

# Novocastra™ Hematoxylin

Product Code: RE7107

Leica Biosystems Newcastle Ltd  
Balliol Business Park West  
Benton Lane  
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW  
United Kingdom  
☎ +44 191 215 4242



EN FR IT DE ES PT SV EL DA NL  
NO TR BG HU RO RU PL SL CS SK

## Instructions for Use

Please read before using this product.

## Mode d'emploi

À lire avant d'utiliser ce produit.

## Istruzioni per L'uso

Si prega di leggere, prima di usare il prodotto.

## Gebrauchsanweisung

Bitte vor der Verwendung dieses Produkts lesen.

## Instrucciones de Uso

Por favor, leer antes de utilizar este producto.

## Instruções de Utilização

Leia estas instruções antes de utilizar este produto.

## Instruktioner vid Användning

Var god läs innan ni använder produkten.

## Οδηγίες Χρήσης

Παρακαλούμε διαβάστε τις οδηγίες πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν αυτό.

## Brugsanvisning

Læs venligst før produktet tages i brug.

## Gebruiksaanwijzing

Lezen vóór gebruik van dit product.

## Bruksanvisning

Vennligst les denne før du bruker produktet.

## Kullanım Talimatları

Lütfen bu ürünü kullanmadan önce okuyunuz.

## Инструкции за употреба

Моля, прочетете преди употреба на този продукт.

## Használati utasítás

A termék használatba vétele előtt olvassa el.

## Instruționi de utilizare

Citiți aceste instrucțiuni înainte de a utiliza produsul.

## Инструкция по применению

Прочтите перед применением этого продукта.

## Instrukcja obsługi

Przed użyciem tego produktu należy przeczytać instrukcję.

## Navodila za uporabo

Preberite pred uporabo tega izdelka.

## Návod k použití

Čtěte před použitím tohoto výrobku.

## Návod na použitie

Prosím, prečítajte si ho pred použitím produktov.

## Check the integrity of the packaging before use.

Vérifier que le conditionnement est en bon état avant l'emploi.

Prima dell'uso, controllare l'integrità della confezione.

Vor dem Gebrauch die Verpackung auf Unversehrtheit überprüfen.

Comprobar la integridad del envase, antes de usarlo.

Verifique a integridade da embalagem antes de utilizar o produto.

Kontrollera att paketet är obrutet innan användning.

Ελέγξτε την ακεραιότητα της συσκευασίας πριν από τη χρήση.

Kontroller, at pakken er ubeskadiget før brug.

Controleer de verpakking vóór gebruik.

Sjekk at pakningen er intakt før bruk.

Kullanmadan önce ambalajın bozulmamış olmasını kontrol edin.

Проверете целостта на опаковката преди употреба.

Használat előtt ellenőrizze a csomagolás épségét.

Verificați integritatea ambalajului înainte de a utiliza produsul.

Перед применением убедитесь в целостности упаковки.

Przed użyciem należy sprawdzić, czy opakowanie jest szczelne.

Pred uporabo preverite celovitost embalaže.

Před použitím zkontrolujte neporušenost obalu.

Pre použitím skontrolujte, či balenie nie je porušené.



# Novocastra™ Hematoxylin

## Product Code: RE7107

### Intended Use

*For in vitro diagnostic use.*

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 is intended for use in immunohistochemical (IHC) staining procedures such as those described in the Instructions for Use of the Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K and Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

### Principle of Procedure

Hematoxylin stains cell nuclei and has many uses in histology, the most common of which is the Hematoxylin and Eosin stain.<sup>1</sup> In IHC procedures hematoxylin can be used as a counterstain to aid the visualisation and localization of the colored end product of the IHC procedure.

This product is used in IHC procedures, which allow the qualitative identification by light microscopy of antigens in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, via sequential steps with interposed washing steps (for IHC Principle of Procedure see appropriate detection system Instructions for Use). Novocastra™ Hematoxylin RE7107 is applied to sections after the substrate/chromogen reaction. It stains nuclei a red color and is converted to blue by washing sections in either water or weak alkaline solution (bluing reagent).

### Reagents Provided

Hematoxylin RE7107 (25ml). <0.1% Hematoxylin.

### Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

Hematoxylin RE7107 is a ready to use reagent. Reconstitution, mixing, dilution, or titration of this reagent is not recommended. Further dilution may result in loss of antigen staining. The user must validate any such change.

### Storage and Stability

Store at 2–8 °C. Do not freeze. Return to 2–8 °C immediately after use. Do not use after expiration date indicated on the product label. Storage conditions other than those specified must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product, therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient samples.

### Specimen Preparation

The recommended fixative is 10% neutral-buffered formalin for paraffin-embedded tissue sections.

### Warnings and Precautions

For professional users.

A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.<sup>2</sup>

Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucus membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Consult Federal, State or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results. Any such change must be validated by the user.

### Procedure

#### A. Reagents required but not supplied

1. Standard solvents used in immunohistochemistry.
2. 50mM tris-buffered saline (TBS) pH7.6.
3. Antigen retrieval solution(s) (see Recommendations on Use for primary antibody).
4. Enzyme retrieval solution(s) (see Recommendations on Use for primary antibody).
5. Antibody diluent.
6. Primary antibody.
7. Detection system.
8. Bluing reagent eg Scotts tap water substitute or saturated lithium carbonate.
9. Mounting medium.

#### B. Equipment required but not supplied

1. Equipment required for antigen retrieval, if recommended for the primary antibody.
2. General immunohistochemistry laboratory equipment.

### C. Methodology

**Prior to undertaking this methodology, users must be trained in immunohistochemical techniques.**

**The combination of the primary antibody, its dilution, together with Hematoxylin RE7107 and the detection system should be validated by the user on a series of known positive and negative controls.**

Unless indicated, all steps are performed at room temperature (25 °C). The following steps should be undertaken at the appropriate stage in the IHC protocol (see detection system Instructions for Use)

1. Rinse in water.
2. Stain sections with Hematoxylin RE7107 for 5 minutes.
3. Rinse in water.
4. If required, blue in bluing reagent.
5. Rinse in water.

### Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures. Controls should be fresh autopsy/biopsy/ surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

### Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques. One positive tissue control should be included for each set of test conditions/primary antibody in each staining run. A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.<sup>3</sup> For recommended positive control tissue see primary antibody instructions for Use. If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

### Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody. For recommended negative control tissue see primary antibody Instructions for Use. Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user. Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.<sup>4</sup> False-positive results may be seen due to nonimmunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin<sup>5</sup> (eg. liver, breast, brain, kidney). To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate-chromogen, Streptavidin-HRP or labeled polymer, and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

### Negative Reagent Control

Use a non-specific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate non-specificstaining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site.

### Patient Tissue

Examine stained patient specimens last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

### General Limitations

Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.<sup>6</sup>

Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 is for use on paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

### Performance Characteristics

The performance of Novocastra™ Hematoxylin RE7107 has been validated using a range of mouse Novocastra™ IgG, mouse IgM and rabbit IgG primary antibodies in combination with the Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K and Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

This product is stable up to the expiry date indicated on the product label.

## **Bibliography - General**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161 167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## **Amendments to Previous Issue**

Reagents Provided.

## **Date of Issue**

24 September 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Référence du Produit: RE7107

### Utilisation Prévue

*Diagnostic in vitro.*

Le Novocastra™ Hematoxylin RE7107 est destiné à être utilisé dans le cadre des procédures immunohistochimiques (IHC) de marquage telles que celles qui sont décrites dans le Mode d'emploi des produits Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K et Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. L'interprétation clinique de tout marquage, ou absence de marquage, doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée par un pathologiste qualifié à la lumière des antécédents cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques.

### Principe de la Procédure

L'hématoxyline colore les noyaux cellulaires et a de nombreuses applications en histologie, la plus courante étant la coloration par l'hématoxyline et l'éosine.<sup>1</sup> Dans le cadre des procédures IHC, l'hématoxyline peut être utilisée comme colorant de contraste et participe à la révélation et à la localisation des produits finaux colorés des procédures IHC. Ce produit est utilisé dans le cadre des procédures immunohistochimiques (IHC) qui permettent une identification qualitative des antigènes par microscopie optique, dans des coupes fixées au formol, incluses en paraffine, par l'intermédiaire d'étapes séquentielles comportant des étapes de lavage (pour le Principe de la procédure de marquage IHC, voir le Mode d'emploi du système de détection approprié). Le Novocastra™ Hematoxylin RE7107 est appliqué sur des coupes après la réaction substrat/chromogène. Il colore les noyaux en rouge puis en bleu après lavage des coupes à l'eau ou par une solution faiblement alcaline (réactif de bleuissement).

### Réactifs fournis

Hematoxylin RE7107 (25 ml). Hématoxyline à <0,1 %.

### Reconstitution, Mélange, Dilution, Titrage

Le Hematoxylin RE7107 est un réactif prêt à l'emploi. Il n'est pas recommandé de reconstituer, mélanger, diluer, ou titrer ces réactifs. Une dilution supplémentaire est susceptible de se traduire par une perte de marquage des antigènes. Toute modification de ce type doit être validée par l'utilisateur.

### Conservation et Stabilité

Conserver à 2–8 °C. Ne pas congeler. Remettre immédiatement à 2–8 °C après utilisation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit. Les conditions de conservation autres que celles qui sont spécifiées doivent faire l'objet d'une vérification par l'utilisateur. Il n'existe aucun signe visible susceptible de signaler une instabilité de ce produit, par conséquent, des contrôles positif et négatif doivent être traités en même temps que les échantillons du patient.

### Préparation des Spécimens

Le fixateur recommandé est le formol à 10 %, tamponné, neutre, pour coupes tissulaires incluses en paraffine.

### Mises en Garde et Précautions

Pour utilisateurs professionnels.

Une fiche toxicologique (MSDS) est disponible sur demande.

Les spécimens, avant et après fixation, ainsi que tous les matériels ayant été en contact avec eux, doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et éliminés conformément aux précautions appropriées en vigueur. 2

Ne jamais pipeter les réactifs avec la bouche et éviter de mettre en contact la peau et les muqueuses avec les réactifs et les spécimens. Rincer avec de grandes quantités d'eau en cas de contact des réactifs ou des spécimens avec des zones sensibles.

Consulter les réglementations nationales, régionales ou locales en vigueur relatives à l'élimination de tous les éléments potentiellement toxiques. Minimiser la contamination microbienne des réactifs sinon un accroissement du marquage non spécifique est susceptible de se produire. Des durées et des températures d'incubation différentes de celles qui ont été spécifiées sont susceptibles de conduire à des résultats erronés. Toutes les modifications de ce type doivent être validées par l'utilisateur.

### Procédure

#### A. Réactifs nécessaires mais non fournis

1. Solvants standard utilisés en immunohistochimie.
2. Solution saline tamponnée de Tris (TBS) 50 mM, pH 7,6.
3. Solution(s) de restauration des antigènes (voir Recommandations d'utilisation de l'anticorps primaire).
4. Solution(s) de restauration de l'enzyme (voir Recommandations d'utilisation de l'anticorps primaire).
5. Diluant de l'anticorps.
6. Anticorps primaire.
7. Système de détection.
8. Réactif de bleuissement, par exemple substitut d'eau du robinet de Scott ou solution saturée de carbonate de lithium.
9. Milieu de montage.

#### B. Equipements nécessaires mais non fournis

1. Equipements nécessaires à la restauration des antigènes, si elle est préconisée pour l'anticorps primaire.
2. Equipements généraux d'un laboratoire d'immunohistochimie.

### C. Méthodologie

**Avant d'utiliser cette méthodologie, les utilisateurs doivent avoir été formés aux techniques immunohistochimiques.**

**L'association de l'anticorps primaire, sa dilution, ainsi que le Hematoxylin RE7107 et le système de détection doit être validée par l'utilisateur sur une série de contrôles négatifs et positifs connus.**

Sauf mention contraire, toutes les étapes sont réalisées à température ambiante (25 °C). Les étapes suivantes doivent être mises en oeuvre au stade approprié du protocole IHC (voir le Mode d'emploi du système de détection).

1. Rincer à l'eau.
2. Colorer les coupes avec le Hematoxylin RE7107 pendant 5 minutes.
3. Rincer à l'eau.
4. Si nécessaire, bleuir dans le réactif de bleuissement.
5. Rincer à l'eau.

### Contrôle de Qualité

Des différences de traitement des tissus et de procédures techniques du laboratoire de l'utilisateur sont susceptibles de conduire à une variabilité significative des résultats, ce qui rend nécessaire la mise en oeuvre de contrôles en interne en plus des procédures suivantes. Les contrôles doivent être des spécimens frais provenant d'autopsies, de biopsies ou d'interventions chirurgicales, fixés au formol, traités et inclus en cire de paraffine dès que possible, de la même façon que le(s) échantillon(s) de patient.

### Tissu de Contrôle Positif

Il est utilisé pour indiquer que les tissus ont été préparés correctement et que les techniques de marquage étaient appropriées.

Un contrôle tissulaire positif doit être inclus dans toute opération de marquage pour chaque ensemble d'anticorps primaire/de conditions d'analyse.

Un tissu présentant un marquage faiblement positif est plus adapté à un contrôle de qualité optimal qu'un tissu présentant un marquage fortement positif et il permet de détecter de moindres niveaux de dégradation du réactif.<sup>3</sup>

Pour le tissu de contrôle positif recommandé, voir le Mode d'emploi de l'anticorps primaire.

Si le tissu de contrôle positif ne présente pas de marquage positif, les résultats des spécimens analysés doivent être considérés comme invalides.

### Tissu de Contrôle Négatif

Il doit être examiné après le tissu de contrôle positif afin de vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire.

Pour le tissu de contrôle négatif recommandé, voir le Mode d'emploi de l'anticorps primaire.

Sinon, la diversité des types cellulaires présents dans la plupart des tissus permet de disposer fréquemment de sites de contrôle négatif, mais ils doivent être vérifiés par l'utilisateur.

S'il est présent, le marquage non spécifique prend habituellement une apparence diffuse. Un marquage sporadique du tissu conjonctif peut également être observé sur des coupes de tissus qui ont été fixées par un excès de formol. Utiliser des cellules intactes pour l'interprétation des résultats du marquage. Les cellules nécrotiques ou dégénérées sont souvent marquées de façon non spécifique.<sup>4</sup>

Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique à des protéines ou à des produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être provoqués par des enzymes endogènes comme la pseudoperoxydase (érythrocytes), la peroxydase endogène (cytochrome C), ou la biotine endogène<sup>5</sup> (foie, sein, cerveau, rein, par exemple). Pour différencier l'activité des enzymes endogènes ou la liaison non spécifique d'enzymes de l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être marqués exclusivement avec le substrat chromogène, le Streptavidin-HRP, ou le polymère marqué et le substrat chromogène respectivement. Si un marquage spécifique se produit dans le tissu de contrôle négatif, les résultats des spécimens du patient doivent être considérés comme invalides.

### Réactif de Contrôle Négatif

Utiliser un réactif de contrôle négatif non spécifique à la place de l'anticorps primaire avec une coupe de chaque spécimen du patient afin d'évaluer le marquage non spécifique et de permettre une meilleure interprétation du marquage spécifique au niveau du site antigénique.

### Tissu du Patient

Examiner en dernier lieu les spécimens du patient. L'intensité du marquage positif doit être évaluée à la lumière du bruit de fond du marquage non spécifique du réactif de contrôle négatif. Comme pour toutes les analyses immunohistochimiques, un résultat négatif signifie que l'antigène n'a pas été détecté mais ne signifie pas qu'il est absent des cellules/tissus testés. Si nécessaire, employer un panel d'anticorps pour identifier les réactions faussement négatives.

### Limites Générales

L'immunohistochimie est un processus diagnostique constitué de plusieurs étapes qui nécessite une formation spécialisée relative au choix des réactifs appropriés ; au choix, à la fixation et au traitement des tissus ; à la préparation des lames IHC ; et à l'interprétation des résultats du marquage.

Le marquage des tissus dépend de leur manipulation et de leur traitement avant le marquage. Une fixation, une congélation, une décongélation, un lavage, un séchage, un chauffage, une coupe, incorrects ou une contamination par d'autres tissus ou d'autres liquides sont susceptibles de conduire à la production d'artefacts, au piégeage de l'anticorps ou à des résultats faussement négatifs. Des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités propres au tissu, peuvent conduire à des résultats incohérents.<sup>6</sup>

Une coloration de contraste excessive ou incomplète peut gêner l'interprétation correcte des résultats.

L'interprétation clinique de tout marquage, ou absence de marquage, doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée par un pathologiste qualifié à la lumière des antécédents cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques.

Le Novocastra™ Hematoxylin RE7107 doit être utilisé sur des coupes incluses en paraffine avec des exigences spécifiques en matière de fixation. Une expression antigénique inattendue est susceptible de se produire, en particulier au niveau des néoplasmes. L'interprétation clinique de toute coupe tissulaire marquée doit comporter une analyse morphologique et l'évaluation des contrôles appropriés.

### **Caractéristiques de performance**

Les performances du Novocastra™ Hematoxylin RE7107 ont été validées à l'aide d'une gamme d'anticorps primaires Novocastra™ de type IgG de souris, IgM de souris et IgG de lapin en association avec le Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, les Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K et les Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Ce produit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit.

### **Bibliographie Générale**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

### **Amendements Apportés à la Version Précédente**

Réactifs fournis.

### **Date de Publication**

24 septembre 2018



# Novocastra™ Hematoxylin

## Codice Del Prodotto: RE7107

### Uso Previsto

*Per uso diagnostico in vitro.*

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 è destinato all'uso nelle tecniche di colorazione immunocitochimica (IHC), quali quelle descritte nelle Istruzioni per l'uso dei sistemi di determinazione Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K e Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. L'interpretazione clinica di ogni colorazione o della sua assenza va integrata da studi morfologici che utilizzino i controlli appropriati e deve essere valutata da un patologo qualificato, nel contesto della storia clinica del paziente e delle altre metodiche diagnostiche adoperate.

### Principio Della Procedura

L'ematosilina colora i nuclei cellulari ed ha molteplici possibilità d'impiego in istologia, la più comune delle quali è rappresentata dalla colorazione ematosilina-eosina<sup>1</sup>. Nelle tecniche IHC, l'ematosilina può essere utilizzata come controcolorante per facilitare la visualizzazione e la localizzazione del prodotto finale colorato.

Questo prodotto viene impiegato nel corso di tecniche IHC che consentono l'identificazione qualitativa in microscopia ottica degli antigeni in sezioni tissutali fissate in formalina e incluse in paraffina, attraverso fasi sequenziali intervallate da fasi di lavaggio (per il Principio della procedura IHC, vedere le Istruzioni per l'uso del sistema di determinazione corrispondente). Novocastra™ Hematoxylin RE7107 viene applicato alle sezioni tissutali dopo la reazione substrato/cromogeno. Il prodotto conferisce ai nuclei una colorazione rossa, che vira al blu lavando le sezioni tissutali in acqua o in soluzione debolmente alcalina (reagente di viraggio blu).

### Reagenti forniti

Hematoxylin RE7107 (25 ml). Ematosilina <0,1%.

### Ricostituzione, miscelazione, diluizione, titolazione

Hematoxylin RE7107 è un reagente pronto all'uso. Non si consiglia la ricostituzione, la miscelazione, la diluizione o la titolazione di questo reagente.

L'ulteriore diluizione potrebbe causare una perdita di colorazione dell'antigene. Tali eventuali variazioni devono essere convalidate dall'utente.

### Conservazione E Stabilità

Conservare a 2–8 °C. Non congelare. Immediatamente dopo l'uso, riportare a 2–8 °C. Non usare dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto. Condizioni di conservazione diverse da quelle sopra specificate vanno verificate dall'utente. Non essendoci segni evidenti che indichino l'instabilità del prodotto, i controlli positivi e negativi vanno eseguiti in parallelo ai test sui campioni del paziente.

### Preparazione Del Campione Biologico

Il fissativo raccomandato è la formalina tamponata neutra al 10% per sezioni tissutali incluse in paraffina.

### Avvertenze E Precauzioni

Per uso professionale.

La scheda di sicurezza del prodotto (MSDS) è disponibile su richiesta.

Prima e dopo la fissazione, i campioni biologici e tutti i materiali ad essi esposti vanno trattati come potenzialmente infettanti e smaltiti con le appropriate precauzioni<sup>2</sup>.

Non pipettare i reagenti con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni biologici con la pelle e con le mucose. Se i reagenti o i campioni biologici vengono a contatto con zone sensibili, sciacquare abbondantemente le parti interessate.

Fare riferimento alla normativa federale, statale o locale per lo smaltimento dei componenti potenzialmente tossici.

Ridurre al minimo la contaminazione microbica dei reagenti, allo scopo di evitare un aumento di colorazione aspecifica. Tempi o temperature d'incubazione diversi da quelli specificati possono condurre a risultati non veritieri. Tali eventuali variazioni devono essere convalidate dall'utente.

### Procedura

#### A. Reagenti necessari ma non forniti

1. Solventi standard utilizzati in immunocitochimica.
2. Tampone Tris (TBS) 50 mM a pH 7,6.
3. Soluzione/i per lo smascheramento antigenico (vedere Raccomandazioni per l'uso per l'anticorpo primario).
4. Soluzione/i per lo smascheramento con enzimi (vedere Raccomandazioni per l'uso per l'anticorpo primario).
5. Diluente per anticorpi.
6. Anticorpo primario.
7. Sistema di determinazione.
8. Reagente di viraggio blu, es. analoghi dell'acqua di Scott o carbonato di litio saturo
9. Mezzo di montaggio.

#### B. Attrezzature necessarie ma non fornite

1. Attrezzatura necessaria per lo smascheramento antigenico, se consigliato per l'anticorpo primario.
2. Attrezzatura di base del laboratorio di immunocitochimica.

### **C. Metodologia**

**Prima di intraprendere questa metodologia, l'utente deve aver acquisito esperienza con le tecniche immunostochimiche.**

**La combinazione dell'anticorpo primario, la sua diluizione, assieme a Peroxidase Block RE7101 e al sistema di determinazione vanno convalidate dall'utente su una serie di controlli positivi e negativi noti.**

Se non indicato diversamente, tutte le fasi vanno condotte a temperatura ambiente (25 °C).

Effettuare le seguenti operazioni nella fase appropriata del protocollo IHC (vedere le Istruzioni per l'uso relative al sistema di determinazione)

1. Sciacquare i vetrini.
2. Colorare le sezioni con Hematoxylin RE7107 per 5 minuti.
3. Sciacquare i vetrini.
4. Se necessario, trattare con reagente di viraggio blu.
5. Sciacquare i vetrini.

### **Controllo Qualità**

Differenze nella processazione del tessuto e nelle tecniche in uso presso il laboratorio dell'utente possono produrre una discrepanza significativa nei risultati, rendendo necessaria la regolare esecuzione di controlli interni, in aggiunta alle procedure descritte di seguito.

I controlli devono essere costituiti da campioni biologici freschi autoptici/bioptici/chirurgici e devono essere il più rapidamente possibile fissati in formalina, processati ed inclusi in paraffina, allo stesso modo dei campioni biologici ottenuti dal paziente.

### **Controllo Positivo Del Tessuto**

È usato per indicare tessuti correttamente preparati e tecniche di colorazione appropriate.

Per ogni gruppo di condizioni del test/anticorpo primario e per ogni ciclo di colorazione, deve essere incluso un controllo positivo del tessuto.

Un tessuto a debole colorazione positiva è più adatto di uno a colorazione positiva intensa per un ottimale controllo qualità e per mettere in evidenza livelli inferiori di degradazione del reagente.<sup>3</sup>

Per il tessuto raccomandato come controllo positivo, vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario.

Se il controllo positivo del tessuto non dimostra colorazione positiva, i risultati con i campioni biologici del test vanno considerati non alidi.

### **Controllo Negativo Del Tessuto**

Va esaminato dopo il controllo positivo, per verificare la specificità della marcatura dell'antigene bersaglio da parte dell'anticorpo primario.

Per il tessuto raccomandato come controllo negativo, vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario.

In alternativa, la varietà dei tipi cellulari presenti nella maggior parte delle sezioni tissutali offre spesso siti di controllo negativo, ma questo va verificato dall'utente.

La colorazione aspecifica, se presente, assume di solito aspetto diffuso. La colorazione sporadica del tessuto connettivo può anche manifestarsi in seguito ad iperfissazione di sezioni di tessuto in formalina. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, usare cellule intatte. Le cellule necrotiche o degenerate si colorano spesso in maniera aspecifica.<sup>4</sup> Si possono osservare risultati falsamente positivi, dovuti a legame non immunologico delle proteine o a prodotti di reazione del substrato. Tali falsi positivi possono essere anche causati da enzimi endogeni quali la pseudoperossidasi (eritrociti), la perossidasi endogena (citocromo C) o la biotina endogena<sup>5</sup> (es. fegato, mammella, cervello, rene). Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame enzimatico aspecifico dall'immunoreattività specifica, possono essere colorati ulteriori tessuti del paziente esclusivamente e rispettivamente con substrato cromogeno, con Streptavidin-HRP o con polimero marcato e substrato cromogeno. Se nel controllo negativo del tessuto compare una colorazione specifica, i risultati sui campioni biologici ottenuti dal paziente devono essere considerati non validi.

### **Controllo Negativo Del Reagente**

Usare un controllo negativo aspecifico del reagente in luogo dell'anticorpo primario, con una sezione di ogni campione biologico del paziente, per valutare la colorazione aspecifica e per consentire una migliore interpretazione della colorazione specifica in corrispondenza del sito antigenico.

### **Tessuto Del Paziente**

Per ultimi, esaminare i campioni biologici colorati del paziente. L'intensità della colorazione positiva va analizzata nel contesto di qualsiasi colorazione aspecifica di fondo del controllo negativo del reagente. Come per tutti gli altri test immunostochimici, un risultato negativo significa che l'antigene non è stato determinato, ma non necessariamente che fosse assente dalle cellule o dal tessuto esaminato. Se necessario, usare un pannello di anticorpi per identificare reazioni falsamente negative.

### **Limitazioni Generali**

L'immunostochimica è un procedimento diagnostico a più passi (multistep) che richiede un'esperienza specifica nella selezione dei reagenti appropriati, nella selezione, fissazione e processazione dei tessuti, nella preparazione di vetrini IHC e nell'interpretazione dei risultati della colorazione.

