

## Peroxidase Detection System (250 tests)

Product No: RE7110-K

## Peroxidase Detection System (500 tests)

Product No: RE7120-K

## DAB (250 Slides)

Product No: RE7190-K

## Biotinylated Secondary Antibody

Product No: RE7103

## Streptavidin-HRP

Product No: RE7104

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

### 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.

### Instructies voor gebruik

Lees deze informatie voordat u dit product gebruikt.

### 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 vóór gebruik de integriteit van de verpakking.



# Peroxidase Detection System (250 tests)

Product No: RE7110-K

# Peroxidase Detection System (500 tests)

Product No: RE7120-K

# DAB (250 Slides)

Product No: RE7190-K

# Biotinylated Secondary Antibody

Product No: RE7103

# Streptavidin-HRP

Product No: RE7104

## Intended Use

*For in vitro diagnostic use.*

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K and (500 tests) RE7120-K are for the visualization of mouse IgG, mouse IgM and rabbit IgG primary antibodies. Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 and Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 are component reagents of these systems that are intended for use in the procedure described below. 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

The first immunoperoxidase technique was reported by Nakane and Pierce<sup>1</sup>, since then many developments have occurred leading to the immunoperoxidase techniques commonly used today. The Novocastra™ Peroxidase Detection Systems are based upon the technique described by Guesdon.<sup>2</sup> These products are used in an immunohistochemical (IHC) procedure, which allows the qualitative identification by light microscopy of Epitopes in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, via sequential steps with interposed washing steps.

If required by the primary antibody, sections are subjected to epitope retrieval prior to staining. Endogenous peroxidase activity is neutralized using the Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. This is followed by application of the Novocastra™ Protein Block RE7102 to reduce non-specific binding of primary and secondary antibodies. The section is subsequently incubated with optimally diluted primary antibody. Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 a biotin-conjugated secondary antibody formulation that recognizes mouse and rabbit immunoglobulins, is used to detect any tissue-bound primary antibody. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, a streptavidin-peroxidase conjugate is then applied and binds to the biotin present on the secondary antibody. Sections are further incubated with the substrate/chromogen, 3,3' - diaminobenzidine (DAB), prepared from Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 and Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106 as described below. Reaction catalyzed by the peroxidase produces a visible brown precipitate at the Epitope site. Sections are counterstained with Novocastra™ Hematoxylin RE7107 and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular Epitope.

## Reagents Provided

Details of those reagents from the following list that are supplied in each product are given in the table below.

1. Peroxidase Block RE7101. 3-4% Hydrogen peroxide.
2. Protein Block RE7102. 0.4% Casein in phosphate-buffered saline, with stabilizers, surfactant, and 0.2% Bronidox L as a preservative.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Affinity purified goat anti-mouse IgM (5µg/ml), horse anti-mouse IgG (10.5µg/mL) and horse anti-rabbit IgG (10.5µg/ml) in Tris-buffered saline with protein stabilizer and 0.35% ProClin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 to 1.4µg/ml in tris-buffered saline with protein stabilizer and 0.35% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1.74% w/v 3,3' - diaminobenzidine, in a stabilizer solution.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Buffered-solution containing ≤ 0.1% hydrogen peroxide and preservative.
7. Hematoxylin RE7107 <0.1% hematoxylin.

Reagent	Product Number	Peroxidase Detection System (250 tests) RE 7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	DAB (250 Slides) RE7190-K	Biotinylated Secondary Antibody RE7103	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25ml	2 x 25ml			
Protein Block	RE7102	1 x 25ml	2 x 25ml			
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25ml	2 x 25ml		1 x 25ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25ml	2 x 25ml			1 x 25ml

DAB Chromogen	RE7105	1 x 3ml	1 x 3ml	1 x 3ml		
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	2 x 30ml	1 x 30ml		
Hematoxylin	RE7107	1 x 25ml	2 x 25ml			

### Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

The Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 and Hematoxylin RE7107 solutions are prediluted. Reconstitution, mixing, dilution, or titration of these reagents is not recommended. Further dilution may result in loss of Epitope staining. The user must validate any such change.

The DAB Chromogen RE7105 requires dilution to 1/20 in DAB Substrate Buffer RE7106 prior to use. Further dilution may result in loss of Epitope 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

#### DAB CHROMOGEN

Contains <10% Biphenyl-3,3', 4,4'-Tetrayltetraamine.	H341: Suspected of causing genetic defects. H350: May cause cancer.	P201: Obtain special instructions before use. P202: Do not handle until all safety precautions have been read and understood. P281: Use personal protective equipment as required. P308+313: IF exposed or concerned: Get medical advice/attention. P501: Dispose of contents/container to hazardous or special waste collection point.
GHS08: Health hazard.		
Signal words: Danger.		

A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

For professional users.

Do not mix reagents from different detection systems.

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>3</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

- Standard solvents used in immunohistochemistry.
- 50mM tris-buffered saline (TBS) pH7.6.
- Epitope retrieval solution(s).
- Enzyme retrieval solution(s).
- Antibody diluent.
- Primary antibody.
- Mounting medium.

#### B. Equipment required but not supplied

- Equipment required for Epitope retrieval, if recommended for the primary antibody.
- 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 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).

- Cut and mount sections on slides coated with a suitable tissue adhesive.
- De-paraffinize sections in xylene or xylene substitutes.
- Re-hydrate through graded alcohols.
- Wash slides in running tap water.
- Perform Epitope retrieval as required (see **Recommendations for Use** for primary antibody).

6. Wash slides in de-ionized water.
7. Neutralize endogenous peroxidase using Peroxidase Block RE7101 for 5 minutes.
8. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
9. Incubate with Protein Block RE7102 for 5 minutes.
10. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
11. Incubate with optimally diluted primary antibody (see **Recommendations for Use** for primary antibody).
12. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
13. Incubate with Biotinylated Secondary Antibody RE7103 for 30 minutes.
14. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
15. Incubate with Streptavidin-HRP RE7104 for 30 mins.
16. Wash in TBS for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
17. Develop peroxidase activity with DAB working solution (see **DAB Working Solution**) for 5 minutes.
18. Rinse slides in water.
19. Counterstain with Hematoxylin RE7107.
20. Rinse slides in water for 5 minutes.
21. Dehydrate, clear and mount sections.

### **DAB Working Solution**

Add 50µl of DAB Chromogen RE7105 to 1ml of DAB Substrate Buffer RE7106. Use within six hours of preparation.

### **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>4</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 Epitope 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>5</sup> False-positive results may be seen due to non-immunological 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>6</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 or Streptavidin-HRP, 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-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the Epitope 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 Epitope was not detected, not that the Epitope was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

### **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>7</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™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K or RE7120-K are for use on paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected Epitope 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™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 and Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 have been validated using a range of Novocastra™ mouse IgG, mouse IgM and rabbit IgG primary antibodies.

These products are stable up to the expiry date(s) printed on the product label.

## **Bibliography**

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979; 27:1131.
3. 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.
4. 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.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## **Amendments to Previous Issue**

Not applicable.

