

Congo Red Staining Kit

REF

860-026

05279429001

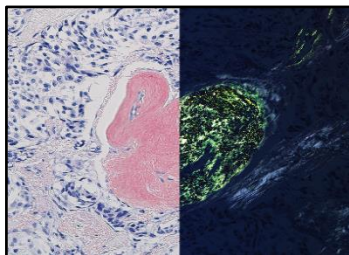
IVD
 40


Figura 1. Coloração da amiloide com Congo Red Staining Kit em tecido pulmonar, sobre fundo claro (esquerda) e luz polarizada (direita).

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

Congo Red Staining Kit destina-se a ser utilizado no laboratório como corante histológico qualitativo para evidenciar a amiloide em secções de tecido fixado em formol e impregnado em parafina (FFPE) coradas num instrumento BenchMark Special Stains.

Este produto deverá ser interpretado por um patologista qualificado, em conjunto com um exame histológico, a informação clínica relevante e os controlos adequados. Este produto destina-se a utilização em diagnóstico in vitro (IVD).

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Congo Red Staining Kit é uma modificação da técnica de Highman.¹

A utilização do corante vermelho do Congo para deteção da amiloide foi descoberta por Bennhold em 1922.² O hidrogénio do corante liga-se às pregas das folhas β da amiloide, e é conhecido por se ligar a todas as formas amiloides.² A amiloide madura contém fibrilos com tamanhos que vão de 0.1 a 10 μm de comprimento e que se agrupam e formam placas insolúveis resistentes à degradação.³

A acumulação de fibrilos amiloides insolúveis nos espaços extracelulares pode dar origem a amiloidose.^{4,5} Existem vários tipos de amiloidose, sendo cada um deles caracterizado pela presença de placa(s) e/ou massas de amiloides insolúveis que podem dar a origem a danos celulares e perturbar a função normal dos órgãos.^{2,4}

Congo Red Staining Kit evidencia a amiloide para ajudar o patologista no diagnóstico da amiloidose.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

A reação de coloração baseia-se na aplicação de Congo Red Stain, que cora os padrões de proteínas atípicas (amiloide) numa cor que vai do rosa ao salmão. É adicionado Congo Red Buffer para diferenciar a coloração. É utilizada Congo Red Hematoxylin, uma solução de hematoxilina de Mayer, para proporcionar uma coloração nuclear azul a púrpura contrastante. As pregas das folhas β da amiloide são adequadas, em termos de tamanho e de forma, para acomodar as moléculas de vermelho do Congo, que permanecem na sua estrutura entrelaçada de pregas de folhas β .⁶ A birrefringência é uma propriedade intrínseca do complexo de vermelho do Congo do fibrilo amiloide.^{7,8}

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

MATERIAIS FORNECIDOS

Os frascos de reagentes são fornecidos em transportadoras marcadas com códigos de barras para serem inseridos no tabuleiro de reagentes do instrumento. Cada kit contém reagentes suficientes para 40 testes.

Um frasco de 19 mL de Congo Red Stain contém aproximadamente 0.1% de vermelho do Congo e 70% de isopropanol.

Um frasco de 13 mL Congo Red Buffer contém aproximadamente 0.5% de glicina e 2.0% de cloreto de sódio.

Um frasco de 19 mL de Congo Red Hematoxylin contém hematoxilina de Mayer modificada.

Três inserções de frasco com tubos de imersão.

Reconstituição, homogeneização, diluição, titulação

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

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

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

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

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

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

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

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

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

Não existem quaisquer sinais óbvios que indiquem a instabilidade destes reagentes; como tal, os controlos deverão ser executados simultaneamente com as amostras desconhecidas. Contacte o representante de assistência local se o material de controlo positivo apresentar uma diminuição da coloração, porque isso pode indicar instabilidade do reagente.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

São necessários tecidos FFPE processados regularmente para utilização com este produto e instrumentos BenchMark Special Stains. O fixador de tecido recomendado é o formol neutro tamponado a 10%.¹

Efetue a colheita e conservação das amostras de acordo com o documento do CLSI M29 T2.⁹ Corte as secções com a espessura apropriada, que é de aproximadamente 8 μm , e coloque as secções sobre lâminas de vidro carregadas positivamente.