La colorazione del tessuto dipende dalle modalità di manipolazione e di processazione del tessuto stesso, adottate prima della colorazione. La fissazione, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento o la sezione condotti in modo non corretto, o la contaminazione con altri tessuti o liquidi, può produrre artefatti, intrappolamento (trapping) anticorpale o risultati falsamente negativi. Risultati incompatibili possono essere dovuti a modifiche dei metodi di fissazione e di inclusione o ad irregolarità intrinseche al tessuto.<sup>6</sup>

Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati.

L'interpretazione clinica di ogni colorazione o della sua assenza va integrata da studi morfologici che utilizzino i controlli appropriati e deve essere valutata da un patologo qualificato, nel contesto della storia clinica del paziente e delle altre metodiche diagnostiche adoperate.

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 è destinato all'uso su sezioni tissutali incluse in paraffina con specifici requisiti di fissazione. Un'espressione antigenica inattesa può manifestarsi in particolare nelle neoplasie. L'interpretazione clinica di ogni sezione tissutale colorata deve includere l'analisi morfologica e la valutazione dei controlli appropriati.

### **Caratteristiche di rendimento**

Il rendimento di Novocastra™ Hematoxylin RE7107 è stato convalidato utilizzando una gamma di anticorpi primari Novocastra™ IgG di topo, IgM di topo e IgG di coniglio, in combinazione con Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K e Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

### **Riferimenti Bibliografici Di Base**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

### **Modifiche Alla Pubblicazione Precedente**

Reagenti forniti.

### **Data Di Pubblicazione**

24 settembre 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Produkt-Nr.: RE7107

### Verwendungszweck

*Für in-vitro-Diagnostik.*

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 dient der Verwendung bei immunhistochemischen (IHC-) Färbeverfahren, wie denen, die in den Gebrauchsanweisungen von Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, und Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K-Nachweissystemen beschrieben sind. Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

### Verfahrensgrundlage

Hämatoxylin färbt Zellkerne und hat viele Verwendungen in der Histologie, wobei die Hämatoxylin- und Eosinfärbung am häufigsten eingesetzt wird<sup>1</sup>. In IHC-Verfahren kann Hämatoxylin als Gegenfärbung zur Unterstützung der Visualisierung und Lokalisierung des gefärbten Endprodukts des IHC-Verfahrens verwendet werden.

Dieses Produkt wird in immunhistochemischen (IHC-) Verfahren verwendet, die den qualitativen Nachweis von Antigenen in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebeschnitten in mehreren aufeinander folgenden Schritten mit dazwischen liegenden Waschschritten mittels Lichtmikroskopie gestatten (die Verfahrensgrundlage der IHC-Färbung ist in den Gebrauchsanweisungen des entsprechenden Nachweissystems beschrieben). Novocastra™ Hematoxylin RE7107 wird nach der Substrat/Chromogen-Reaktion auf die Schnitte gegeben. Es färbt Zellkerne rot ein und wird durch Waschen der Schnitte in Wasser oder einer schwach basischen Lösung in eine blaue Färbung umgewandelt (Blaufärbungsreagenz).

### Gelieferte Reagenzien

Hematoxylin RE7107 (25 ml). <0,1% Hämatoxylin.

### Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration

Hematoxylin RE7107 ist ein gebrauchsfertiges Reagenz. Rekonstitution, Mischen, Verdünnung oder Titration dieses Reagenz wird nicht empfohlen. Eine weitere Verdünnung könnte zum Verlust der Antigenfärbung führen. Der Benutzer muss solche Änderungen zuvor validieren.

### Lagerung und Stabilität

Bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren. Nach Gebrauch sofort wieder bei 2–8 °C lagern. Nach Ablauf des Verfallsdatums (auf dem Behälteretikett angezeigt) darf das Produkt nicht mehr verwendet werden. Lagerbedingungen, die von den oben genannten Bedingungen abweichen, müssen vom Benutzer verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für die Instabilität dieses Produkts. Daher sind die positiven und negativen Kontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben durchzuführen.

### Probenvorbereitung

Für paraffineingebettete Gewebeschnitte ist das empfohlene Fixativ 10% neutral gepuffertes Formalin.

### Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

Für geschultes Fachpersonal.

Ein Sicherheitsdatenblatt (Material Safety Data Sheet (MSDS)) ist auf Anfrage erhältlich.

Vor und nach der Fixierung sind die Proben sowie alle Materialien, die mit ihnen in Kontakt gekommen sind, als potentiell infektiös zu behandeln und daher mit entsprechender Vorsicht zu entsorgen. 2

Reagenzien dürfen niemals mit dem Mund pipettiert werden, und jeglicher Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden. Falls Reagenzien oder Proben mit empfindlichen Bereichen in Kontakt gekommen sind, müssen diese mit reichlich Wasser gespült werden.

Die entsprechenden nationalen und lokalen Bestimmungen und Vorschriften zur Entsorgung potentiell giftiger Komponenten sind einzuhalten.

Die mikrobielle Verunreinigung von Reagenzien ist zu minimieren, da ansonsten eine erhöhte unspezifische Färbung auftreten kann. Falls die spezifizierten Inkubationszeiten oder –temperaturen nicht eingehalten werden, kann es zu fehlerhaften Ergebnissen kommen. Jegliche Abweichungen von den angegebenen Werten müssen vom Benutzer verifiziert werden.

### Verfahren

#### A. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Reagenzien

1. In der Immunhistochemie übliche Standardlösungsmittel.
2. 50 mmol/l Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (Tris-Buffered Saline, TBS) pH 7,6.
3. Antigendemaskierungslösung(en) (siehe Gebrauchsempfehlungen für den primären Antikörper).
4. Enzymdemaskierungslösung(en) (siehe Gebrauchsempfehlungen für den primären Antikörper).
5. Antikörperverdünnung.
6. Primärer Antikörper.
7. Nachweissystem.
8. Blaufärbungsreagenz, zum Beispiel Leitungswasserersatz von Scott oder saturiertes Lithiumcarbonat
9. Aufbringungsmedium.

#### B. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Ausrüstung

1. Für die Antigendemaskierung benötigte Ausrüstung, falls für den primären Antikörper empfohlen.
2. Allgemeine immunhistochemische Laborausstattung.

### **C. Vorgehensweise**

**Vor Anwendung dieser Vorgehensweise müssen die Benutzer mit immunhistochemischen Techniken vertraut sein.**

**Die Kombination aus dem primären Antikörper, seiner Verdünnung zusammen mit Peroxidase Block RE7101 und dem Nachweissystem ist vom Benutzer auf einer Reihe bekannter positiver und negativer Kontrollen zu validieren.**

Sofern nicht anderweitig vorgegeben, werden alle Schritte bei Raumtemperatur (25 °C) durchgeführt.

Die folgenden Schritte sind im entsprechenden Stadium des IHC-Protokolls durchzuführen (siehe Gebrauchsanweisungen des Nachweissystems).

1. In Wasser spülen.
2. Schnitte mit Hematoxylin RE7107 5 Minuten lang färben.
3. In Wasser spülen.
4. Bei Bedarf in Blaufärbungsreagenz blau färben.
5. In Wasser spülen.

### **Qualitätskontrolle**

Unterschiede bei der Gewebeparbeitung und den technischen Verfahren im Labor des Benutzers können zu signifikanten Schwankungen bei den Ergebnissen führen. Daher ist es wichtig, zusätzlich zu den folgenden Verfahren regelmäßige laborinterne Kontrollen durchzuführen.

Die Kontrollen sollten mit frischen Autopsie-/Biopsie-/chirurgischen Proben vorgenommen werden, die so bald wie möglich und auf dieselbe Weise wie die Patientenprobe(n) in Formalin fixiert, behandelt und in Paraffin eingebettet worden sind.

### **Positive Gewebekontrolle**

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an.

In jedem Färbelauf sollte für jeden Satz Testbedingungen/primärer Antikörper eine positive Gewebekontrolle durchgeführt werden.

Gewebe mit schwach positiver Färbung ist für die optimale Qualitätskontrolle und den Nachweis kleiner Minderungen in der Reagenzleistung besser geeignet, als ein Gewebe mit stark positiver Färbung.<sup>3</sup>

Informationen über das positive Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden.

Falls das positive Kontrollgewebe keine positive Färbung nachweisen kann, sollten die mit den Testproben erzielten Ergebnisse als ungültig betrachtet werden.

### **Negative Gewebekontrolle**

Die negative Gewebekontrolle sollte nach der positiven Gewebekontrolle erfolgen, um die Spezifität der Zielantigenmarkierung durch den primären Antikörper zu verifizieren.

Informationen über das empfohlene negative Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden.

Alternativ bietet die Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen, die in den meisten Gewebeschnitten vorliegen, häufig Stellen für eine negative Kontrolle. Jedoch sollte dies vom Benutzer verifiziert werden.

Liegt eine unspezifische Färbung vor, hat diese gewöhnlich ein diffuses Erscheinungsbild. Eine sporadische Färbung des Bindegewebes kann ebenfalls in Schnitten von übermäßig formalinfixierten Geweben beobachtet werden. Zur Bewertung der Färbeergebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.<sup>4</sup> Falsch-positive Ergebnisse können aufgrund einer nichtimmunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten beobachtet werden. Solche Ergebnisse können auch durch endogene Enzyme wie Pseudoperoxidase (Erythrozyten), endogene Peroxidase (Zytochrom C) oder endogenes Biotin<sup>5</sup> (beispielsweise Leber, Mamma, Gehirn, Niere) hervorgerufen werden. Um eine endogene Enzymaktivität bzw. eine unspezifische Enzymbindung von einer spezifischen Immunreaktivität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substratchromogen, Streptavidin-HRP bzw. markiertem Polymer plus Substratchromogen gefärbt werden. Falls im negativen Kontrollgewebe eine spezifische Färbung auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

### **Negative Reagenzkontrolle**

Zur Beurteilung einer unspezifischen Färbung und zur besseren Bewertung einer spezifischen Färbung an der Antigenstelle ist mit einem Schnitt jedes Patientenpräparates anstelle des primären Antikörpers eine unspezifische negative Reagenzkontrolle zu verwenden.

### **Patientengewebe**

Die gefärbten Patientenproben müssen zuletzt untersucht werden. Eine positive Färbeintensität ist im Kontext einer unspezifischen Hintergrundfärbung der negativen Reagenzkontrolle zu bewerten. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis, dass das Antigen nicht nachgewiesen wurde. Ein negatives Ergebnis bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, dass das Antigen in den getesteten Zellen / im getesteten Gewebe nicht vorlag. Bei Bedarf sollte zur Identifizierung falsch-negativer Reaktionen eine Gruppe von Antikörpern verwendet werden.

### **Allgemeine Beschränkungen**

Die Immunhistochemie ist ein mehrstufiger diagnostischer Prozess, der eine spezialisierte Ausbildung auf den folgenden Gebieten erfordert: Auswahl der entsprechenden Reagenzien; Gewebeauswahl, -fixierung und -verarbeitung; Vorbereitung des IHC-Objekträgers sowie Bewertung der Färbeergebnisse.

Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor dem Färben ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder eine Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper-Trapping oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Abweichende Ergebnisse können aufgrund von Unterschieden bei der Fixierung und Einbettung oder intrinsischen Unregelmäßigkeiten im Gewebe selbst entstehen.<sup>6</sup>

Eine exzessive oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Bewertung von Ergebnissen gefährden.

Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 ist zur Verwendung auf paraffineingebetteten Schnitten mit spezifischen Fixierungsanforderungen bestimmt. Es kann insbesondere bei Neoplasmen zu einer unerwarteten Antigenexpression kommen. Die klinische Bewertung eines gefärbten Gewebeschnitts muss eine morphologische Analyse und die Auswertung der entsprechenden Kontrollen einschließen.

### **Leistungsmerkmale**

Die Leistung von Novocastra™ Hematoxylin RE7107 wurde mithilfe einer Reihe von primären Novocastra™ Maus-IgG-, Maus-IgM- und Kaninchen-IgG-Antikörpern in Kombination mit Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K und Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K validiert. Dieses Produkt bleibt bis zum auf dem Behälteretikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

### **Literatur - Allgemein**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

### **Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe**

Gelieferte Reagenzien.

### **Ausgabedatum**

24 September 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Código De Producto: RE7107

### Indicaciones De Uso

*Para uso diagnóstico in vitro.*

El uso del producto Novocastra™ Hematoxylin RE7107 está indicado en los procedimientos de tinción inmunohistoquímica, como los descritos en las Instrucciones de uso de los sistemas de detección Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K y Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia se debe complementar con estudios morfológicos utilizando los controles adecuados, y un patólogo cualificado debe evaluarla en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

### Principio Del Procedimiento

Hematoxylin tiñe los núcleos celulares y tiene muchos usos en histología, siendo el más común la tinción de hematoxilina y eosina<sup>1</sup>. En los procedimientos inmunohistoquímicos, la hematoxilina se puede usar como contratinción, para facilitar la visualización y localización del producto final coloreado del procedimiento inmunohistoquímico.

Este producto se usa en los procedimientos inmunohistoquímicos, lo que permite la identificación cualitativa mediante microscopía óptica de antígenos en secciones fijadas con formol e incluidos en parafina, mediante pasos secuenciales, con pasos intermedios de lavado (vea el Principio del procedimiento inmunohistoquímico en las Instrucciones de uso del sistema de detección adecuado). Novocastra™ Hematoxylin RE7107 se aplica a secciones tras la reacción sustrato/cromógeno. Tiñe los núcleos de rojo y se convierte en azul al lavar las secciones con agua o con solución débilmente alcalina (reactivo azulante).

### Reactivos suministrados

Hematoxylin RE7107 (25 ml). Hematoxilina al <0,1%.

### Reconstitución, mezclado, dilución y titulación

Hematoxylin RE7107 es un reactivo listo para su uso. No se recomienda reconstituir, mezclar, diluir ni titular este reactivo.

Una mayor dilución puede provocar la pérdida de tinción del antígeno. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo.

### Almacenamiento Y Estabilidad

Almacénelo a una temperatura de 2–8 °C. No lo congele. Devuélvalo a 2–8 °C inmediatamente después de su uso. No lo utilice después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto. Cualquiera condición de almacenamiento que no sean las especificadas deben ser verificadas por el usuario. No existe ningún signo evidente que indique la inestabilidad de este producto; por lo tanto, deberán realizarse simultáneamente controles positivos y negativos con muestras de paciente.

### Preparación De Las Muestras

El fijador recomendado para secciones de tejido incluidos en parafina es formol tamponado neutro al 10%.

### Advertencias Y Precauciones

Para usuarios profesionales.

Si la solicita, existe una hoja de información sobre la seguridad del material (MSDS) a su disposición.

Las muestras, antes y después de ser fijadas, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como capaces de transmitir una infección, y se deben desechar tomando las precauciones adecuadas. 2

No pipeteo nunca los reactivos con la boca y evite el contacto de la piel y de las membranas mucosas con los reactivos y las muestras. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas sensibles, lave éstas con abundante agua.

Consulte las normativas nacionales, estatales, provinciales o municipales acerca de cómo desechar cualquier componente potencialmente tóxico. Reduzca al mínimo la contaminación microbiana de los reactivos; de lo contrario, podría producirse un aumento de la tinción no específica. Cualquier tiempo o temperatura de incubación que no sean los aquí especificados pueden conducir a resultados erróneos. Cualquier cambio de tal naturaleza debe ser validado por el usuario.

### Procedimiento

#### A. Reactivos necesarios que no se suministran

1. Disolventes estándar utilizados en inmunohistoquímica.
2. Solución salina tamponada con Tris 50 mM (TBS), pH 7,6.
3. Soluciones de recuperación de antígenos (vea en Recomendaciones de uso del anticuerpo primario).
4. Soluciones de recuperación de enzimas (vea en Recomendaciones de uso del anticuerpo primario).
5. Diluyente de anticuerpos.
6. Anticuerpo primario.
7. Sistema de detección.
8. Reactivo azulante, por ejemplo, sustituto Scotts de agua del grifo o solución saturada de carbonato de litio.
9. Medio de montaje.

#### B. Equipo necesario que no se suministra

1. Equipo necesario para recuperar antígenos, si está recomendado para el anticuerpo primario.
2. Equipo de laboratorio utilizado generalmente para inmunohistoquímica.

### C. Metodología

Antes de poner en práctica esta metodología, los usuarios deben formarse en el uso de las técnicas inmunohistoquímicas.

La combinación del anticuerpo primario, su dilución, junto con Peroxidase Block RE7101 y el sistema de detección deben ser validados por el usuario sobre una serie de controles positivos y negativos conocidos.

A menos que se indique otra cosa, todos los pasos se llevan a cabo a temperatura ambiente (25 °C).

Los pasos siguientes deberán ejecutarse en la fase apropiada del protocolo de inmunohistoquímica (vea las Instrucciones de uso del sistema de detección).

1. Aclare con agua.
2. Tiña las secciones con Hematoxylin RE7107 durante 5 minutos.
3. Aclare con agua.
4. Si es necesario, vire al azul con un reactivo azulante.
5. Aclare con agua.

### Control De Calidad

Las diferencias en el procesado de los tejidos y en los procedimientos técnicos del laboratorio del usuario pueden producir una variabilidad significativa en los resultados; por ello, es necesario que éste lleve a cabo regularmente sus propios controles además de los siguientes procedimientos. Los controles deben ser muestras frescas de autopsias, biopsias o quirúrgicas fijadas en formol, procesadas e incluidas en parafina lo antes posible de manera idéntica a la utilizada para la muestra o muestras del paciente o pacientes.

### Control Tisular Positivo

Se utiliza para indicar la preparación correcta de los tejidos y las técnicas de tinción adecuadas.

Debe incluirse un control tisular positivo por cada conjunto de condiciones de ensayo y anticuerpo primario en cada tinción o serie de tinciones realizada.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado que un tejido con una tinción positiva intensa para un control de calidad óptimo y para detectar niveles bajos de degradación del reactivo.<sup>3</sup>

En cuanto al control de tejido positivo recomendado, vea las Instrucciones de uso del anticuerpo primario.

Si el control de tejido positivo no muestra tinción positiva, los resultados de las muestras analizadas deben considerarse no válidos.

### Control Tisular Negativo

Deberá examinarse después del control de tejido positivo, a fin de verificar la especificidad del marcado del antígeno diana por el anticuerpo primario.

En cuanto al control negativo recomendado, vea las Instrucciones de uso del anticuerpo primario.

O bien, la variedad de diferentes tipos de células presentes en la mayoría de las secciones de tejido ofrece con frecuencia lugares de control negativo, pero esto deberá ser verificado por el usuario.

Si aparece tinción no específica, tiene generalmente aspecto difuso. En secciones de tejido fijado excesivamente en formol puede observarse también tinción esporádica del tejido conectivo. Utilice células intactas para la interpretación de los resultados de la tinción. A menudo, las células necróticas o degeneradas quedan teñidas de forma no específica.<sup>4</sup> También pueden observarse falsos positivos causados por la unión no inmunológica de proteínas o de productos de reacción del sustrato. Estos falsos positivos pueden estar causados también por enzimas endógenas tales como la pseudoperoxidasa (eritrocitos), la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena<sup>5</sup> (por ejemplo, de hígado, mama, cerebro o riñón). Para diferenciar la actividad de las enzimas endógenas o la unión inespecífica de las enzimas de la inmunoreactividad específica, pueden teñirse otros tejidos del paciente exclusivamente con cromógeno-sustrato, Streptavidin-HRP o polímeros marcados, y con cromógeno-sustrato, respectivamente. Si se produce tinción específica del control tisular negativo, los resultados de las muestras de los pacientes deben considerarse no válidos.

### Control De Reactivo Negativo

Utilice un control de reactivo negativo no específico en lugar del anticuerpo primario con una sección de cada muestra del paciente, a fin de evaluar la tinción no específica y obtener una mejor interpretación de la tinción específica en el lugar en que se encuentra el antígeno.

### Tejido Del Paciente

Examine, por último, las muestras de paciente teñidas. La intensidad de la tinción positiva debe valorarse en el contexto de cualquier tinción de fondo no específica del control de reactivo negativo. Como con cualquier prueba inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que no se ha detectado antígeno, y no que el antígeno esté ausente en las células o tejido probados. Si es necesario, use un panel de anticuerpos para identificar falsas reacciones negativas.

### Limitaciones Generales

La inmunohistoquímica es un proceso de diagnóstico en varias fases que abarca: formación especializada en la selección de los reactivos apropiados; selección, fijación y procesamiento de tejidos; preparación del portaobjeto para IHQ; e interpretación de los resultados de la tinción.

La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento del tejido previos a la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o seccionamiento incorrectos, o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede generar artefactos, atrapamiento del anticuerpo o falsos negativos. La aparición de resultados incoherentes puede deberse a variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, o a irregularidades inherentes al tejido.<sup>6</sup>

Una contratinción excesiva o incompleta puede poner en peligro la interpretación correcta de los resultados.

La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia se debe complementar con estudios morfológicos utilizando los controles adecuados, y un patólogo cualificado debe evaluarla en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.



Novocastra™ Hematoxylin RE7107 está indicado en secciones incluidas en parafina, con requisitos de fijación específicos. Puede producirse una expresión inesperada del antígeno, especialmente en las neoplasias. La interpretación clínica de cualquier sección de tejido teñida debe incluir un análisis morfológico y la evaluación de los controles apropiados.

### **Características del rendimiento**

La eficacia de Novocastra™ Hematoxylin RE7107 se ha validado usando una gama de anticuerpos primarios de IgG e IgM murinas e IgG de conejo Novocastra™, combinados con Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K y Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

Este producto es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto.

### **Bibliografía - General**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

### **Correcciones A La Publicación Anterior**

Reactivos suministrados.

### **Fecha De Publicación**

24 de septiembre de 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Código Do Produto: RE7107

### Utilização prevista

*Para utilização em diagnósticos in vitro.*

O produto Novocastra™ Hematoxylin RE7107 foi concebido para ser utilizado em procedimentos de coloração imunohistoquímica (IHQ) tais como os que se encontram descritos nas instruções de utilização dos sistemas de detecção Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K e Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos que empreguem os devidos controlos, e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto dos antecedentes clínicos do doente e de outros testes de diagnóstico.

### Princípio Do Procedimento

A hematoxilina cora os núcleos celulares e tem muitas aplicações em histologia, sendo a mais comum a coloração de hematoxilina e eosina<sup>1</sup>. Nos procedimentos de IHQ, pode empregar-se a hematoxilina como contração, para ajudar a efectuar a visualização e localização do produto final colorido do procedimento de IHQ.

Este produto é utilizado em procedimentos de IHQ, os quais permitem a identificação qualitativa de antígenos, por microscopia óptica, em secções de tecido fixado com formol e envolvido em parafina, através de etapas sequenciais intercaladas com etapas de lavagem (consultar as Instruções de utilização do sistema de detecção apropriado para obter informações sobre o princípio do procedimento da coloração IHQ). Novocastra™ Hematoxylin RE7107 é aplicado às secções após a reacção de substrato/cromogénio. O produto cora os núcleos, tornando-os vermelhos, e transforma-se numa cor azul quando se lavam as secções ou em água ou numa solução alcalina fraca (reagente de azuragem).

### Reagentes fornecidos

Hematoxylin RE7107 (25ml). Hematoxilina a <0,1%.

### Reconstituição, mistura, diluição, titulação

O produto Hematoxylin RE7107 é um reagente pronto para ser utilizado. Não se recomenda a reconstituição, mistura, diluição ou titulação deste reagente.

Qualquer diluição adicional poderá resultar na perda de coloração do antígeno. O utilizador deve validar quaisquer alterações dessa natureza.

### Armazenamento E Estabilidade

Armazenar a 2–8 °C. Não congelar. Retornar à temperatura de 2–8 °C imediatamente após a utilização. Não utilizar após o prazo de validade indicado no rótulo do produto. As condições de armazenamento que diferirem das que se encontram especificadas devem ser verificadas pelo utilizador. Não há sinais óbvios que indiquem a instabilidade deste produto, portanto os controlos positivos e negativos devem ser activados em simultâneo com as amostras do doente.

### Preparação Das Amostras

O fixador recomendado é formol tamponado neutro a 10% para secções de tecido envolvidas em parafina.

### Avisos E Precauções

Apenas para utilizadores profissionais.

Encontra-se disponível, mediante pedido, uma Folha de Dados da Segurança dos Materiais (MSDS).

As amostras, antes e depois da sua fixação, bem como todos os materiais expostos às mesmas, devem ser processados tal como se tivessem a capacidade de transmitir infecções e devem ser descartados com as devidas precauções 2.

Nunca pipetar os reagentes com a boca e evitar o contacto da pele e membranas mucosas com os reagentes e amostras. Caso os reagentes ou amostras entrem em contacto com áreas sensíveis, lavar com grandes quantidades de água.

Consultar a legislação nacional ou europeia em relação ao descarte de quaisquer componentes potencialmente tóxicos.

Minimizar a contaminação microbiana dos reagentes, para evitar a possibilidade do aumento da coloração não específica. Os períodos de incubação ou temperaturas diferentes dos que foram especificados poderão dar azo a resultados errados. Todas as alterações desse tipo devem ser validadas pelo utilizador.

### Procedimento

#### A. Reagentes necessários não fornecidos

1. Solventes comuns utilizados em imunohistoquímica.
2. 50 mM de tris-buffered saline (TBS) pH 7,6.
3. Solução ou soluções de recuperação do antígeno (consultar a secção Recomendações sobre a utilização para obter informações sobre o anticorpo primário).
4. Solução ou soluções de recuperação das enzimas (consultar a secção Recomendações sobre a utilização para obter informações sobre o anticorpo primário).
5. Diluente do anticorpo.
6. Anticorpo primário.
7. Sistema de detecção.
8. Reagente de azuragem, ex. produto de substituição de água da torneira Scotts ou carbonato de lítio saturado
9. Meio de montagem.

## **B. Equipamento necessário não fornecido**

1. Equipamento necessário para a recuperação de antígenos, caso seja indicado para o anticorpo primário.
2. Equipamento geral de laboratório de imunohistoquímica.

## **C. Metodologia**

**Antes de intentar esta metodologia, o utilizador deve ter recebido a devida formação em técnicas de imunohistoquímica.**

**A combinação do anticorpo primário, da sua diluição, juntamente com o produto Peroxidase Block RE7101 e do sistema de detecção deve ser validada pelo utilizador numa série de controlos positivos e negativos conhecidos.**

A não ser indicação em contrário, todas as etapas devem ser efectuadas à temperatura ambiente (25 °C).