## **Date of Issue**

27 February 2015

# Peroxidase Detection System (250 tests)

Référence du produit : RE7110-K

# Peroxidase Detection System (500 tests)

Référence du produit : RE7120-K

# DAB (250 Slides)

Référence du produit : RE7190-K

# Biotinylated Secondary Antibody

Référence du produit : RE7103

# Streptavidin-HRP

Référence du produit : RE7104

## Utilisation prévue

*Diagnostic in vitro.*

Les Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K et (500 tests) RE7120-K sont destinés à la révélation des anticorps primaires de type IgG de souris, IgM de souris et IgG de lapin. Le Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 et Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 sont des éléments réactifs de ces systèmes et sont destinés à être utilisés dans le cadre de la procédure décrite ci-dessous. 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

La première technique immunoperoxydasique a été décrite par Nakane et Pierce<sup>1</sup>, depuis lors, elle a fait l'objet de nombreux développements qui ont conduit aux techniques immunoperoxydasiques communément utilisées aujourd'hui. Les Novocastra™ Peroxidase Detection Systems sont basés sur la technique décrite par Guesdon.<sup>2</sup> Ces produits sont utilisés dans le cadre d'une procédure immunohistochimique (IHC) qui permet 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.

Préalablement au marquage, les coupes sont soumises à une restauration des épitopes, si l'anticorps primaire le nécessite. L'activité de la peroxydase endogène est neutralisée par le Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Ceci est suivi par l'application du Novocastra™ Protein Block RE7102 afin de réduire la liaison non spécifique des anticorps primaire et secondaire. Les coupes sont ensuite incubées avec un anticorps primaire dilué de façon optimale. Le Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 une formulation d'anticorps secondaire conjugué à la biotine qui reconnaît les immunoglobulines de souris et de lapin, est utilisé pour détecter tout anticorps primaire lié à un tissu. Le Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, un conjugué de streptavidine et de peroxydase est alors appliqué et se lie à la biotine présente sur l'anticorps secondaire. Les coupes sont ensuite incubées avec le substrat chromogène, la 3,3'-diaminobenzidine (DAB), préparé à partir du Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 et du Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106 comme indiqué ci-dessous. La réaction avec la peroxydase produit un précipité brun visible au niveau du site antigénique. Les coupes font l'objet d'une coloration de contraste au Novocastra™ Hematoxylin RE7107 et sont placées sous une lamelle. Les résultats sont interprétés à l'aide d'un microscope optique et participent au diagnostic différentiel des processus physiopathologiques, susceptibles, ou non, d'être associés à un antigène particulier.

## Réactifs fournis

Le détail des réactifs de la liste suivante fournis avec chaque produit est donné dans le tableau ci-dessous.

1. Peroxidase Block RE7101. Peroxyde d'hydrogène à 3-4 %.
2. Protein Block RE7102. Caséine à 0,4 % dans une solution saline tampon phosphate, avec des agents de stabilisation, un surfactant, et un agent de conservation à 0,2 %, le Bronidox L.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. IgM de chèvre, anti-souris (5 µg/ml), IgG de cheval, anti-souris (10,5 µg/ml) et IgG de cheval, anti-lapin (10,5 µg/ml), purifiées par affinité, dans une solution saline tamponnée de tris, avec un agent stabilisant des protéines et du ProCIn™ 950 à 0,35 %.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 à 1,4 µg/ml dans une solution saline tamponnée de tris, avec un agent stabilisant des protéines et du ProCIn™ 950 à 0,35 %.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74 % w/v 3,3'-diaminobenzidine, dans une solution stabilisante.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Solution tamponnée contenant du peroxyde d'hydrogène à ≤ 0.1% et un agent de conservation.
7. Hematoxylin RE7107. Hématoxyline à < 0.1 %.

Réactif	Référence du produit	Peroxidase Detection System (250 tests) RE 7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	DAB (250 Slides) RE7190-K	Biotinylated Secondary Antibody RE7103	Streptavidin-HRP RE7104.
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml			
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml			
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml		1 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml			1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	1 x 3 ml		
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 ml	2 x 30 ml	1 x 30 ml		
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml			

### Reconstitution, Mélange, Dilution, Titrage

Les solutions de Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 et Hematoxylin RE7107 sont pré-diluées. 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. Le DAB Chromogen RE7105 doit être dilué au 1/20 dans du DAB Substrate Buffer RE7106 avant emploi. 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

#### DAB CHROMOGEN

Contient <10% Biphényl-3,3',4,4'-Terayltetraamine.

GHS08: Danger pour la santé.

Mentions d'avertissement:

Danger.

H341: Susceptible d'induire des anomalies génétiques.

H350: Peut provoquer le cancer.

P201: Se procurer les instructions avant utilisation.

P202: Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.

P281: Utiliser l'équipement de protection individuel requis.

P308+313: EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.

P501: Éliminer le contenu/récipient dans.

Pour utilisateurs professionnels.

Ne pas mélanger les réactifs provenant de divers systèmes de détection.

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.<sup>3</sup>

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.
4. Solution(s) de restauration des enzymes.



5. Diluant de l'anticorps.
6. Anticorps primaire.
7. 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, 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).

1. Couper et monter les coupes sur des lames revêtues d'un adhésif adapté aux tissus.
2. Déparaffiner les coupes dans le xylène ou des substituts de xylène.
3. Réhydrater par l'intermédiaire d'alcools titrés.
4. Laver les lames à l'eau courante.
5. Mettre en œuvre la restauration des antigènes si nécessaire (voir **Recommandations d'utilisation** de l'anticorps primaire).
6. Laver les lames à l'eau désionisée.
7. Neutraliser la peroxydase endogène à l'aide de Peroxidase Block RE7101 pendant 5 minutes.
8. Laver dans du TBS, 2 fois 5 minutes.
9. Incuber avec le Protein Block RE7102 pendant 5 minutes.
10. Laver dans du TBS, 2 fois 5 minutes.
11. Incuber avec l'anticorps primaire dilué de façon optimale (voir **Recommandations d'utilisation** de l'anticorps primaire).
12. Laver dans du TBS, 2 fois 5 minutes.
13. Incuber avec le Biotinylated Secondary Antibody Novocastra™ RE7103 pendant 30 minutes.
14. Laver dans du TBS, 2 fois 5 minutes.
15. Incuber avec le Streptavidin-HRP RE7104 pendant 30 minutes.
16. Laver dans du TBS, 2 fois 5 minutes sous agitation légère.
17. Laisser se développer l'activité de la peroxydase avec la solution de travail DAB (voir **Solution de travail DAB**) pendant 5 minutes.
18. Rincer les lames à l'eau.
19. Procéder à la coloration de contraste avec le Hematoxylin RE7107.
20. Rincer les lames sous l'eau pendant 5 minutes.
21. Déshydrater, assécher et monter les coupes.

## **Solution de travail DAB**

Ajouter 50 µl de DAB Chromogen RE7105 à 1 ml de DAB Substrate Buffer RE7106. Utiliser dans les six heures qui suivent la préparation.

## **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 œuvre 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>4</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>5</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>6</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 ou le Streptavidin-HRP, 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

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>7</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. Les Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K ou RE7120-K doivent être utilisés 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 des Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ DAB (250 slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 et Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 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.

Ces produits sont stables jusqu'à la (aux) date(s) de péremption indiquée(s) sur l'étiquette du produit.

## Bibliographie

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979; 27:1131.
3. 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.
4. 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.
5. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## Amendements apportés à la version précédente

Non applicable.

