

## USO PREVISTO

I reagenti PAS (acido periodico-Schiff) sono riservati al solo "uso diagnostico in vitro". La procedura di colorazione PAS Sigma-Aldrich prevede procedure standard e al microonde per la rivelazione dei linfociti e dei mucopolisaccaridi. Lo schema di colorazione dei linfociti è utile per prendere decisioni terapeutiche in casi appurati di leucemia linfocitica. La reazione PAS nelle sezioni di tessuto è utile per la rivelazione dei mucopolisaccaridi. Il processo digestivo denominato diastasi ( $\alpha$ -amilasi), seguito dalla colorazione PAS, costituisce un utile strumento ausiliario nella diagnosi della glicogenosi.

La procedura di colorazione PAS può essere inoltre impiegata per la rivelazione di organismi fungini nelle sezioni di tessuto.<sup>2</sup>

Se trattati con acido periodico, i glicoli vengono trasformati in aldeidi mediante ossidazione. Dopo la reazione con il reagente di Schiff (una miscela di pararosanilina e metabisolfito di sodio), viene rilasciato un addotto di pararosanilina che colora i componenti cellulari contenenti glicole.<sup>1</sup> Questa reazione può essere effettuata su pellicole con sangue o midollo osseo, preparati di tessuto per microscopia oppure sezioni di tessuto.<sup>2,3</sup> Se si utilizzano pellicole con sangue o midollo osseo, il test può fornire indicazioni utili per l'identificazione di casi di eritroleucemia e leucemia linfoblastica acuta.<sup>4</sup>

La diastasi ( $\alpha$ -amilasi) può costituire uno strumento di supporto nella diagnosi della glicogenosi. Tramite questo processo digestivo vengono idrolizzati l'amido, il glicogeno e i prodotti di degradazione originati da questi polisaccaridi presenti nel tessuto. I prodotti di scarto della digestione vengono lavati via prima della colorazione PAS.<sup>5</sup>

Le procedure Sigma-Aldrich includono tecniche PAS per la colorazione rapida in forno a microonde.<sup>6-8</sup>

## REAGENTI

### SOLUZIONE DI ACIDO PERIODICO, n. di catalogo 395-1

Acido periodico 1 g/dl.

### REAGENTE DI SCHIFF, n. di catalogo 395-2

Pararosanilina HCl all'1% e metabisolfito di sodio al 4% in acido cloridrico 0,25 mol/l.

### SOLUZIONE EMATOSSILINA DI GILL 3, n. di catalogo GHS-3

Ematossilina certificata 6 g/l; iodato di sodio 0,6 g/l; solfato di alluminio 52,8 g/l; con stabilizzatore.

### CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare la soluzione di acido periodico e il reagente di Schiff in frigorifero (2–8°C). Conservare la soluzione ematosilina di Gill 3 a temperatura ambiente (18–26°C) e al riparo dalla luce. I reagenti si mantengono stabili sino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

### DETERIORAMENTO

Scartare la soluzione ematosilina di Gill 3 se assume una colorazione marrone (sovraossidazione per mezzo dell'aria) o viola (perdita di acidità) oppure se il tempo necessario per un'adeguata colorazione supera di oltre 5 minuti il tempo consigliato nella procedura.

### PREPARAZIONE

La soluzione di acido periodico, il reagente di Schiff e la soluzione ematosilina di Gill 3 sono forniti già pronti per l'uso.

Preparare la SOLUZIONE FISSANTE ETANOLO-FORMALINA mescolando 5 ml di formaldeide con 45 ml di etanolo al 95% (alcol anidro). Preparare giornalmente e conservare in un contenitore ben chiuso.

### PRECAUZIONI

Seguire le normali precauzioni adottate per i reagenti di laboratorio. Smaltire i rifiuti conformemente alle normative vigenti a livello locale, regionale o nazionale. Fare riferimento al foglio dati relativo alla sicurezza dei materiali per informazioni aggiornate riguardanti i rischi, i pericoli e la sicurezza associati all'uso di questi prodotti.

I vetrini di controllo PAS TISSUE-TROL contengono sezioni di tessuto umano sparaffinate e devono essere considerati potenziali veicoli di infezioni.

Dichiarazioni sui rischi e la sicurezza (U.S.A.)

La soluzione di acido periodico è CORROSIVA. Causa ustioni. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Rimuovere immediatamente eventuali indumenti contaminati. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso.