As etapas que se seguem devem ser efectuadas no estágio apropriado do protocolo IHQ (consultar as Instruções de utilização do sistema de detecção):

1. Enxaguar em água.
2. Colorir as secções com Hematoxylin RE7107 durante 5 minutos.
3. Enxaguar em água.
4. Caso necessário, azulizar em agente de azulagem.
5. Enxaguar em água.

## **Controlo Da Qualidade**

As diferenças entre os diferentes métodos e técnicas de processamento de tecidos no laboratório do utilizador podem causar uma grande variabilidade de resultados, requerendo a realização frequente de controlos internos suplementares aos procedimentos que se seguem. Os controlos devem ser amostras de autópsia/biopsia/cirurgia frescas, fixadas em formol, processadas e envolvidas em cera parafínica logo que possível, da mesma maneira que a(s) amostra(s) do(s) doente(s).

### **Controlo De Tecido Positivo**

Usado para assinalar os tecidos correctamente preparados e as técnicas de coloração indicadas.

Por cada conjunto de condições de testes, em cada processo de coloração, deve incluir-se um controlo de tecido positivo.

Os tecidos com uma coloração positiva fraca são mais apropriados do que os têm uma coloração positiva forte para proporcionarem um controlo de qualidade óptimo, bem como para detectar níveis reduzidos de degradação dos reagentes<sup>4</sup>.

Consultar as Instruções de utilização do anticorpo primário para obter informações sobre o tecido de controlo positivo recomendado.

Se o controlo de tecido positivo não demonstrar uma coloração positiva, os resultados obtidos com as amostras de testes devem ser considerados inválidos.

### **Controlo De Tecido Negativo**

Este deve ser examinado depois do controlo de tecido positivo, para verificar a especificidade da marcação do antígeno objectivado pelo anticorpo primário.

Consultar as Instruções de utilização do anticorpo primário para obter informações sobre o tecido de controlo negativo recomendado.

Alternativamente, a variedade de diferentes tipos de células presentes na maioria das secções de tecidos oferece muitas vezes locais de controlo negativo, mas isto deve ser verificado pelo utilizador.

A coloração não específica, caso ocorra, tem geralmente um aspecto difuso. A coloração esporádica do tecido conjuntivo pode também ter lugar em secções de tecido excessivamente fixado em formol. Devem utilizar-se células intactas para a interpretação dos resultados da coloração. As células necróticas ou degeneradas causam muitas vezes uma coloração não específica<sup>5</sup>. Podem verificar-se resultados falso-positivos devido à ligação não imunológica de proteínas ou de produtos da reacção do substrato. Esses resultados podem também ser causados por enzimas endógenas tais como a pseudoperoxidase (eritrócitos), a peroxidase endógena (citocromo C), ou a biotina endógena<sup>6</sup> (ex. no fígado, mama, cérebro ou rim). Para se diferenciar entre a actividade das enzimas endógenas ou as ligações não específicas de enzimas e as imunoreactividades específicas, podem colorir-se tecidos adicionais dos doentes exclusivamente com substrato cromogénio, Streptavidin-HRP ou com polímero etiquetado e substrato-cromogénio, respectivamente. Se ocorrer a coloração específica no controlo de tecido negativo, os resultados dos testes feitos com as amostras do doente devem ser considerados inválidos.

### **Controlo De Reagente Negativo**

Utilizar um controlo de reagente negativo não específico em vez do anticorpo primário com uma secção de cada amostra de doente para avaliar a coloração não específica e permitir uma melhor interpretação da coloração específica no local do antígeno.

## **Tecido Do Doente**

Examinar as amostras coloridas do doente em último lugar. A intensidade da coloração positiva deve ser avaliada dentro do contexto de qualquer coloração não específica de fundo do controlo de reagente negativo. Tal como com qualquer teste imunohistoquímico, um resultado negativo significa que o antígeno não foi detectado, e não que o antígeno se encontrava ausente das células ou tecido analisados. Se necessário, deve utilizar-se um painel de anticorpos para identificar reacções negativas falsas.

## **Limitações Gerais**

A imunohistoquímica é um processo diagnóstico em múltiplas etapas, que consta de: uma formação especializada na selecção dos reagentes apropriados; selecção, fixação e processamento de tecidos; preparação das lâminas de IHQ; e interpretação dos resultados das colorações.

A coloração de tecidos depende do seu manuseamento e processamento antes da sua coloração. A fixação, congelação, descongelação, lavagem, secagem, aquecimento ou corte incorrectos das amostras, ou a sua contaminação com outros tecidos ou fluidos, pode produzir artefactos, retenção de anticorpos, ou resultados falso-negativos. Os resultados inconsistentes podem dever-se a variações nos métodos de fixação e envolvimento, ou a irregularidades inerentes ao tecido<sup>7</sup>.

Uma contrastação excessiva ou incompleta pode comprometer a devida interpretação dos resultados.

A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos que empreguem os devidos controles, e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto dos antecedentes clínicos do doente e de outros testes de diagnóstico.

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 serve para ser utilizado em secções envolvidas em parafina com requisitos especiais de fixação. Pode ocorrer uma expressão inesperada de antígeno, especialmente em neoplasmas. A interpretação clínica de qualquer secção de tecido colorido deverá incluir a análise morfológica e a avaliação de controles apropriados.

### **Características de desempenho**

O desempenho de Novocastra™ Hematoxylin RE7107 foi validado através da utilização de uma série de anticorpos primários Novocastra™ de IgG de rato, IgM de rato e IgG de coelho, em combinação com os sistemas de detecção Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K e Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

Este produto é estável até ao prazo de validade indicado no rótulo do mesmo

### **Bibliografia**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

### **Emendas Da Edição Anterior**

Reagentes fornecidos.

### **Data De Emissão**

24 de Setembro de 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Produktkod: RE7107

### Avsedd Användning

*För in vitro diagnostisk användning.*

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 är avsedd för användning i immunhistokemiska (IHC) färgningsprocedurer såsom de beskrivna i Instruktioner vid användning av Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K och Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Den kliniska tolkningen av färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar med lämpliga kontroller och bör utvärderas av en kvalificerad patolog inom ramen för patientens anamnes och andra diagnostiska tester.

### Metodens Princip

Hematoxylin färgar cellkärnor och har många tillämpningar inom histologi, varav den vanligaste är Hematoxylin och Eosin färg<sup>1</sup>. Vid IHC procedurer kan hematoxylin användas som kontrastfärg för att hjälpa visualiseringen och lokaliseringen av en färgad slutprodukt för IHC proceduren.

Denna produkt används i IHC procedurer som tillåter kvalitativ identifikation med ljusmikroskopi av antigener i sektioner av formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad via sekvenssteg med inlagda tvättsteg (för IHC färgning Metodens princip se Instruktioner vid användning för lämpligt detektionssystem). Novocastra™ Hematoxylin RE7107 appliceras på sektioner efter substrat/kromogenreaktionen. Det färgar kärnor rött och omvandlas till blått genom tvättning av sektioner i antingen vatten eller svag alkalisk lösning (blåagens).

### Tillhandahållna reagens

Hematoxylin RE7107 (25ml). <0,1 % Hematoxylin.

### Rekonstitution, blandning, spädning, titrering

Hematoxylin RE7107 är ett bruksfärdigt reagens. Rekonstitution, blandning, spädning eller titrering av dessa reagens rekommenderas inte. Fortsatt spädning kan resultera i förlust av antigenfärgning. Användaren måste kontrollera sådana förändringar.

### Förvaring Och Stabilitet

Förvara vid 2–8 °C. Frysa inte. Återgå till 2–8 °C direkt efter användning. Använd inte efter det utgångsdatum som anges på produktens etikett. Förvaringsförhållanden som skiljer sig från de ovannämnda måste kontrolleras av användaren. Det finns inga tydliga tecken på att denna produkt är ostabil därför bör positiva och negativa kontroller köras samtidigt med patientprover.

### Preparation Av Prov

Rekommenderat fixeringsmedel för paraffinbäddade vävnadssnitt är 10% neutralbuffrat formalin.

### Varningar Och Försiktighetsåtgärder

För professionella användare.

Varuinformationsblad (MSDS) finns att få på begäran.

Prover, innan och efter fixering samt all material som utsätts för dem bör hanteras som om de överför infektioner och kastas enligt gällande försiktighetsåtgärder. 2

Pipettera aldrig via mun och se till att hud och slemhinnor inte kommer i kontakt med reagens och prover. Om reagens eller prover kommer i kontakt med känsliga områden skall du tvätta med rikliga mängder vatten.

Angående kassering av potentiellt toxiska komponenter hänvisas till nationella eller lokala bestämmelser.

Minimera mikrobisk kontaminering av reagens annars kan en ökning av ospecifik färgning ske. Inkubationstider eller temperaturer som skiljer sig från dem som specificeras kan ge felaktiga resultat. Alla sådana förändringar måste kontrolleras av användaren.

### Procedur

#### A. Reagens som krävs men inte tillhandahålls

1. Standardlösningar som används inom immunhistokemi.
2. 50 mM tris-buffrad koksaltlösning (TBS) pH 7,6.
3. Antigenåtervinningslösningar (se Rekommendationer vid användning för primära antikroppar).
4. Enzymåtervinningslösningar (se Rekommendationer vid användning för primära antikroppar).
5. Antikroppslösning.
6. Primär antikropp.
7. Detektionssystem.
8. Blåagens t.ex. Scotts kravattensubstitut eller mättad litiumkarbonat
9. Monteringsmedium.

#### B. Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

1. Utrustning som krävs för antigenåtervinning om det rekommenderas för den primära antikroppen.
2. Allmän immunhistokemisk laboratorieutrustning.

### C. Metod

Innan metoden tillämpas måste användarna vara utbildade i immunhistokemiska tekniker.

**Kombinationen av primär antikropp, dess spädning, tillsammans med Peroxidase Block RE7101 och detektionssystemet bör kontrolleras av användare genom en serie kända positiva och negativa kontroller.**

h Om inte annat anges utförs alla steg vid rumstemperatur (25 °C).

Följande steg bör tas på rätt plats enligt IHC protokollet (se detektionssystem Instruktioner vid användning)

1. Skölj i vatten.
2. Färga sektioner med Hematoxylin RE7107 i 5 minuter.
3. Skölj i vatten.
4. Vid behov, blått i blåreagens.
5. Skölj i vatten.

### Kvalitetskontroll

Skilnader i vävnadsbehandling och tekniska metoder i användarens laboratorium kan ge stor variation i resultaten vilket kan göra det nödvändigt att genomföra regelbundna interna kontroller utöver följande metoder.

Kontroller bör vara färskas obduktions-/biopsi-/kirurgi prover som snarast möjligt formalinfixeras, bearbetas och paraffinbäddas på samma sätt som patientprover.

### Positiv Vävnadskontroll

Används för att ange korrekt förberedda vävnader och rätt färgningstekniker.

En positiv vävnadskontroll bör ingå i varje uppsättning av testförhållanden/primär antikropp vid varje färgningskörning.

En vävnad med svag positiv färgning är mer passande för optimal kvalitetskontroll och för att upptäcka låga nivåer av reagensdegradering än en vävnad med stark positiv färgning.<sup>8</sup>

För rekommenderad negativ kontrollvävnad se primär antikropp Instruktioner vid användning.

Om den positiva vävnadskontrollen misslyckas med att uppvisa positiv färgning bör resultat med testproverna anses vara ogiltiga.

### Negativ Vävnadskontroll

Bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen för att fastställa specificiteten för märkningen av målantigenet med den primära antikroppen.

För rekommenderad negativ kontrollvävnad se primär antikropp Instruktioner vid användning.

Alternativt ger ofta en mängd olika celltyper som finns i de flesta vävnadssnitt negativa kontrollområden men detta bör kontrolleras av användaren.

Ospecifik färgning, om det förekommer, har ofta ett diffus utseende. Sporadisk färgning av bindväv kan också observeras i snitt från överflödigt formalinfixerade vävnader. Använd intakta celler för tolkning av färgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler färgar ofta ospecifikt.<sup>4</sup> Falskt positiva resultat kan ses p.g.a. ickeimmunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erytrocyter), endogent peroxidase (cytokrom C), eller endogent biotin<sup>5</sup> (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure). För att skilja endogen enzymaktivitet eller ospecifik enzymbindning från specifik immunreaktivitet kan ytterligare patientvävnader färgas exklusivt med respektive substratkromogen eller Streptavidin-HRP eller märkt polymer och substratkromogen. Om specifik färgning sker i den negativa vävnadskontrollen bör resultat med patientprover anses vara ogiltiga.

### Negativ Reagenskontroll

Använd en ospecifik negativ reagenskontroll istället för den primära antikroppen med ett snitt från varje patientprov för att utvärdera ospecifik färgning och tillåta bättre tolkning av specifik färgning på antigenområdet.

### Patientvävnad

Undersök färgade patientprover sist. Positiv färgningsintensitet bör utvärderas inom ramen för all ospecifik bakgrunds-färgning av den negativa reagenskontrollen. Som vid alla immunhistokemiska tester betyder ett negativt resultat att antigenet inte upptäcktes, inte att det inte förekom i de analyserade cellerna/vävnaderna. Använd vid behov en antikroppspanel för att identifiera falskt negativa reaktioner.

### Allmänna Begränsningar

Immunhistokemi är en diagnostisk process i flera steg som kräver specialiserad utbildning i urvalet av lämpliga reagens; val av vävnad, fixering och bearbetning; förberedelse av IHC-objektglaset samt tolkning av färgningsresultaten.

Vävnadsfärgning är beroende av hantering och bearbetning av vävnaden före färgningen. Felaktig fixering, nedfrysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering med andra vävnader eller vätskor kan framställa artefakter, infångande av antikroppar eller falskt negativa resultat. Motsägelsefulla resultat kan bero på variationer av fixerings- och inbäddningsmetoder eller på naturliga oregelbundenheter inom vävnaden.<sup>7</sup>

Överflödigt eller ofullständig kontrastfärgning kan äventyra korrekt tolkning av resultat.

Den kliniska tolkningen av all färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar som använder korrekta kontroller och utvärderas av kvalificerad patolog inom ramen för patientens kliniska anamnes och andra diagnostiska tester.

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 är till för användning på paraffinbäddade sektioner med specifika fixeringskrav. Övrigt antigenuttryck kan ske, speciellt i neoplaser. Morfologisk analys och utvärdering av lämpliga kontroller måste ingå i den kliniska tolkningen av alla färgade vävnadssnitt.

## **Prestanda**

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 prestanda har kontrollerats med en rad mus Novocastra™ IgG, mus IgM och kanin IgG primära antikroppar i kombination med Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K och Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

Denna produkt är stabil fram till utgångsdatumet på produktens etikett.

## **Bibliografi**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## **Rättelser Av Tidigare Utgivning**

Tillhandahållna reagens.

## **Utgivningsdatum**

24 september 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Κωδικός είδους: RE7107

### Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

*Gia in vitro διαγνωστική χρήση.*

Το Novocastra™ Hematoxylin RE7107 προορίζεται για χρήση στις ανοσοϊστοχημικές (IHC) διαδικασίες χρώσης, όπως εκείνες που περιγράφονται στις οδηγίες χρήσης των συστημάτων ανίχνευσης Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K και Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν σωστούς μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογοανατόμο.

### Αρχή Της Διαδικασίας

Η αιματοξυλίνη χρωματίζει πυρήνες κυττάρων και έχει πολλές χρήσεις στην ιστολογία, η πλέον κοινή από τις οποίες είναι η χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης! Σε ανοσοϊστοχημικές (IHC) διαδικασίες, η αιματοξυλίνη είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί ως αντιχρώση για βοήθεια στην οπτικοποίηση και τον εντοπισμό του έγχρωμου τελικού προϊόντος της ανοσοϊστοχημικής διαδικασίας.

Το προϊόν αυτό χρησιμοποιείται σε ανοσοϊστοχημικές (IHC) διαδικασίες, οι οποίες επιτρέπουν την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός των αντιγόνων σε τομές ιστού μονιμοποιημένου με φορμόλη και εγκλεισμένου σε παραφίνη, μέσω διαδοχικών βημάτων με παρεμβαλλόμενα βήματα πλύσης (για την Αρχή της διαδικασίας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, δείτε τις οδηγίες χρήσης του κατάλληλου συστήματος ανίχνευσης). Το Novocastra™ Hematoxylin RE7107 εφαρμόζεται στις τομές μετά την αντίδραση υποστρώματος/χρωμογόνου. Χρωματίζει τους πυρήνες με ερυθρό χρώμα και μετατρέπεται σε κυανό με πλύση των τομών είτε με νερό είτε με ασθενές αλκαλικό διάλυμα (αντιδραστήριο κυάνωσης).

### Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Hematoxylin RE7107 (25 ml). Αιματοξυλίνη <0,1%.

### Ανασύσταση, ανάμειξη, αραιώση, τιτλοδότηση

Το Hematoxylin RE7107 είναι ένα έτοιμο προς χρήση αντιδραστήριο. Δε συνιστάται ανασύσταση, ανάμειξη, αραιώση ή τιτλοδότηση του αντιδραστήριου αυτού.

Περαιτέρω αραιώση ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα απώλεια χρώσης του αντιγόνου. Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει τυχόν τέτοια αλλαγή

### Φύλαξη Και Σταθερότητα

Φυλάσσετε στους 2–8 °C. Μην καταψύχετε. Επαναφέρετε στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Μην χρησιμοποιείτε μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος. Τυχόν συνθήκες φύλαξης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται πρέπει να επαληθεύονται από το χρήστη. Δεν υπάρχουν εμφανή σημεία που να υποδεικνύουν αστάθεια του προϊόντος αυτού, επομένως πρέπει να αναλύονται θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες ταυτόχρονα με τα δείγματα των ασθενών.

### Παρασκευή Δείγματος

Το συνιστώμενο μονιμοποιητικό είναι ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10% για τομές ιστού εγκλεισμένες σε παραφίνη.

### Προειδοποιήσεις Και Προφυλάξεις

Για επαγγελματίες χρήστες.

Κατόπιν αιτήματος διατίθεται ένα δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού (MSDS).

Τα δείγματα, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, καθώς και όλα τα υλικά που εκτίθενται σε αυτά, πρέπει να υποβάλλονται σε χειρισμό ως δυνητικά μεταδότες μόλυνσης και να απορρίπτονται με κατάλληλες προφυλάξεις. 2

Μην αναρροφάτε ποτέ με πιπέτα τα αντιδραστήρια με το στόμα και αποφεύγετε την επαφή του δέρματος και των βλεννογόνων με αντιδραστήρια και δείγματα. Εάν τα αντιδραστήρια ή τα δείγματα έλθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, πλύνετε με άφθονες ποσότητες νερού.

Συμβουλευτείτε τους ομοσπονδιακούς, πολιτειακούς ή τοπικούς κανονισμούς για απόρριψη τυχόν δυνητικών τοξικών συστατικών. Ελαχιστοποιήστε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διότι ενδέχεται να συμβεί αύξηση της μη ειδικής χρώσης. Χρόνοι ή θερμοκρασίες επίωσσης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται ενδέχεται να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τυχόν τέτοια μεταβολή πρέπει να επικυρώνεται από το χρήστη.

### Διαδικασία

#### A. Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Πρότυποι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημεία.
2. 50 mM αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος Tris (TBS) pH 7,6.
3. Διάλυμα(τα) ανάκτησης αντιγόνων (δείτε την ενότητα Συστάσεις για τη χρήση για το πρωτοταγές αντίσωμα).
4. Διάλυμα(τα) ανάκτησης ενζύμων (δείτε την ενότητα Συστάσεις για τη χρήση για το πρωτοταγές αντίσωμα).
5. Αραιωτικό αντισώματος.
6. Πρωτοταγές αντίσωμα.
7. Σύστημα ανίχνευσης.
8. Αντιδραστήριο κυάνωσης π.χ. υποκατάστατο νερού βρύσης Scotts ή κεκορεσμένο ανθρακικό λίθιο.
9. Υλικό στερέωσης.

#### B. Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

1. Εξοπλισμός που απαιτείται για την ανάκτηση αντιγόνων, εάν συνιστάται για το πρωτοταγές αντίσωμα.
2. Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός ανοσοϊστοχημείας.



## C. Μεθοδολογία

Πριν από την εφαρμογή της μεθοδολογίας αυτής, οι χρήστες πρέπει εκπαιδευτούν σε ανοσοϊστοχημικές τεχνικές.

Ο συνδυασμός του πρωτοταγούς αντισώματος, της αραϊώσής του, σε συνδυασμό με το Peroxidase Block RE7101 και το σύστημα ανίχνευσης πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη σε σειρά γνωστών θετικών και αρνητικών μαρτύρων.

Νεκτός εάν υποδεικνύεται διαφορετικά, όλα τα βήματα εκτελούνται σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C).

Τα ακόλουθα βήματα πρέπει να εκτελούνται στο κατάλληλο στάδιο του ανοσοϊστοχημικού (IHC) πρωτοκόλλου (δείτε τις οδηγίες χρήσης του συστήματος ανίχνευσης)

1. Εκπλύνετε με νερό.
2. Χρωματίστε τις τομές με Hematoxylin RE7107 επί 5 λεπτά.
3. Εκπλύνετε με νερό.
4. Εάν απαιτείται, μετατρέψτε το χρώμα σε κυανό με αντιδραστήριο κυάνωσης.
5. Εκπλύνετε με νερό.

## Ποιοτικός Έλεγχος

Τυχόν διαφορές στην επεξεργασία των ιστών και τις τεχνικές διαδικασίες στο εργαστήριο του χρήστη ενδέχεται να προκαλέσουν σημαντική μεταβλητότητα στα αποτελέσματα, καθιστώντας αναγκαία την τακτική εκτέλεση εσωτερικών ελέγχων επιπέδων των ακόλουθων διαδικασιών.

Οι μάρτυρες θα πρέπει να είναι φρέσκα δείγματα νεκρωσιάζ/βιοψιάς/χειρουργικά δείγματα, τα οποία είναι μονιμοποιημένα με φορμόλη, επεξεργασμένα και εγκλεισμένα σε κηρό παραφίνης, το συντομότερο δυνατό με τον ίδιο τρόπο με το(α) δείγμα(τα) του ασθενούς.

## Θετικός Μάρτυρας Ιστού

Χρησιμοποιείται για να υποδεικνύει σωστά παρασκευασμένους ιστούς και σωστές τεχνικές χρώσης.

Θα πρέπει να περιλαμβάνεται ένας θετικός μάρτυρας ιστού για κάθε σύνολο συνθηκών εξέτασης/πρωτοταγούς αντισώματος σε κάθε εκτέλεση χρώσης.

Ένας ιστός με ασθενή θετική χρώση είναι πιο κατάλληλος από έναν ιστό με ισχυρή θετική χρώση για βέλτιστο ποιοτικό έλεγχο και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόμησης των αντιδραστηρίων.<sup>3</sup>

Για το συνιστώμενο ιστό θετικού μάρτυρα, δείτε τις οδηγίες χρήσης του πρωτοταγούς αντισώματος.

Εάν ο θετικός μάρτυρας ιστού δεν παρουσιάζει θετική χρώση, τα αποτελέσματα με τα δείγματα της εξέτασης θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

## Αρνητικός Μάρτυρας Ιστού

Θα πρέπει να εξετάζεται μετά τον θετικό μάρτυρα ιστού για την επαλήθευση της ειδικότητας της επισήμανσης του αντιγόνου-στόχου από το πρωτοταγές αντίσωμα.

Για τον συνιστώμενο ιστό αρνητικού μάρτυρα, δείτε τις οδηγίες χρήσης του πρωτοταγούς αντισώματος.

Εναλλακτικά, η ποικιλία διαφόρων κυτταρικών τύπων που υπάρχουν στις περισσότερες τομές ιστών παρέχει συχνά θέσεις αρνητικού μάρτυρα, αλλά αυτό πρέπει να επαληθεύεται από το χρήστη.

Μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, έχει συνήθως διάχυτη εμφάνιση. Ενδέχεται επίσης να παρατηρηθεί σποραδική χρώση του συνδεδεμένου ιστού σε τομές από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με υπερβολική ποσότητα φορμόλης. Χρησιμοποιείτε άθικτα κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης. Νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα παρουσιάζουν u963 συχνά μη ειδική χρώση.<sup>4</sup> Ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ανοσολογικής δέσμευσης των πρωτεϊνών ή των προϊόντων αντίδρασης του υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδοπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη<sup>5</sup> (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός). Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμευσης των ενζύμων από ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπέδων ιστού ασθενών με υπόστρωμα-χρωμογόνο, στρεπταβιδίνη-HRP ή σημειωμένο πολυμερές και υπόστρωμα-χρωμογόνο, αντίστοιχα. Εάν παρουσιαστεί ειδική χρώση στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενούς θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

## Αρνητικός Μάρτυρας Αντιδραστήριου

Χρησιμοποιείτε έναν μη ειδικό αρνητικό μάρτυρα αντιδραστήριου αντί του πρωτοταγούς αντισώματος με μια τομή κάθε δείγματος ασθενούς για την αξιολόγηση της μη ειδικής χρώσης και για να επιτρέπεται καλύτερη ερμηνεία της ειδικής χρώσης στη θέση του αντιγόνου.

## Ιστός Ασθενούς

Εξετάστε τελευταία τα κεχρωσμένα δείγματα ασθενούς. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκτιμάται στα πλαίσια τυχόν μη ειδικής χρώσης υποβάθρου του αρνητικού μάρτυρα αντιδραστήριου. Όπως συμβαίνει με οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική εξέταση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύτηκε, όχι ότι το αντιγόνο δεν υπήρχε στα κύτταρα/στον ιστό που εξετάστηκε. Εάν είναι απαραίτητο, χρησιμοποιήστε μια σειρά αντισωμάτων για την αναγνώριση ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων.

## Γενικοί Περιορισμοί

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια διαγνωστική διεργασία πολλαπλών βημάτων, η οποία αποτελείται από ειδικευμένη εκπαίδευση στην επιλογή των κατάλληλων αντιδραστηρίων, επιλογή ιστού, μονιμοποίηση και επεξεργασία, παρασκευή της πλάκας IHC και ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης.