## Date de publication

27 février 2015

# Peroxidase Detection System (250 tests)

Cod. prodotto: RE7110-K

# Peroxidase Detection System (500 tests)

Cod. prodotto: RE7120-K

# DAB (250 Slides)

Cod. prodotto: RE7190-K

# Biotinylated Secondary Antibody

Cod. prodotto: RE7103

# Streptavidin-HRP

Cod. prodotto: RE7104

## Uso previsto

Per uso diagnostico in vitro.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K e (500 tests) RE7120-K sono destinati alla visualizzazione degli anticorpi primari IgG di topo, IgM di topo e IgG di coniglio. Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 e Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 sono reagenti componenti di tali sistemi, destinati all'uso nella tecnica descritta di seguito. 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

La prima tecnica immunoperoxidasica è stata descritta da Nakane e Pierce.<sup>1</sup> A partire da quel momento, sono stati fatti molti progressi che hanno portato alle tecniche immunoperoxidasiche oggi comunemente in uso. Novocastra™ Peroxidase Detection Systems si basano sulla tecnica descritta da Guesdon.<sup>2</sup> Questi prodotti vengono impiegati nel corso di una tecnica immunostochimica (IHC), che consente l'identificazione qualitativa in microscopia ottica degli Epitopi in sezioni tissutali fissate in formalina e incluse in paraffina, attraverso fasi sequenziali intervallate da fasi di lavaggio. Se l'anticorpo primario lo richiede, prima della colorazione le sezioni tissutali vengono sottoposte a smascheramento degli epitopi. L'attività perossidasi endogena viene neutralizzata utilizzando Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Segue quindi l'applicazione di Novocastra™ Protein Block RE7102, per ridurre il legame aspecifico degli anticorpi primari e secondari. La sezione tissutale viene successivamente incubata con anticorpo primario diluito in maniera ottimale. Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 una formulazione di anticorpi secondari coniugati con biotina, che riconosce le immunoglobuline di topo e di coniglio, viene impiegato per determinare qualsiasi anticorpo primario legato ai tessuti. Successivamente, si applica Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, un coniugato streptavidina-perossidasi che si lega alla biotina presente sull'anticorpo secondario. Le sezioni vengono poi incubate con il substrato cromogeno, 3,3'-diaminobenzidina (DAB), preparato da Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 e da Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106, come descritto più avanti. La reazione con la perossidasi produce un precipitato visibile di colore marrone in corrispondenza del sito Epitopico. Le sezioni tissutali vengono controcolorate con Novocastra™ Hematoxylin RE7107 e coperte da vetrino coprioggetto. I risultati vengono interpretati mediante un microscopio ottico e sono utili nella diagnosi differenziale di processi fisiopatologici, che possono essere più o meno associati ad un particolare Epitopeo.

## Reagenti forniti

Per ulteriori informazioni su quali reagenti della seguente lista siano forniti in ciascun prodotto, vedere la tabella in basso.

1. Peroxidase Block RE7101. Perossido di idrogeno 3-4%.
2. Protein Block RE7102. Caseina 0,4% in tampone fosfato, con stabilizzatori, surfattante e Bronidox L 0,2% come conservante.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. IgM di capra anti-topo (5 µg/ml), IgG di cavallo anti-topo (10,5 µg/ml) e IgG di cavallo anti-coniglio (10,5 µg/ml) purificate per affinità, in tampone Tris con stabilizzatore proteico e 0,35% di ProClin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 - 1,4 µg/ml in tampone Tris, con stabilizzatore proteico e 0,35% di ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 3,3' - diaminobenzidina all'1,74% (p/v) in soluzione stabilizzante.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Soluzione tampone contenente lo ≤ 0.1% di perossido di idrogeno e conservante.
7. Hematoxylin RE7107. Ematosilina < 0.1%.

Reagente	Codice prodotto	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	DAB (250 Slides) RE7190-K	Biotinylated Secondary Antibody RE7103	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml			
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml			
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml		1 x 25 ml	

Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml			1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	1 x 3 ml		
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 ml	2 x 30 ml	1 x 30 ml		
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml			

### Ricostituzione, miscelazione, diluizione, titolazione

Le soluzioni Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 e Hematoxylin RE7107 sono prediluite. Non si consiglia la ricostituzione, la miscelazione, la diluizione o la titolazione di questi reagenti. L'ulteriore diluizione potrebbe causare una perdita di colorazione dell'Epitopeo. Tali eventuali variazioni devono essere convalidate dall'utente. Prima dell'uso, DAB Chromogen RE7105 va diluito 1/20 in DAB Substrate Buffer RE7106. L'ulteriore diluizione potrebbe causare una perdita di colorazione dell'Epitopeo. 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

#### DAB CHROMOGEN

Contiene <10% Biphenyl-3,3', 4,4'-Tetrayltetraamine.

GHS08: Pericolo per la salute.

Avvertenze: Pericolo.

H341: Sospettato di provocare alterazioni genetiche.

H350: Può provocare il cancro.

P201: Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.

P202: Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.

P281: Utilizzare il dispositivo di protezione individuale richiesto.

P308+313: IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.

P501: Smaltire il prodotto/recipiente in.

Una scheda di sicurezza del prodotto (MSDS) è disponibile su richiesta o dal sito [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Per uso professionale.

Non miscelare con reagenti di altri sistemi di determinazione.

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>3</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 immunocistochemica.
2. Tampone Tris (TBS) 50 mM a pH 7,6.
3. Soluzione/i per lo smascheramento Epitopeico.
4. Soluzione/i per lo smascheramento con enzimi.
5. Diluente per anticorpi.
6. Anticorpo primario.
7. Mezzo di montaggio.

#### B. Attrezzature necessarie ma non fornite

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

#### C. Metodologia

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

La combinazione dell'anticorpo primario, la sua diluizione, assieme 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).

1. Tagliare e montare le sezioni sui vetrini rivestiti da un adatto adesivo tissutale.
2. Deparaffinare le sezioni mediante xilene o suoi analoghi.

3. Reidratare mediante passaggi in alcool a gradazione decrescente.
4. Lavare i vetrini con acqua corrente.
5. Eseguire lo smascheramento Epitopeico come descritto (vedere **Raccomandazioni per l'uso** per l'anticorpo primario).
6. Lavare i vetrini con acqua deionizzata.
7. Neutralizzare la perossidasi endogena usando Peroxidase Block RE7101 per 5 minuti.
8. Lavare 2 volte in TBS per 5 minuti.
9. Incubare con Protein Block RE7102 per 5 minuti.
10. Lavare 2 volte in TBS per 5 minuti.
11. Incubare con anticorpo primario diluito in maniera ottimale (vedere **Raccomandazioni per l'uso** per l'anticorpo primario).
12. Lavare 2 volte in TBS per 5 minuti.
13. Incubare con Biotinylated Secondary Antibody RE7103 per 30 minuti.
14. Lavare 2 volte in TBS per 5 minuti.
15. Incubare con Streptavidin-HRP RE7104 per 30 minuti.
16. Lavare 2 volte in TBS per 5 minuti, scuotendo delicatamente.
17. Sviluppare l'attività perossidasi con soluzione di lavoro DAB (vedere **Soluzione di lavoro DAB**) per 5 minuti.
18. Sciacquare i vetrini.
19. Controcolorare con Hematoxylin RE7107.
20. Sciacquare i vetrini per 5 minuti.
21. Disidratare, chiarificare e montare le sezioni.

### Soluzione di lavoro DAB

Aggiungere 50 µl di DAB Chromogen RE7105 a 1 ml di DAB Substrate Buffer RE7106. Utilizzare entro sei ore dalla preparazione.

### 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 dei 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.\* 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 validi.

### Controllo negativo del tessuto

Va esaminato dopo il controllo positivo, per verificare la specificità della marcatura dell'Epitopee 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.\* 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>6</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 o Streptavidin-HRP e con 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 Epitopeico.

