

## Congorød - påvisning av amyloid. Histologilaboratorium, Histologisk enhet, Avd. for patologi, SSK.

Side 1 av 5

Dokumentplassering:

**II.MSK.Pat.2.3.2.4.2-10**

Godkjent dato:

**21.10.2024**

Gyldig til:

**21.10.2026**

Dato endret:

**21.10.2024**

Revisjon:

**16.00**

Medisinsk serviceklinikk/Avd for patologi SSK/Pasienter og brukere/Histologisk enhet/Histologilaboratorium


DISTRIBUSJONSliste: EK

ENDRINGER FRA FORRIGE VERSJON: Tilpasset Benchmark Special Stains

<b>Omfang</b>	Prosedyren gjelder for bioingeniører ved Enhet for histologi, med opplæring i bruk av spesialfargeinstrumentet Benchmark Special Stains (BSS) og softwareprogrammet Ventana Special Stains (VSS).
<b>Bakgrunn</b>	Kvalitativ metode for å vise amyloid i formalinfiksert og parafininnstøpt (FFPE) vev ved mistanke om amyloidose.  Moden amyloid inneholder fibriller med størrelse fra 0.1 til 10 µm i lengde som samler seg for å danne uløselige plakk som er resistent mot nedbryting. Akkumuleringen av uløselige amyloidfibriller i ekstracellulære rom kan føre til amyloidose. Det er flere typer amyloidose, og hver er karakterisert ved forekomst av uløselige amyloidplakk og/eller -masser som kan føre til celledskade og forstyrre normal organfunksjon.
<b>Akkreditert?</b>	Ja
<b>Prinsipp</b>	Congorød er et lineært fargemolekyl med affinitet for amyloidfibre. Amyloid er strukturer av β-flak, arrangert på en unik måte med kryssbindinger. Fargestoffet binder seg til strukturene med hydrogenbinding og danner et stabilt kompleks.  Dobbel lysbrytningsevne (birefringens) er en iboende egenskap ved komplekset av amyloidfibrill og Congo-rødt. Den ordnede strukturen av amyloider påvirker lysbrytningen under polarisert lys. Disse områdene vil derfor vises med en eplegrønn farge i mikroskopet. Dette anses å være spesifikt for amyloid.  Congo Red Stain: farger de atypiske proteinene (amyloid) rosa til lakserøde. Congo Red Buffer: tilsettes for å differensiere fargen. Congo Red Hematoxylin, en Mayer-hematoksylinløsning, brukes for å gi kontrasterende blå til lilla kjernefarge.
<b>Ytelse</b>	Bruk av alkoholiske løsninger, høyt saltinnhold og høy pH, vil øke spesifisiteten for amyloid. Kan falme over tid ved eksponering for lys.
<b>Sikkerhet</b>	Faresetninger: H225 Meget brannfarlig væske og damp. H315 Irriterer huden. H319 Gir alvorlig øyeirritasjon. H336 Kan forårsake døsighet eller svimmelhet. H350 Kan forårsake kreft. H373 Kan forårsake organskader ved langvarig eller gjentatt eksponering. Sikkerhetssetninger: P210 Holdes vekk fra varme, varme overflater, gnister, åpen ild og andre antenningsskilder. P260 Ikke innånd tåke eller damp.


DokumentID:D01977

Utarbeidet av: <b>Hege Wiksén</b>	Fagansvarlig: <b>Fagbioingeniør Hege Wiksén</b>	Godkjent av: <b>Avdelingssjef Hilde Bjørnestøl Hansen</b>	Verifisert av:
--------------------------------------	--	--	----------------

 SØRLANDET SYKEHUS	<b>Congorød - påvisning av amyloid. Histologilaboratorium, Histologisk enhet, Avd. for patologi, SSK.</b>				<b>Side: 2 Av: 5</b>
Dokumentplassering: II.MSK.Pat.2.3.2.4.2-10	Utarbeidet av: Hege Wiksén	Fagansvarlig: Fagbioingeniør Hege Wiksén	Godkjent dato: 21.10.2024	Godkjent av: Avdelings sjef Hilde Bjørnestøl Hansen	Revisjon: 16.00


Medisinsk serviceklinikk/Avd for patologi SSK/Pasienter og brukere/Histologisk enhet/Histologilaboratorium