Η χρώση του ιστού εξαρτάται από το χειρισμό και την επεξεργασία του ιστού πριν από τη χρώση. Τυχόν εσφαλμένη μονιμοποίηση, κατάψυξη, απόψυξη, πλύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να παράγει μορφώματα, παγίδευση αντισώματος ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τυχόν ασυνεπή αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται σε παραλλαγές των μεθόδων μονιμοποίησης και εγκλεισμού ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.<sup>6</sup>

Τυχόν υπερβολική ή ατελής αντιχρώση ενδέχεται να διακυβεύσει τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν σωστούς μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογοανατόμο.

Το Novocastra™ hematoxylin RE7107 προορίζεται για χρήση σε τομές εγκλεισμένες σε παραφίνη με ειδικές απαιτήσεις μονιμοποίησης. Ενδέχεται να παρουσιαστεί μη αναμενόμενη έκφραση αντιγόνου, ειδικά σε νεοπλασματά. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε κεχρωσμένης τομής ιστού πρέπει να περιλαμβάνει μορφολογική ανάλυση και την αξιολόγηση των κατάλληλων μαρτύρων.

## Χαρακτηριστικά απόδοσης

Η απόδοση του Novocastra™ Hematoxylin RE7107 έχει επικυρωθεί με χρήση μιας σειράς πρωτοπαγών αντισωμάτων IgG ποντικού, IgM ποντικού και IgG κουνελιού Novocastra™ σε συνδυασμό με τα Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K και NovocLink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

Το προϊόν αυτό είναι σταθερό έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος.

## Βιβλιογραφία - Γενική

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση

Παρεχόμενα αντιδραστήρια.

## Ημερομηνία Έκδοσης

24 Σεπτεμβρίου 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Produktkode: RE7107

### Tilsigtet Anvendelse

*Til in vitro diagnostisk anvendelse.*

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 er beregnet til anvendelse i immunhistokemiske (IHC) farvningsprocedurer, såsom de beskrevet i brugsvejledningen for Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K og Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Den kliniske fortolkning af al farvning eller fravær af farvning skal suppleres med morfologiske studier ved anvendelse af passende kontroller og skal evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests af en kvalificeret patolog.

### Procedureprincip

Hematoxylin farver cellekerner og har mange anvendelser inden for histologi, af hvilke de mest almindelige er farvning med hæmatoxylin og eosin<sup>1</sup>. IHC-procedurer kan hæmatoxylin anvendes til kontrastfarvning for at lette visualisering og lokalisering af de farvede slutprodukter ved IHC-proceduren.

Dette produkt anvendes i IHC-procedurer, der muliggør kvalitativ identifikation af antigener ved lysmikroskopi i vævssnit af formalinfixeret, paraffinindstøbt væv via sekventielle trin med indskudte vasketrin (vedrørende Procedureprincip for IHC, se brugsvejledningen for det passende detektionssystem). Novocastra™ Hematoxylin RE7107 tilsættes til vævssnittene efter reaktionen med substrat/chromogen. Det giver kernerne en rød farve, der omdannes til blåt efter vask af vævssnittene med enten vand eller en svagt basisk opløsning (blåningsreagens).

### Leverede reagenser

Hematoxylin RE7107 (25 ml), <0,1 % Hæmatoxylin.

### Rekonstituering, blanding, fortynding, titrering

Hematoxylin RE7107 er et brugsklart reagens. Rekonstituering, blanding, fortynding eller titrering af dette reagens anbefales ikke. Yderligere fortynding kan resultere i tab af antigenfarvning. Brugeren skal kontrollere alle sådanne ændringer.

### Opbevaring Og Holdbarhed

Opbevares ved 2–8 °C. Må ikke fryses. Sættes tilbage til 2–8 °C umiddelbart efter brug. Må ikke anvendes efter udløbsdatoen angivet på produktets etikette. Andre opbevaringsbetingelser end de angivne skal verificeres af brugeren. Der er ingen tydelige tegn, der indikerer at produktet er ustabil. Der skal derfor udføres positive og negative kontroller samtidigt med patientprøver.

### Prøveklargøring

Det anbefalede fiksativ er 10% neutralbufferjusteret formalin til paraffinindstøbte vævssnit.

### Advarsler Og Forholdsregler

Må kun anvendes af uddannet fagpersonale.

Der kan efter anmodning leveres et datablad for materialesikkerhed (MSDS).

Prøver skal før og efter fiksering, lige som alle materialer eksponeret mod prøverne, håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler. 2

Pipetter aldrig reagenser med munden og undgå, at reagenser og prøver kommer i kontakt med huden eller slimhinder. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skal der skylles efter med rigelige mængder vand.

Konsulter landsdækkende og lokale love og regler vedrørende bortskaffelse af alle potentielt toksiske komponenter.

Minimer mikrobiel kontaminering af reagenserne, da der ellers kan forekomme øget uspecifik farvning. Inkubationstider eller temperaturer andre end de specificerede kan give fejlagtige resultater. Alle sådanne ændringer skal valideres af brugeren.

### Procedure

#### A. Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

1. Standardopløsningsmidler anvendt i immunhistokemi.
2. 50 mM tris-bufferjusteret saltvandsopløsning (TBS) pH 7,6.
3. Antigengennfindingsopløsning(er) (se Anbefalinger vedrørende anvendelse for primært antistof).
4. Enzymgennfindingsopløsning(er) (se Anbefalinger vedrørende anvendelse for primært antistof).
5. Antistofdiluent.
6. Primært antistof.
7. Detektionssystem
8. Blåningsreagens, f.eks. erstatning for skotsk vandhanevand eller mættet lithiumcarbonat
9. Monteringsmedium.

#### B. Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

1. Udstyr nødvendigt til antigengennfindning hvis anbefalet for det primære antistof.
2. Almindeligt laboratorieudstyr til immunhistokemi.

## C. Metodologi

Inden ibrugtagning af denne metodologi, skal brugere være oplært i immunhistokemiske teknikker.

Kombinationen af primært antistof og dets fortynding sammen med Peroxidase Block RE7101 og detektionssystemet skal valideres af brugeren på en serie kendte positive og negative kontroller.

Med mindre andet er anført, skal alle trin udføres ved stuetemperatur (25 °C).

Følgende trin skal udføres på det passende trin i IHC-protokollen (se brugsvejledningen for detektionssystemet)

1. Skyl i vand.
2. Farv vævssnittene med Hematoxylin RE7107 i 5 minutter.
3. Skyl i vand.
4. Hvis nødvendigt blånes i blåningsreagens.
5. Skyl i vand.

### Kvalitetskontrol

Forskelle i behandlingen af væv og forskelle i tekniske procedurer i brugerens laboratorium kan frembringe betydeligt varierende resultater og nødvendiggøre regelmæssig udførelse af kontroller på stedet ud over nedenstående procedurer.

Kontrollerne skal være friske autopsier/biopsier/kirurgiske prøver fikseret i formalin og behandlet og indstøbt i paraffin så hurtigt som muligt på samme måde som patientprøver.

### Positiv Vævskontrol

Anvendes til påvisning af, at vævet er fremstillet korrekt, og at der er anvendt korrekte farvningsteknikker.

Der bør inkluderes en positiv vævskontrol for hvert sæt testbetingelser/primært antistof i hver farvekørsel.

Svagt positivt farvet væv er mere egnet end kraftigt positivt farvet væv til optimal kvalitetskontrol og påvisning af små niveauer af reagensnedbrydning<sup>3</sup>.

Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede positive kontrolvæv.

Hvis den positive vævskontrol ikke udviser positiv farvning, skal resultater af testprøverne kasseres.

### Negativ Vævskontrol

Skal undersøges efter den positive vævskontrol for at sikre, at det primære antistof mærker målantigenet specifikt.

Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede negative kontrolvæv.

Alternativt frembyder de mange forskellige celletyper, der er til stede i de fleste vævssnit, ofte negative kontrolsteder, men dette skal verificeres af brugeren.

Uspecifik farvning har, hvis til stede, ofte et diffust udseende. Sporadisk farvning af bindevæv kan ligeledes observeres i vævssnit af væv, der er fikseret for kraftigt i formalin. Anvend intakte celler til fortolkning af farvningsresultaterne. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte mere uspecifikt.<sup>4</sup> Der kan eventuelt ses falske positive resultater, der skyldes non-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. Dette kan ligeledes skyldes endogene enzymer, såsom pseudoperoxidase (erythrocytter), endogen peroxidase (cytochrom C) eller endogent biotin<sup>5</sup> (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre). For at differentiere mellem endogen enzymaktivitet eller uspecifik enzymbinding og specifik immunreaktivitet kan yderligere patientvæv eventuelt farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen, Streptavidin-HRP eller mærket polymer og substratkromogen. Hvis der optræder specifik farvning i den negative vævskontrol, skal resultaterne af patientprøverne kasseres.

### Negativ Reagenskontrol

Anvend en uspecifik negativ reagenskontrol i stedet for det primære antistof på et vævssnit af hver patientprøve for at vurdere uspecifik farvning og muliggøre bedre fortolkning af specifik farvning på antigenstedet.

### Patientvæv

Anvendes til påvisning af, at vævet er fremstillet korrekt, og at der er anvendt korrekte farvningsteknikker. Der bør inkluderes en positiv vævskontrol for hvert sæt testbetingelser/primært antistof i hver farvekørsel. Svagt positivt farvet væv er mere egnet end kraftigt positivt farvet væv til optimal kvalitetskontrol og påvisning af små niveauer af reagensnedbrydning. Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede positive kontrolvæv. Hvis den positive vævskontrol ikke udviser positiv farvning, skal resultater af testprøverne kasseres.

### Generelle Begrænsninger

Immunhistokemi er en diagnostisk proces bestående af mange trin, der omfatter specialiseret uddannelse i valg af passende reagenser, vævsselektion, -fiksering og -behandling samt fremstilling af IHC-objektglas og fortolkning af farvningsresultaterne.

Vævsfarvning er afhængig af håndteringen og behandlingen af vævet inden farvning. Forkert fiksering, frysning, optøning, vask, tørring, opvarmning, sektionering eller kontaminering med andet væv eller andre væsker kan frembringe artefakter, indfangning af antistof eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variationer i fikserings- og indstøbningsmetoder eller irregularetter indeholdt i vævet.<sup>7</sup>

For kraftig eller ukomplet kontrastfarvning kan gøre korrekt fortolkning af resultaterne vanskelig.

Klinisk fortolkning af farvning eller mangel derpå skal suppleres med morfologiske undersøgelser under anvendelse af passende kontroller og bør evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests af en kvalificeret patolog.

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 er beregnet til anvendelse på paraffinindstøbt vævssnit med specifikke krav til fiksering. Der kan forekomme uventet antigenekspresion, navnlig i neoplaser. Den kliniske fortolkning af alle farvede vævssnit skal indbefatte morfologisk analyse og evaluering af passende kontroller.

## Ydeevne

Ydelsen af Novocastra™ Hematoxylin RE7107 er blevet valideret ved anvendelse af en række primære Novocastra™ muse-IgG-, muse-IgM- og kanin-IgG-antistoffer i kombination med Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K og Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/ RE7150-K.

Produktet er stabilt til udløbsdatoen angivet på produktets etikette.

## Bibliografi - Generelt

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## Rettelser Til Tidligere Udgave

Leverede reagenser.

## Udgivelsesdato

24 september 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Productcode: RE7107

### Beoogd gebruik

Voor diagnostisch gebruik *in vitro*.

De Novocastra™ Hematoxylin RE7107 is bedoeld voor gebruik in de immunohistochemische (IHC) kleuringsprocedures zoals beschreven in de gebruiksinstructies van de Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, het Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K en NovoLink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. De klinische interpretatie van een kleuring of de afwezigheid hiervan moet worden aangevuld met morfologische studies en de juiste controles. Ook moeten er evaluaties worden uitgevoerd binnen de context van de klinische voorgeschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests uitgevoerd door een bevoegd patholoog.

### Principe van de procedure

Hematoxylin kleurt celkernen en wordt voor veel histologische toepassingen gebruikt, maar het vaakst voor het kleuren van Hematoxylin en eosine.<sup>1</sup> Hematoxylin kan gebruikt worden in IHC-procedures als tegenkleuring om te voorkomen dat het gekleurde eindproduct van de IHC-procedure gevisualiseerd of gelokaliseerd wordt.

Dit product wordt gebruikt in IHC-procedures, waarmee kwalitatieve identificatie, met behulp van lichtmicroscopie, van antigenen in formaline-gefixeerde, in paraffine ingebedde weefselcoupes mogelijk is, via sequentiële stappen met ingevoegde spoelingsstappen (zie voor het principe van de IHC-procedure de gebruiksaanwijzing van het gepaste detectiesysteem). Novocastra™ Hematoxylin RE7107 wordt na de reactie van substraat/chromogeen op coupes toegepast. Het kleurt kernen rood en dit wordt naar blauw omgezet door coupes te reinigen met water of een licht alkalische oplossing (blauw reagens).

### Geleverde reagentia

Hematoxylin RE7107 (25 ml). <0,1% Hematoxylin.

### Reconstitutie, menging, verdunning of titratie

Hematoxylin RE7107 is een gebruiksklaar reagens. Reconstitutie, menging, verdunning of titratie van dit reagens wordt afgeraden. Verdere verdunning kan tot een verlies van antigeenkleuring leiden. Dergelijke wijzigingen moeten door de gebruiker worden gevalideerd.

### Opslag en stabiliteit

Bewaren bij 2–8 °C. Niet invriezen. Direct na gebruik weer bij 2–8 °C opslaan. Niet gebruiken na de vervaldatum die op het label van het product staat. Andere dan de genoemde opslagcondities moeten door de gebruiker worden geverifieerd. Er zijn geen duidelijke tekens die wijzen op instabiliteit van dit product. Daarom moeten positieve en negatieve controles gelijktijdig met patiëntenmonsters worden uitgevoerd.

### Specimenpreparatie

Het aanbevolen fixeermiddel is 10% neutraal gebufferde formaline voor in paraffine ingebedde weefselcoupes.

### Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor professionele gebruikers.

Er is een veiligheidsinformatieblad (MSDS) beschikbaar op verzoek.

Specimens, en alle materialen die eraan worden blootgesteld, moeten voor en na fixatie worden behandeld als potentiële overdragers van infectie en moeten met inachtneming van de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd.<sup>2</sup>

Pipeteer reagentia nooit met de mond en vermijd contact van de huid en slijmvliezen met reagentia of specimens. Indien reagentia of specimens in aanraking komen met gevoelige gebieden, spoel deze dan overvloedig met water. Raadpleeg de nationale, regionale en plaatselijke voorschriften voor de afvoer van alle potentieel giftige stoffen.

Minimaliseer de kans op microbiële contaminatie van reagentia, want dit kan de niet-specifieke kleuring verhogen. Andere incubatietijden of temperaturen dan hierin vermeld, kunnen onjuiste resultaten opleveren. Dergelijke wijzigingen moeten door de gebruiker worden gevalideerd.

### Procedure

#### A. Benodigde, maar niet inbegrepen reagentia

1. Standaard oplosmiddelen gebruikt in de immunohistochemie.
2. 50 mm tris-gebufferde zoutoplossing (TBS) pH 7,6.
3. Antigeenhersteloplossing(en) - (zie Aanbevelingen voor het gebruik voor primair antilichaam).
4. Enzymhersteloplossing(en) - (zie Aanbevelingen voor het gebruik voor primair antilichaam).
5. Antilichaam-verdunningsmiddel.
6. Primair antilichaam.
7. Detectiesysteem.
8. Blauw reagens, oftewel Scotts vervanging voor kraanwater of verzadigd lithiumcarbonaat.
9. Insluitmiddel.

#### B. Benodigde, maar niet inbegrepen apparatuur

1. Apparaat vereist voor antigeenherstel, indien aanbevolen voor het primaire antilichaam.
2. Algemene immunohistochemische laboratoriumuitrusting.

### C. Methodologie

**Gebruikers moeten vóór het ondernemen van deze methodologie worden opgeleid in immunohistochemische technieken.**

**De combinatie van het primaire antilichaam, de verdunning ervan, samen met Hematoxylin RE7107 en het detectiesysteem moeten door de gebruiker gecontroleerd worden aan de hand van een aantal positieve en negatieve controles.**

Tenzij anders vermeld worden alle stappen uitgevoerd bij kamertemperatuur (25 °C). De volgende stappen moeten in de gepaste fase van het IHC-protocol worden uitgevoerd (zie gebruiksinstructies van het detectiesysteem)

1. Spoelen in water.
2. Kleur coupes 5 minuten lang met Hematoxylin RE7107.
3. Spoelen in water.
4. Indien nodig blauw maken in blauw reagens.
5. Spoelen in water.

### Kwaliteitscontrole

Verschillen in weefselbewerking en technische procedures in het laboratorium van de gebruiker kunnen tot aanzienlijke variabiliteit in de resultaten leiden, waardoor het nodig is om regelmatig interne controles uit te voeren als aanvulling op de volgende procedures. Controles zijn verse autopsie-/biopsie-/chirurgische specimens die zo snel mogelijk en op dezelfde manier als het monster of de monsters van de patiënt zijn gefixeerd in formaline, bewerkt en ingebed in paraffinewas.

### Positieve weefselcontrole

Wordt gebruikt om aan te geven dat weefsels correct geprepareerd zijn en dat passende kleuringstechnieken zijn gebruikt. Voor elke set testvoorwaarden/primaire antilichaam in elke kleuringrun moet één positieve weefselcontrole worden opgenomen. Voor optimale kwaliteitscontrole en detectie van lichte degeneratie van het reagens is een weefsel met zwakke positieve kleuring meer geschikt dan een weefsel met sterke positieve kleuring.<sup>3</sup> Voor aanbevolen positieve controleweefsel, zie gebruiksinstructies primaire antilichaam. Als de positieve weefselcontrole geen positieve kleuring vertoont, moeten de resultaten die met testspecimens zijn verkregen als ongeldig worden beschouwd.

### Negatieve weefselcontrole

De negatieve weefselcontrole moet na de positieve weefselcontrole worden onderzocht om de specificiteit van de labeling van het doelaantigeen door het primaire antilichaam te verifiëren. Voor aanbevolen negatieve controleweefsel, zie gebruiksinstructies primaire antilichaam. Aan de andere kant levert de verscheidenheid aan diverse celtypen die in de meeste weefselcoupes aanwezig zijn, vaak negatieve controlelocaties op, maar dit moet wel worden geverifieerd door de gebruiker. Niet-specifieke kleuring, indien aanwezig, ziet er doorgaans diffuus uit. Een sporadische kleuring van bindweefsel kan ook worden waargenomen in coupes van overmatig in formaline gefixeerde weefsels. Gebruik intacte cellen voor het interpreteren van kleuringresultaten. Necrotische of gedegenererde cellen kleuren vaak niet-specifiek.<sup>4</sup> Fout-positieve resultaten kunnen optreden als gevolg van niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten. Ze kunnen ook worden veroorzaakt door endogene enzymen zoals pseudoperoxidase (erythrocyten), endogene peroxidase (cytochrom C) of endogeen biotine<sup>5</sup> (bv. lever, borst, hersenen, nier). Om activiteit van endogene enzymen of niet-specifieke binding van enzymen te onderscheiden van specifieke immunoreactiviteit, kunnen aanvullende patiëntweefsels uitsluitend worden gekleurd met respectievelijk substraatchromogeen, Streptavidin-HRP of gelabeld polymeer en substraatchromogeen. Als er specifieke kleuring optreedt in de negatieve weefselcontrole, moeten resultaten met de patiëntspecimens als ongeldig worden beschouwd.

### Negatieve reagenscontrole

Gebruik een niet-specifieke negatieve reagenscontrole van het primaire antilichaam met een coupe van elk patiëntspecimen om niet-specifieke kleuring te evalueren en specifieke kleuring op de antigeenlocatie beter te kunnen interpreteren.

### Patiëntweefsel

Onderzoek gekleurde patiëntspecimens het laatst. De intensiteit van de positieve kleuring moet worden geëvalueerd binnen de context van niet-specifieke achtergrondkleuring van de negatieve reagenscontrole. Zoals bij elke immunohistochemische test betekent een negatief resultaat dat het antigeen niet is gedetecteerd. Het betekent niet dat het antigeen afwezig was in de onderzochte cellen of het onderzochte weefsel. Gebruik zo nodig een panel van antilichamen om fout-negatieve reacties te identificeren.

### Algemene beperkingen

Immunohistochemie (IHC) is een diagnostisch meerstapsproces waarvoor een gespecialiseerde opleiding nodig is in het kiezen van de juiste reagentia, het selecteren, fixeren en bewerken van weefsel, het prepareren van IHC-objectglasjes en het interpreteren van de kleuringresultaten.

Weefselkleuring is afhankelijk van de manier waarop het weefsel vóór de kleuring wordt behandeld en bewerkt. Verkeerd fixeren, invriezen, ontdooien, wassen, drogen, verwarmen, snijden of contaminatie met andere weefsels of vloeistoffen kan tot artefacten, insluiting van antilichamen of fout-negatieve resultaten leiden. Inconsistente resultaten kunnen te wijten zijn aan variaties in de fixatie- en inbeddingsmethode, of aan intrinsieke onregelmatigheden in het weefsel.<sup>6</sup>

Een te sterke of onvolledige tegenkleuring kan een juiste interpretatie van de resultaten bemoeilijken of onmogelijk maken.

De klinische interpretatie van een kleuring of de afwezigheid hiervan moet worden aangevuld met morfologische studies en de juiste controles. Ook moeten er evaluaties worden uitgevoerd binnen de context van de klinische voorgeschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests uitgevoerd door een bevoegd patholoog.

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 is bedoeld voor gebruik op in paraffine ingebedde coupes met specifieke fixatievereisten. Er kan onverwachte antigeenexpressie optreden, met name bij neoplasma's. De klinische interpretatie van gekleurde weefselcoupes moet een morfologische analyse en de evaluatie van overeenkomstige controles bevatten.

## **Prestatiekenmerken**

De prestaties van Novocastra™ Hematoxylin RE7107 zijn gevalideerd met behulp van een aantal Novocastra™ IgG, muis IgM en konijn IgG primaire antilichamen in combinatie met het Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K en Novolink Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

Het product is stabiel tot de vervaldatum die op het label van de verpakking is aangegeven.

## **Literatuurlijst - algemeen**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## **Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave**

Geleverde reagentia.

## **Datum uitgave**

24 september 2018



# Novocastra™ Hematoxylin

## Produktkode: RE7107

### Tiltent bruk

*Til in vitro-diagnostisk bruk.*

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 er tenkt brukt i immunohistokjemiske (IHC) fargingsprosedyrer slik som de som er beskrevet i bruksanvisningen for Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K og Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Den kliniske tolkningen av en farging eller uteblitt farging må suppleres av morfologiske studier ved bruk av riktige kontroller og skal evalueres av en kvalifisert patolog innenfor konteksten av pasientens sykehistorie og andre diagnostiske tester utført av en kvalifisert patolog.

### Prinsipp for prosedyren

Hematoxylin farger cellekjerner og har mange anvendelser i histologi, den vanligste av disse er hematoksylin- og eosin-farging.<sup>1</sup> I IHC-prosedyrer kan hematoksylin brukes som kontrastfarging for å lette visualisering og lokalisering av det fargede sluttproduktet av IHC-prosedyren.

Dette produktet brukes i IHC-prosedyrer, som muliggjør kvalitativ identifisering med lysmikroskopering av antigener i snitt av formalinfiksert, parafininnstøpt vev, via sekvensielle trinn med mellomliggende vasketrinn (for IHCs prinsipp for prosedyren, se bruksanvisningen for det aktuelle deteksjonssystemet). Novocastra™ Hematoxylin RE7107 påføres snittene etter substrat-/kromogenreaksjonen. Den farger kjerner røde og omdannes til blått ved å vaske snitt i enten vann eller en svak alkalisk oppløsning (blåfargingsreagens).

### Medfølgende reagenser

Hematoxylin RE7107 (25ml). <0,1 % Hematoxylin.

### Rekonstitusjon, blanding, fortykning, titrering

Hematoxylin RE7107 er en reagens som er klar til bruk. Rekonstitusjon, blanding, fortykning eller titrering av denne reagensen er ikke anbefalt. Ytterligere fortykning kan forårsake tap av antigenfarging. Brukeren må validere enhver slik endring.

### Oppbevaring og stabilitet

Oppbevares ved 2–8 °C. Skal ikke fryses. Returner til 2–8 °C umiddelbart etter bruk. Må ikke brukes etter utløpsdatoen som er angitt på produktetiketten. Andre oppbevaringsforhold enn de som er spesifisert, må verifiseres av brukeren. Det finnes ikke åpenbare tegn som indikerer ustabilitet for dette produktet. Derfor skal det kjøres positive og negative kontroller samtidig med pasientprøver.

### Prøveklargjøring

Anbefalt fiksativ er 10 % nøytralbufret formalin for parafininnstøpte vevsnitt.

### Advarsler og forholdsregler

For helsepersonell.

Et sikkerhetsdatablad (SDS) er tilgjengelig på forespørsel.

Prøver, før og etter fiksering, og alle materialer som er utsatt for dem, skal behandles som om de kan overføre smitte og kasseres med riktige forholdsregler.<sup>2</sup>

Pipetter aldri reagenser med munnen, og unngå at hud og slimhinner kommer i kontakt med reagenser og prøver. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skyl med rikelige mengder vann. Se lokale, regionale eller statlige forskrifter for avfallshåndtering av eventuelle potensielle giftkomponenter.

Minimer mikrobiell kontaminering av reagenser, ellers kan det forekomme en økning i uspesifikk farging. Andre inkuberingstider eller temperaturer enn de som er spesifisert, kan gi feilaktige resultater. Enhver slik endring må valideres av brukeren.

### Prosedyre

#### A. Nødvendige reagenser som ikke følger med

1. Standard løsemidler som brukes innen immunhistokjemi.
2. 50 mM tris-bufret saltvann (TBS) pH 7,6.
3. Antigen-demaskeringsoppløsning(er) (se Anbefalinger for bruk for primært antistoff).
4. Enzym-demaskeringsoppløsning(er) (se Anbefalinger for bruk for primært antistoff).
5. Antistofffortynner.
6. Primært antistoff.
7. Deteksjonssystem.
8. Blåfargingsreagens f.eks. Scotts springvannerstatning eller mettet litiumkarbonat.
9. Monteringsmedium.