### 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 immunoistochimici, un risultato negativo significa che l'Epitopee 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

L'immunoistochimica 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>7</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™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K e RE7120-K sono destinati all'uso su sezioni tissutali incluse in paraffina con specifici requisiti di fissazione. Un'espressione Epitopeica 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™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 e Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 è stato convalidato utilizzando una gamma di anticorpi primari Novocastra™ IgG di topo, IgM di topo e IgG di coniglio. Questi prodotti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

### **Riferimenti bibliografici**

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979; 27:1131.
3. 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.
4. 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.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

### **Modifiche alla pubblicazione precedente**

Non applicabile.

### **Data di pubblicazione**

27 febbraio 2015

# Peroxidase Detection System (250 tests)

Produkt Nr.: RE7110-K

# Peroxidase Detection System (500 tests)

Produkt Nr.: RE7120-K

# DAB (250 Slides)

Produkt Nr.: RE7190-K

# Biotinylated Secondary Antibody

Produkt Nr.: RE7103

# Streptavidin-HRP

Produkt Nr.: RE7104

## Verwendungszweck

*Für in-vitro-Diagnostik.*

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K und (500 tests) RE7120-K sind zur Visualisierung primärer Maus-IgG-, Maus-IgM- und Kaninchen-IgG-Antikörper bestimmt. Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 und Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 sind Komponentenreagenzien dieser Systeme, die zur Verwendung im unten beschriebenen Verfahren bestimmt 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

Die erste Immunperoxidasetechnik wurde von Nakane und Pierce beschrieben.<sup>1</sup> Seitdem haben viele Entwicklungen auf diesem Gebiet zu den heute weit verbreiteten Immunperoxidasetechniken geführt. Die Novocastra™ Peroxidase Detection Systems basieren auf der von Guesdon beschriebenen Technik.<sup>2</sup> Diese Produkte werden in einem immunhistochemischen (IHC-) Verfahren verwendet, das den qualitativen Nachweis von Epitopen in Schnitten von formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe in mehreren aufeinander folgenden Schritten mit dazwischen liegenden Waschschrritten mittels Lichtmikroskopie gestattet. Falls der primäre Antikörper dies verlangt, werden die Schnitte vor der Färbung einer Epitopdemaskierung unterworfen. Die endogene Peroxidaseaktivität wird mithilfe des Novocastra™ Peroxidase Block RE7101 neutralisiert. Daraufhin wird der Novocastra™ Protein Block RE7102 angewandt, um die unspezifische Bindung von primären und sekundären Antikörpern zu verringern. Der Schnitt wird daraufhin mit dem optimal verdünnten primären Antikörper inkubiert. Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 eine biotin-konjugierte Formulierung aus sekundären Antikörpern, die Maus- und Kaninchenimmunglobuline erkennt, wird zum Nachweis eines gewebegebundenen primären Antikörpers verwendet. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, ein Streptavidin-Peroxidasekonjugat, wird dann zugegeben und bindet sich an das auf dem sekundären Antikörper vorliegende Biotin. Die Schnitte werden mit dem Substrat/Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), das aus Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 und Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106 wie im Folgenden beschrieben präpariert wurde, weiter inkubiert. Die Reaktion mit der Peroxidase produziert ein sichtbares braunes Präzipitat an der Stelle des Epitopes. Die Schnitte werden mit Novocastra™ Hematoxylin RE7107 gegengefärbt und abgedeckt. Die Ergebnisse werden mithilfe eines Lichtmikroskops interpretiert und unterstützen die Differentialdiagnose pathophysiologischer Prozesse, die mit einem bestimmten Epitope assoziiert sein könnten.

## Gelieferte Reagenzien

Die Einzelheiten der in jedem Produkt enthaltenen Reagenzien aus der folgenden Liste werden in der unten aufgeführten Tabelle angegeben.

1. Peroxidase Block RE7101. 3-4% Wasserstoffperoxid.
2. Protein Block RE7102. 0,4% Casein in einer phosphatgepufferten physiologischen Kochsalzlösung mit Stabilisatoren, oberflächenaktiver Substanz und 0,2% Bronidox L als Konservierungsmittel.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Affinitätsgereinigtes, Anti-Maus-IgM (5 µg/ml) der Ziege, Anti-Maus-IgG (10,5 µg/ml) des Pferdes und Anti-Kaninchen-IgG (10,5 µg/ml) des Pferdes in Tris gepufferter physiologischer Kochsalzlösung mit Proteinestabilisator und 0,35% ProClin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 bis 1,4 µg/ml in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung mit Proteinestabilisator und 0,35% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74 Gew.-% 3,3'-Diaminobenzidin in einer Stabilisatorlösung.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Pufferlösung mit ≤ 0,1% Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel.
7. Hematoxylin RE7107. < 0,1% Hämatoxylin.

Reagenz	Produktnummer	Peroxidase Detection System (250 tests) RE 7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	DAB (250 Slides) RE7190-K	Biotinylated Secondary Antibody RE7103	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml			
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml			

Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml		1 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml			1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	1 x 3 ml		
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 ml	2 x 30 ml	1 x 30 ml		
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml			

### Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration

Die Lösungen von Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 und Hematoxylin RE7107 sind vorverdünnt. Rekonstitution, Mischen, Verdünnung oder Titration dieser Reagenzien wird nicht empfohlen. Eine weitere Verdünnung könnte zum Verlust der Epitopefärbung führen. Der Benutzer muss solche Änderungen zuvor validieren. Das DAB Chromogen RE7105 muss vor dem Gebrauch in DAB Substrate Buffer RE7106 auf 1/20 verdünnt werden. Eine weitere Verdünnung könnte zum Verlust der Epitopefärbung 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

#### DAB CHROMOGEN

Enthält 10% Biphenyl-3,3',4,4'-Tetrayltetraamine.

GHS08: Gesundheitsgefahr.

Signalwörter: Gefahr.

H341: Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.

H350: Kann Krebs erzeugen.

P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P202: Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.

P281: Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.

P308+313: BEI Exposition oder falls betroffen:.

P501: Inhalt/Behälter zuführen.

Ein Material Sicherheits-Datenblatt ist auf Anfrage von [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com) erhältlich.

Für geschultes Fachpersonal.

Reagenzien aus unterschiedlichen Nachweissystemen dürfen nicht gemischt werden.

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.<sup>3</sup> 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) pH7,6.
3. Epitopedemaskierungslösung(en).
4. Enzymdemaskierungslösung(en).
5. Antikörperverdünnung.
6. Primärer Antikörper.
7. Aufbringungsmedium.

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

1. Für die Epitopedemaskierung 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 und seiner Verdünnung zusammen mit 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.



1. Das Präparat schneiden und auf Objektträger aufbringen, die mit einem geeigneten Gewebekleber beschichtet sind.
2. Schnitte mit Xylol oder Xylolersatzstoffen von Paraffin säubern.
3. Mit abgestuft konzentriertem Alkohol rehydrieren.
4. Die Objektträger unter laufendem Leitungswasser abspülen.
5. Epitopedemaskierung wie erforderlich durchführen (siehe **Gebrauchsempfehlungen** für den primären Antikörper).
6. Die Objektträger unter entionisiertem Wasser abspülen.
7. Die endogene Peroxidase 5 Minuten lang mit Peroxidase Block RE7101 neutralisieren.
8. 2 X 5 Minuten lang in TBS waschen.
9. 5 Minuten lang mit Protein Block RE7102 inkubieren.
10. 2 X 5 Minuten lang in TBS waschen.
11. Mit dem optimal verdünnten primären Antikörper inkubieren (siehe **Gebrauchsempfehlungen** für den primären Antikörper).
12. 2 X 5 Minuten lang in TBS waschen.
13. Mit Biotinylated Secondary Antibody RE7103 30 Minuten lang inkubieren.
14. 2 X 5 Minuten lang in TBS waschen.
15. Mit Streptavidin-HRP RE7104 30 Minuten lang inkubieren.
16. Die Schnitte in TBS-Puffer 2 x 5 Minuten lang mit sanfter Kippbewegung spülen.
17. Die Peroxidaseaktivität mit DAB-Arbeitslösung (siehe **DAB-Arbeitslösung**) 5 Minuten lang entwickeln.
18. Objektträger in Wasser spülen.
19. Mit Hematoxylin RE7107 gegenfärben.
20. Objektträger 5 Minuten lang in Wasser abspülen.
21. Schnitte dehydrieren, reinigen und aufbringen.

