITACIONES ESPECÍFICAS

Únicamente se han utilizado y validado en este ensayo los portaobjetos para microscopio con carga positiva.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

RENDIMIENTO DE ANÁLISIS

Se realizaron pruebas de tinción para evaluar la sensibilidad, especificidad y precisión y los resultados se indican a continuación.

Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad y especificidad analíticas se evaluaron en tejidos positivos en amiloides (diferentes tipos de tejido) y piel normal. Ambas opciones de protocolo (Opción 1 y Opción 2) se analizaron en todos los casos de tejido que se enumeran en la Tabla 3. En todos los casos de tejido evaluados (60/60) se obtuvo un resultado apto de tinción aceptable, tal y como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. La sensibilidad y especificidad de Congo Red Staining Kit se determinó mediante el análisis de los siguientes tejidos FFPE normales y patológicos.

Tejido	N.º de aptos/analizados
Tejidos positivos en amiloides (varios tipos de tejido*)	45 / 45
Piel normal	15 / 15

*Entre otros tejidos analizados figuraban los tejidos de tiroides, glándula prostática, hígado, estómago, colon, tejido blando y pulmón.

Precisión

Se determinó la precisión de Congo Red Staining Kit entre varias sesiones, días, instrumentos y lotes de reactivo con diferentes portaobjetos con cortes de distintos tipos de tejidos positivos en amiloides (tiroides, glándula prostática, hígado, estómago, colon, tejido blando y pulmón) con el protocolo de la Opción 1. Se cumplieron todos los criterios de aceptación. Los estudios de precisión se llevaron a cabo con Congo Red Staining Kit según la información que se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Estudios de precisión de portaobjetos con Congo Red Staining Kit.

Parámetros analizados	N.º de condiciones	N.º de aptos/ N.º de analizados
Entre sesiones	Tres sesiones en un mismo día	54 / 54
Entre días	5 días	90 / 90
Entre instrumentos	Tres instrumentos	54 / 54
En la misma sesión	mismo día y mismo instrumento	54 / 54
Entre lotes	Tres lotes	54 / 54

Los resultados demostraron que no existía una diferencia significativa en la intensidad de la tinción entre los portaobjetos.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

1. El grosor del corte puede afectar la calidad y la intensidad de la tinción. Si la tinción no es adecuada, póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche para obtener ayuda.
2. El tejido necrótico o autolizado puede presentar tinción no específica.
3. Si el control positivo es negativo, es posible que los tejidos se hayan recogido, fijado o desparafinado de forma incorrecta. Siga el procedimiento apropiado para llevar a cabo la recogida, el almacenamiento y la fijación.
4. Si el control positivo es negativo, asegúrese de que el portaobjetos lleva la etiqueta de código de barras correcta. Si el etiquetado del portaobjetos es correcto, compruebe el resto de los controles positivos de la misma sesión para saber si se han teñido los controles adecuadamente.
5. Si se presenta una tinción de fondo excesiva: una eliminación incompleta de la parafina puede provocar la aparición de artefactos en la tinción o la ausencia de esta. Si no se ha eliminado toda la parafina del portaobjetos, la sesión de tinción debería repetirse con una opción de desparafinado más prolongada, si fuera posible.
6. Si las secciones de tejido se pierden en el portaobjetos, compruebe que los portaobjetos tienen carga positiva.
7. Las secciones más gruesas presentaban depósitos de amiloides de forma más eficaz, mientras que en las secciones más finas no se observaba la birrefringencia verde manzana.
8. La intensidad de la tinción se reduce con la antigüedad de las secciones de tejido; las más recientes sufren una reacción de tinción de mayor intensidad.
9. Es importante deshidratar los portaobjetos en profundidad y evaluarlos de inmediato. Tal y como sucede con la tinción manual, el rojo Congo se puede extraer durante una exposición prolongada al alcohol en el proceso de deshidratación.
10. Una conservación prolongada de los portaobjetos cargados en el instrumento una vez que ha finalizado la sesión puede afectar a la calidad y la intensidad de la tinción. Si la tinción no es adecuada, retire los portaobjetos de inmediato al finalizar la sesión y continúe con el procesamiento post-instrumento.
11. Si necesita llevar a cabo acciones correctivas, consulte la sección Instrucciones de uso, el Manual del usuario del instrumento o póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche.

REFERENCIAS

1. Carson FL, Cappellano C. Histotechnology; A Self-Instructional Text, 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2020, 2022.
2. Gilbertson JA. Amyloid. In: Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 2019;231-253.
3. Dapson RW. Amyloid from a Histochemical Perspective. A Review of the Structure, Properties and Types of Amyloid, and a Proposed Staining Mechanism for Congo Red Staining. Biotech Histochem. 2018;93(8):543-556.
4. Mollee P, Renaut P, Gottlieb D, et al. How to Diagnose Amyloidosis. Intern Med J. 2014;44(1):7-17.
5. Gertz MA, Dispenzieri A. Systemic Amyloidosis Recognition, Prognosis, and Therapy: A Systematic Review. JAMA. 2020;324(1):79-89.
6. Wheeler PR, Burkitt HG. Basic Histopathology, 2nd edition. New York: Churchill Livingstone; 1991.
7. Navarro A, Tolivia J, Valle E. Congo Red Method for Demonstrating Amyloid in Paraffin Sections. J Histotechnol. 1999;22(4):305-308.
8. Fredenburgh JL, Grizzle WE. Special Stains: Their Chemical Mechanism. Chicago: ASCP Press; 1998.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI Web site. <http://www.clsi.org/>. Accessed November 3, 2011.
10. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
11. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 24 June 2020 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.

NOTA: En este documento se ha usado el punto como separador decimal para marcar el borde entre la parte entera y la parte fraccionaria de los numerales con decimales. No se han usado separadores para las unidades de millar.

Símbolos

Ventana usa los siguientes símbolos y signos además de los indicados en la norma ISO 15223-1 (para EE. UU.: consulte en elabdoc.roche.com/symbols la definición de los símbolos usados):



Número mundial de artículo comercial



Identificación única del dispositivo



Indica la entidad que ha importado el producto sanitario en la Unión Europea

HISTORIAL DE REVISIONES

Rev.	Actualizaciones
H	Se han actualizado las secciones Advertencias y precauciones y Referencias.

PROPIEDAD INTELECTUAL

VENTANA, BENCHMARK, VENTANA HE y el logotipo de VENTANA son marcas comerciales de Roche. Todas las demás marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

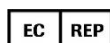
© 2023 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMACIÓN DE CONTACTO



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

www.roche.com



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

