

## POUŽITÍ

Kit výrobce Sigma-Aldrich, amyloidní barvivo, konžská červeně, je určen k determinaci amyloidu v tkáňových řezech. Lze ho použít pro standardní postup i pro postup v mikrovlnné troubě. Reagencie amyloidního barviva jsou určeny k "diagnostice in vitro."

Amyloid, abnormální proteinový produkt imunologické odezvy, se shromažďuje mezi parenchymálními buňkami pojivové tkáně a výsledkem je amyloidóza. Amyloid lze detekovat v tkáni pomocí konžské červeně, metachromatického aniontového barviva. První metody barvení pomocí konžské červeně vyžadovaly vyšetření nabarvených řezů polarizačním mikroskopem.<sup>1</sup> Puchtlerova modifikace, na které je založen tento postup společnosti Sigma-Aldrich, intenzifikuje barvení konžskou červení pomocí předběžného zpracování tkáně alkalickým roztokem chloridu sodného.<sup>2</sup> Řezy lze potom vyhodnotit světelným nebo polarizačním mikroskopem.

Zahrnutá je i technika barvení amyloidu pro rychlé nabarvení pomocí mikrovlnné trouby.<sup>3-5</sup>

## REAGENCIE

**ROZTOK CHLORIDU SODNÉHO, ALKOHOLOVÝ**, katalogové č. HT60-1  
SD 3A alkohol, 80 %, nasycený chloridem sodným.

**ROZTOK HYDROXIDU SODNÉHO**, katalogové č. HT60-2  
Hydroxid sodný, 1 % (0,25 mol/l).

**ROZTOK KONŽSKÉ ČERVENĚ**, katalogové č. HT60-3  
Konžská červeně (certifikovaná), 0,2 %, v SD 3A alkoholu, 80 % nasycený chloridem sodným.

### ULOŽENÍ A STABILITA:

Skladujte barvicí reagencii amyloidního barviva při pokojové teplotě (18-26 °C). Roztok konžské červeně a alkoholový roztok chloridu sodného, jsou stabilní až do data použitelnosti uvedeného na štítku.

Molarita roztoku hydroxidu sodného se dá ověřit titrací.

Výskyt sraženin v alkoholovém roztoku chloridu sodného nebo roztoku konžské červeně nemá vliv na použití.

### PŘÍPRAVA:

Roztok chloridu sodného je dodáván připravený k okamžitému použití.

Alkalický roztok chloridu sodného se připraví přidáním 0,4 mL roztoku hydroxidu sodného, katalogové č. HT60-2, do 40 mL alkoholového roztoku chloridu sodného, katalogové č. HT60-1. Těsně před použitím promíchejte. Použít jednou a znehodnotit.

Alkalický roztok konžské červeně se připraví přidáním 0,4 mL roztoku hydroxidu sodného, katalogové č. HT60-2 do 40 mL roztoku konžské červeně, katalogové č. HT60-3. Přefiltrujte do 15 minut před použitím.

### BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagensii. Odpad likvidujte v souladu se všemi místními, státními a oblastními předpisy. Viz Bezpečnostní list k materiálu, který uvádí aktuální informace o riziku, nebezpečí a bezpečnosti.

Kontrolní sklička TISSUE-TROL na amyloid jsou lidské tkáňové řezy zalité v parafínu obsahující amyloid a je třeba s nimi zacházet jako s potencionálně infekčními.

### US prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Alkoholový roztok chloridu sodného je HOŘLAVÝ A ŠKODLIVÝ. Škodlivé při vdechnutí, v kontaktu s pokožkou a spolknutím. Škodlivý: nebezpečí vážného poškození zdraví při delší expozici vdechováním, při kontaktu s kůží a požití. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice.

Roztok hydroxidu sodného je ŽÍRAVÝ. Způsobuje popáleniny. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Odstraňte okamžitě kontaminovaný oděv. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Roztok konžské červeně je HOŘLAVÝ A TOXICKÝ. Vysoce hořlavý. Může způsobit rakovinu. Škodlivé při vdechnutí, v kontaktu s pokožkou a spolknutím. Škodlivý: možné riziko ireverzibilních vlivů vdechnutím, v kontaktu s pokožkou a požitím. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. Pouze pro profesionální uživatele. Pozor: Zabraňte expozici - před použitím se seznamte se zvláštními pokyny.

Reagenční alkohol je HOŘLAVÝ A DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy. Zasažené orgány: Nervy a játra.