Il reagente di Schiff è TOSSICO. Nocivo per ingestione. Causa ustioni. Prodotto cancerogeno. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile). Solo per uso professionale. Evitare l'esposizione – Procurarsi le istruzioni speciali prima dell'uso.

La soluzione ematosilina di Gill 3 è NOCIVA. Molto tossica per inalazione. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei. Organi colpiti: fegato e reni.

L'alcol anidro è INFIAMMABILE e IRRITANTE. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Mantenere i contenitori ben chiusi. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei.

Lo xilene è INFIAMMABILE e NOCIVO. Possibile rischio di riduzione della fertilità. Può provocare danni al feto. Nocivo per inalazione e a contatto con la cute. Irritante per il sistema respiratorio e la cute. Rischio di gravi lesioni oculari. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile).

Dichiarazioni sui rischi e la sicurezza (U.E.)

La soluzione di acido periodico è CORROSIVA. Causa ustioni. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Rimuovere immediatamente eventuali indumenti contaminati. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso.

Il reagente di Schiff è TOSSICO. Causa ustioni. Prodotto cancerogeno. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti adeguatamente protettivi, guanti e protezione per gli occhi e il viso. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrando l'etichetta del prodotto se possibile). Solo per uso professionale. Evitare l'esposizione – Procurarsi le istruzioni speciali prima dell'uso.

La soluzione ematosilina di Gill 3 è NOCIVA. Molto tossica per inalazione. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei.

L'alcol anidro è FACILMENTE INFIAMMABILE e IRRITANTE. Facilmente infiammabile. Irritante per gli occhi, il sistema respiratorio e la cute. Mantenere i contenitori ben chiusi. Tenere lontano da fiamme e scintille – Non fumare. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e ricorrere all'assistenza di un medico. Indossare indumenti protettivi idonei.

Lo xilene è NOCIVO. Infiammabile. Nocivo per inalazione e a contatto con la cute. Irritante per la cute. Evitare il contatto con gli occhi.

## PROCEDURA

### RACCOLTA DEI CAMPIONI

Per la raccolta dei campioni, attenersi alla procedura descritta nel documento NCCLS numero M29-A2. Nessun metodo di analisi noto garantisce con assoluta certezza che i campioni di sangue o il tessuto non trasmettano infezioni. Di conseguenza tutti i derivati del sangue e i campioni di tessuto devono essere considerati potenziali veicoli di infezioni.

Si utilizzano pellicole con midollo osseo o con sangue intero in EDTA o eparina. Fissare appena possibile.<sup>4</sup>

Per i polisaccaridi è possibile utilizzare tessuto fissato in formalina neutra tamponata al 10% di Zenker o di Bouin.<sup>2</sup> Si noti che alcuni carboidrati sono idrosolubili.<sup>3</sup> Per la rivelazione del glicogeno, si consiglia di utilizzare liquido di Carnoy o di Gendre oppure formalina alcolica acida.<sup>2</sup> Il tempo necessario per l'estrazione della diastasi potrebbe aumentare se il tessuto è stato fissato in acido picrico contenente un fissante.<sup>2</sup> Tagliare le sezioni di tessuto a 5 micron.

### MATERIALI SPECIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Soluzione di formaldeide, 37%

Alcol anidro

Carta Whatman n. 4

Ad ogni seduta utilizzare i vetrini di controllo PAS, come Sigma-Aldrich PAS TISSUE-TROL (n. di catalogo P 8814).

### SOLO CON LE PROCEDURE PER FORNO A MICROONDE

Forno a microonde ACCUMATE™ H2100, n. di catalogo A 9084 (110 v) o A 9209 (220 v)

Vaschetta Coplin con coperchi perforati

Acqua di Scott tampone concentrato  
 $\alpha$ -amilasi, tipo VI-B, da pancreas porcini (solo per la procedura di estrazione della diastasi)

### NOTE

Se si adotta la procedura Sigma-Aldrich per forno a microonde H2100, fare riferimento al manuale del produttore per le istruzioni operative.

A scopo di controllo, è possibile includere anche pellicole di sangue preparate, provenienti da individui clinicamente sani. I leucociti polimorfonucleari presenteranno una colorazione citoplasmatica rosso intenso. Ogni volta che viene eseguita una sequenza di colorazione, è necessario includere alcune sezioni di tessuto risultate positive al PAS e/o contenenti glicogeno. A questo scopo sono disponibili i vetrini di controllo Sigma-Aldrich PAS TISSUE-TROL™ (n. di catalogo P 8814).

I dati generati da questa procedura sono da utilizzarsi soltanto a sostegno della diagnosi e devono essere valutati congiuntamente ad altri esami e dati diagnostici.