	P280 Bruk vernehansker/ verneklær/ øyebeskyttelse/ ansiktsbeskyttelse. Se sikkerhetsdatablad i EcoOnline stoffkartotek.
<i>Prøvemateriale</i>	Histologiske snitt (10 µm) fra formalinfiksert parafininnstøpt (FFPE) vev.
<i>Undersøkelse</i>	Farging av snitt til mikroskopering.
<i>Forsendelse</i>	Ikke relevant.
<i>Oppbevaring og prøvepreparering</i>	Fargesettet oppbevares i 2-8°C, i kjøleskap på rom 1013BI. Bulkreagenser oppbevares i romtemperatur på rom 1009BI. Instrumentet er helautomatisk.  Prøvepreparering omfatter kun skjæring av snitt: Ferskt snittet prøve og kontrollmateriale (én dag før er ok). Tykkelse: 10 µm. Objektglass: Superfrost plus- eller Tomo Adhesive-glass.
<i>Utstyr, kalibrering</i>	BenchMark Special Stains med tilhørende utstyr og software, Tissue-Tek Prisma og – Film, superfrost plus eller TOMO-glass med aktuelt kontrollsnitt.
<i>Interferens/ Kryssreaksjoner og andre feilkilder</i>	<u>Negativt kontrollsnitt:</u> For lite bulkreagenser til at protokollen kan fullføres. Forbytting av bulkreagenser. Hette på reagensflaskene ikke fjernet.  <u>Vev falt av glass under fargeprosess:</u> Feil glasstype. Må være positivt ladet/adhesive.  <u>Ikke-spesifikk farging kan forårsakes av:</u> Nekrotisk eller autolysert vev. Fiksert i annet fiksativ enn 10% formalin. Ufullstendig parafinfjerning.  <u>Falskt negativt eller svakt resultat kan forekomme dersom:</u> Lang fikseringstid. <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ β-flakene kan ødelegges pga. oksidering. β-flakene er nødvendig for å få dobbeltbrytning.</li> </ul> Ufullstendig avparafinering. <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Kan forårsake fargingsartefakter eller ingen farging.</li> </ul> Snitt-tykkelse. <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ For tynt: Molekylkomplekset av amyloidfibrill og Congorød er stort. Derfor vil det bli vanskelig å visualisere den eplegrønne dobbeltbrytingene med polarisert lys dersom snittet er for tynt (mindre en 5 µm).</li> <li>➤ For tykt: Kan gi uklar farging. Dobbeltbrytningen blir vanskelig å tolke.</li> </ul> Gammelt snitt. <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ufargede snitt mister over tid evnen til dobbeltbrytning fordi oksidering av amyloid gir endringer i β-foldingen. Ferske snitt gir mer intens fargereaksjon.</li> </ul> Suboptimal inkubasjonstid. <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ For lang eller kort inkubasjonstid i Congorød-løsning gir h.h.v. utilstrekkelig eller overmettet farging som gjør tolkning vanskelig.</li> </ul> Lang tid i instrumentet etter endt kjøring. Lang tid i dehydreringsprosessen. <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Congorød kan ekstraheres i etanol.</li> </ul>

 SØRLANDET SYKEHUS	<b>Congorød - påvisning av amyloid. Histologilaboratorium, Histologisk enhet, Avd. for patologi, SSK.</b>			<b>Side: 3 Av: 5</b>
Dokumentplassering: II.MSK.Pat.2.3.2.4.2-10	Utarbeidet av: Hege Wiksén	Fagansvarlig: Fagbioingeniør Hege Wiksén	Godkjent dato: 21.10.2024	Godkjent av: Avdelingssjef Hilde Bjørnestøl Hansen
Revisjon: 16.00				

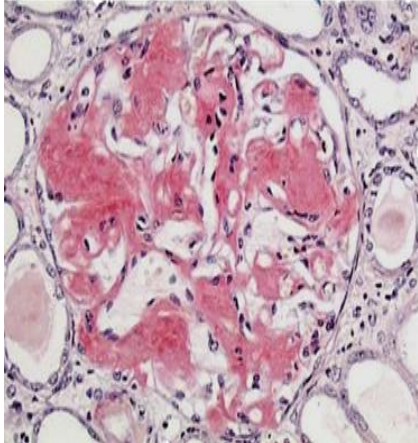
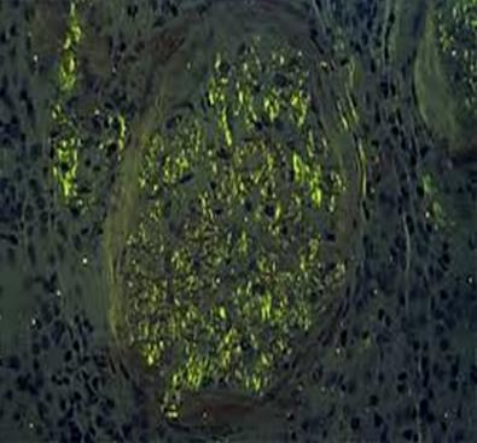
Medisinsk serviceklinikk/Avd for patologi SSK/Pasienter og brukere/Histologisk enhet/Histologilaboratorium