### **DAB-Arbeitslösung**

50 µl DAB Chromogen RE7105 zu 1 ml DAB Substrate Buffer RE7106 hinzugeben. Innerhalb von sechs Stunden nach Vorbereitung verwenden.

### **Qualitätskontrolle**

Unterschiede bei der Gewebearbeitung 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>4</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 ZielEpitopemarkierung 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 Färberegebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.<sup>5</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>6</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 bzw. Streptavidin-HRP 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 Epitopestelle 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 Epitope nicht nachgewiesen wurde. Ein negatives Ergebnis bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, dass das Epitope in den getesteten Zellen / im getesteten Gewebe nicht vorlag. Bei Bedarf sollte zur Identifizierung falsch-negativer Reaktionen eine Gruppe von Antikörpern verwendet werden.

### **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-Objektträgers sowie Bewertung der Färberegebnisse. 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>7</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™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K bzw. RE7120-K dienen zur Verwendung auf paraffineingebetteten Schnitten mit spezifischen Fixierungsanforderungen.

Es kann insbesondere bei Neoplasmen zu einer unerwarteten Epitopeexpression kommen. Die klinische Bewertung eines gefärbten Gewebeschnitts muss eine morphologische Analyse und die Auswertung der entsprechenden Kontrollen einschließen.

### **Leistungsmerkmale**

Die Leistung von Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 und Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 wurde mithilfe einer Reihe primärer Novocastra™ Maus-IgG-, Maus-IgM- und Kaninchen-IgG-Antikörper validiert. Diese Produkte bleiben bis zum auf dem Behälteretikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

### **Literatur**

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1979; 27:1131.
3. 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.
4. 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.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

### **Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe**

Nicht zutreffend.

### **Ausgabedatum**

27 Februar 2015

# Peroxidase Detection System (250 tests)

Referencia: RE7110-K

# Peroxidase Detection System (500 tests)

Referencia: RE7120-K

# DAB (250 Slides)

Referencia: RE7190-K

# Biotinylated Secondary Antibody

Referencia: RE7103

# Streptavidin-HRP

Referencia: RE7104

## Indicaciones de uso

### Para uso diagnóstico in vitro.

Los sistemas de detección Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K y (500 tests) RE7120-K están indicados para visualizar anticuerpos primarios IgG e IgM de ratón, e IgG de conejo. Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 y Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 son reactivos componentes de estos sistemas, cuyo uso está indicado en el procedimiento descrito más abajo. 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

La primera técnica de la inmunoperoxidasa fue descrita por Nakane and Pierce<sup>1</sup>; desde entonces, se han producido muchos avances que han dado lugar a las técnicas de la inmunoperoxidasa utilizadas actualmente. Los productos Novocastra™ Peroxidase Detection Systems se basan en la técnica descrita por Guesdon<sup>2</sup>. Estos productos se usan en un procedimiento inmunohistoquímico, lo que permite la identificación cualitativa, por microscopía óptica, de antígenos en secciones de tejidos fijadas con formol e incluidas en parafina, mediante pasos sucesivos, con pasos intermedios de lavado. Si se necesita a causa del anticuerpo primario, las secciones se someten a recuperación de epítomos antes de la tinción. La actividad de la peroxidasa endógena se neutraliza con Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Esto va seguido de la aplicación de Novocastra™ Protein Block RE7102 para reducir la unión inespecífica de anticuerpos primarios y secundarios. A continuación, la sección se incuba con anticuerpo primario, con una dilución óptima. Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 una formulación de anticuerpo secundario conjugado con biotina que reconoce inmunoglobulinas murinas y de conejo, se usa para detectar cualquier anticuerpo primario unido al tejido. Seguidamente, se aplica Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, y se une a la biotina presente en el anticuerpo secundario. Las secciones se incuban más tiempo con substrato-cromógeno, 3,3'-diaminobenzidina (DAB), preparado a partir de Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 y Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106 tal y como se describe más abajo. La reacción con la peroxidasa produce un precipitado pardo, visible en el lugar donde se encuentra el antígeno. Las secciones se someten a contratinción con Novocastra™ Hematoxylin RE7107 y se coloca un cubreobjetos. Los resultados se interpretan utilizando un microscopio óptico y son de ayuda en el diagnóstico diferencial de los procesos fisiopatológicos, que pueden estar o no vinculados a un determinado antígeno.

## Reactivos suministrados

En la tabla que aparece más abajo se ofrecen detalles de los reactivos de la lista siguiente que se suministran con cada producto.

1. Peroxidase Block RE7101. Peróxido de hidrógeno al 3-4%.
2. Protein Block RE7102. Caseína al 0,4% en solución salina con tampón fosfato, con estabilizantes, agente tensioactivo y Bronidox L al 0,2% como conservante.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón (5 µg/ml), anticuerpos de caballo anti-IgG de ratón (10,5 µg/ml) y anticuerpos de caballo anti-IgG de conejo (10,5 µg/ml), purificados mediante cromatografía por afinidad, en solución salina tamponada con Tris y estabilizante de proteína con ProClin™ 950 al 0,35%.
4. Streptavidin-HRP RE7104. De 1 a 1,4 µg/ml en solución salina tamponada con tris, con estabilizante de proteínas y ProClin™ 950 al 0,35%.
5. DAB Chromogen RE7105. 3,3'-diaminobenzidina al 1,74% peso/volumen, en solución estabilizante.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Solución tamponada que contiene peróxido de hidrógeno al ≤ 0.1% y conservante.
7. Hematoxylin RE7107. Hematoxilina al < 0.1%.

Reactivo	Referencia	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	DAB (250 Slides) RE7190-K	Biotinylated Secondary Antibody RE7103	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml			
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml			

Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml		1 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml			1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	1 x 3 ml		
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 ml	2 x 30 ml	1 x 30 ml		
Hematoxylin	RE7107	1 x 25ml	2 x 25 ml			

### Reconstitución, mezcla, dilución y titulación

Las soluciones de Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 y Hematoxylin RE7107 están prediluidas. No se recomienda reconstituir, mezclar, diluir ni titular estos reactivos. Una mayor dilución puede provocar la pérdida de la tinción del antígeno. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo. Es necesario diluir DAB Chromogen RE7105 a 1/20 en DAB Substrate Buffer RE7106 antes de usarlo. Una mayor dilución puede provocar la pérdida de la tinción del antígeno. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo.

### Almacenamiento y estabilidad

n realizar simultáneamente controles positivos y negativos con muestras de paciente.

### Preparación de las muestras

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

### Advertencias y precauciones

#### DAB CHROMOGEN

Contiene <10% Bifenil-3,3', 4,4'-Tetrayltetraamine.

GHS08: Peligro para la salud.

Palabras de advertencia: Peligro.

H341: Se sospecha que provoca defectos genéticos.

H350: Puede provocar cáncer.

P201: Pedir instrucciones especiales antes del uso.

P202: No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.

P281: Utilizar el equipo de protección individual obligatorio.