1. Seque as lâminas.¹
2. Imprima a(s) etiqueta(s) de código(s) de barras apropriada(s).
3. Aplique as etiquetas de códigos de barras na extremidade fosca das lâminas antes de as carregar no instrumento (consulte o Manual do utilizador do instrumento para saber como aplicar corretamente as etiquetas).

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




AVISOS E PRECAUÇÕES

1. Para utilização em diagnóstico in vitro (IVD).
2. Apenas para utilização profissional.
3. **AVERTÊNCIA:** Nos Estados Unidos, a Lei Federal restringe a venda deste dispositivo a um médico ou mediante receita médica. (Rx Only)
4. Não utilizar num número de testes superior ao especificado.
5. As lâminas carregadas positivamente podem ser suscetíveis a pressões ambientais que podem ter como consequência uma coloração inadequada. Contacte o representante da Roche para mais informações sobre como utilizar estes tipos de lâminas.
6. Os materiais de origem humana ou animal devem ser manuseados como materiais que envolvem risco de contaminação e eliminados adotando as devidas precauções. Em caso de exposição, devem ser seguidas as diretivas de saúde das autoridades responsáveis.^{10,11}

- Evite o contacto dos reagentes com os olhos e as membranas mucosas. Se os reagentes entrarem em contacto com áreas sensíveis, enxague com água em abundância.
- Evite a contaminação microbiana dos reagentes, pois tal poderá dar origem a resultados incorretos.
- Para mais informações acerca da utilização deste dispositivo, consulte o Manual do utilizador do instrumento BenchMark Special Stains, bem como as instruções de utilização de todos os componentes necessários em navifyportal.roche.com.
- Consulte as autoridades locais e/ou estatais no que se refere ao método de eliminação recomendado.
- A etiquetagem de segurança do produto segue principalmente as diretrizes do GHS da UE. Ficha de dados de segurança disponível para utilizadores profissionais a pedido.
- Para reportar situações graves suspeitas relacionadas com este dispositivo, contacte o representante local da Roche e a autoridade competente do Estado-Membro ou do País onde o utilizador está estabelecido.

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

Tabela 1. Informações sobre os perigos.

Perigo	Código	Advertência
  	H225	Líquido e vapor altamente inflamáveis.
	H315	Provoca irritação cutânea.
	H319	Provoca irritação ocular grave.
	H336	Pode provocar sonolência ou vertigens.
	H350	Pode provocar cancro.
	H373	Pode afetar os órgãos após exposição prolongada ou repetida.
	P201	Pedir instruções específicas antes da utilização.
	P210	Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar.
	P260	Não respirar névoas ou vapores.
	P280	Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial/proteção auditiva.
P308+ P313	EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.	
P370+ P378	Em caso de incêndio: para extinguir utilizar areia seca, produtos químicos secos e espuma resistente a álcool.	

EUH208: este produto contém iodato de sódio. Pode provocar uma reação alérgica.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Preparar frasco de reagente

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

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

Procedimento de coloração

- Carregue os reagentes e as lâminas no instrumento.

- Introduza a tampa mole na ranhura existente no suporte de reagentes quando o reagente estiver a ser utilizado.
- Execute o processo de coloração de acordo com o protocolo recomendado na Tabela 2 e as instruções do Manual do utilizador.
- Quando o ensaio estiver concluído, remova as lâminas do instrumento.
- Utilize a tampa mole para cobrir o frasco de reagente quando o reagente não estiver a ser utilizado.