<i>Reagenser, slå sammen</i>	Congo Red Staining Kit, 5279429001, Roche BenchMark Special Stains Deparaffinization Solution (10 X), 6523102001, Roche BenchMark Special Stains Liquid Coverslip, 6523072001, Roche BenchMark Special Stains Wash II, 8309817001, Roche Deionisert vann
<i>Tillaging av reagenser</i>	Fargesettet er klart til bruk. Bulkreagenser blandes ved behov. Se <a href="#">egen prosedyre</a> .
<i>Kontroll- materiale</i>	Nyre og sædblære egner seg best. Kontrollsnitt må alltid være ferskt skåret på 10 µm.
<i>Utførelse</i>	Benytt Superfrost plus- eller TOMO-glass. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Objektglass merkes med riktig prøve-id ved hjelp av LVMS og SlideMate.</li> <li>• Kontrollsnitt og snitt fra aktuell prøve snittes ferskt, 10 µm tykt og monteres på objektglasset.</li> <li>• Kontrollsnittet plasseres cirka 0,5-1 cm nedenfor merkefeltet, og snitt fra prøven monteres nedenfor.</li> <li>• Kan med fordel stå i varmeskapet i ca. 15 min. før den legges i fargeinstrumentet.</li> <li>• Forsegling festes over merkeområdet med prøve-id.</li> <li>• Fargeprotokollen utføres på spesialfargemaskinen BenchMark Special Stains. Se <a href="#">egen prosedyre</a> for hvordan instrumentet betjenes.</li> </ul> For detaljert protokoll, så under. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ved fullført protokoll dehydreres, klares og dekkes prøven i Tissue-Tek Prisma/-Film ved hjelp av programmet «spesfarg dehydrering». Dette kan eventuelt gjøres manuelt.</li> </ul>

 SØRLANDET SYKEHUS	<b>Congorød - påvisning av amyloid. Histologilaboratorium, Histologisk enhet, Avd. for patologi, SSK.</b>				<b>Side: 4 Av: 5</b>
Dokumentplassering: II.MSK.Pat.2.3.2.4.2-10	Utarbeidet av: Hege Wiksén	Fagansvarlig: Fagbioingeniør Hege Wiksén	Godkjent dato: 21.10.2024	Godkjent av: Avdelings sjef Hilde Bjørnestøl Hansen	Revisjon: 16.00

Medisinsk serviceklinikk/Avd for patologi SSK/Pasienter og brukere/Histologisk enhet/Histologilaboratorium