#### B. Nødvendig utstyr som ikke følger med

1. Utstyr som er nødvendig for antigen-demaskering, hvis det anbefales for det primære antistoffet.
2. Generelt immunhistokjemisk laboratorieutstyr.

### C. Metodikk

**Før bruk av denne metoden må brukerne være opplært i immunhistokjemiske teknikker.**

**Kombinasjonen av primært antistoff, dets fortykning, sammen med Hematoxylin RE7107 og deteksjonssystemet, skal valideres av brukeren på en rekke kjente positive og negative kontroller.**

Med mindre annet er angitt, utføres alle trinn ved romtemperatur (25 °C). Følgende trinn må utføres på riktig trinn i IHC-protokollen (se deteksjonssystemets bruksanvisning)

1. Skyll med vann.
2. Farg snittene med Hematoxylin RE7107 i 5 minutter.
3. Skyll med vann.
4. Om nødvendig, blått i en blåfargingsreagens.
5. Skyll med vann.

### Kvalitetskontroll

Forskjeller i vevprosessering og tekniske prosedyrer i brukerens laboratorium kan frembringe signifikant variasjon i resultatene og gjør det påkrevd med regelmessige interne ytelseskontroller i tillegg til følgende prosedyrer. Kontroller skal være ferske prøver fra obduksjon/ biopsi/kirurgi, som er formalinfisert, behandlet og parafinvoxsinnstøpt så snart som mulig på samme måte som pasientprøven(e).

### Positivt kontrollvev

Brukes for å indikere riktig klagjorte vev og riktige fargingsteknikker. Positivt kontrollvev skal inkluderes for hvert sett av testbetingelser/ primært antistoff i hver fargekjøring. Vev med svak positiv farging er mer egnet til optimal kvalitetskontroll og til deteksjon av en eventuell mindre degradering av reagensene enn vev med sterk positiv farging.<sup>3</sup> For anbefalt positivt kontrollvev, se bruksanvisningen for primært antistoff. Hvis det positive kontrollvevet ikke gir positiv farging, skal resultater med testprøvene betraktes som ugyldige.

### Negativt kontrollvev

Skal undersøkes etter det positive kontrollvevet for å verifisere spesifisiteten i merkingen av målantigenet med det primære antistoffet. For anbefalt negativt kontrollvev, se bruksanvisningen for primært antistoff. Alternativt gir variasjonen av forskjellige celletyper som kan finnes i de fleste vevsnitt ofte rom for negativ kontroll, men dette må verifiseres av brukeren. Uspesifikk farging, hvis dette forekommer, har vanligvis et diffus utseende. Spasdiske farging av bindevev vil også kunne observeres i vevsnitt som er fiksert i for mye formalin. Bruk intakte celler til tolkning av fargingsresultater. Nekrotiske eller degenererte celler farger ofte uspesifikt.<sup>4</sup> Falske positive resultater kan sees på grunn av ikke-immunologisk binding av proteiner eller substratreaksjonsprodukter. De kan også være forårsaket av endogene enzymer slik som pseudoperoksidase (erytrocytter), endogen peroksidase (cytokrom C) eller endogent biotin<sup>5</sup> (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre). For å differensiere endogen enzymaktivitet eller uspesifikk binding av enzymer fra spesifikk immunreaktivitet kan ekstra pasientvev farges eksklusivt med henholdsvis substratkromogen, Streptavidin-HRP eller merket polymer og substratkromogen. Hvis det forekommer spesifikk farging i det negative kontrollvevet, skal resultater med pasientprøvene betraktes som ugyldige.

### Negativ reagenskontroll

Bruk en uspesifikk negativ reagenskontroll i stedet for det primære antistoffet med et snitt av hver pasientprøve for å evaluere uspesifikk farging og gi bedre mulighet for tolkning av den spesifikke fargingen på antigenstedet.

### Pasientvev

Undersøk fargede pasientprøver til slutt. Positiv fargingsintensitet skal vurderes i lys av eventuell uspesifikk bakgrunnsfarging av den negative reagenskontrollen. På samme måte som for alle andre immunhistokjemiske tester betyr et negativt resultat at antigenet ikke ble påvist, ikke at antigenet ikke var til stede i cellene/det analyserte vevet. Om nødvendig, skal det brukes et antistoffpanel til å identifisere falske negative reaksjoner.

### Generelle begrensninger

Immunhistokjemi er en flertrinns diagnostisk prosess som krever spesialisert opplæring i valg av egnede reagenser, valg, fiksering og behandling av vev, klagjøring av IHC-objektglass og tolkning av fargingsresultater.

Vevfargingen er avhengig av håndteringen og behandlingen av vevet før det farges. Uriktig fiksering, dyppfrysing, opptining, vasking, tørking, oppvarming, snitting eller kontaminering med annet vev eller væsker kan frembringe artefakter, farging av antistoff eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpingsmetoder eller uregelmessigheter i vevet<sup>6</sup>. Overdreven eller ufullstendig kontrastfarging kan hindre riktig tolkning av resultater.

Den kliniske tolkningen av en farging eller uteblitt farging skal suppleres av morfologiske studier ved bruk av riktige kontroller og skal evalueres av en kvalifisert patolog innenfor sammenhengen av pasientens sykehistorie og andre diagnostiske tester.

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 skal brukes på parafininnstøpte snitt med spesifikke fikseringskrav. Det kan forekomme uventet antigenuttrykk, spesielt i neoplasmer. Den kliniske tolkningen av ethvert farget vevsnitt må inkludere morfologisk analyse og evaluering av egnede kontroller.

### Ytelseegenskaper

The performance of Novocastra™ Hematoxylin RE7107 har blitt validert ved bruk av en rekke Novocastra™ primære antistoffer for mus-IgG, mus-IgM og kanin-IgG i kombinasjon med Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K og Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

Dette produktet er stabilt inntil utløpsdatoen som er vist på produktetiketten.

## **Bibliografi – generell**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## **Endringer på tidligere utgave**

Medfølgende reagenser.

## **Utstedelsesdato**

24 september 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Ürün Kodu: RE7107

### Kullanım Amacı

*In vitro* diagnostik kullanım içindir.

Novocastra™ Hematoxylin RE7107, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K ve Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K Kullanım Talimatlarında belirtilen immünohistokimyasal (IHC) boyama prosedürlerinde kullanım içindir. Herhangi bir boyamanın veya boyama yokluğunun klinik yorumu, morfolojik çalışmalar ve uygun kontrollerle tamamlanmalıdır ve nitelikli bir patoloj tarafından hastanın klinik öyküsü ve diğer tanı testleri bağlamında değerlendirilmelidir.

### Prosedür İlikesi

Hematoxilin, hücre çekirdeğini boyar ve histolojide birçok alanda kullanılır. Bunlardan en yaygını Hematoxilin ve Eosin boyamasıdır.<sup>1</sup> IHC prosedürlerinde hematoxilin, IHC prosedürünün renkli son ürününün görüntülenmesine ve lokalizasyonuna yardımcı olmak için karşıt boyama olarak kullanılabilir.

Bu ürün, bir araya getirilmiş yıkama adımları ile sıralı basamaklar yoluyla formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş doku kesitlerindeki antijenlerin ışık mikroskopisi ile kalitatif tanımlamaya izin veren IHC prosedürlerinde kullanılır (IHC Prosedür İlikesi için bkz. uygun saptama sistemi Kullanım Talimatları). Novocastra™ Hematoxylin RE7107, subtrat/kromojen reaksiyonundan sonra kesitlere uygulanır. Çekirdekleri kırmızı renge boyar ve suda ve zayıf alkalın çözeltisinde yıkama kesitlerinde mavileşme (mavileştirme reaktifi).

### Sağlanan Reaktifler

Hematoxylin RE7107 (25ml). <math>\leq 0,1\%</math> Hematoxilin.

### Sulandırma, Karıştırma, Seyreltme, Titrasyon

Hematoxylin RE7107, kullanıma hazır bir reaktiftir. Bu reaktifin karıştırılması, seyreltilmesi veya titre edilmesi önerilmemektedir. Fazla seyreltme antijen boyanması kaybına yol açabilir. Bu tür herhangi bir değişiklik kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

### Saklama ve Stabilite

2-8°C'de saklayın. Dondurmayın. Kullanımdan hemen sonra 2-8°C'ye geri alın. Ürün etiketinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın. Yukarıda belirtilenler dışında saklama koşulları kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Ürünün instabilitesini gösteren belirgin bulgular yoktur, bu nedenle pozitif ve negatif kontroller hasta numuneleriyle eş zamanlı olarak çalışılmalıdır.

### Örnek Hazırlama

Önerilen fiksatif, parafine gömülmüş doku kesitleri için %10 nötr tamponlu formalindir.

### Uyarılar ve Önlemler

Profesyonel kullanıcılar içindir.

Malzeme Güvenlik Bilgileri Formu (MSDS), talep üzerine sağlanmaktadır.

Fikse etme işleminden önce ve sonra örnekler ve bunlara maruz kalan tüm materyaller, enfeksiyon yayabilecek gibi ele alınmalı ve doğru önlemler alınmalıdır.<sup>2</sup>

Reaktifleri hiçbir zaman ağızla pipetlemeyin. Cildin ve mukoz membranların reaktifler ve örneklerle temas etmesini önleyin. Reaktifler veya örnekler hassas bölgelere temas ederse bol miktarda suyla yıkayın. Potansiyel olarak toksik bileşenlerin atılmasıyla ilgili yerel, ulusal veya bölgesel düzenlemeleri dikkate alın.

Reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyonunu minimize edin, aksi takdirde spesifik olmayan boyamada artış meydana gelebilir. Belirtilenler dışında inkübasyon süreleri veya sıcaklıklar hatalı sonuçlara yol açabilir. Bu tür herhangi bir değişiklik kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

### Prosedür

#### A. Gereken ancak sağlanmayan reaktifler

1. İmmünohistokimyada kullanılan standart çözücüler.
2. 50 mM tris tamponlu salin (TBS) pH 7,6.
3. Antijen geri kazanım çözeltisi/çözeltileri (bkz. primer antikor için Kullanım Önerileri).
4. Enzim geri kazanım çözeltisi/çözeltileri (bkz. primer antikor için Kullanım Önerileri).
5. Antikor seyreltici.
6. Primer antikor.
7. Saptama sistemi.
8. Mavileştirme reaktifi ör. Scotts musluk suyu ikamesi veya doymuş lityum karbonat.
9. Montaj ortamı.

#### B. Gereken ancak sağlanmayan ekipman

1. Primer antikor için önerildiyse antijen geri kazanımı için gerekli ekipman.
2. Genel immünohistokimya laboratuvar ekipmanı.

### C. Metodoloji

**Kullanıcılar, bu yöntemi uygulamadan önce, immünohistokimya teknikleri konusunda gerekli eğitimi almış olmalıdır.**

**Primer antikorun, seyreltisinin Hematoxylin RE7107 ve saptama sistemiyle kombinasyonu, bilinen bir dizi pozitif ve negatif kontrollerle kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.**

Aksi belirtilmedikçe tüm adımlar oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilir. Aşağıdaki adımlar, IHC protokolündeki uygun aşamalarda izlenmelidir (bkz. saptama sistemi Kullanım Talimatları)

1. Suda durulayın.
2. Kesitleri Hematoxylin RE7107 ile 5 dakika boyunca boyayın.
3. Suda durulayın.
4. Gerekliği takdirde mavileştirme reaktifinde mavi yapın.
5. Suda durulayın.

### Kalite Kontrol

Kullanıcı laboratuvarında doku işleme ve teknik prosedürlerdeki farklılıklar sonuçlarda, aşağıdaki prosedürlere ek olarak kurum içi kontrollerin düzenli performansını gerektiren anlamlı değişkenliğe yol açabilir. Kontroller, hasta numunesinde/humunelerinde yapıldığı gibi mümkün olan en kısa sürede dondurulan formalinle fikse edilmiş, parafin mumuna gömülmüş, taze otopsi numuneleri/biyopsi numuneleri/cerrahi örnekler olmalıdır.

### Pozitif Doku Kontrolü

Doğru hazırlanmış dokuları ve uygun boyama tekniklerini belirtmek için kullanılır. Her boyama çalışmasında her test koşulu/primer antikor seti için bir pozitif doku kontrolü dahil edilmelidir. Zayıf pozitif boyama yapılmış doku, optimal kalite kontrolü ve minör reaktif bozunma düzeylerini saptamak için güçlü pozitif boyama yapılmış dokudan daha uygundur.<sup>3</sup> Önerilen pozitif kontrol dokuları için primer antikor Kullanım Talimatlarına bakın. Pozitif doku kontrolü pozitif boyama göstermezse test örneklerinin sonuçları geçersiz kabul edilmelidir.

### Negatif Doku Kontrolü

Primer antikor tarafından hedef antijenin etiketlenmesinin spesifikliğini doğrulamak için, pozitif doku kontrolünden sonra incelenmelidir. Önerilen negatif kontrol doku için primer antikor Kullanım Talimatlarına bakın. Alternatif olarak, doku kesitlerinin çoğunda bulunan farklı hücre tipi çeşitleri sıklıkla negatif kontrol bölgeleri sunar ancak bu kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Olduğu durumda, spesifik olmayan boyamanın görünümü genelde diffüzdür. Aşırı formalin fiksasyonlu dokulardan kesitlerde bağ dokusunun sporadik boyanması da görülebilir. Boyama sonuçlarının yorumlanması için intakt hücreler kullanın. Nekrotik ve dejenere hücreler genellikle spesifik olmayan şekilde boyanır.<sup>4</sup> Proteinlerin veya substrat reaksiyon ürünlerinin immünoolojik olmayan bağlanması nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar görülebilir. Bunlar ayrıca psödoperoksidad (eritrositler), endojen peroksidad (sitokrom C) veya endojen biotin<sup>5</sup> (ör. karaciğer, meme, beyin, böbrek) gibi endojen enzimler nedeniyle oluşabilir. Endojen enzim aktivitesini veya enzimlerin spesifik olmayan bağlanmasını spesifik immünoreaktiviteden ayırmak için ek hasta dokuları sırasıyla sadece substrat kromojenle, Streptavidin-HRP'yle ya da etiketlenmiş polimer ve substrat kromojenle boyanabilir. Negatif doku kontrolünde spesifik boyanma oluşursa hasta örneklerinin sonuçları geçersiz kabul edilmelidir.

### Negatif Reaktif Kontrolü

Spesifik olmayan boyanmayı değerlendirmek ve antijen bölgesinde spesifik boyanmayı daha iyi yorumlayabilmek için her hasta örneği kesitinde primer antikor yerine spesifik olmayan bir negatif reaktif kontrolü kullanın.

### Hasta Dokusu

Boyanmış hasta örneklerini son olarak inceleyin. Pozitif boyama yoğunluğu, negatif reaktif kontrolünün spesifik olmayan herhangi bir arka plan boyanması bağlamında değerlendirilmelidir. Her immünohistokimyasal testte olduğu gibi negatif bir sonuç antijenin saptanmadığı anlamına gelir, antijenin miktar tayinine tabi tutulan hücrelerde/dokuda bulunmadığı anlamına gelmez. Gerekirse yanlış negatif reaksiyonların belirlenmesi için antikor paneli kullanın.

### Genel Sınırlamalar

İmmünohistokimya; uygun reaktiflerin seçimi, doku seçimi, fiksasyonu ve işlenmesi, IHC slaytının hazırlanması ve boyama sonuçlarının yorumlanması alanlarında özel eğitimin oluşması, çok adımlı bir diagnostik süreçtir.

Doku boyama, boyama öncesinde dokunun kullanımına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer dokular veya sıvılarla kontaminasyon artefaktlara, antikor tutulmasına veya yanlış negatif sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçların nedeni, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki değişiklikler veya dokunun yapısından kaynaklanan düzensizlikler olabilir.<sup>6</sup>

Aşırı veya tam olmayan karşıt boyama sonuçlarının uygun yorumlanmasını olumsuz etkileyebilir.

Herhangi bir boyamanın veya boyama yokluğunun klinik yorumu, morfolojik çalışmalar ve uygun kontrollerle tamamlanmalıdır ve nitelikli bir patolog tarafından hastanın klinik öyküsü ve diğer tanı testleri bağlamında değerlendirilmelidir.

Novocastra™ Hematoxylin RE7107, spesifik fiksasyon gereklilikleri olan parafine gömülmüş kesitlerde kullanım içindir. Özellikle neoplazmlarda beklenmeyen antijen ekspresyonu oluşabilir. Boyanmış herhangi bir doku kesitinin klinik yorumu, morfolojik analizi ve uygun kontrollerin değerlendirilmesini içermelidir.

### Performans Özellikleri

Novocastra™ Hematoxylin RE7107'nin performansı, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K ve Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K kombinasyonu ile bir dizi fare Novocastra™ IgG ve fare IgM ve tavşan IgG primer antikorları kullanılarak doğrulanmıştır.

Bu ürün, ürün etiketinde belirtilen son geçerlilik tarihine kadar stabildir.

## **Kaynakça - Genel**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## **Önceki Sayıya Göre Değişiklikler**

Sağlanan Reaktifler.

## **Düzenlenme Tarihi**

24 Eylül 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Код на продукта: RE7107

### Предназначение

За употреба при *in vitro* диагностика.

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 е предназначен за имунохистохимични (ИHC) процедури за оцветяване като например тези, описани в инструкциите за употреба на Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K и Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Клиничната интерпретация на всяко оцветяване или неговата липса трябва да бъде допълнено с морфологични изследвания, като се използват правилни контроли и трябва да бъде оценено в контекста на клиничната история на пациента и други диагностични изследвания от квалифициран патолог.

### Принцип на процедурата

Hematoxylin оцветява клетъчните ядра и има много употреби в хистологията, като най-често срещаното е оцветяване с Hematoxylin и Eosin.<sup>1</sup> При имунохистохимичните процедури hematoxylin може да бъде използван като контраоцветяване за по-добро визуализиране и локализиране на оцветения краен продукт на имунохистохимичната процедура.

Този продукт се използва при имунохистохимични процедури, което позволява идентификацията с оптична микроскопия на антигени в срези на фиксирана във формалин и вградена в парафин тъкан, чрез последователни междинни стъпки на промиване (за принципа на процедурата на имунохистохимично оцветяване вижте инструкциите за употреба на съответната система за откриване). Novocastra™ Hematoxylin RE7107 се прилага към срези след осъществяване на реакцията субстрат/хромоген. Той оцветява ядрата в червено и преминава в синьо при промиване на срезите във вода или слаб алкален разтвор (оцветяващ в синьо реактив).

### Предоставени реактиви

Hematoxylin RE7107 (25 mL), <0,1% Hematoxylin.

### Възстановяване, смесване, разреждане или титриране

Hematoxylin RE7107 е готов за употреба реактив. Не се препоръчва възстановяване, смесване, разреждане или титриране на този реактив. По-нататъшното разреждане може да доведе до загуба на оцветяване на антигена. Всички подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя.

### Съхранение и стабилност

Да се съхранява при температура 2 – 8 °C. Да не се замразява. Да се върне на температура 2 – 8 °C веднага след употреба. Не използвайте след срока на годност, отбелязан върху етикета на продукта. Другите условия на съхранение, освен посочените по-горе, трябва да бъдат проверени от потребителя. Не са налице очевидни признаци, указващи нестабилност на този продукт, ето защо позитивните и негативните контроли трябва да бъдат обработвани едновременно с проби на пациента.

### Подготовка на спесимени

Препоръчителният фиксиращ разтвор е неутрален буфериран формалин 10% за тъканни срези, вградени в парафин.

### Предупреждения и предпазни мерки

За професионална употреба.

Информационен лист за безопасност на материалите (MSDS) е наличен при поискване.

Спесимените преди и след фиксация, както и всички материали, изложени на тяхното влияние, трябва да бъдат третирани като способни да предадат инфекция и да бъдат изхвърлени, прилагайки съответните предпазни мерки.<sup>2</sup>

Никога не пипетирайте реактиви с уста и избягвайте контакт на кожата и лигавиците с реактиви или спесимени. В случай че реактиви или спесимени влязат в контакт с чувствителни участъци, промийте с обилно количество вода. Консултирайте се с федералните, държавните или местните регламенти относно изхвърлянето на потенциално токсични компоненти.

Свеждайте до минимум микробната контаминация на реактивите, иначе може да се появи увеличаване на неспецифичното оцветяване. Инкубационни времена или температури, различни от посочените, могат да доведат до грешни резултати. Всякакви подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя.

### Процедура

#### А. Необходими, но непредоставени реактиви

1. Стандартни разтворители, използвани с имунохистохимията.
2. 50 mM трометамин-буфериран физиологичен разтвор (TBS) pH 7,6.
3. Разтвор(и) за извличане на антиген – вж. Препоръки за употреба за първично анти тяло).
4. Разтвор(и) за извличане на ензим – вж. Препоръки за употреба за първично анти тяло).
5. Разредител за антигела.
6. Първично анти тяло.
7. Система за откриване.
8. Оцветяващ в синьо реактив и заместител на Scotts tap water или наситен литиев карбонат.
9. Микроскопски препарат.

#### В. Необходимо, но непредоставено оборудване

1. Необходимо оборудване за извличане на антиген, ако се изисква за първичното анти тяло.
2. Общо имунохистохимично лабораторно оборудване.

## С. Методология

Преди прилагането на тази методология потребителите трябва да бъдат обучени за имунохистохимичните техники.

Комбинацията от първичното анти тяло, неговия разтвор, заедно с Hematoxylin RE7107 и системата за откриване, трябва да бъде валидирана от потребителя посредством поредица от известни позитивни и негативни контроли.

Освен ако не е указано друго, всички стъпки се извършват при стайна температура (25 °C). Трябва да бъдат предприети следните стъпки на съответния етап от имунохистохимичния протокол (вж. инструкциите за употреба на системата за откриване)

1. Изплакнете във вода.
2. Оцветете срезите с Hematoxylin RE7107 за 5 минути.
3. Изплакнете във вода.
4. Ако е необходимо, оцветете в синьо с оцветяващ в синьо реактив.
5. Изплакнете във вода.

### Качествен контрол

Различията в обработката на тъканите и техническите процедури в лабораторията могат да доведат до значително вариране на резултатите, налагащо редовно извършване на вътрешен контрол в допълнение към следните процедури. Контролите трябва да са свежи спесимени, взети по време на аутопсия/биопсия/операция, фиксирани във формалин, обработени и вградени в парафинов восък, възможно най-бързо, по същия начин като пробата(ите) на пациента(ите).

### Позитивна тъканна контрола

Използва се, за да се покажат правилно приготвени тъкани и правилни техники на оцветяване. Една позитивна тъканна контрола трябва да бъде включена за всеки сет с тест условия/първично анти тяло при всяка серия проби за оцветяване. Тъкан със слабо позитивно оцветяване е по-подходяща от тъкан със силно позитивно оцветяване за оптимален качествен контрол и за откриване на по-малки нива на деградация на реактива.<sup>3</sup> За препоръчителна позитивна контролна тъкан вижте инструкциите за употреба за първично анти тяло. Ако позитивна тъканна контрола не показва позитивно оцветяване, резултатите от спесимените, включени в теста, трябва да се считат за невалидни.

### Негативна тъканна контрола

Трябва да се изследва след позитивната тъканна контрола, за да се провери специфичността на белязването на таргетния антиген от първичното анти тяло. За препоръчителна негативна контролна тъкан вижте инструкциите за употреба за първично анти тяло. Алтернативно, разнообразието от различни видове клетки, присъстващи в повечето тъканни срези, често предлага места за негативна контрола, но това трябва да се провери от потребителя. Неспецифичното оцветяване, ако присъства, обикновено е дифузно на вид. Спорадично оцветяване на съединителна тъкан може да се наблюдава и в части от прекомерно фиксирани във формалин тъкани. Използвайте интактни клетки за интерпретация на резултатите от оцветяването. Некротичните или дегенерираните клетки често се оцветяват неспецифично.<sup>4</sup> Може да се видят фалшиво позитивни резултати поради неимунологично свързване на протеини или реакционни продукти на субстрата. Те може да са причинени и от ендогенни ензими като псевдопероксидаза (еритроцити), ендогенна пероксидаза (цитохром С) или ендогенен биотин<sup>5</sup> (напр. черен дроб, гърда, мозък, бъбрек). За диференциране на ендогенна ензимна активност или неспецифично ензимно свързване от специфична имунна реактивност ексклузивно може да се оцветят допълнителни тъкани от пациента, съответно със субстрат-хромоген, Streptavidin-HRP или маркиран полимер и субстрат-хромоген. Ако се появи специфично оцветяване в негативната тъканна контрола, резултатите от спесимените на пациентите трябва да се считат за невалидни.

### Негативна контрола на реактива

Използвайте неспецифична негативна контрола на реактива, вместо първичното анти тяло, със срез от всеки спесимен на пациента, за да се направи оценка на неспецифичното оцветяване и да се даде по-добра интерпретация на специфичното оцветяване на мястото на антигена.

### Тъкан от пациента

Разгледайте оцветените пациентски спесимени накрая. Наситеността на позитивното оцветяване трябва да бъде оценена в контекста на всяко неспецифично фоново оцветяване на негативната контрола на реактива. Както при всеки имунохистохимичен тест, един негативен резултат означава, че антигенът не е открит, а не че антигенът отсъства в анализираният клетка/тъкан. Ако се налага, използвайте панел от антигела за идентифициране на неверни негативни реакции.

### Общи ограничения

Имунохистохимията е многостъпков диагностичен процес, който се състои от специализирано обучение за избор на подходящи реактиви, избор на тъкани, фиксация и обработка, подготовка на предметното стъкло за имунохистохимия и интерпретация на резултатите от оцветяването.

Тъканното оцветяване зависи от боравенето с тъканта и нейната обработка преди оцветяването. Неправилната фиксация, замразяване, размразяване, промиване, изсушаване, затопляне, сръзване или контаминацията с други тъкани или течности може да причини поява на артефакти, блокиране на антигелата или неверни негативни резултати. Несъместимите резултати може да са причинени от отклонения във фиксацията и методите на вграждане в парафина или от присъщи нередности вътре в тъканта.<sup>6</sup>

Прекаленото или непълно контраоцветяване може да компрометира правилната интерпретация на резултатите.