Protocolo recomendado

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

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

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

Procedimento de coloração	S Congo Red
Passo do Protocolo	Método
Desparafinação	Selecione a remoção automática de parafina.
Cozedura (opcional)	A predefinição é não estar selecionada. Recomendados 75 °C durante 4 minutos.
Option 1 ou Option 2	A predefinição é Option 1. Selecione Option 1 ou Option 2: <ul style="list-style-type: none"> Option 1 vai dispensar Congo Red Stain antes da Hematoxylin, e os núcleos vão ficar com a cor púrpura. Option 2 vai dispensar Hematoxylin antes de Congo Red Stain, e os núcleos vão ficar com a cor azul.
Option 1	
Otimizar a intensidade da coloração (C. Red Stain)	A predefinição da Option 1 é 37 °C durante 24 minutos. Selecione para ativar o ajuste da intensidade da coloração.* Selecione uma temperatura entre 37-60 °C: <ul style="list-style-type: none"> 37 °C, coloração mais clara da amiloide 60 °C, coloração mais escura da amiloide Selecione um tempo de incubação entre 20-32 minutos: <ul style="list-style-type: none"> 20 minutos, coloração mais clara da amiloide 32 minutos, coloração mais escura da amiloide
Otimizar a intensidade da Hematoxylin (C. Red Hematoxylin)	A predefinição da Option 1 é 12 minutos. Selecione, para otimizar a hematoxilina*: <ul style="list-style-type: none"> 4 minutos, coloração nuclear mais clara 16 minutos, coloração nuclear mais escura
Option 2	
Otimizar a intensidade da Hematoxylin (C. Red Hematoxylin)	A predefinição da Option 2 é 8 minutos. Selecione, para otimizar a hematoxilina*:

Procedimento de coloração	S Congo Red
Passo do Protocolo	Método
	<ul style="list-style-type: none"> 4 minutos, coloração nuclear mais clara 16 minutos, coloração nuclear mais escura
Otimizar a intensidade do vermelho Congo Red (C. Red Stain)	<p>A predefinição da Option 2 é 48 minutos.</p> <p>Selecione para ativar o ajuste da intensidade da coloração.*</p> <p>Selecione um tempo de incubação entre 32-48 minutos:</p> <ul style="list-style-type: none"> 32 minutos, coloração mais clara da amiloide 48 minutos, coloração mais escura da amiloide

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

Processamento pós-instrumento recomendado

1. Enxague as lâminas em três mudas de etanol a 100% para remover a solução restante, durante 5 a 10 segundos cada, com agitação suave.
2. Desidrate as lâminas em três mudas de xileno a 100% durante 5 a 10 segundos cada, com agitação suave.
3. Coverslip com meio de montagem permanente.
4. Compatível com o protocolo de aplicação de coverslips do sistema VENTANA HE 600. Para obter mais instruções, consulte o Manual do utilizador do sistema VENTANA HE 600.

PROCEDIMENTO DE CONTROLO DE QUALIDADE

Um exemplo de material de controlo positivo seria tecido humano FFPE positivo para amiloide, como, por exemplo, tecido de um paciente com amiloidose.¹ O tecido de controlo deverá ser uma amostra recém-colhida de autópsia, biópsia ou cirurgia, preparada ou fixada o mais cedo possível e de forma idêntica à das secções de teste. Este tipo de tecidos deve servir para monitorizar todas as etapas da análise, desde a preparação do tecido até à coloração.

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

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

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

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

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

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

INTERPRETAÇÃO DA COLORAÇÃO / RESULTADOS PREVISTOS

Congo Red Staining Kit foi testado para evidenciar a amiloide.

- Amiloide (sob fundo claro): rosa a salmão
- Amiloide (sob luz polarizada): birrefringência verde maçã
- Núcleos: púrpura com Option 1 do protocolo

- Núcleos: azul com Option 2 do protocolo
- A amiloide pode ter o aspeto de depósitos circulares ou em forma de fita com coloração rosa em todo o tecido. Tem uma particular preferência para deposição nas paredes dos vasos sanguíneos e das membranas basais. As fibras de colagénio queratinoso, elásticas e densas, podem reter o corante vermelho do Congo. A birrefringência é uma propriedade intrínseca do complexo de vermelho do Congo nos fibrilos amiloides.^{7,8} Não é possível efetuar uma identificação definitiva da amiloide sem a coloração rosa a salmão do vermelho do Congo sob fundo claro e sem a birrefringência verde maçã sob luz polarizada.

LIMITAÇÕES ESPECÍFICAS

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

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

DESEMPENHO ANALÍTICO

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

Sensibilidade e especificidade

A sensibilidade e especificidade analíticas foram avaliadas em tecidos positivos para a amiloide (vários tipos de tecidos) e pele normal. Ambas as opções do protocolo (Option 1 e Option 2) foram testadas em todos os casos de tecidos incluídos na Tabela 3. Todos os casos de tecidos avaliados (60/60) passaram no que diz respeito à coloração aceitável, como se pode ver na Tabela 3.