P308+313: EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

P501: Eliminar el contenido/el recipiente en.

Está disponible una Hoja de información sobre la seguridad del material, previa petición, o en [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Para usuarios profesionales.

No mezcle reactivos procedentes de sistemas de detección diferentes.

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.<sup>3</sup> No pipetee nunca los reactivos con la boca; 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 del antígeno.
4. Soluciones de recuperación de la enzima.
5. Diluyente de anticuerpos.
6. Anticuerpo primario.
7. 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 el sistema de detección los debe validar 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).

1. Corte y monte las secciones recubiertas con un adhesivo de tejidos adecuado.
2. Desparafine las secciones en xileno o en sustitutos del xileno.
3. Rehidrate en alcoholes de gradación decreciente.
4. Lave los portaobjetos en agua corriente.
5. Realice la recuperación del antígeno tal y como se necesite (vea las **Recomendaciones de uso** del anticuerpo primario).
6. Lave los portaobjetos en agua desionizada.
7. Neutralice la peroxidasa endógena con Peroxidase Block RE7101 durante 5 minutos.
8. Lave en TBS durante 2 x 5 minutos.
9. Incube en Protein Block RE7102 durante 5 minutos.
10. Lave en TBS durante 2 x 5 minutos.
11. Incube con anticuerpo de dilución óptima (vea las **Recomendaciones de uso** del anticuerpo primario).
12. Lave en TBS durante 2 x 5 minutos.
13. Incube con Biotinylated Secondary Antibody RE7103 durante 30 minutos.
14. Lave en TBS durante 2 x 5 minutos.
15. Incube en Streptavidin-HRP RE7104 durante 30 minutos.
16. Lave en TBS durante 2 x 5 minutos, aplicando una suave oscilación.
17. Revele la actividad peroxidásica con solución de trabajo DAB (vea **Solución de trabajo DAB**) durante 5 minutos.
18. Aclare los portaobjetos con agua.
19. Realice la contratinción con Hematoxylin RE7107.
20. Aclare los portaobjetos durante 5 minutos.
21. Deshidrate, aclare y monte las secciones.

### Solución de trabajo DAB

Añada 50 µl de DAB Chromogen RE7105 a 1 ml de DAB Substrate Buffer RE7106. Úsela antes de transcurridas seis horas desde la preparación.

### 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 autopsia, biopsia 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>4</sup> En cuanto al tejido de control positivo recomendado, vea las Instrucciones de uso del anticuerpo primario. Si el tejido de control positivo no muestra tinción positiva, los resultados de las muestras analizadas deben considerarse no válidos.

### Control tisular negativo

Debe 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 tejido de control negativo recomendado, vea las Instrucciones de uso del anticuerpo primario. Como alternativa, 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 debe 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>5</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 la biotina endógena<sup>6</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 o Streptavidin-HRP, y con sustrato-cromógeno, 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

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>7</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.

Los productos Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K o RE7120-K están pensados para su empleo 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™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/(500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 y Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 se ha validado con una gama de anticuerpos primarios de IgG e IgM murinas e IgG de conejo. Estos productos son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del producto.

## Bibliografía

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979; 27:1131.
3. 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.
4. 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.
5. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## Correcciones a la publicación anterior

No aplicable.

## Fecha de publicación

27 de febrero de 2015

# Peroxidase Detection System (250 tests)

N.º do produto: RE7110-K

# Peroxidase Detection System (500 tests)

N.º do produto: RE7120-K

# DAB (250 Slides)

N.º do produto: RE7190-K

# Biotinylated Secondary Antibody

N.º do produto: RE7103

# Streptavidin-HRP

N.º do produto: RE7104

## Utilização prevista

*Para utilização em diagnósticos in vitro.*

Os sistemas Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K e (500 tests) RE7120-K são próprios para a visualização de anticorpos primários da IgG de rato, da IgM de rato e da IgG de coelho. Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 e Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 são reagentes componentes destes sistemas, concebidos para serem utilizados no procedimento descrito a seguir. 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 primeira técnica de imunoperoxidase foi registada por Nakane e Pierce.<sup>1</sup> Desde essa altura, ocorreram muitos desenvolvimentos que resultaram nas técnicas de imunoperoxidase normalmente utilizadas actualmente. Os Novocastra™ Peroxidase Detection Systems baseiam-se na técnica descrita por Guesdon.<sup>2</sup> Estes produtos são empregados num procedimento imunohistoquímico (IHQ), o qual permite 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. Caso o anticorpo primário assim o exija, as secções são submetidas à recuperação de epitopos antes de serem coradas. A actividade endógena da peroxidase é neutralizada através da aplicação de Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Segue-se a isto a aplicação do Novocastra™ Protein Block RE7102, para reduzir a ligação não específica dos anticorpos primários e secundários. Subsequentemente, a secção é incubada com um anticorpo primário a uma diluição óptima. O produto Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 uma formulação de anticorpos secundários conjugados com biotina que reconhece imunoglobulinas de rato e coelho, é utilizado para detectar qualquer anticorpo primário ligado aos tecidos. O produto Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, um conjugado de estreptavidina e peroxidase, é então aplicado, e liga-se à biotina presente no anticorpo secundário. As secções são ainda incubadas com o substrato/cromogénio 3,3'-diaminobenzidina (DAB), um produto da combinação de Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 com Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106, conforme descrito a seguir. A reacção com a peroxidase produz um precipitado visível, de cor castanha, no local do antígeno. As secções são contrastadas com Novocastra™ Hematoxylin RE7107 e cobertas com uma lamela. Os resultados são interpretados por meio de um microscópio óptico, e ajudam a formular o diagnóstico diferencial dos processos fisiopatológicos, os quais podem ou não estar associados a antígenos específicos.

## Reagentes fornecidos

Os pormenores desses reagentes, extraídos da lista que se segue e fornecidos em cada produto, são apresentados na tabela a seguir:

1. Peroxidase Block RE7101. Peróxido de hidrogénio a 3-4%.
2. Protein Block RE7102. Caseína a 0,4% em soro com tampão fosfato e produtos estabilizadores e tensio-activos, bem como Bronidox L a 0,2% como produto conservante.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. IgM de cabra anti-ratino, purificada por afinidade (5µg/ml), IgG de cavalo anti-ratino (10,5µg/ml) e IgG de cavalo anti-coelho (10,5µg/ml) em solução salina tamponada com tris, com estabilizador de proteína e ProClin™ 950 a 0,35%.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 a 1,4 µg/ml em solução salina tamponada com tris, com estabilizador de proteína e ProClin™ 950 a 0,35%.
5. DAB Chromogen RE7105. 3,3'-diaminobenzidina a 1,74% p/v, numa solução estabilizadora.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Solução tamponada contendo peróxido de hidrogénio a ≤ 0.1% e um produto conservante.
7. Hematoxylin RE7107. Hematoxilina a < 0.1%.

Reagente	Número do produto	Peroxidase Detection System (250 tests) RE 7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE 7120-K	DAB (250 Slides) RE7190-K	Biotinylated Secondary Antibody RE7103	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25ml	2 x 25ml			
Protein Block	RE7102	1 x 25ml	2 x 25ml			

Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25ml	2 x 25ml		1 x 25ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25ml	2 x 25ml			1 x 25ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3ml	1 x 3ml	1 x 3ml		
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	2 x 30ml	1 x 30ml		
Hematoxylin	RE7107	1 x 25ml	2 x 25ml			

### Reconstituição, mistura, diluição, titulação

As soluções Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 e Hematoxylin RE7107 são pré-diluídas. Não se recomenda a reconstituição, mistura, diluição ou titulação destes reagentes. Qualquer diluição adicional poderá resultar na perda de coloração do antígeno. O utilizador deve validar quaisquer alterações dessa natureza. O DAB Chromogen RE7105 tem de ser diluído à razão 1/20 em DAB Substrate Buffer RE7106 antes de ser utilizado. 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

#### DAB CHROMOGEN

Contém <10% Bifenil-3,3', 4,4'-Tetrailetreamine.