	<b>Protocol # 3 : Congo (23.10.2020)</b> <b>Version: 3                      Validated: No                      Active: Yes</b> <b>Procedure: S Congo Red ( v1.00.0040 )</b> <b>BenchMark Special Stains</b> <b>Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA</b>																																																													
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Step No</th> <th style="text-align: left;">Procedure Step</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>Warmup Slide to [75 Deg C], and Incubate for [32 Minutes]</td></tr> <tr><td>2</td><td>Warmup Slide to 75 Deg C, and Incubate for 4 Minutes</td></tr> <tr><td>3</td><td>Apply 1000ul Depar Volume Adjust</td></tr> <tr><td>4</td><td>Rinse Slide (Depar 2)</td></tr> <tr><td>5</td><td>Apply 1000ul Depar Volume Adjust</td></tr> <tr><td>6</td><td>Rinse Slide (Depar 2)</td></tr> <tr><td>7</td><td>Apply 1000ul Depar Volume Adjust</td></tr> <tr><td>8</td><td>Apply Coverslip</td></tr> <tr><td>9</td><td>Warmup Slide to 76 Deg C, and Incubate for 4 Minutes</td></tr> <tr><td>10</td><td>Rinse Slide (Depar 2)</td></tr> <tr><td>11</td><td>Apply 500ul Depar Volume Adjust</td></tr> <tr><td>12</td><td>Apply Coverslip</td></tr> <tr><td>13</td><td>Disable Slide Heater</td></tr> <tr><td>14</td><td>Rinse Slide (SS Wash)</td></tr> <tr><td>15</td><td>Adjust SS Wash Volume</td></tr> <tr><td>16</td><td>Apply Coverslip</td></tr> <tr><td>17</td><td>Warmup Slide to [37 Deg C]</td></tr> <tr><td>18</td><td>Rinse Slide (SS Wash)</td></tr> <tr><td>19</td><td>Apply Volume Adjust + 130ul SS Wash Volume Adjust</td></tr> <tr><td>20</td><td>Apply Coverslip, 300ul of C. RED STAIN, and Incubate for [32 Minutes]</td></tr> <tr><td>21</td><td>[ Default - 37 Deg C for 24 minutes ]</td></tr> <tr><td>22</td><td>Warmup Slide to 37 Deg C</td></tr> <tr><td>23</td><td>Rinse Slide (SS Mega)</td></tr> <tr><td>24</td><td>Adjust SS Wash Volume</td></tr> <tr><td>25</td><td>Apply Coverslip, 150ul of C. RED BUFF 1, and Incubate for 4 Minutes</td></tr> <tr><td>26</td><td>Rinse Slide (SS Wash)</td></tr> <tr><td>27</td><td>Adjust SS Wash Volume</td></tr> <tr><td>28</td><td>Apply Coverslip, 100ul of C. RED HEMATOX., and Incubate for [12 Minutes]</td></tr> <tr><td>29</td><td>[ Default - 12 minutes ]</td></tr> <tr><td>30</td><td>Rinse Slide (SS Wash)</td></tr> </tbody> </table>	Step No	Procedure Step	1	Warmup Slide to [75 Deg C], and Incubate for [32 Minutes]	2	Warmup Slide to 75 Deg C, and Incubate for 4 Minutes	3	Apply 1000ul Depar Volume Adjust	4	Rinse Slide (Depar 2)	5	Apply 1000ul Depar Volume Adjust	6	Rinse Slide (Depar 2)	7	Apply 1000ul Depar Volume Adjust	8	Apply Coverslip	9	Warmup Slide to 76 Deg C, and Incubate for 4 Minutes	10	Rinse Slide (Depar 2)	11	Apply 500ul Depar Volume Adjust	12	Apply Coverslip	13	Disable Slide Heater	14	Rinse Slide (SS Wash)	15	Adjust SS Wash Volume	16	Apply Coverslip	17	Warmup Slide to [37 Deg C]	18	Rinse Slide (SS Wash)	19	Apply Volume Adjust + 130ul SS Wash Volume Adjust	20	Apply Coverslip, 300ul of C. RED STAIN, and Incubate for [32 Minutes]	21	[ Default - 37 Deg C for 24 minutes ]	22	Warmup Slide to 37 Deg C	23	Rinse Slide (SS Mega)	24	Adjust SS Wash Volume	25	Apply Coverslip, 150ul of C. RED BUFF 1, and Incubate for 4 Minutes	26	Rinse Slide (SS Wash)	27	Adjust SS Wash Volume	28	Apply Coverslip, 100ul of C. RED HEMATOX., and Incubate for [12 Minutes]	29	[ Default - 12 minutes ]	30
Step No	Procedure Step																																																													
1	Warmup Slide to [75 Deg C], and Incubate for [32 Minutes]																																																													
2	Warmup Slide to 75 Deg C, and Incubate for 4 Minutes																																																													
3	Apply 1000ul Depar Volume Adjust																																																													
4	Rinse Slide (Depar 2)																																																													
5	Apply 1000ul Depar Volume Adjust																																																													
6	Rinse Slide (Depar 2)																																																													
7	Apply 1000ul Depar Volume Adjust																																																													
8	Apply Coverslip																																																													
9	Warmup Slide to 76 Deg C, and Incubate for 4 Minutes																																																													
10	Rinse Slide (Depar 2)																																																													
11	Apply 500ul Depar Volume Adjust																																																													
12	Apply Coverslip																																																													
13	Disable Slide Heater																																																													
14	Rinse Slide (SS Wash)																																																													
15	Adjust SS Wash Volume																																																													
16	Apply Coverslip																																																													
17	Warmup Slide to [37 Deg C]																																																													
18	Rinse Slide (SS Wash)																																																													
19	Apply Volume Adjust + 130ul SS Wash Volume Adjust																																																													
20	Apply Coverslip, 300ul of C. RED STAIN, and Incubate for [32 Minutes]																																																													
21	[ Default - 37 Deg C for 24 minutes ]																																																													
22	Warmup Slide to 37 Deg C																																																													
23	Rinse Slide (SS Mega)																																																													
24	Adjust SS Wash Volume																																																													
25	Apply Coverslip, 150ul of C. RED BUFF 1, and Incubate for 4 Minutes																																																													
26	Rinse Slide (SS Wash)																																																													
27	Adjust SS Wash Volume																																																													
28	Apply Coverslip, 100ul of C. RED HEMATOX., and Incubate for [12 Minutes]																																																													
29	[ Default - 12 minutes ]																																																													
30	Rinse Slide (SS Wash)																																																													