Tabela 3. A sensibilidade/especificidade de Congo Red Staining Kit foi determinada testando os seguintes tecidos FFPE normais e patológicos.

Tecido	N.º dos que passaram/N.º de testados
Tecidos positivos para a amiloide (vários tipos de tecidos*)	45 / 45
Pele normal	15 / 15

*Os tecidos testados incluem, mas não só, tireoide, glândula da próstata, fígado, estômago, cólon, tecidos moles e pulmão.

Precisão

A precisão de Congo Red Staining Kit foi determinada em vários ensaios, dias, instrumentos e lotes de reagentes, utilizando várias lâminas com cortes de vários tecidos positivos para a amiloide (tireoide, glândula da próstata, fígado, estômago, cólon, tecidos moles e pulmão) utilizando a Option 1 do protocolo. Todos os critérios de aceitação foram inteiramente cumpridos. Foram realizados estudos de precisão de Congo Red Staining Kit de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4. Estudos de precisão das lâminas de Congo Red Staining Kit.

Parâmetros testados	N.º de condições	N.º das que passaram/N.º testadas
De ensaio para ensaio	3 ensaios, mesmo dia	54 / 54
De dia para dia	5 dias	90 / 90
De instrumento para instrumento	3 instrumentos	54 / 54
Intraensaio	mesmo dia, mesmo instrumento	54 / 54
De lote para lote	3 lotes	54 / 54

Os resultados não demonstraram diferenças significativas na intensidade da coloração entre as lâminas.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

1. A espessura da secção pode afetar a qualidade e a intensidade da coloração. Se a coloração não for a apropriada, contacte o representante de assistência local para obter assistência.
2. O tecido necrótico ou autolisado poderá exibir uma coloração não específica.
3. Se o controlo positivo for negativo, o tecido pode ter sido colhido, fixado ou desparafinado de forma incorreta. Siga o procedimento correto de colheita, conservação e fixação.
4. Se o controlo positivo for negativo, verifique se a lâmina tem a etiqueta de código de barras correta. Se a lâmina estiver etiquetada de forma correta, verifique os outros controlos positivos do mesmo ensaio, para determinar se foram corados corretamente.
5. Se ocorrer coloração de fundo excessiva: a remoção incompleta da parafina pode causar artefactos de coloração ou ausência de coloração. Se a parafina não for toda removida da lâmina, repita o processo de coloração utilizando a opção de desparafinação alargada, caso esteja disponível.
6. Se as secções de tecido saírem da lâmina, verifique se as lâminas estão carregadas positivamente.
7. As secções mais espessas permitem observar os depósitos amiloidais de forma mais eficiente, enquanto as secções mais finas podem não apresentar a birrefringência verde maçã.
8. A intensidade da coloração diminui com a idade das secções; as secções acabadas de cortar produzem uma reação de coloração mais intensa.
9. É importante desidratar as lâminas cuidadosamente e fazer uma avaliação imediata. À semelhança do que acontece na coloração manual, o vermelho do Congo pode ser extraído durante exposição prolongada ao álcool durante a desidratação.
10. A estadia prolongada das lâminas a bordo do instrumento depois da conclusão do ensaio pode afetar a qualidade e a intensidade da coloração. Se a coloração não for a apropriada, retire prontamente as lâminas no final do ensaio e avance para o processamento pós-instrumento.
11. Para aplicar uma ação corretiva, consulte a secção Instruções de utilização, o Manual do utilizador do instrumento ou contacte o representante de assistência local.

REFERÊNCIAS

1. Carson FL, Cappellano C. Hlstotechnology; 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: neste documento, é sempre utilizado o ponto como separador decimal para marcar o limite entre a parte inteira e as partes fracionais de um número decimal. Não são utilizados separadores de milhares.

Símbolos

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



Número Global de Item Comercial



Identificação única de dispositivo



Indica a entidade que importa o dispositivo médico para a União Europeia

HISTÓRICO DE REVISÕES

Rev	Atualizações
H	Foram feitas atualizações nas secções Avisos e precauções e Referências.

PROPRIEDADE INTELECTUAL

VENTANA, BENCHMARK, VENTANA HE e o logótipo VENTANA são marcas comerciais da Roche. Todas as restantes marcas comerciais são propriedade dos respetivos titulares.

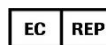
© 2023 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMAÇÕES 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