GHS08: Perigo para a saúde.

Palavras-sinal: Perigo.

H341: Suspeito de provocar anomalias genéticas.

H350: Pode provocar cancro.

P201: Pedir instruções específicas antes da utilização.

P202: Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança.

P281: Usar o equipamento de protecção individual exigido.

P308+313: EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

P501: Eliminar o conteúdo/recipiente em.

Encontra-se disponível uma Ficha de Dados de Segurança do Material, mediante pedido ou através do site [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)  
Apenas para utilizadores profissionais.

Não misturar reagentes de diferentes sistemas de detecção.

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<sup>3</sup>. 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 mas não fornecidos

1. Solventes comuns utilizados em imunohistoquímica.
2. 50mM tris-buffered saline (TBS) pH7,6.
3. Solução/soluções para a recuperação de antígenos.
4. Solução/soluções para a recuperação de enzimas.
5. Diluente de anticorpos.
6. Anticorpo primário.
7. 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 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).

1. Cortar e montar secções em lâminas revestidas de um tecido adesivo apropriado.
2. Desparafinizar as secções em xileno ou substitutos de xileno.
3. Reidratar através de álcoois graduados.
4. Lavar as lâminas em água corrente de torneira.
5. Efectuar a recuperação do antígeno conforme necessário (consultar a secção **Recomendações sobre a utilização** para obter informações sobre o anticorpo primário).
6. Lavar as lâminas em água desionizada.
7. Neutralizar a peroxidase endógena, empregando para tal Peroxidase Block RE7101 durante 5 minutos.
8. Lavar em TBS durante 2 x 5 minutos.
9. Incubar as secções com Protein Block RE7102 durante 5 minutos.
10. Lavar em TBS durante 2 x 5 minutos.
11. Incubar com anticorpo primário a uma diluição óptima (consultar a secção **Recomendações sobre a utilização** para obter informações sobre o anticorpo primário).
12. Lavar em TBS durante 2 x 5 minutos.
13. Incubar com Biotinylated Secondary Antibody RE7103 durante 30 minutos.
14. Lavar em TBS durante 2 x 5 minutos.
15. Incubar com Streptavidin-HRP RE7104 durante 30 minutos.
16. Lavar em tampão TBS durante 2 x 5 minutos, agitando levemente.
17. Desenvolver a actividade da peroxidase com a solução de trabalho DAB (consultar **Solução de trabalho DAB**) durante 5 minutos.
18. Enxaguar as lâminas em água.
19. Contrastar com Hematoxylin RE7107.
20. Enxaguar as lâminas em água durante 5 minutos.
21. Desidratar, soltar e montar as secções.

### **Solução de trabalho DAB**

Adicionar 50 µl de DAB Chromogen RE7105 a 1ml de DAB Substrate Buffer RE7106. Utilizar dentro de seis horas após a preparação.

### **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 indicados 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> (p. ex. no fígado, mama, cérebro ou rim). Para 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 ou com Streptavidin-HRP 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 falso-negativas.

## Limites

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 controlos, e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto dos antecedentes clínicos do doente e de outros testes de diagnóstico.

Os produtos Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K ou RE7120-K são próprios para ser utilizados em secções envolvidas em parafina com requisitos de fixação específicos. 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 controlos apropriados.

## Características de desempenho

O desempenho do Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 e Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 foi validado através da utilização de uma série de anticorpos primários Novocastra™ de IgG de rato, de IgM de rato e de IgG de coelho. Estes produtos permanecem estáveis até ao(s) prazo(s) de validade impresso(s) no(s) rótulo(s) do produto.

## Bibliografia

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979; 27:1131.
3. 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.
4. 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.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## Emendas da edição anterior

Não aplicável.

## Data de emissão

27 de Fevereiro de 2015

# Peroxidase Detection System (250 tests)

Produktnr.: RE7110-K

# Peroxidase Detection System (500 tests)

Produktnr.: RE7120-K

# DAB (250 Slides)

Produktnr.: RE7190-K

# Biotinylated Secondary Antibody

Produktnr.: RE7103

# Streptavidin-HRP

Produktnr.: RE7104

## Avsedd användning

*För in vitro diagnostisk användning.*

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K och (500 tests) RE7120-K är till för visualiseringen av mus IgG, mus IgM och kanin IgG primära antikroppar. Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 och Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 är ingående reagens i dessa system som är avsedda för användning i nedan beskrivna procedur. 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.

## Metodens princip

Den första immunperoxidastekniken rapporterades av Nakane och Pierce,<sup>1</sup> sedan dess har mycket utvecklats vilket har lett till den immunperoxidastekniken som är vanlig idag. Novocastra™ Peroxidase Detection Systems är baserat på tekniken beskriven av Guesdon.<sup>2</sup> Dessa produkter används i en immunhistokemisk procedur (IHC) som tillåter kvalitativ identifikation med ljusmikroskopi av Epitoper i formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad via sekvenssteg med inlagda tvättsteg. Om den primära antikroppen så kräver undergår sektionerna epitopåtvättning före färgning. Endogent peroxidaktivitet neutraliseras genom Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Detta följs av applicering av Novocastra™ Protein Block RE7102 för att minska ospecifik bindning av primära och sekundära antikroppar. Sektionen inkuberas sedan med optimalt utspädd primär antikropp. Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 en biotinkonjugerad sekundär antikropsformulering som igenkänner immunoglobuliner från mus och kanin används för att upptäcka vävnadsbunden primär antikropp. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, ett streptavidinperoxidaskonjugat appliceras sedan och binds till biotinet som finns på den sekundära antikroppen. Sektionerna inkuberas vidare med substrat/kromogen, 3,3' -diaminobenzidin (DAB) som bereds med Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 och Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106 enligt beskrivning nedan. Reaktion med peroxidas ger en synlig brun precipitering på Epitopeområdet. Sektioner kontrastfärgas med Novocastra™ Hematoxilin RE7107 och täcks med objektglas. Resultaten tolkas med ljusmikroskop och bidrar till differentialdiagnosen av patofysiologiska processer som eventuellt kan associeras till ett särskilt Epitope.

## Tillhandahållna reagens

Uppgifter om reagens från följande lista som tillhandahålls med varje produkt ges i tabellen nedan.

1. Peroxidase Block RE7101. 3-4 % Väteperoxid.
2. Protein Block RE7102. 0,4 % kasein i fosfatbuffrad koksalltösning med stabiliseringsmedel, ytaktivt medel och 0,2 % Bronidox L som konserveringsmedel.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Affinitetsrenad get antimus IgM (5µg/ml), häst antimus IgG (10,5µg/ml) och häst antikanin IgG (10,5µg/ml) i trisbuffrad koksalltösning med proteinstabilisator och 0,35 % ProClin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 till 1,4µg/ml i trisbuffrad koksalltösning med proteinstabilisator och 0,35 % ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74 % w/v 3,3' - diaminobenzidin , i en stabiliseringslösning.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Buffrad lösning innehållandes 0,1% väteperoxid och konserveringsmedel.
7. Hematoxilin RE7107. < 0,1 % Hematoxilin.