Клиничната интерпретация на всяко оцветяване или неговата липса следва да бъде допълнена от морфологични проучвания с помощта на подходящи контроли и трябва да се оценява в контекста на клиничната история на пациента и други диагностични изследвания от квалифициран патолог.



Novocastra™ Hematoxylin RE7107 е предназначен за употреба с вградени в парафин срези със специфични изисквания за фиксация. Възможно е да настъпи неочаквана антигенна експресия, особено при неоплазми. Клиничната интерпретация на всеки оцветен тъканен срез трябва да включва морфологичен анализ и оценката на подходящи контроли.

### **Работни характеристики**

Действието на Novocastra™ Hematoxylin RE7107 е валидирано чрез използване на редица миши Novocastra™ IgG, миши IgM и заешки IgG първични антитела в комбинация с Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K и Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

Този продукт е стабилен до изтичане на срока на годност, отпечатан на етикета му.

### **Библиография – основна**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

### **Изменения на предишно издание**

Предоставени реактиви.

### **Дата на издаване**

24 Септември 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Termékkód: RE7107

### Alkalmazási terület

*In vitro* diagnosztikai használatra.

A Novocastra™ Hematoxylin RE7107 a Novocastra™ Peroxidase Detection System RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K és Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K használati útmutatójában ismertett immunhisztokémiai (immunohistochemical, IHC) festési eljárásokhoz való használatra szolgál. Minden festődés meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollokkal kell kiegészíteni, valamint az értékelést a beteg klinikai kórtörténete és egyéb diagnosztikai vizsgálatok figyelembevételével, képzett patológusnak kell elvégeznie.

### Az eljárás elve

A hematoxylin egy sejtmagfesték, amely számos felhasználási lehetőséget kínál a szövettani vizsgálatok területén, ezek közül a legáltalánosabb a hematoxilin-eozin festés.<sup>1</sup> Az IHC-eljárásokban a hematoxilin kontrasztfestékként alkalmazható az IHC-eljárás során keletkezett színes végtérmegek megjelenítésének és lokalizációjának elősegítése céljából.

Ez a termék IHC-eljárásokhoz használandó, amelyek egymás utáni műveletekből és közbeiktatott mosási lépésekből álló munkafolyamat alkalmazásával lehetővé teszik a formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetszövetek antigénjeinek fénymikroszkópos vizsgálattal történő kvalitatív azonosítását (az IHC eljárási elvének leírását lásd az adott detektáló rendszer használati útmutatójában).

A Novocastra™ Hematoxylin RE7107 terméket a kromogén szubsztráttal lejártszódo reakció után kell alkalmazni a metszeteken. A termék vörösré festi a sejtmagot, amely kék színre vált a metszetek vízzel vagy gyenge lúgos oldattal (kékítő reagenssel) történő mosása után.

### Biztosított reagensek

Hematoxylin RE7107 (25 ml). <0,1% hematoxilin.

### Feloldás, elegyítés, hígítás és titrálás

A Hematoxylin RE7107 használatra kész reagens. Nem javasolt a reagens feloldása, elegyítése, hígítása vagy titrálása. A további hígítás az antigénfestődés elvesztését okozhatja. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatás validálnia kell.

### Tárolás és stabilitás

2–8 °C-on tárolandó. Tilos lefagyasztani. Felhasználás után azonnal tegye vissza 2–8 °C közötti hőmérsékletre. Ne használja a termék címkjének feltüntetett lejárati dátum után. Az előírtaktól eltérő tárolási feltételeket a felhasználónak ellenőriznie kell. Nincsenek a termék instabilitására utaló egyértelmű jelek, ezért a betegmintákkal egy időben a megfelelő pozitív és negatív kontrollok futtatását is el kell végezni.

### A minták előkészítése

A javasolt fixálószer a paraffinba ágyazott szövetszöveteknél 10%-os, semleges pufferolású formalin.

### Figyelmeztetések és óvintézkedések

Szakemberek általi használatra.

Az anyagbiztonsági adatlapot (Material Safety Data Sheet, MSDS) igény esetén rendelkezésre bocsátjuk.

A mintákat fixálás előtt és után, valamint a velük érintkező összes anyagot fertőzések terjesztésére képes anyagként kell kezelni, és megfelelő körültekintéssel kell ártalmatlanítani.<sup>2</sup>

Soha ne pipettázza szájjal a reagenseket, továbbá kerülje a bőr és a nyálkahártyák érintkezését a reagensekkel és a mintákkal. Ha a reagensek vagy minták érzékeny területtel érintkeznek, bő vízzel mossa le az érintett területet. Minden potenciálisan toxikus összetevő ártalmatlanításával kapcsolatban kövesse a szövetségi, állami és helyi előírásokat.

Minimálisan kell csökkenteni a reagensek mikrobiális szennyeződését, különben megnövekedhet a nem specifikus festődés.

A megadottaktól eltérő inkubációs idők és hőmérsékletek hibás eredményekhez vezethetnek. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatást validálnia kell.

### Eljárás

#### A. Szükséges, de nem szállított reagensek

1. Az immunhisztokémiában alkalmazott standard oldószerek.
2. 50 mM tris-pufferelt sóoldat (Tris-buffered saline, TBS), pH 7,6.
3. Antigénfeltáró oldat(ok) – (az elsődleges antitesttel kapcsolatban lásd Felhasználási javaslatok).
4. Enzimes feltáró oldat(ok) – (az elsődleges antitesttel kapcsolatban lásd Felhasználási javaslatok).
5. Antitesthígító.
6. Elsődleges antitest.
7. Detektáló rendszer.
8. Kékítő reagens, pl. Scott-féle csapvíz-helyettesítő oldat vagy telített lítium-karbonát.
9. Fedőanyag.

#### B. Szükséges, de nem szállított felszerelés

1. Az antigénfeltáráshoz szükséges felszerelés, amennyiben az elsődleges antitesthez javasolt.
2. Általános immunhisztokémiai laboratóriumi felszerelés.

### C. Módszer

**A módszer végrehajtása előtt a felhasználóknak képzésben kell részesülniük az immunhisztokémiai módszerekkel kapcsolatban.**

**Az elsődleges antitest, a hígítás, valamint a Hematoxylin RE7107 és a detektáló rendszer kombinációját a felhasználónak kell validálnia ismert pozitív és negatív kontrollsorozat alkalmazásával.**

Ha nincs másként feltüntetve, minden lépést szobahőmérsékleten (25 °C) kell végrehajtani. A következő lépéseket kell az IHC-protokoll megfelelő stádiumában elvégezni (lásd a detektáló rendszer használati útmutatóját).

1. Öblítse le vízben.
2. Fesse meg a metszeteket a Hematoxylin RE7107 termékkel 5 percen keresztül.
3. Öblítse le vízben.
4. Ha szükséges, fesse őket kékre kékítő reagenssel.
5. Öblítse le vízben.

### Minőség-ellenőrzés

A felhasználó laboratóriumában alkalmazott szövetfeldolgozási és technikai eljárások eltérései jelentős különbséget okozhatnak az eredményekben, ami az alábbi eljárásokon túl belső kontrollok rendszeres futtatását teszi szükségessé. Kontrollként friss boncolási/biopsziás/sebészeti mintákat kell használni, amelyeket a lehető leghamarabb a betegmintákkal megegyező módon kell formalinban fixálni, feldolgozni és paraffinvaszba ágyazni.

### Pozitív szövetkontroll

A megfelelő szövet-előkészítés és festési technikák ellenőrzésére használatos. Minden tesztelési körülményegyettes/elsődleges antitest esetében és minden megfestési sorozatban kell alkalmazni egy pozitív szövetkontrollt. A gyengén pozitív festődésű szövet alkalmasabb az erősebben pozitív festődésű szövetnél az optimális minőség-ellenőrzéshez, valamint a kismértékű reagensbomlás észleléséhez.<sup>3</sup> A javasolt pozitív kontrollszóval kapcsolatban lásd az elsődleges antitest használati útmutatóját. Ha a pozitív szövetkontroll nem mutat pozitív festődést, a vizsgált minták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

### Negatív szövetkontroll

A pozitív szövetkontroll után azért kell megvizsgálni, hogy a vizsgált antigén elsődleges antitest segítségével történő jelölésének specificitását ellenőrizni lehessen. A javasolt negatív kontrollszóval kapcsolatban lásd az elsődleges antitest használati útmutatóját. Ezenkívül a legtöbb szövetmetszetben jelen lévő különböző sejttípusok gyakran használhatók negatív kontrollként, de ezeket a felhasználónak kell ellenőriznie. Ha van nem specifikus festődés, az rendszerint diffúz megjelenésű. A formalinban túlfixált szövetekből származó metszeteknél a kötőszövet szórányos festődése is megfigyelhető. A festési eredmények értelmezésére ép sejteket használjon. A nekrotizált vagy degenerálódott sejtek gyakran nem specifikusan festődnek meg.<sup>4</sup> A fehérvérj vagy a szubsztát reakciótermékeinek nem immunológiai kötődése miatt álpozitív eredmények jelentkezhetnek. Álpozitív eredményeket okozhatnak olyan endogén enzimek is, mint a pszeudoperoxidáz (vörösvérsejtek), endogén peroxidáz (citokróm C), illetve endogén biotin<sup>5</sup> (pl. máj, emlő, agy, vese). Az endogén enzim aktivitásának vagy az enzimek nem specifikus kötődésének a specifikus immunreakciótól való megkülönböztetésére további betegszövetek festhetők kizárólag szubsztát–kromogén oldattal, Streptavidin-HRP-vel vagy jelölt polimerrel és szubsztát–kromogénnel. Ha a negatív szövetkontroll specifikus festődést mutat, a betegminták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

### Negatív reagenskontroll

A nem specifikus festődés kiértékeléséhez és az antigén helyén létrejövő specifikus festődés jobb értelmezéséhez minden betegminta esetén egy metszeten alkalmazzon az elsődleges antitest helyett nem specifikus negatív reagenskontrollt.

### Betegszövet

A betegmintákat vizsgálja meg utolsóként. A pozitív festődés intenzitását a negatív reagenskontroll esetleges nem specifikus háttérfestődésének viszonylatában értékelje. Mint minden immunhisztokémiai vizsgálatnál, a negatív eredmény azt jelenti, hogy az antigén nem volt kimutatható, nem pedig azt, hogy az antigén nem volt jelen a vizsgált sejtekben/szövetben. Szükség esetén az álnegatív reakciók azonosítására használjon antitestpanelt.

### Általános korlátozások

Az immunhisztokémia több lépésből álló diagnosztikai folyamat, amely a következőket foglalja magában: speciális képzés alapján a megfelelő reagens kiválasztása; a szövetek kiválasztása, fixálása és feldolgozása; az IHC tárgylemez előkészítése; és a festési eredmények értelmezése.

A szövet festődése függ a szövet festés előtti kezelésétől és feldolgozásától. A nem megfelelő fixálás, a fagyasztás, olvasztás, mosás, szárítás, melegítés, metszetkészítés, illetve a más szövetekkel vagy folyadékokkal történő szennyezés műtermékeket, az antitestek befogását, illetve álnegatív eredményeket okozhat. Ellenmondó eredményekhez vezethetnek a fixálási vagy beágyazási módszerek eltérései, illetve a szövet eredendő rendellenességei.<sup>6</sup>

A túlzott vagy hiányos kontrasztfestés ronthatja az eredmények megfelelő értelmezését.

Minden festődés meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollokkal kell kiegészíteni, valamint az értékelést a beteg klinikai kórtörténete és egyéb diagnosztikai vizsgálatok figyelembevételével, képzett patológusnak kell elvégeznie.

A Novocastra™ Hematoxylin RE7107 termék paraffinba ágyazott metszeteken történő alkalmazásra szolgál meghatározott fixálási követelmények mellett. Időnként véletlenül antigén-expresszió fordulhat elő, különösen daganatok esetében. Bármely festett szövetmetszet klinikai értelmezéséhez morfológiai elemzést is kell végezni, és ki kell értékelni a megfelelő kontrollokat.

## **Teljesítményjellemzők**

A Novocastra™ Hematoxylin RE7107 teljesítményét különféle Novocastra™ egér IgG, egér IgM és nyúl IgG elsődleges antitestekkel, valamint a Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, a Novocastra™ Peroxidase Detection System RE7110-K/RE7120-K és a Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K termékek együttes használatával validálták. A termék a termékcímkén feltüntetett lejárati dátumig stabil.

## **Bibliográfia – általános**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## **Módosítások az előző változathoz képest**

Biztosított reagensek.

## **Kiadás dátuma**

24 szeptember 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Cod produs: RE7107

### Utilizare prevăzută

*Pentru diagnosticare in vitro.*

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 este destinat utilizării în procedurile de colorație imunohistochimică (IHC) bazate pe peroxidază, descrise în Instrucțiunile de Utilizare ale Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K și NovoLink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Interpretarea clinică a oricărei colorări sau a absenței acesteia trebuie completată cu studii morfologice utilizând controale adecvate și trebuie evaluată în contextul istoricului clinic al pacientului și al altor teste de diagnostic de către un patolog calificat.

### Principiul procedurii

Hematoxylin colorează nucleele celulare și are multe utilizări în histologie, cea mai comună fiind colorația cu Hematoxylin și eozină.<sup>1</sup> În procedurile IHC, Hematoxylin poate fi utilizată drept contracolorație pentru a ajuta la vizualizarea și localizarea produsului final colorat al procedurii IHC.

Acest produs este utilizat într-o procedură IHC bazată pe peroxidază care permite identificarea calitativă prin microscopie optică a antigenilor în secțiuni de țesut fixat cu formalină, încorporat în parafină, prin etape secvențiale cu etape de spălare intercalate (pentru Principiul Procedurii de colorație IHC a se vedea Instrucțiunile de Utilizare ale sistemului de detecție corespunzător). Novocastra™ Hematoxylin RE7107 este aplicată la secțiuni după reacția cu substratul/cromogenul. Colorează nucleele cu culoare roșie și este convertită la albastru prin spălarea secțiunilor cu apă sau o soluție alcalină slabă (reactiv de albăstrire).

### Reactivi furnizați

Hematoxylin RE7107 (25ml). Hematoxylin <0,1%.

### Reconstituire, amestecare, diluare, titrare

Hematoxylin RE7107 este un reactiv gata de utilizare. Reconstituirea, amestecarea, diluarea sau titrarea acestui reactiv nu sunt recomandate. Diluarea poate duce la pierderea colorării antigenilor. Utilizatorul trebuie să valideze orice astfel de schimbare.

### Depozitare și stabilitate

A se depozita la 2–8 °C. A nu se congela. A se returna la 2–8 °C imediat după utilizare. A nu se utiliza după data expirării indicată pe eticheta produsului. Alte condiții de depozitare decât cele specificate trebuie verificate de către utilizator. Nu există semne evidente care să indice instabilitatea acestui produs, astfel că trebuie rulate controale pozitive și negative simultan cu eșantioanele pacientului.

### Pregătirea specimenului

Fixativul recomandat este formalină tamponată neutră 10% pentru secțiunile de țesut încorporate în parafină.

### Avertismente și precauții

Pentru utilizatori profesioniști.

O Fișă cu date de siguranță a materialului (FDSM) este disponibilă la cerere.

Specimenele, înainte și după fixare, precum și toate materialele expuse la acestea, trebuie manipulate ca și când ar avea potențialul de a transmite infecții și trebuie eliminate luând măsurile de precauție adecvate.<sup>2</sup>

Nu pipetați niciodată reactivii cu gura și evitați contactul reactivilor și specimenelor cu pielea și membranele mucoase. Dacă reactivii sau probele vin în contact cu suprafețele sensibile, spălați cu apă din abundență. Consultați reglementările naționale, județene sau locale pentru informații privind eliminarea la deșeurile a oricăror componente cu potențial toxic.

Reduceți la minimum contaminarea microbiană a reactivilor, în caz contrar poate apărea o creștere a colorării nespecifice. Timpii sau temperaturile de incubație care diferă de valorile specificate pot genera rezultate eronate. Orice astfel de modificare trebuie validată de către utilizator.

### Procedură

#### A. Reactivi necesari care nu sunt însă furnizați

1. Solvenți standard folosiți în imunohistochimie.
2. Soluție salină tamponată cu trometamină 50 mM (TBS) pH 7,6.
3. Soluție(i) de recuperare cu antigeni (vezi Recomandările de utilizare pentru anticorpus primar).
4. Soluție(i) de recuperare cu enzime (vezi Recomandările de utilizare pentru anticorpus primar)
5. Diluant pentru anticorpi.
6. Anticorpus primar.
7. Sistem de detecție.
8. Reactiv de albăstrire de ex. înlocuitor de apă de la robinet Scotts sau carbonat de litiu saturat.
9. Mediu de montare.

#### B. Echipamente necesare care nu sunt însă furnizate

1. Echipament necesar pentru recuperarea cu antigen, dacă este recomandată pentru anticorpus primar.
2. Echipament de laborator general pentru imunohistochimie.

### C. Metodologie

**Înainte de a aplica această metodologie, utilizatorii trebuie să fie instruiți în ceea ce privește tehnicile imunohistochimice.**

**Combinăția între anticorpii primari, diluția acestuia, împreună cu Hematoxylin RE7107 și sistemul de detecție, trebuie validată de utilizator pe o serie de controale pozitive și negative cunoscute.**

Dacă nu se indică altfel, toate etapele se efectuează la temperatura camerei (25 °C). Trebuie realizate următoarele în etapa corespondentă a protocolului IHC (a se vedea Instrucțiunile de utilizare ale sistemului de detecție)

1. Clățiți cu apă.
2. Colorați secțiunile cu Hematoxylin RE7107 timp de 5 minute.
3. Clățiți cu apă.
4. Dacă este necesar, utilizați reactiv de albăstrire.
5. Clățiți cu apă.

### Controlul calității

Diferențele în ceea ce privește procesarea țesutului și procedurile tehnice în laboratorul utilizatorului pot cauza o variabilitate semnificativă a rezultatelor, necesitând efectuarea de controale interne, în plus față de următoarele proceduri. Probele de control trebuie să fie probe proaspete de autopsie/biopsie/chirurgicale, fixate în formalină, procesate și încorporate în ceară de parafină cât mai curând posibil și în aceeași manieră ca și eșantioanele pacientului.

### Țesutul de control pozitiv

Folosit pentru a indica țesuturile pregătite corect și tehnicile de colorație adecvate. O probă de țesut de control pozitiv trebuie să fie inclusă pentru fiecare set de condiții de testare/anticorp primar în fiecare etapă de colorație. Un țesut cu colorație pozitivă slabă este mai adecvat decât un țesut cu colorație pozitivă puternică pentru controlul optim al calității și pentru a detecta nivele minore de degradare a reactivilor.<sup>3</sup> Pentru țesutul de control pozitiv recomandat a se vedea Instrucțiunile de utilizare ale reactivului primar. Dacă țesutul de control pozitiv nu demonstrează colorația pozitivă, rezultatele obținute cu acele probe de testare trebuie considerate nevalide.

### Țesutul de control negativ

Trebuie examinat după țesutul de control pozitiv pentru a verifica specificitatea informațiilor de etichetare ale antigenului țintă în funcție de anticorpii primari. Pentru țesutul de control negativ recomandat, a se vedea Instrucțiunile de utilizare pentru anticorpii primari. Ca alternativă, varietatea de tipuri diferite de celule prezente în majoritatea secțiunilor tisulare oferă frecvent locuri de control negativ, dar acest lucru trebuie verificat de către utilizator. Colorația nespecifică, dacă este prezentă, are, de obicei, un aspect difuz. Colorația sporadică a țesutului conjunctiv poate fi observată, de asemenea, în secțiuni de țesuturi fixate în mod excesiv în formalină. Folosiți celule intacte pentru interpretarea rezultatelor de colorație. Celulele necrotice sau degenerate se colorează deseori într-un mod nespecific.<sup>4</sup> Se pot observa rezultate fals pozitive ca urmare a legării non-immunologice a proteinelor sau produșilor de reacție ai substratului. Acestea pot fi cauzate, de asemenea, de enzimele endogene precum pseudoperoxidaza (eritrocite), peroxidaza endogenă (citocromul C) sau biotina endogenă<sup>5</sup> (de exemplu, ficat, sân, creier, rinichi). Pentru a diferenția activitatea enzimelor endogene sau legarea nespecifică a enzimelor de imunoreactivitatea specifică, pot fi colorate țesuturi suplimentare de la pacient numai cu substrat-cromogen Streptavidin-HRP sau polimer etichetat și substrat cromogen. În cazul în care colorația specifică are loc în țesutul de control negativ, rezultatele obținute pe eșantioanele pacientului trebuie să fie considerate nevalide.

### Reactivul de control negativ

Folosiți un reactiv de control negativ nespecific în locul anticorpului primar cu o secțiune din fiecare specimen al pacientului pentru a evalua colorația nespecifică și a permite o mai bună interpretare a colorării specifice la situl antigenului.

### Țesutul pacientului

Examinați speciimenele colorate ale pacientului ultimele. Intensitatea colorării pozitive trebuie evaluată în contextul oricărei colorații de fundal nespecifice a reactivului de control negativ. La fel ca în cazul oricărui test imunohistochimic, un rezultat negativ înseamnă că antigenul nu a fost detectat, și nu că antigenul a fost absent în celulele/țesuturile analizate. Dacă este necesar, folosiți un panel de anticorpi pentru identificarea reacțiilor fals negative.

### Limitări generale

Imunohistochimie este un proces de diagnostic cu mai multe etape, care constă din instruirea specializată în ceea ce privește alegerea reactivilor adecvați; alegerea, fixarea și procesarea țesutului; prepararea lamei IHC; și interpretarea rezultatelor de colorație.

Colorația tisulară depinde de manipularea și procesarea țesutului înainte de colorație. Fixarea, congelarea, dezghețarea, spălarea, uscarea, încălzirea, secționarea necorespunzătoare sau contaminarea cu alte țesuturi ori fluide pot cauza artefacte, captura anticorpilor sau rezultate fals negative. Rezultatele inconsecvente pot fi atribuite diferențelor în ceea ce privește metodele de fixare și încorporare, ori neregularităților inerente ale țesutului.<sup>5</sup>

Contracolorația excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea adecvată a rezultatelor.

Interpretarea clinică a oricărei colorări sau a absenței acesteia trebuie completată cu studii morfologice utilizând controale adecvate și trebuie evaluată în contextul antecedentelor clinice ale pacientului, precum și al altor teste de diagnosticare efectuate de către un patolog calificat.

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 este destinată utilizării pe secțiuni încorporate în parafină cu cerințe specifice de fixare. Poate apărea expresia neașteptată a antigenului, în special în neoplasme. Interpretarea clinică a oricărei secțiuni tisulare colorate trebuie să includă analiza morfologică și evaluarea probelor de control adecvate.

### Caracteristici de performanță

Caracteristicile Novocastra™ Hematoxylin RE7107 fost validată utilizând o gamă de anticorpi primari Novocastra™ IgG șoarece, IgM șoarece și IgG iepure, în combinație cu Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K și Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

Acest produs este stabil până la data expirării tipărită pe eticheta produsului.

## **Bibliografie - General**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## **Amendamente la ediția anterioară**

Reactivi furnizați.

## **Data publicării**

24 septembrie 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Код продукта: RE7107

### Назначение

Для диагностики *in vitro*.

Гематоксилин Novocastra™ Hematoxylin RE7107 предназначен для использования в процедурах иммуногистохимического окрашивания на основе пероксидазы, описанных в Инструкции по использованию систем обнаружения на основе пероксидазы Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, систем обнаружения на основе концентрированной пероксидазы Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K и систем обнаружения полимеров Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Клиническая интерпретация любого окрашивания или его отсутствия должна быть дополнена морфологическими исследованиями с надлежащими контролями и должна быть оценена квалифицированным патологом с учетом анамнеза пациента и других диагностических тестов.

### Принцип процедуры

Hematoxylin окрашивает ядра клеток и различным образом используется в гистологии, самое типичное использование включает гематоксилиновое и эозиновое окрашивание.<sup>1</sup> В процедурах иммуногистохимического окрашивания гематоксилин может использоваться как вещество для контрастного окрашивания, способствующее визуализации и локализации конечного продукта окрашивания иммуногистохимической процедуры.

Этот продукт используется в иммуногистохимических процедурах, делая возможным количественное определение методом световой микроскопии антигенов на срезах зафиксированных в формалине и залитых в парафин тканей последовательными этапами с промежуточными процедурами промывки (Принцип иммуногистохимического окрашивания представлен в Инструкции по использованию соответствующей системы детекции). Гематоксилин Novocastra™ Hematoxylin RE7107 применяется к срезам после реакции с субстратом / хромогеном. Он окрашивает ядра в красный цвет и преобразуется в синий при промывке срезов либо водой, либо слабым щелочным раствором (реактив, красящий в синий).

### Реактивы, входящие в комплект поставки

Hematoxylin RE7107 (25 млб). <0,1 % гематоксилина.

### Восстановление, смешивание, разведение, титрование

Hematoxylin RE7107 — реактив, готовый к использованию. Этот реактив не требует восстановления, смешивания, разведения или титрования. Дальнейшее разведение может привести к потере окрашивания антигена. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.

### Хранение и стабильность

Хранить при температуре 2–8 °С. Не замораживать. После использования немедленно вернуть на хранение при температуре 2–8 °С. Не используйте по истечении срока годности, который указан на маркировке продукции. Условия хранения, отличающиеся от указанных, должны быть верифицированы пользователем. Не существует явных признаков, указывающих на нестабильность данной продукции, поэтому положительные и отрицательные контроли следует подготавливать одновременно с образцами, взятыми у пациента.

### Подготовка образцов

Для приготовления залитых в парафин срезов тканей рекомендуется фиксация в 10 % нейтральном забуференном формалине.

### Предупреждения и меры предосторожности

Только для профессионального использования.

Паспорт безопасности химической продукции предоставляется по запросу.

С образцами (до и после фиксации) и всеми материалами, на которые они воздействуют, следует обращаться как с потенциально способными к передаче инфекции и утилизировать, соблюдая соответствующие меры предосторожности.<sup>2</sup>

Никогда не набирайте реактивы в пипетку ртом и не допускайте контакта реактивов и образцов с кожей и слизистыми оболочками. В случае контакта реактивов или образцов с чувствительными зонами промойте их большим количеством воды. По вопросам утилизации любых возможно токсических компонентов выполняйте требования федеральных, региональных или местных нормативных документов.