<i>Evaluering av resultat/ Vurdering av kontroller</i>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%;">Kjerner</td> <td>Lilla</td> </tr> <tr> <td>Elastin</td> <td>Lys rosa</td> </tr> <tr> <td>Amyloid</td> <td>Rosa til rød, blir eplegrønn i polarisert lys</td> </tr> </table> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;">   </div> <p>Fargingen bør være avgrenset til amyloid-avleiringer i vevet.  Ved vanlig lys vil amyloid generelt sett vise en rosa til rød farge. Intensiteten avhenger av størrelsen, tettheten og alderen på avleiringen.  I polarisert lys vil amyloid vise en karakteristisk eplegrønn farge. Dette er obligatorisk for å kunne diagnostisere amyloid.  Andre farger som eventuelt oppstår under polarisert lys, f.eks. oransje og hvit, er ikke amyloid.</p>	Kjerner	Lilla	Elastin	Lys rosa	Amyloid	Rosa til rød, blir eplegrønn i polarisert lys
Kjerner	Lilla						
Elastin	Lys rosa						
Amyloid	Rosa til rød, blir eplegrønn i polarisert lys						

 SØRLANDET SYKEHUS	<b>Congorød - påvisning av amyloid. Histologilaboratorium, Histologisk enhet, Avd. for patologi, SSK.</b>				<b>Side: 5 Av: 5</b>
Dokumentplassering: II.MSK.Pat.2.3.2.4.2-10	Utarbeidet av: Hege Wiksén	Fagansvarlig: Fagbioingeniør Hege Wiksén	Godkjent dato: 21.10.2024	Godkjent av: Avdelingssjef Hilde Bjørnestøl Hansen	Revisjon: 16.00

Medisinsk serviceklinikk/Avd for patologi SSK/Pasienter og brukere/Histologisk enhet/Histologilaboratorium

	<p>Fremgangsmåte for å visualisere amyloid mikroskopisk:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Legg snittet på preparatbordet og finn et område der det er forholdsvis sterk rosafarge.</li> <li>• Polariseringsfilteret er plassert i den sorte avlange platen, som er finnes mellom okularene og objektivene. Platen trykkes helt mot venstre.</li> <li>• Nederst på kondensatoren finnes et filter med en liten spak. Flytt spaken slik at den står på 0 (ikke under 0).</li> <li>• Synsfeltet skal nå være mørkt og positive områder vil vises som eplegrønne områder som vist på bildet over.</li> </ul>
<i>Usikkerhet</i>	<p>Vevet må være korrekt fiksert og fremført for å oppnå tilfredstillende fargeresultat. God vannkvalitet er en forutsetning for optimalt fargeresultat. Uspesifikk binding av fargestoffene ved ionebindinger holdes på et minimum ved at pH til fargeløsningen holdes høy og at det tilsettes uorganiske salter som NaCl. Feiltolkning av dobbeltbrytning. Mikroskop ikke kalibrert, ustabil lys eller feil polariseringsvinkel. Se avsnitt Interferens, kryssreaksjoner og andre feilkilder.</p>
<i>Avfallshåndtering</i>	<p>Se prosedyre for Faremerker/avfallshåndtering for kjemikalier. Avd. for patologi. SSK.</p>
<i>Validering/dokumentasjon/referanser</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <a href="#">Pakningsvedlegg</a> Kat.nr. 05279429001: Congo Red Staining Kit</li> <li>• BenchMark Special Stains General Reference Guide_v1.0</li> <li>• BenchMark Special Stains Product Guide_v3.0</li> <li>• Theory and Practice of Histological Techniques, Bancroft and Stevens, Fourth Edition, Churchill Livingstone.</li> <li>• Histologic Preparations, Common problems and their solutions, Richard W. Brown.</li> <li>• Verifiseringsvedlegg: <a href="#">O:\Medisinsk serviceklinikk\Avdeling for patologi SSK\Histologi\Felles\Histologi\BenchMark Special Stains Ventana\Verifisering BSS 2020.xlsx</a></li> <li>• <a href="#">Endringskontroll</a></li> <li>• <a href="#">Verifisering</a></li> </ul>

**Kryssreferanser:**

[II.MSK.Pat.10.4-1 Måleusikkerhet, Histologisk enhet. Avd. for patologi. SSK](#)