Xylen je HOŘLAVÝ A ŠKODLIVÝ. Možné riziko poruch plodnosti. Může poškodit nenarozené dítě. Škodlivý je vdechnutím a v kontaktu s pokožkou. Dráždí dýchací systém a pokožku. Riziko vážného poškození očí. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

Mayerův hematoxylinový roztok je TOXICKÝ. Toxický při požití. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. Zasažené orgány: Nervy a játra.

Roztoky Gill Hematoxylin jsou ŠKODLIVÉ. Škodlivý při požití. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy. Zasažené orgány: Játra a ledviny.

EU Prohlášení o rizicích a bezpečnosti (Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná)

Alkoholový roztok chloridu sodného je VYSOCE HOŘLAVÝ A ŠKODLIVÝ. Vysoce hořlavý. Škodlivé při vdechnutí, v kontaktu s pokožkou a spolknutím. Škodlivý: nebezpečí vážného poškození zdraví při delší expozici vdechováním, při kontaktu s kůží a požití. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice.

Roztok hydroxidu sodného je DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc.

Roztok konžské červeně je VYSOCE HOŘLAVÝ A TOXICKÝ. Vysoce hořlavý. Může způsobit rakovinu. Škodlivé při vdechnutí, v kontaktu s pokožkou a spolknutím. Škodlivý: možné riziko ireverzibilních vlivů vdechnutím, v kontaktu s pokožkou a požitím. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Používejte vhodné ochranné oblečení a rukavice. Pouze pro profesionální uživatele. Pozor: Zabraňte expozici - před použitím se seznamte se zvláštními pokyny.

Reagenční alkohol je VYSOCE HOŘLAVÝ A DRÁŽDIVÝ. Vysoce hořlavý. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Chraňte před zdrojem zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy.

Xylen je ŠKODLIVÝ. Hořlavý. Škodlivý je vdechnutím a v kontaktu s pokožkou. Dráždí oči. Zamezte kontaktu s očima.

Mayerův hematoxylinový roztok je ŠKODLIVÝ. Škodlivý při požití.

Roztoky Gill Hematoxylin jsou ŠKODLIVÉ. Škodlivý při požití. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy.

## POSTUP

### ODBĚR VZORKŮ:

Doporučuje se provádět odběr vzorků v souladu s dokumentem M29-A2 směrnice NCCLS. Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout úplné zajištění, že krevní vzorky nebo tkáň nebudou přenášet infekci. Proto všechny krevní deriváty nebo tkáňové vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční.

Lze použít parafínové řezy fixované v tekutině podle Carnoye, absolutní alkohol, roztok formalinu, 10 % neutrální pufovaný nebo Bouinův roztok.<sup>2</sup> Řezy je třeba nařezat na tloušťku 6-12 mikronů. Tenčí řezy nemusí zobrazovat malá množství usazenin amyloidu a nezobrazí dvojloem.

### POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

Positivní kontrolní sklička, například Sigma Amyloid TISSUE-TROL, katalogové č. A 2424,

je třeba zařadit do každého cyklu

Mayerův hematoxylinový roztok nebo

Hematoxylinový roztok, Gill č. 3

Xylen

Ethanol, absolutní

POUZE PRO POSTUP S MIKROVLNNOU TROUBOU:

Mikrovlnná trouba ACCUMATE™ H2100, katalogové č. A 9084 (110 v) nebo A 9209 (220 v)

Nádoby pro barvení, katalogové č. S 5641

VOLITELNÉ REAGENCIE / VYBAVENÍ:

Mikroskop nebo polarizační mikroskop

### POZNÁMKY:

Před použitím mikrovlnné trouby Sigma-Aldrich H2100 Microwave se prosím seznamte s Návodem k použití výrobce.

Pro vyhodnocování usazenin amyloidu je velmi doporučováno použití polarizačního světla. Dvojloem barvy zeleného jablka je považován za specifický pro amyloid.

Prodoulená fixace ve formalinu může tlumit intenzitu barvení konžskou červení.<sup>7</sup>

Tkáň fixovaná v alkoholu mohou vykazovat více intenzivní zbarvení amyloidu ve srovnání s tkáněmi fixovanými ve formalínu.<sup>8</sup>

Údaje získané z tohoto postupu slouží pouze jako diagnostická pomůcka a měly by se prověřit ve spojení s jinými klinickými diagnostickými testy nebo informacemi.