### PROCEDURA

#### I. PREPARATI PER MICROSCOPIA CON SANGUE, MIDOLLO OSSEO O TESSUTO

##### Procedura standard:

1. Fissare le pellicole di sangue (asciugate all'aria) per **1 minuto a temperatura ambiente** in soluzione fissante formalina-etanolo.
2. Sciacquare i vetrini per **1 minuto** sotto un flusso leggero di acqua corrente.
3. Immergere i vetrini nella soluzione di acido periodico (n. di catalogo 395-1) per **5 minuti a temperatura ambiente**.
4. Sciacquare i vetrini cambiando più volte l'acqua distillata.
5. Immergere i vetrini nel reagente di Schiff (n. di catalogo 395-2) per **15 minuti a temperatura ambiente**.

NOTA Subito dopo l'uso, apporre il tappo e riporre il reagente di Schiff in frigorifero (2–8°C).

6. Lavare i vetrini in acqua corrente per **5 minuti**.

7. Procedere alla colorazione di contrasto dei vetrini in soluzione ematossilina di Gill 3 (n. di catalogo GHS-3) per **90 secondi**.
8. Sciacquare i vetrini in acqua corrente per **15–30 secondi**, asciugarli all'aria ed esaminarli al microscopio utilizzando lenti ad immersione in olio (900x). I vetrini possono essere montati su un mezzo di montaggio in toluene o xilene.

#### Procedura per microonde:

1. Fissare le pellicole asciugate all'aria a **temperatura ambiente** per **1 minuto** nel fissante formalina-etanolo.
2. Sciacquare i vetrini per **1 minuto** sotto un flusso leggero di acqua corrente.
3. Collocare i vetrini in **40 ml** di soluzione di acido periodico all'interno di una vaschetta Coplin di plastica.
4. Mettere in microonde a **800 watt** per **10 secondi**.
5. Sciacquare accuratamente i vetrini cambiando più volte l'acqua deionizzata.
6. Collocare i vetrini in **40 ml** di reagente di Schiff all'interno di una vaschetta Coplin di plastica.
7. Mettere in microonde a **800 watt** per **15 secondi**. Mescolare la soluzione con una pipetta Beral o un bastoncino applicatore e incubare per **1 minuto**.
8. Sciacquare sotto un flusso leggero di acqua corrente calda per **5 minuti**.
9. Collocare i vetrini in **40 ml** di soluzione ematossilina di Gill 3 all'interno di una vaschetta Coplin di plastica.
10. Mettere in microonde a **800 watt** per **10 secondi**.
11. Sciacquare in acqua corrente per **1–2 minuti**, quindi colorare di Blu in acqua di Scott tampone concentrato a **temperatura ambiente**.
12. Sciacquare in acqua corrente. Asciugare all'aria.
13. I vetrini possono essere montati su un mezzo di montaggio in toluene o xilene.

#### II. SEZIONI DI TESSUTO

##### Procedura standard:

1. Deparaffinare e idratare le sezioni in acqua deionizzata.
2. Immergere i vetrini nella soluzione di acido periodico (n. di catalogo 395-1) per **5 minuti a temperatura ambiente**.
3. Sciacquare i vetrini cambiando più volte l'acqua distillata.
4. Immergere i vetrini nel reagente di Schiff (n. di catalogo 395-2) per **15 minuti a temperatura ambiente** (18–26°C).
5. Lavare i vetrini in acqua corrente per **5 minuti**.
6. Procedere alla colorazione di contrasto dei vetrini in soluzione ematossilina di Gill 3 (n. di catalogo GHS-3) per **90 secondi**.
7. Sciacquare i vetrini in acqua corrente.
8. Disidratare, chiarificare e montare le sezioni su un mezzo di montaggio in toluene o xilene.

##### Procedura in microonde per diastasi ( $\alpha$ -amilasi):

1. Utilizzare vetrini duplicati. Etichettare un vetrino per la digestione con diastasi e un vetrino per la sola colorazione PAS.  
NOTA Si consiglia l'uso di vetrini rivestiti di tessuto adesivo.  
Non utilizzare celloidina nelle sezioni quando si effettua la digestione con diastasi.<sup>2</sup>
2. Deparaffinare e idratare i vetrini in acqua deionizzata.
3. Preparare la soluzione di lavoro diastasi ( $\alpha$ -amilasi) facendo sciogliere **0,2 g di  $\alpha$ -amilasi** (n. di catalogo A 3176) in **40 ml** di acqua deionizzata. Mescolare con cura e collocare in una vaschetta Coplin di plastica. Preparare appena prima dell'uso.
4. Mettere in microonde a **600 watt** per **25 secondi**.
5. Estrarre i vetrini dalla vaschetta Coplin e sciacquare i vetrini per la digestione in acqua corrente per **5 minuti**.
6. Utilizzando sia i vetrini per la digestione sia gli altri vetrini, passare alla procedura per microonde per i tessuti (punto 2).