Сведите к минимуму микробное загрязнение реактивов во избежание усиления неспецифического окрашивания. Инкубация при температуре или продолжительность, которые отличаются от указанных в инструкции, может дать ошибочные результаты. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.

### Процедура

#### А. Необходимые реактивы, не входящие в комплект поставки

1. Стандартные растворители, используемые в иммуногистохимических исследованиях.
2. 50 мМ трис-солевой буферный раствор (TBS), pH 7,6.
3. Растворы для демаскировки антигенов (смотрите «Рекомендации по использованию, касающиеся первичных антител»).
4. Ферментные восстанавливающие растворы (смотрите «Рекомендации по использованию, касающиеся первичных антител»).
5. Разбавитель антител.
6. Первичные антитела.
7. Системы обнаружения.
8. Реактив, окрашивающий в синий цвет, например, заменитель водопроводной воды Скотта или насыщенный карбонат лития.
9. Заливочная среда препаратов.



## **В. Необходимое оборудование, не входящее в комплект поставки**

1. Оборудование, необходимое для демаскировки антигенов, если это рекомендуется для подготовки первичных антител.
2. Стандартное лабораторное оборудование для иммуногистохимических исследований.

## **С. Методика**

**Прежде чем применять эту методику, пользователи должны научиться проводить иммуногистохимические исследования.**

**Комбинация первичных антител и их разведение должны быть валидированы пользователем наряду с Hematoxylin RE7107 и системой обнаружения с использованием серий известных положительных и отрицательных контролей.**

Если не указано иное, выполняйте все этапы при комнатной температуре (25 °C). Следующие шаги необходимо предпринять на соответствующей стадии выполнения протокола ИГХ (смотрите «Инструкции по использованию систем обнаружения»).

1. Промойте водой.
2. Окрасьте срезы ткани гематоксилином Hematoxylin RE7107 в течение 5 минут.
3. Промойте водой.
4. Если необходимо, подсиньте в окрашивающем в синий цвет реактиве.
5. Промойте водой.

## **Контроль качества**

Различия в методах обработки тканей и технических процедурах, выполняемых в лаборатории пользователя, могут привести к существенной вариабельности результатов, в связи с чем требуется регулярное выполнение внутрилабораторных контролей в дополнение к указанным ниже процедурам. В качестве контролей следует использовать свежие образцы, полученные при аутопсии, биопсии или хирургических процедурах, фиксированные в формалине, обработанные и как можно скорее залитые в парафин так же, как были обработаны полученные у пациентов образцы.

### **Положительный контроль ткани**

Применяется для проверки правильности подготовки тканей и методов окрашивания. Один образец ткани, используемый в качестве положительного контроля, должен быть включен в каждый процесс окрашивания для каждого комплекса «Условия проведения исследования» / «Первичные антитела». Для оптимального контроля качества и обнаружения незначительных уровней деградации реактива более подходит ткань со слабым положительным окрашиванием, чем ткань с сильным положительным окрашиванием.<sup>3</sup> Для определения тканей, которые рекомендуются использовать в качестве положительного контроля, смотрите Инструкции по использованию первичных антител. При отсутствии положительного окрашивания положительного контроля ткани результаты, полученные с исследуемыми образцами, считаются недействительными.

### **Отрицательный контроль ткани**

Этот тест необходимо выполнять после положительного контроля ткани для проверки специфичности меченая целевого антигена первичным антителом. Для определения тканей, которые рекомендуются использовать в качестве отрицательного контроля, смотрите «Инструкции по использованию первичных антител». Кроме того, разнообразие типов клеток для отрицательного контроля можно часто найти в большинстве срезов тканей, однако такие препараты должны быть проверены пользователем. Неспецифическое окрашивание, если оно присутствует, обычно выглядит диффузным. В срезах тканей, избыточно фиксированных формалином, можно также иногда увидеть окрашивание соединительной ткани. Для интерпретации результатов окрашивания используйте интактные клетки. Что касается некротизированных или разрушенных клеток, часто можно наблюдать неспецифическое окрашивание.<sup>4</sup> Связывание белков или продуктов реакции субстрата, происходящее неиммунологическим способом, может привести к ложноположительным результатам. Они могут быть обусловлены активностью эндогенных ферментов, таких как псевдопероксидаза (эритроцитов), эндогенная пероксидаза (цитохром С) или эндогенный биотин<sup>5</sup> (например, в печени, молочной железе, головном мозге, почках). Чтобы отличить активность эндогенных ферментов или неспецифическое связывание ферментов от специфической иммунореактивности, можно выполнить окрашивание дополнительных тканей, взятых у пациента, с использованием исключительно хромогенного субстрата или с применением Стрептавидина, ковалентно конъюгированного с пероксидазой хрена (Streptavidin-HRP), или меченого полимера и хромогенного субстрата соответственно. При наличии специфического окрашивания в отрицательном контроле ткани результаты исследования полученных у пациентов образцов считаются недействительными.

### **Отрицательный контроль реактива**

Используйте неспецифический отрицательный контроль реактива вместо первичного антитела на срезе каждого полученного у пациента образца с целью оценки неспецифического окрашивания и лучшей интерпретации специфического окрашивания в месте расположения антигена.

### **Ткань, полученная у пациента**

Исследуйте окрашенные образцы ткани, взятой у пациента, в последнюю очередь. Интенсивность положительного окрашивания следует оценивать с учетом любого неспецифического фонового окрашивания отрицательного контроля реактива. Как и при любом иммуногистохимическом исследовании, отрицательный результат означает не обнаружение антигена, но не его отсутствие в исследованных клетках или ткани. При необходимости следует использовать панель антител для выявления ложноотрицательных реакций.

### **Общие ограничения**

Имуногистохимическое исследование является многостадийным диагностическим процессом, требующим специальных навыков в выборе надлежащих реактивов; выборе, фиксации и обработке тканей; приготовлении среза с ИГХ препаратом; интерпретации результатов окрашивания.

Окрашивание тканей зависит от обращения с тканями и их обработки перед окрашиванием. Неправильные процедуры фиксации, замораживания, оттаивания, промывки, сушки, нагрева, приготовления срезов, а также загрязнение другими тканями или жидкостями могут приводить к артефактам, захвату антител или ложноотрицательным результатам. Противоречивые результаты могут быть обусловлены различиями методов фиксации и заливки препарата или присущей тканям внутренней неравномерностью структуры.<sup>6</sup>

Избыточное или неполное контрастное окрашивание может привести к неправильной интерпретации результатов.

Клиническая интерпретация любого окрашивания или его отсутствия должна быть дополнена морфологическими исследованиями с надлежащими контролями и должна быть оценена квалифицированным патологом с учетом анамнеза пациента и других диагностических тестов.

Гематоксилин Novocastra™ Hematoxylin RE7107 предназначен для использования с залитыми в парафин срезами, подготовленными с учетом определенных требований к фиксации. Возможна непредвиденная экспрессия антигена, особенно в опухолях. Клиническая интерпретация любого окрашенного среза ткани должна включать морфологический анализ и оценку соответствующих контролей.

### **Эксплуатационные характеристики**

Эффективность гематоксилина Novocastra™ Hematoxylin RE7107 была валидирована с использованием ряда первичных антител к иммуноглобулинам IgG и IgM мышей Novocastra™ в комбинации с системами обнаружения на основе концентрированной пероксидазы Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, системами обнаружения на основе пероксидазы Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K и системами обнаружения полимеров Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

Данная продукция остается стабильной до истечения срока годности, который указан на ее этикетке.

### **Литература — общая**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F, Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

### **Дополнения к предыдущему выпуску**

Реактивы, входящие в комплект поставки.

### **Дата выпуска**

24 Сентябрь 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Kod produktu: RE7107

### Przeznaczenie

*Do diagnostyki in vitro.*

Preparat Novocastra™ Hematoxylin RE7107 jest przeznaczony do stosowania w procedurach barwienia immunohistochemicznego (IHC) opisanych w Instrukcji stosowania Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K i Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Kliniczną interpretację wybarwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. Ocenę powinien przeprowadzić wykwalifikowany patolog w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych.

### Zasady postępowania

Hematoxylina barwi jądra komórkowe i ma wiele zastosowań w histologii, z których najczęściej wykorzystywanym jest barwienie hematoxyliną i eozyną.<sup>1</sup> W procedurach IHC (badań immunochemicznych) hematoxylinę można stosować do barwienia kontrastowego w celu łatwiejszej wizualizacji i lokalizacji barwnego produktu końcowego procedury IHC (badania immunochemicznego).

Produkt ten jest stosowany w procedurach IHC (badań immunochemicznych), które pozwalają na jakościową identyfikację za pomocą mikroskopii świetlnej antygenów w skrawkach utwalonej w formalinie i zatopionej w parafinie tkanki, w kolejnych etapach przedzielonych przemywaniem (Zasady Postępowania IHC są opisane w Instrukcji stosowania odpowiedniego systemu detekcji). Preparat Novocastra™ Hematoxylin RE7107 jest stosowany na skrawki po reakcji substrat/chromogen. Barwi on jądra na czerwono, a następnie - po przemyciu skrawków w wodzie lub słabo zasadowym roztworze (niebieski barwnik) - na niebiesko.

### Odczynniki znajdujące się w zestawie

Hematoxylin RE7107 (25 ml). <0,1% Hematoxyliny.

### Dodawanie wody, mieszanie, rozcieńczanie, miareczkowanie.

Hematoxylin RE7107 jest gotowym do użycia odczynnikiem. W przypadku tego odczynnika nie jest konieczne dodawanie wody, mieszanie, rozcieńczanie ani miareczkowanie. Dalsze rozcieńczanie może prowadzić do niemożliwości przeprowadzenia barwienia antygenu. Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

### Przechowywanie i trwałość

Przechowywać w temperaturze 2-8 °C. Nie zamrażać. Niezwłocznie po użyciu ponownie umieścić w temperaturze 2-8 °C. Nie używać po upływie daty ważności podanej na etykiecie produktu. Przechowywanie w warunkach innych od wskazanych wymaga weryfikacji użytkownika. Nie ma wyraźnych oznak niestabilności tego produktu; w związku z tym kontrole pozytywne i negatywne powinny być prowadzone jednocześnie z badaniem próbek pobranych od pacjenta.

### Przygotowanie próbek

Zalecanym utwalcaczem jest 10-procentowa obojętna buforowana formalina do zatopionych w parafinie skrawków tkankowych.

### Ostrzeżenia i środki ostrożności

Dla profesjonalnych użytkowników.

Karta charakterystyki (MSDS) jest udostępniana na żądanie.

Z preparatami przed utwaleniem i po utwaleniu, jak również ze wszystkimi materiałami, które mają z nimi styczność, należy obchodzić się tak, jak z materiałami potencjalnie zakaźnymi i należy je utylizować, zachowując odpowiednie środki ostrożności.<sup>2</sup>

Podczas pobierania pipetą odczynników nie wolno nigdy zasysać ustami i należy unikać kontaktu odczynników i preparatów ze skórą oraz błonami śluzowymi. W razie kontaktu odczynników lub próbek ze szczególnie narażonymi miejscami przemocy kontaktu dużą ilością wody. Wszelkie potencjalnie toksyczne składniki należy utylizować zgodnie z krajowymi lub lokalnymi przepisami.

Chronić odczynniki przed skażeniem drobnoustrojami, ponieważ może ono doprowadzić do zwiększonego barwienia niespecyficznego. W przypadku zastosowania okresów inkubacji i temperatur innych niż podano w instrukcji mogą wystąpić błędne wyniki. Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

### Procedura

#### A. Odczynniki wymagane, lecz niedostarczane

1. Standardowe rozpuszczalniki stosowane w immunohistochemii.
2. 50 mM roztworu soli fizjologicznej buforowanego odczynnikiem Tris (TBS) pH 7,6.
3. Roztwór/Roztwory do odmaskowywania antygenu (zob. Zalecenia dotyczące stosowania)
4. Roztwór/Roztwory do odmaskowywania enzymu (zob. Zalecenia dotyczące stosowania)
5. Rozcieńczalnik do przeciwciał.
6. Przeciwciało pierwszorzędowe.
7. System detekcji.
8. Odczynnik barwiący na niebiesko, np. Scotts tap water substitute lub nasycony węgiel litu.
9. Środek do zamykania preparatów mikroskopowych

#### B. Sprzęt wymagany, lecz niedostarczany

1. Sprzęt wymagany do odmaskowywania antygenu, jeśli jest zalecany dla przeciwciała pierwszorzędowego.
2. Ogólne wyposażenie laboratorium immunohistochemicznego.

### C. Metodologia

Przed przystąpieniem do działań w ramach niniejszej metodologii użytkownik powinien zostać przeszkolony w zakresie technik immunohistochemicznych.

Zastosowanie przeciwciała pierwszorzędowego, jego rozcieńczenia wraz z Hematocylin RE7107 w systemie detekcji powinno zostać zweryfikowane przez użytkownika w serii stosowanych wcześniej kontroli pozytywnych i negatywnych.

O ile nie wskazano inaczej, wszystkie etapy należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej (25°C). Następujące kroki należy wykonać na odpowiednim etapie protokołu IHC (badania immunochemicznego) (zob. Instrukcja zastosowania systemu detekcji)

1. Przemycić w wodzie.
2. Barwić skrawki przy pomocy Hematocylin RE7107 przez 5 minut.
3. Przemycić w wodzie.
4. Jeśli jest to konieczne, zabarwić na niebiesko barwnikiem.
5. Przemycić w wodzie.

#### Kontrola jakości

Różnice w przetwarzaniu tkanek i procedurach technicznych w laboratorium użytkownika mogą doprowadzić do znacznej zmienności wyników, co oznacza konieczność dodatkowego przeprowadzania regularnych kontroli wewnętrznych. Kontrole należy przeprowadzać jak najszyciej na świeżych próbkach z autopsji/biopsji/operacji chirurgicznej utwalonych, przetworzonych i zatopionych w parafinie, taką samą metodą, jaką badane są pobrane tkanki.

#### Tkankowa kontrola pozytywna

Stosowana w celu wskazania prawidłowo przygotowanych tkanek i prawidłowych technik barwienia. W każdej serii barwienia każdy zestaw warunków testowych/przeciwciał pierwszorzędowych powinien uwzględniać jedną tkankową kontrolę pozytywną. Do optymalnej kontroli jakości i do wykrywania niewielkich poziomów degradacji odczynników bardziej nadaje się tkanka o słabym barwieniu pozytywnym niż tkanka o silnym barwieniu pozytywnym.<sup>3</sup> Informacje na temat zalecanej pozytywnej kontroli tkankowej zob. Instrukcja stosowania przeciwciała pierwszorzędowego. Jeśli tkankowa kontrola pozytywna nie wykaże odpowiedniego barwienia pozytywnego, wyniki testu przeprowadzonego na próbkach pobranych od pacjenta należy uznać za nieważne.

#### Tkankowa kontrola negatywna

Należy ją wykonać po tkankowej kontroli pozytywnej, aby sprawdzić swoistość znakowania docelowego antygeny przez przeciwciała pierwszorzędowe. W przypadku zalecanej negatywnej kontroli tkankowej zob. Instrukcja stosowania przeciwciała pierwszorzędowego. Ewentualnie tkankowa kontrola negatywna może obejmować różne typy komórek obecne w większości skrawków tkankowych, jednak powinno to zostać zweryfikowane przez użytkownika. Barwienie niespecyficzne, jeżeli jest obecne, zwykle ma charakter rozproszony. Na skrawkach wykonanych z materiału tkankowego nadmiernie utwalonego w formalinie można również zaobserwować sporadyczne barwienie tkanki łącznej. Do interpretacji wyników barwienia należy używać nieuszkodzonych komórek. Komórki martwicze lub zdegenerowane często powodują barwienie niespecyficzne.<sup>4</sup> Wyniki fałszywie pozytywne mogą pojawić się w następstwie niemiunologicznego wiązania białek lub występowania produktów reakcji substratów. Mogą być również spowodowane przez enzymy endogenne, takie jak pseudoperoksydaza (erytrocyty), peroksydaza endogenna (cytochrom C) lub endogenna biotylna<sup>5</sup> (np. wątroba, sutki, mózg, nerki). Aby odróżnić endogenną aktywność enzymatyczną lub niespecyficzne wiązanie enzymów od swoistej immunoreaktywności, dodatkowe tkanki pacjenta mogą być barwione - odpowiednio - wyłącznie substratem chromogenem, preparatem Streptavidin-HRP lub znakowanym polimerem i substratem chromogenicznym. Jeśli w trakcie tkankowej kontroli negatywnej nastąpi barwienie niespecyficzne, wyniki testu przeprowadzonego na próbkach pobranych od pacjenta należy uznać za nieważne.

#### Negatywna kontrola odczynnika

Aby przeprowadzić ocenę barwienia niespecyficznego oraz umożliwić lepszą interpretację barwienia specyficznego na każdym skrawku z próbki pobranej od pacjenta należy przeprowadzić nieswoistą kontrolę negatywną odczynnika w miejscu wiązania przeciwciała pierwszorzędowego.

#### Tkanka pacjenta

Wybarwione próbki pobrane od pacjenta należy zbadać na końcu. Intensywność barwienia pozytywnego należy oceniać w kontekście ewentualnego barwienia niespecyficznego tła podczas negatywnej kontroli odczynnika. Tak jak we wszystkich innych badaniach immunohistochemicznych wynik ujemny oznacza, że antygen nie został wykryty, co jednak nie oznacza, że jest on nieobecny w badanych komórkach/tkankach. W razie konieczności do identyfikacji reakcji fałszywych należy wykorzystać panel przeciwciał.

#### Ograniczenia ogólne

Badanie immunohistochemiczne to wieloetapowy proces diagnostyczny, który wymaga specjalistycznego szkolenia w zakresie doboru odpowiednich odczynników i tkanek, utwalania i przetwarzania tkanek, przygotowywania preparatów immunohistochemicznych oraz interpretacji wyników barwienia.

Barwienie tkanek zależy od postępowania z tkanką i jej przetwarzania przed barwieniem. Nieprawidłowe utwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, podgrzewanie, ścinanie skrawków lub skażenie innymi tkankami lub płynami może powodować artefakty, zatrzymywanie przeciwciał lub wyniki fałszywie negatywne. Niespójność wyników może być spowodowana zastosowaniem różnych metod utwalania i zatapiań lub przez nieprawidłowości samego materiału tkankowego.<sup>6</sup>

Nadmierne lub niepełne barwienie ujemne może pogarszać interpretację wyników.

Kliniczną interpretację barwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami.

Ocenę powinien przeprowadzić wykwalifikowany patolog w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych.

Preparat Novocastra™ Hematocylin RE7107 jest przeznaczony do skrawków zatopionych w parafinie o określonych wymagach dotyczących utwalania. Może wystąpić nieoczekiwana ekspresja antygeny, szczególnie w przypadku nowotworów. Interpretacja kliniczna wybarwionych skrawków musi obejmować analizę morfologiczną oraz ocenę przeprowadzoną w ramach odpowiednich kontroli.

## Charakterystyka działania

Skuteczność preparatu Novocastra™ Hematoxylin RE7107 została zweryfikowana za pomocą szeregu przeciwciał pierwszorzędowych mysich IgG, mysich IgM i króliczych IgG Novocastra™ w połączeniu z Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K i Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

Produkt zachowuje stabilność do upływu daty ważności umieszczonej na etykiecie.

## Piśmiennictwo - ogólne.

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Odczynniki znajdujące się w zestawie.

## Data publikacji

24 września 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Koda izdelka: RE7107

### Predvidena uporaba

Za *diagnostično uporabo in vitro*.

Izdelek Novocastra™ Hematoxylin RE7107 je namenjen uporabi pri postopkih imunohistokemijskega (IHC) barvanja, kot so tisti, opisani v navodilih za uporabo izdelkov Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K in Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Klinično razlago obarvanja ali odsotnosti le-tega morajo dopolnjevati morfološke študije ustreznih kontrolnih vzorcev, ki jih v okviru klinične anamneze bolnika in drugih diagnostičnih testov oceni usposobljen patolog.

### Načelo postopka

Hematoksilin obarva celična jedra in se uporablja v histologiji, najpogosteje za barvanje s hematoksilinom in eozinom.<sup>1</sup> Pri postopkih IHC se hematoksilin lahko uporablja za nasprotno barvanje kot pomoč pri vizualizaciji in lokalizaciji obarvanega končnega produkta postopka IHC.

Ta izdelek se uporablja pri postopkih IHC, ki omogoča svetlobno-mikroskopsko kvalitativno identifikacijo antigenov v rezinah tkiva, fiksiranih s formalinom in vstavljenih v parafin, z zaporednimi koraki in vmesnimi koraki izpiranja (za načelo postopka IHC glejte navodila za uporabo ustreznega sistema za zaznavanje). Izdelek Novocastra™ Hematoxylin RE7107 se nanese na rezine po reakciji substrata in kromogena. Jedra obarva rdeče, po izpiranju rezin v vodi ali šibki alkalni raztopini (modrilni reagent) pa spremeni barvo v modro.

### Priloženi reagenti

Hematoxylin RE7107 (25ml). < 0,1-% hematoksilin.

### Rekonstitucija, mešanje, redčenje, titracija

Hematoxylin RE7107 je reagent, pripravljen za uporabo. Rekonstitucija, mešanje, redčenje ali titracija tega reagenta niso priporočljivi. Nadaljnje redčenje lahko privede do neobarvanja antigena. Uporabnik mora potrditi vsako takšno spremembo.

### Shranjevanje in stabilnost

Hraniti pri temperaturi 2–8 °C. Ne zamrzujte. Takoj po uporabi ohladite na temperaturo 2–8 °C. Ne uporabite po datumu izteka roka uporabnosti, ki je naveden na oznaki na izdelku. Uporabnik mora potrditi ustreznost pogojev shranjevanja, če se ti razlikujejo od navedenih. Ni očitnih znakov, ki bi nakazovali nestabilnost tega izdelka, zato morate hkrati z vzorci bolnikov testirati tudi pozitivne in negativne kontrole.

### Priprava vzorcev

Priporočena fiksirna raztopina je 10-% formalin v nevtralnem pufru za tkivne rezine, vstavljene v parafin.

### Opozorila in previdnostni ukrepi

Za poklicne uporabnike.

Na zahtevo je na voljo varnostni list.

Z vzorci, pred fiksiranjem in po njem, in vsemi materiali, s katerimi so prišli v stik, morate ravnati, kot da bi lahko prenašali okužbe, pri njihovem odstranjevanju pa morate upoštevati ustrezne previdnostne ukrepe.<sup>2</sup>

Nikoli ne pipetirajte reagentov z usti. Pazite, da reagenti in vzorci ne pridejo v stik s kožo ali sluznicami. Če reagenti ali vzorci pridejo v stik z občutljivimi deli, jih izperite z obilo vode. Sledite zveznim, državnim ali lokalnim predpisom za odstranjevanje katerih koli morebitno strupenih sestavin.

Pazite, da ne pride do mikrobnih okužb reagentov, saj lahko povzroči nespecifično barvanje. Če uporabite čas ali temperature inkubacije, ki se razlikujejo od navedenih, lahko pridobite napačne rezultate. Uporabnik mora validirati morebitne spremembe.

### Postopek

#### A. Potrebni reagenti, ki niso priloženi

1. Standardna topila, ki se uporabljajo v imunohistokemiji.
2. Fiziološka raztopina s 50 mM pufra tris (TBS) pH 7,6.
3. Raztopine za pridobivanje antigenov (glejte priporočila za uporabo primarnega protitelesa).
4. Raztopine za pridobivanje encimov (glejte priporočila za uporabo primarnega protitelesa).
5. Redčilo za protitelesa.
6. Primarno protitelo.
7. Sistem za zaznavanje.
8. Modrilni reagent, npr. Scottov nadomestek za vodovodno vodo (Scott's Tap Water substitute) ali nasičeni litijev karbonat.
9. Medij za pritrjevanje.

#### B. Potrebna oprema, ki ni priložena

1. Oprema, potrebna za odkrivanje antigenov, če je priporočljiva za primarno protitelo.
2. Splošna oprema za imunohistokemijski laboratorij.

### C. Metodologija

**Preden uporabniki začnejo uporabljati to metodologijo, morajo biti usposobljeni za delo z imunohistokemijskimi tehnikami.**

**Kombinacijo primarnega protitelesa, njegove redčitve skupaj z izdelkom Hematoxylin RE7107 in sistemom za zaznavanje mora uporabnik validirati na vrsti znanih pozitivnih in negativnih kontrol.**

Vse korake izvajajte pri sobni temperaturi (25 °C), razen če je navedeno drugače. Naslednje korake morate izvesti v ustreznem koraku protokola IHC (glejte navodilo za uporabo sistema za zaznavanje)

1. Izperite v vodi.
2. Barvajte rezine 5 minut z izdelkom Hematoxylin RE7107.
3. Izperite v vodi.
4. Po potrebi izvedite reakcijo z modrilnim reagentom.
5. Izperite v vodi.

### Kontrola kakovosti

Razlike pri obdelavi tkiva in tehničnih postopkih v laboratoriju uporabnika lahko vodijo do precejšnje variabilnosti rezultatov, kar zahteva redne interne kontrole učinkovitosti poleg spodaj navedenih postopkov. Kontrolni vzorci morajo biti sveži vzorci, pridobljeni z obdukcijo/ biopsijo/kirurškim posegom, fiksirani s formalinom, obdelani in shranjeni v parafinskem vosku kakor hitro je mogoče ter na isti način, kot vzorci bolnikov.

### Pozitivni kontrolni vzorci tkiva

Uporabite jih za opredelitev pravilno pripravljenih tkiv in ustreznih tehnik barvanja. Pri vsakem postopku barvanja morate vsakemu sklopu preizkusnih pogojev/primarnega protitelesa dodati en pozitiven kontrolni vzorec tkiva. Za kar najboljšo kontrolo kakovosti in boljše zaznavanje manjših stopenj razkroja reagenta je tkivo s šibkim pozitivnim obarvanjem bolj primerno kot tkivo z močnim pozitivnim obarvanjem.<sup>3</sup> Za priporočeno pozitivno kontrolno tkivo glejte navodila za uporabo primarnega protitelesa. Če pozitivni kontrolni vzorci tkiva ne pokažejo pozitivnega obarvanja, morate rezultate preizkusnih vzorcev zavreči kot neveljavne.