### POSTUP:

1. Odstraňte paraffin a hydratujte řezy deionizovanou vodou.
2. Proveďte barvení v roztoku Mayerův hematoxylinový roztok, 10 minut.

NEBO

1. v roztoku hematoxylinu, Gill č. 3, na **3 minuty**.
2. Promyjte sklička ve vodovodní vodě po dobu **5 minut**.
3. Vložte do alkalického roztoku chloridu sodného na **20 minut**.
4. Proveďte barvení v alkalickém roztoku konžské červeně po dobu **20 minut**.<sup>9</sup>
5. Propláchněte ve 3 vyměněných lázních absolutního ethanolu.
6. Vyčistěte v xylynu a namontujte. Vyšetřete mikroskopicky.

#### MIKROVLNNÝ POSTUP ACCUMATE™ H2100:

1. Odstraňte parafin a hydratujte řezy deionizovanou vodou.
2. Umístíte sklíčka do roztoku **40 mL** hematoxylinu Gill č. 3 umístěného v umělohmotné nádobě Coplin. Volně přikryjte nádobu víkem nebo použijte víko s otvory.
3. Spusťte mikrovlnou troubu na **800 wattů** na **5 sekund**.
4. Promyjte řádně sklíčka v tekoucí vodě po dobu **1–2 minut**.
5. Umístíte sklíčka do alkalického roztoku **40 mL** chloridu sodného umístěného v umělohmotné nádobě Coplin.
6. Spusťte mikrovlnou troubu na **400 wattů** na **20 sekund**.
7. Vložte sklíčka přímo do alkalického roztoku **40 mL** konzské červeně umístěného v umělohmotné nádobě Coplin.
8. Spusťte mikrovlnou troubu na **400 wattů** na **30 sekund**. Inkubujte **5 minut**.
9. Propláchněte ve třech vyměňených lázních absolutního ethanolu.
10. Vyčistěte v xyleny a namontujte. Vyšetřete mikroskopicky.

---

### CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

---

Amyloid	—	Červený až růžovo červený
Jádra	—	Modrá
Elastická vlákna	—	Slabě červená

Jestliže jsou sklíčka vyšetřována polarizačním mikroskopem, amyloid zobrazuje dvojnolm barvy zeleného jablka.

Pokud se zjištěné výsledky liší od očekávaných, kontaktujte prosím technické služby společnosti Sigma-Aldrich za účelem konzultace.

---

### REFERENCE

---

1. Selected Histochemical and Histopathological Methods. Edited by SW Thompson, Charles C. Thomas, Springfield (IL), 1966, pp 402-405
2. Theory and Practice of Histotechnology. Edited by DC Sheehan and BB Hrapchak, 2nd ed. Mosby, St. Louis (MO), 1980, pp 177-178
3. Leong AS-Y, Milios J: Rapid immunoperoxidase staining of lymphocyte antigens using microwave irradiation. J Pathol 148:183, 1986
4. Brinn NT: Rapid metallic histologic staining using the microwave oven. J Histotechnol 6:125, 1983
5. Valle S: Special stains in microwave oven. J Histotechnol 9:237, 1986
6. Theory and Practice of Histological Techniques. Edited by J D Bancroft and A Stevens, Churchill Livingstone, New York (NY), 1977, p 129
7. Theory and Practice of Histological Techniques, 5th Edition, Bancroft JD, Gamble M, Editors Churchill Livingstone, New York (NY), 2002, p 311
8. Humanson's Animal Tissue Techniques, 5th Edition, Presnell JK and Schreibman MP, Editors The John Hopkins University Press, Baltimore (MD), 1997, p 270

Sigma-Aldrich, Inc. garantuje, že její produkty se shodují s informacemi obsaženými v této a jiných publikacích Sigma-Aldrich. Kupující musí stanovit vhodnost produktu(ů) pro dané použití. Mohou platit dodatečné podmínky. Viz zadní strana faktury nebo útržek obalu, kde jsou uvedeny dodatky k prodejním podmínkám.

Postup č. HT60  
Předchozí revize: 2003-03  
Revidováno: 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse  
Egham, TW20 9BD Velká Británie

SIGMA-ALDRICH, INC.  
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765  
Technické služby: 800-325-0250 nebo volejte na 314-771-3122  
nebo e-mailujte na [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)  
Objednávky: 800-325-3010 nebo volejte na 314-771-5750  
[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH  
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Německo 49-7329-970