##### Procedura per microonde:

1. Deparaffinare e idratare in acqua deionizzata.
2. Collocare i vetrini in **40 ml** di soluzione di acido periodico all'interno di una vaschetta Coplin di plastica. Richiudere la vaschetta senza stringere il coperchio oppure utilizzare un coperchio perforato.
3. Mettere in microonde a **800 watt** per **10 secondi**.
4. Sciacquare accuratamente i vetrini cambiando più volte l'acqua deionizzata.
5. Collocare i vetrini in **40 ml** di reagente di Schiff all'interno di una vaschetta Coplin di plastica.
6. Mettere in microonde a **800 watt** per **15 secondi**. Mescolare la soluzione con una pipetta Beral o un bastoncino applicatore e incubare per **1 minuto**.
7. Sciacquare sotto un flusso leggero di acqua corrente calda per **5 minuti**.
8. Collocare i vetrini in soluzione ematossilina di Gill 3 oppure in soluzione verde luce (Light Green) all'interno di una vaschetta Coplin di plastica.
9. Mettere in microonde a **800 watt** per **10 secondi**.
10. a. Se si utilizza la soluzione ematossilina di Gill, sciacquare in acqua corrente per **1–2 minuti**, quindi colorare di Blu in acqua di Scott tampone concentrato a **temperatura ambiente**. Sciacquare in acqua corrente. Disidratare, chiarificare e montare.  
b. Se si utilizza la soluzione verde luce (Light Green), sciacquare rapidamente in acqua deionizzata, disidratare rapidamente, chiarificare e montare.

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (USA) +1 314 771 5765

Assistenza tecnica: a carico del destinatario +1 314 771 3122

o tramite e-mail all'indirizzo [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)

Per ordinare: a carico del destinatario +1 314 771 5750

[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

## CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Le sostanze positive al PAS assumono una colorazione tra il rosa e il rosso, mentre i nuclei sono blu. Un vetrino di estrazione della diastasi ( $\alpha$ -amilasi) non presenterà nessuna colorazione PAS visibile del glicogeno se confrontato con un vetrino di controllo positivo al glicogeno non digerito.

Se i risultati osservati si discostano dai risultati attesi, contattare l'assistenza tecnica Sigma-Aldrich per informazioni di supporto.

## BIBLIOGRAFIA

1. Hotchkiss RD: A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Arch Biochem 16:131, 1948
2. Sheehan DC, Hrapchak BB: Theory and Practice Histotechnology, 2nd ed. CV Mosby, St. Louis, (MO), pp 52, 164–167, 1980
3. Culling CFA, Allison RT, Barr WT: Cellular Pathology Technique, 4th ed. Butterworths, pp 216–220, 1985
4. Davey FR, Nelson DA: Periodic Acid Schiff (PAS) Stain. IN Hematology, 2nd ed. WJ Williams, E Buetler, AJ Erslev, RW Rundles, McGraw-Hill, New York, pp 1630–1632, 1977
5. Thompson SW: Selected Histochemical and Histopathological Methods, CC Thomas, Springfield, (IL), pp 520–539, 1966
6. Leong AS-Y, Milios J: Rapid immunoperoxidase staining of lymphocyte antigens using microwave irradiation. J Pathol 148:183, 1986
7. Brinn NT: Rapid metallic histologic staining using the microwave oven. J Histotechnol 6:125, 1983
8. Valle S: Special stains in the microwave oven. J. Histotechnol 9:237, 1986

Sigma-Aldrich, Inc. garantisce che i propri prodotti sono conformi alle informazioni contenute nel presente documento e in altre pubblicazioni Sigma-Aldrich. Spetta all'acquirente stabilire se i prodotti sono idonei all'uso particolare che ne viene fatto. È possibile che sussistano ulteriori termini e condizioni. Vedere il retro della fattura o la distinta di imballaggio per i termini e le condizioni di vendita.

Procedura n. 395  
Revisione precedente: 2003-02  
Revisione: 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse  
Egham TW20 9BD (Regno Unito)