### Negativni kontrolni vzorci tkiva

Pregledati jih morate po pregledu pozitivnih kontrolnih vzorcev tkiva, da preverite specifičnost oznake ciljnega antigena glede na primarno protiteleso. Za priporočeno negativno kontrolno tkivo glejte navodila za uporabo primarnega protitelesa. Drugače pa se kot negativni kontrolni vzorci pogosto uporablja vrsta različnih celic, ki so prisotne v večini rezin tkiv, vendar pa mora tako uporabo preveriti uporabnik. Nespecifično barvanje, če je prisotno, je običajno razpršeno. Opazite lahko tudi posamično obarvanje vezivnega tkiva v rezinah tkiv, kot posledica premočnega fiksiranja s formalinom. Za razlago rezultatov obarvanja uporabite nespremenjene celice. Obarvanje nekrotičnih ali degeneriranih celic je pogosto nespecifično.<sup>4</sup> Lažno pozitivni rezultati se lahko pojavijo zaradi neimunske vezave proteinov ali produktov reakcije substrata. Povzročijo jih lahko tudi endogeni encimi, kot so psevdoperoksidaza (eritrociti), endogena peroksidaza (citokrom C) ali endogeni biotin<sup>5</sup> (npr. jetra, dojke, možgani, ledvice). Za razlikovanje med endogeno aktivnostjo encimov ali nespecifično vezavo encimov od specifične imunske reaktivnosti, lahko barvate dodatna tkiva bolnikov izključno s kombinacijami substrat-kromogen, streptavidin-HRP ali označeni polimer in substrat-kromogen. Če pride do specifičnega obarvanja negativnih kontrolnih vzorcev tkiva, morate rezultate vzorcev bolnika zavreči kot neveljavne.

### Negativni kontrolni reagent

Za oceno nespecifičnega barvanja in boljšo razlago specifičnega obarvanja na antigenem mestu uporabite nespecifični negativni kontrolni reagent namesto primarnega protitelesa z eno rezino vsakega vzorca bolnika.

### Bolnikovo tkivo

Obarvane vzorce bolnikov pregledajte nazadnje. Intenzivnost pozitivnega obarvanja ocenite v okviru morebitnega nespecifičnega obarvanja ozadja z negativnim kontrolnim reagentom. Tako kot pri vseh imunohistokemijskih preizkusih negativen rezultat pomeni, da antigen ni bil zaznan, ne pa odsotnosti antigena v testiranih celicah/tkivih. Po potrebi uporabite nabor protiteles za opredelitev napačnih negativnih reakcij.

### Splošne omejitve

Imunohistokemija je diagnostični postopek z več koraki, ki zahteva specializirano usposabljanje za izbiro ustreznih reagentov, izbiro, fiksiranje in obdelavo tkiv, pripravo IHC preparata in razlago rezultatov obarvanja.

Obarvanje tkiva je odvisno od rokovanja s tkivom in njegovo obdelavo pred barvanjem. Nepravilno fiksiranje, zamrzovanje, odtajanje, izpiranje, sušenje, segrevanje, rezanje ali okužba z drugimi tkivi ali tekočinami lahko povzroči nastanek artefaktov, lovljenje protitelesa ali lažne negativne rezultate. Nedosledni rezultati so lahko posledica razlik pri metodah fiksiranja in vstavljanja ali pa so del nepravilnosti tkiva samega.<sup>5</sup>

Prekomerno ali nepopolno kontrastno barvanje lahko neugodno vpliva na pravilno razlago rezultatov.

Klinično razlago obarvanja ali odsotnosti le-tega morajo dopolnjevati morfološke študije ustreznih kontrolnih vzorcev, ki jih v okviru klinične anamneze bolnika in drugih diagnostičnih testov oceni usposobljen patolog.

Izdelek Novocastra™ Hematoxylin RE7107 je namenjen uporabi na rezinah, vstavljenih v parafin, s posebnimi zahtevami glede fiksiranja. Lahko pride do nepričakovanega izražanja antigena, zlasti pri neoplazmah. Pri klinični razlagi obarvane rezine tkiva morate upoštevati morfološko analizo in oceno ustreznih kontrol.

### Značilnosti učinkovitosti

Učinkovitost izdelka Novocastra™ Hematoxylin RE7107 so validirali z nizom primarnih protiteles proti IgG, mišjim IgM in kunčjim IgG Novocastra™ v kombinaciji s sistemi za zaznavanje Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K in Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

Izdelek je stabilen do datuma izteka roka uporabnosti, ki je naveden na oznaki izdelka.

## **Splošna literatura**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161 167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## **Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji**

Priloženi reagenti

## **Datum izdaje**

24 september 2018



# Novocastra™ Hematoxylin

## Kód výrobku: RE7107

### Zamýšlené použití

*Pro diagnostické použití in vitro.*

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 je určen k použití v rámci postupů imunohistochemického (IHC) barvení, popsanych v návodu k použití detekčních systémů Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K a Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-R/RE7150-K. Klinickou interpretaci jakéhokoliv barvení nebo jeho nepřítomnosti je nutné doplnit morfologickým vyšetřením s použitím správných kontrol a zhodnotit je musí kvalifikovaný patolog v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a jinými diagnostickými testy.

### Princip metody

Hematoxylin barví buněčná jádra a má široké využití v histologii. Nejběžnějším z nich je barvení hematoxylinem a eosinem.<sup>1</sup> V imunohistochemických (IHC) postupech lze hematoxylin použít jako kontrastní barvivo k podpoře vizualizace a lokalizace barevných koncových produktů postupu IHC.

Tento produkt se používá v rámci metod imunohistochemického (IHC) barvení, který umožňuje kvalitativní identifikaci světelnou mikroskopii ve tkáni fixované formálním a zalité v parafínu prostřednictvím sekvenčních kroků s interponovanými omývacími kroky (princip metody IHC viz návod k použití příslušného detekčního systému). Novocastra™ Hematoxylin RE7107 se používá u řezů po substrátové/chromogenní reakci. Barví jádra červeně a při promývání řezů vodou nebo slabým alkalickým roztokem (modřidlem) se barva mění na modrou.

### Dodávané reagensie

Hematoxylin RE7107 (25 ml). < 0,1% Hematoxylin.

### Rekonstituce, Míchání, Ředění, Titrace

Hematoxylin RE7107 je reagensie připravená k použití. Rekonstituce, míchání, ředění ani titrace této reagensie nejsou doporučeny. Další ředění může vést k ztrátě barvení antigenu. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

### Skladování a stabilita

Skladujte při teplotě 2–8 °C. Nezmrazujte. Okamžitě po použití vraťte do prostředí s teplotou 2–8 °C. Nepoužívejte po uplynutí data expirace uvedeného na štítku výrobku. Podmínky skladování jiné než uvedené musí uživatel validovat. Neexistují zjevné známky, které by indikovaly kontaminaci anebo nestabilitu. Současné s neznámými vzorky je proto u vzorků pacienta třeba provést i hodnocení příslušné pozitivní a negativní tkáňové kontroly.

### Příprava vzorku

Fixační roztok doporučený pro řezu tkáně zalité v parafínu je 10% formalin pufovaný na neutrální pH.

### Varování a bezpečnostní opatření

Pro profesionální uživatele.

Bezpečnostní list materiálu (MSDS) je k dispozici na vyžádání.

Se vzorky, před fixací i po fixaci, a se všemi materiály, které s nimi přišli do kontaktu, je nutno zacházet, jako by mohly přenášet infekci, a zlikvidovat je s použitím příslušných bezpečnostních opatření.<sup>2</sup>

Nikdy reagensie nepipetujte ústy a zabraňte kontaktu reagensií a vzorků s kůží a sliznicemi. Pokud se reagensie nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody. Údaje o likvidaci jakýchkoli potenciálně toxických komponent prostudujte ve federálních, státních nebo místních nařízeních.

Minimalizujte mikrobiální kontaminaci reagensií, mohlo by dojít ke zvýšení výskytu nespecifického barvení. Inkubační doby nebo teploty jiné než předepsané mohou vést k chybným výsledkům. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

### Postup

#### A. Potřebné reagensie, které nejsou součástí dodávky

1. Standardní rozpouštědla používaná v imunohistochemii.
2. Fyziologický roztok pufovaný 50mM roztokem tris-pufuru (TBS), pH 7,6.
3. Odmaskovací roztok (roztoky) pro antigen (viz Doporučení k použití primární protilátky).
4. Odmaskovací roztok (roztoky) pro enzym (viz Doporučení k použití primární protilátky).
5. Ředící roztok na protilátku.
6. Primární protilátka.
7. Detekční systém.
8. Modřidlo, např. náhražka vody z vodovodu Scott nebo saturovaný uhlíčitán lithný.
9. Fixační médium.

#### B. Potřebné vybavení, které není dodáno

1. Vybavení požadované k odmaskování antigenu, pokud je doporučen pro primární protilátku.
2. Obecné vybavení imunohistochemické laboratoře.

### C. Metodika

**Než uživatelé přistoupí k této metodice, musí být proškoleni v imunohistochemických technikách.**

**Kombinace primární protilátky, její ředění, společně s Hematoxylin RE7107 a detekčním systémem musí uživatel validovat při sérii známých pozitivních a negativních kontrol.**

Pokud není uvedeno jinak, provádějí se všechny kroky při pokojové teplotě (25 °C). Následující kroky je třeba provést v příslušné fázi imunohistochemického protokolu (viz návod k použití detekčního systému)

1. Opláchněte ve vodě.
2. Proveďte barvení reagensí Hematoxylin RE7107 po dobu 5 minut.
3. Opláchněte ve vodě.
4. Je-li třeba, namodřete modřidlem.
5. Opláchněte ve vodě.

#### Kontrola jakosti

Rozdíly ve zpracování tkání a v technických postupech v laboratoři uživatele mohou způsobit významnou variabilitu výsledků, což vyžaduje kromě níže uvedených postupů i pravidelné provádění kontrol v laboratoři. Kontroly musí být čerstvé pitevni/bioptické/operační vzorky co nejdříve fixované formalinem, zpracované a zalité do parafinového vosku, stejným způsobem jako vzorek/vzorky pacienta.

#### Pozitivní tkáňová kontrola

Používá se k průkazu správně připravených tkání a správných barvicích technik. V každém barvicím cyklu musí být použita jedna pozitivní tkáňová kontrola pro každý soubor testovacích podmínek/primárních protilátek. Pro optimální kontrolu jakosti a k detekci menšího stupně degradace reagenzie je vhodnější tkáň se slabým pozitivním barvením než tkáň se silným pozitivním barvením<sup>3</sup>. Doporučená pozitivní tkáňová kontrola je stanovena v návodu k použití primární protilátky. Pokud pozitivní tkáňová kontrola nevykazuje pozitivní barvení, musí být výsledky testovaných vzorků považovány za neplatné.

#### Negativní tkáňová kontrola

Musi být vyšetřena po pozitivní tkáňové kontrole k ověření specifity označení cílového antigenu primární protilátkou. Doporučená negativní tkáňová kontrola je stanovena v návodu k použití primární protilátky. Alternativně často představuje místa negativní kontroly řada různých typů buněk přítomných ve většině tkáňových řezů, to ale musí uživatel validovat. Nespecifické barvení, je-li přítomno, má obvykle difúzní vzhled. V řezech ze tkání nadměrně fixovaných formalinem může být také zjištěno sporadické barvení pojivové tkáně. K interpretaci výsledků barvení použijte neporušené buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky se často barví nespecificky.<sup>4</sup> Falešně pozitivní výsledky mohou být důsledkem neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakčního substrátu. Mohou být také způsobeny endogenními enzymy, jako je např. pseudoperoxidáza (erythrocyty), endogenní peroxidáza (cytochrom C) nebo endogenní biotín<sup>5</sup> (např. játra, prs, mozek, ledviny). K odlišení aktivity endogenních enzymů či nespecifické vazby enzymů od specifické imunoreaktivity mohou být barveny další tkáně pacienta vylučně chromogenním substrátem, Streptavidin-HRP nebo značeným polymerem a chromogenním substrátem, v tomto pořadí. Pokud dojde v negativní tkáňové kontrole ke specifickému barvení, musí být výsledky vzorků pacienta považovány za neplatné.

#### Negativní reagenční kontrola

K vyhodnocení nespecifického barvení a umožnění lepší interpretace specifického barvení v místě antigenu použijte na řezu z každého vzorku pacienta nespecifickou negativní reagenční kontrolu místo primární protilátky.

#### Tkáň pacienta

Nakonec vyšetřete barvené vzorky pacienta. Intenzita pozitivního barvení musí být zhodnocena v kontextu se vším nespecifickým barvením pozadí u negativní reagenční kontroly. Jako u každého imunohistochemického vyšetření, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl zjištěn, nikoli, že antigen není ve vyšetřovaných buňkách/tkáňích přítomen. V případě potřeby použijte k identifikaci falešně negativních reakcí panel protilátek.

#### Obecná omezení

Imunohistochemické vyšetření je vícekrokový diagnostický proces, který spočívá ve specializovaném školení ve výběru vhodných reagensí; výběru, fixaci a zpracování tkání; přípravě IHC sklíčka; a v interpretaci výsledků barvení.

Barvení tkáně závisí na manipulaci s tkání a jejím zpracování před barvením. Nesprávným postupem při fixaci, zmrazení, rozmrazení, omývání, sušení, zahřívání, krájení řezů nebo kontaminací jinými tkáněmi či tekutinami mohou vzniknout artefakty, může dojít k vychytávání protilátek nebo k falešně negativním výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem odchylek ve fixačních metodách a metodách zalití v konzervačním médiu, nebo přirozených odchylek ve tkáni.<sup>6</sup>

Nadměrně nebo nedostatečně kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.

Klinickou interpretaci jakéhokoli barvení nebo jeho nepřítomnosti je nutné doplnit morfologickým vyšetřením s použitím správných kontrol a zhodnotit je musí kvalifikovaný patolog v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a jinými diagnostickými testy.

Novocastra™ Hematoxylin RE7107 je určena k použití s řezy zalitými v parafínu se specifickými fixačními požadavky. Může dojít k expresi neočekávaných antigenů, zejména u nádorů. Klinická interpretace jakéhokoli barveného tkáňového řezu musí zahrnovat morfologickou analýzu a zhodnocení příslušných kontrol.

#### Vlastnosti výkonu

Výkonost Novocastra™ Hematoxylin RE7107 byla validována pomocí řady myších primárních protilátek Novocastra™ IgG, myších IgM a králíčích IgG v kombinaci s detekčními systémy Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection System RE7110-K/RE7120-K a Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

Tento produkt je stabilní až do data expirace uvedeného na štítku výrobku.

## **Literatura - všeobecná**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161–167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## **Opravy předchozího vydání**

Dodávané reagensie

## **Datum vydání**

24 září 2018

# Novocastra™ Hematoxylin

## Kód produktu: RE7107

### Zamýšľané použitie

*Na diagnostické použitie in vitro.*

Prípravok Novocastra™ Hematoxylin RE7107 je určený na použitie pri imunohistochemických (IHC) postupoch farbenia opísaných v návodoch na použitie pre systémy Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrate Peroxidase Detection System RE7130-K a Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Klinická interpretácia akéhokoľvek zafarbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými vyšetreniami a zodpovedajúcimi kontrolami. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a ďalších diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.

### Princíp postupu

Hematoxylin farbí jadrá buniek a má mnohoraké využitie v histológii, pričom najbežnejšie je farbenie hematoxylinom a eozínom.<sup>1</sup> Pri postupoch IHC sa hematoxylin môže použiť ako kontrastné farbivo na uľahčenie vizualizácie a lokalizácie zafarbeného koncového produktu v rámci postupu IHC.

Tento produkt sa používa pri postupoch IHC a umožňuje kvalitatívnu identifikáciu prostredníctvom svetelnej mikroskopie antigénov v rezoch tkaniva zaliateho do parafínu a fixovaného formalínom postupnými krokmi a medzikrokmi umývania (informácie týkajúce sa princípov postupu IHC nájdete v návode na použitie k príslušnému detekčnému systému). Novocastra™ Hematoxylin RE7107 sa používa na rezy po reakcii substrátu/chromogénu. Zafarbí jadro načerveno a prepláchnutím rezov vodou alebo slabým zásaditým roztokom (modriace činidlo) zmení farbu na modrú.

### Dodané činidlá

Hematoxylin RE7107 (25 ml), <0,1 % Hematoxylin.

### Rekonštitúcia, miešanie, riedenie, titrácia

Hematoxylin RE7107 je činidlo pripravené na použitie. Rekonštitúcia, miešanie, riedenie ani titrácia tohto činidla sa neodporúčajú. Ďalšie zriedenie môže viesť k strate antigénového zafarbenia. Každú takúto zmenu musí validovať používateľ.

### Uskladnenie a stabilita

Skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Nezmrazujte. Okamžite po použití vráťte do teploty 2 – 8 °C. Nepoužívajte po uplynutí dátumu expirácie uvedeného na štítku produktu. Iné než uvedené podmienky skladovania si vyžadujú validáciu používateľom. Neexistujú evidentné známky signalizujúce nestabilitu tohto produktu, s patientskymi vzorkami sa preto musia súbežne testovať pozitívne aj negatívne kontroly.

### Príprava vzorky

Odporúčaný fixačný prípravok je 10 % neutrálny pufrovaný formalín pre bločky tkaniva zaliate do parafínu.

### Varovania a bezpečnostné opatrenia

Určené pre odborníkov.

Karta bezpečnostných údajov (KBÚ) je k dispozícii na požiadanie.

So vzorkami pred fixáciou a po nej a všetkými materiálmi, ktoré s nimi prišli do kontaktu, je nutné manipulovať ako s potenciálne infekčnými a zlikvidovať ich pri dodržaní zodpovedajúcich bezpečnostných opatrení.<sup>2</sup>

Činidlá nikdy nepipetujte ústami a zabráňte kontaktu činidiel a vzoriek s kožou a sliznicami. Ak sa činidlá alebo vzorky dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, umyte ich veľkým množstvom vody. Likvidáciu prípadných potenciálne toxických súčastí definujú federálne, štátne alebo miestne predpisy.

Minimalizujte mikrobiálnu kontamináciu činidiel. V opačnom prípade môže dôjsť k zvýšeniu nešpecifického zafarbenia. Nedodržanie predpísaných inkubačných dôb alebo teplôt môže viesť k nesprávnym výsledkom. Všetky takéto zmeny si vyžadujú validáciu používateľom.

### Postup

#### A. Požadované, ale nedodávané činidlá

1. Štandardné rozpúšťadlá používané v imunohistochemii
2. 50 mM tris-pufrovaný fyziologický roztok (TBS), pH 7,6.
3. Antigénový záchytý roztok (roztoky) (pozri časť Odporúčania k použitiu primárnej protilátky)
4. Enzymatický záchytý roztok (roztoky) (pozri časť Odporúčania k použitiu primárnej protilátky)
5. Zriedovadlo protilátok
6. Primárna protilátka
7. Detekčný systém
8. Modriace činidlo, napr. náhrada vody z vodovodu Scotts alebo nasýtený uhlíčan lítny.
9. Upevňovacie médium

#### B. Požadované, ale nedodávané vybavenie

1. Vybavenie potrebné na záchyt antigénu, ak sa odporúča pre primárnu protilátku
2. Všeobecné vybavenie imunohistochemického laboratória

### C. Metóda

**Používateľia musia byť vyškolení v oblasti imunohistochemických techník skôr, než pristúpia k tejto metóde.**

**Používateľ musí validovať kombináciu primárnej protilátky a jej riedenia spolu s činidlom Hematoxylin RE7107 a detekčným systémom v sérii známych pozitívnych a negatívnych kontrol.**

Ak nie je uvedené inak, všetky kroky sa vykonávajú pri izbovej teplote (25 °C). Nasledujúce kroky sa vykonávajú v príslušnej fáze protokolu IHC (pozri návod na použitie detekčného systému).

1. Opláchnite vo vode.
2. Nechajte rezy farbiť 5 minút s prípravkom Hematoxylin RE7107.
3. Opláchnite vo vode.
4. Podľa potreby zafarbite namodro pomocou modriaceho činidla.
5. Opláchnite vo vode.

### Kontrola kvality

Rozdiely v spracovaní tkaníva a technických postupoch v laboratóriu používateľa môžu viesť k významnému kolísaniu výsledkov, čo si vyžaduje, okrem nasledujúcich postupov, aj pravidelné interné kontroly. Kontroly by mali byť čerstvé pitevné/biopsické/chirurgické vzorky fixované čo najskôr formálnom a spracované zaliatím do parafínu rovnakým spôsobom ako vzorky pacienta.

### Pozitívna kontrola tkanívom

Identifikuje správne pripravené tkanivá a techniky zafarbenia. Každá súprava testových podmienok/primárnej protilátky v každom cykle zafarbenia musí obsahovať jednu pozitívnu kontrolu tkanívom. Tkanivo so slabým pozitívnym zafarbením je pre optimálnu kontrolu kvality a na detekciu slabšej degradácie činidla vhodnejšie než tkanivo so silným pozitívnym zafarbením.<sup>3</sup> Odporúčané pozitívne kontrolné tkanivo si pozrite v návode na použitie primárnej protilátky. Ak pozitívna kontrola tkanívom nebude vykazovať pozitívne zafarbenie, výsledky testovaných vzoriek je nutné považovať za neplatné.

### Negatívna kontrola tkanívom

Nutné vyšetriť po pozitívnej kontrole tkanívom s cieľom overiť špecifickosť značenia cieľového antigénu primárnou protilátkou. Odporúčanú negatívnu kontrolu tkanívom si pozrite v návode na použitie primárnej protilátky. Ako negatívnu kontrolu je možné použiť aj rôzne typy buniek prítomné vo väčšine tkanivových rezov, takýto postup si však vyžaduje validáciu používateľom. Prípadné nešpecifické farbenie má obvykle difúzný vzhľad. V rezoch tkanív silne fixovaných formálnom môže byť pozorované sporadické farbenie spojiva. Na interpretáciu výsledkov farbenia používajte intaktné bunky. Nekrotické alebo degenerované bunky sa často farbja nešpecificky.<sup>4</sup> Falošne pozitívne výsledky môžu byť pozorované v dôsledku neimunologickej väzby proteínov alebo produktov reakcie substrátu. Môžu byť spôsobené aj endogénnymi enzýmami, ako napr. pseudoperoxidázou (erytrocyty), endogénnou peroxidázou (cytochróm C) alebo endogénnym biotínom<sup>5</sup> (napr. pečeň, prsník, mozog, oblička). S cieľom diferencovať endogénnu enzymatickú aktivitu alebo nešpecifickú väzbu enzýmov od špecifickej imunoreaktivity môžete nafarbiť ďalšie vzorky tkanív pacienta výhradne substrátovým chromogénom, prípravkom Streptavidin-HRP, resp. značeným polymérom alebo substrátovým chromogénom. V prípade špecifického farbenia v negatívnej kontrole tkanívom je nutné výsledky vzoriek pacienta považovať za neplatné.

### Negatívna kontrola činidlom

Na vyhodnotenie nešpecifického zafarbenia použite nešpecifickú negatívnu kontrolu činidlom namiesto primárnej protilátky s rezom jednotlivých vzoriek pacienta, čo umožní lepšiu interpretáciu špecifického zafarbenia na mieste antigénu.

### Tkanivo pacienta

Zafarbené patientske vzorky preskúmajte ako posledné. Intenzitu pozitívneho farbenia je nutné vyhodnotiť v kontexte prípadného nešpecifického zafarbenia negatívnej kontroly činidlom na pozadí. Podobne ako pri všetkých imunohistochemických testov znamená negatívny výsledok, že antigén nebol detegovaný. Nepotvrzuje jeho absenciu v testovaných bunkách/tkanivách. V prípade potreby identifikujte falošne negatívne reakcie pomocou panelu protilátok.

### Všeobecné limitácie

Imunohistochemia je diagnostický postup pozostávajúci z viacerých krokov, ktorý si vyžaduje špecializované zaškolenie vo výbere zodpovedajúcich činidiel, výbere tkanív, fixácie a spracovania, príprave IHC sklíčka a interpretácii výsledkov farbenia.

Farbenie tkaníva závisí od manipulácie s tkanivom a od jeho spracovania pred farbením. Nesprávna fixácia, zmrazovanie, rozmrazovanie, premývanie, sušenie, ohrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými tkanivami či tekutinami môžu viesť k vzniku artefaktov, záchytu protilátok alebo falošne negatívnym výsledkom. Inkonzistentné výsledky môžu byť spôsobené zmenami metód fixácie a montáže preparátov alebo inherentnými nepravidłnosťami v tkanive.<sup>6</sup>

Nadmerné alebo neúplné kontrastné zafarbenie môže narušiť správnosť interpretácie výsledkov.

Klinická interpretácia akéhokoľvek farbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými vyšetreniami za použitia zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a iných diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.

Prípravok Novocastra™ Hematoxylin RE7107 je určený na použitie na rezoch zaliatých do parafínu so špecifickými požiadavkami na fixáciu. Najmä pri neopláziách môže dôjsť k nečakanej expresii antigénov. Klinická interpretácia akýchkoľvek farbených tkanivových rezov musí zahŕňať morfológickú analýzu a vyhodnotenie zodpovedajúcich kontrol.

### Parametre výkonu

Výkonnosť prípravku Novocastra™ Hematoxylin RE7107 bola overená použitím spektra primárnych protilátok myšiacich Novocastra™ IgG, myšiacich IgM a králičích IgG v kombinácii so systémami Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, Novocastra™ Peroxidase Detection System RE7110-K/RE7120-K a Novolink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K.

Tento produkt je stabilný až do dátumu expirácie, ktorý je uvedený na štítku produktu.

## **Bibliografia – všeobecne**

1. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161 167
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## **Úpravy predchádzajúceho vydania**

Dodané činidlá.

## **Dátum vydania**

24 septembra 2018

Leica Biosystems Newcastle Ltd  
Balliol Business Park West   
Benton Lane  
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW  
United Kingdom  
J +44 191 215 4242

Leica Biosystems Canada  
71 Four Valley Drive  
Concord, Ontario L4K 4V8  
Canada  
J +1 800 248 0123

Leica Biosystems Inc  
1700 Leider Lane  
Buffalo Grove IL 60089  
USA  
J +1 800 248 0123

Leica Biosystems Melbourne  
Pty Ltd  
495 Blackburn Road  
Mt Waverley VIC 3149  
Australia  
J +61 2 8870 3500