Reagens	Produkt-numme	Peroxidase Detection System (250 tests) RE 7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE 7120-K	DAB (250 Slides) RE7190-K	Biotinylated Secondary Antibody RE7103	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25ml	2 x 25 ml			
Protein Block	RE7102	1 x 25ml	2 x 25 ml			
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25ml	2 x 25 ml		1 x 25ml	

Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25ml	2 x 25ml			1 x 25ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3ml	1 x 3ml	1 x 3ml		
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	2 x 30ml	1 x 30ml		
Hematoxylin	RE7107	1 x 25ml	2 x 25ml			

### Rekonstitution, blandning, spädning, titrering

Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 och Hematoxylin RE7107 lösningar är förspädda. Rekonstitution, blandning, spädning eller titrering av dessa reagens rekommenderas inte. Fortsatt spädning kan resultera i förlust av Epitopefärgning. Användaren måste kontrollera sådana förändringar.

DAB Chromogen RE7105 kräver utspädning 1/20 i DAB Substrate Buffer RE7106 före användning. Fortsatt spädning kan resultera i förlust av Epitopefärgning. Användaren måste kontrollera sådana förändringar.

### Förvaring och stabilitet

Förvara vid 2–8 °C. Frys 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

Det rekommenderade fixeringsmedlet för paraffinbäddade vävnadssnitt är 10 % neutralbuffrat formalin.

### Varningar och försiktighetsåtgärder

#### DAB CHROMOGEN

Innehåller Bifenyl-3,3', 4,4'-Tetrayltetraamine.

GHS08: Hälsofara.

Signalord: Fara.

H341: Misstänks kunna orsaka genetiska defekter.

H350: Kan orsaka cancer.

P201: Inhämta särskilda instruktioner före användning.

P202: Använd inte produkten innan du har läst och förstått säkerhetsanvisningarna.

P281: Använd föreskriven personlig skyddsutrustning.

P308+313: Vid exponering eller misstanke om exponering Sök läkarhjälp.

P501: Innehållet/Behållaren lämnas till.

Materialsäkerhetsdatablad finns att få på begäran eller från [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

För professionella användare.

Blanda inte reagens från olika detektionssystem.

Prover, innan och efter fixering samt all material som utsätts för dem bör hanteras som om de överför infektioner och kastas enligt gällande försiktighetsåtgärder.<sup>3</sup>

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. 50mM tris-buffrad koksalltösning (TBS) pH7,6.
3. Epitopeätverinningslösningar.
4. Enzymätverinningslösningar.
5. Antikroppslösning.
6. Primär antikropp.
7. Monteringsmedium.

### B. Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

1. Utrustning som krävs för Epitopeätverinning 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 detektionssystemet bör kontrolleras av användare genom en serie kända positiva och negativa kontroller.**

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

1. Klipp och montera sektionerna på objektglas bekladda med lämplig vävnadsklister.
2. Avparaffinera sektionerna i xylene eller xylenersättningsmedel.
3. Avhydratisera genom graderad spirit.
4. Tvätta objektglasen under rinnande krannvatten.
5. Utför Epitopeätverinning enligt behov (se **Rekommendationer vid användning** för primära antikroppar).
6. Tvätta objektglasen i avjoniserat vatten.

7. Neutralisera endogent peroxidas med Peroxidase Block RE7101 i 5 minuter.
8. Tvätta i TBS i 2 x 5 minuter.
9. Inkubera med Protein Block RE7102 i 5 minuter.
10. Tvätta i TBS i 2 x 5 minuter.
11. Inkubera med optimalt spädd primär antikropp (se **Rekommendationer vid användning** för primär antikropp).
12. Tvätta i TBS i 2 x 5 minuter.
13. Inkubera med Biotinylated Secondary Antibody RE7103 i 30 minuter.
14. Tvätta i TBS i 2 x 5 minuter.
15. Inkubera med Streptavidin-HRP RE7104 i 30 minuter.
16. Tvätta i TBS 2 x 5 minuter och gunga varsamt.
17. Utveckla peroxididasaktivitet med DAB brukslösning (se **DAB brukslösning**) i 5 minuter.
18. Skölj objektglaset i vatten.
19. Kontrastfärga med Hematoxylin RE7107.
20. Skölj objektglaset i vatten i 5 minuter.
21. Avhydratisera, rensa och montera sektionerna.

## DAB brukslösning

Tillsätt 50µl av DAB Chromogen RE7105 till 1ml av DAB Substrate Buffer RE7106. Använd inom sex timmar efter beredning.

## 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 färska obduktions-/biopsi-/kirurgiprover 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>4</sup> För rekommenderad positiv 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 målEpiteoetet 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. Ospezifisk färgning, om det förekommer, har ofta ett diffust 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 ospezifiskt.<sup>5</sup> Falskt positiva resultat kan ses p.g.a. icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erytrocyter), endogent peroxididas (cytokrom C), eller endogent biotin<sup>6</sup> (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure). För att skilja endogen enzymaktivitet eller ospezifisk enzymbindning från specifik immunreaktivitet kan ytterligare patientvävnader färgas exklusivt med respektive substratkromogen eller Streptavidin-HRP, och substrat-kromogen. Om specifik färgning sker i den negativa vävnadskontrollen bör resultat med patientprover anses vara ogiltiga.

## Negativ reagenskontroll

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

## Patientvävnad

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

## 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™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K eller RE7120-K är avsedda för användning på paraffinbäddade sektioner med specifika fixeringskrav. Övrigt Epiteoettryck kan ske, speciellt i neoplasmer. Morfologisk analys och utvärdering av lämpliga kontroller måste ingå i den kliniska tolkningen av alla färgade vävnadssnitt.

## Prestanda

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 och Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 har kontrollerats med en rad Novocastra™ som IgG, sekundär IgM och kanin IgG primära antikroppar. Dessa produkter håller sig stabila fram till utgångsdatumet som är tryckt på produktens etikett

## **Bibliografi**

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1979; 27:1131.
3. 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.
4. 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.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## **Rättelser av tidigare utgivning**

Gäller inte.

## **Utgivningsdatum**

27 februari 2015

# Peroxidase Detection System (250 tests)

Κωδικός είδους: RE7110-K

# Peroxidase Detection System (500 tests)

Κωδικός είδους: RE7120-K

# DAB (250 Slides)

Κωδικός είδους: RE7190-K

# Biotinylated Secondary Antibody

Κωδικός είδους: RE7103

# Streptavidin-HRP

Κωδικός είδους: RE7104

## Χρήση για την οποία προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Τα Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K και (500 tests) RE7120-K προορίζονται για την οπτικοποίηση πρωτογενών αντισωμάτων IgG ποντικού, IgM ποντικού και IgG κουνελιού. Τα Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 και Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 είναι συστατικά αντιδραστήρια των συστημάτων αυτών, τα οποία προορίζονται για χρήση στη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω. 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 πρώτη τεχνική ανοσουπεροξειδάσης αναφέρθηκε από τους Nakane και Pierce.<sup>1</sup> Έκτοτε, έχουν σημειωθεί πολλές εξελίξεις που οδήγησαν στις τεχνικές ανοσουπεροξειδάσης, οι οποίες χρησιμοποιούνται συνήθως σήμερα. Τα συστήματα ανίχνευσης υπεροξειδάσης Novocastra™ βασίζονται στην τεχνική που περιγράφεται από τον Guesdon.<sup>2</sup> Τα προϊόντα αυτά χρησιμοποιούνται σε μια ανοσοϊστοχημική (IHC) διαδικασία, η οποία επιτρέπει την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός αντιγόνων σε τομές ιστού μονιμοποιημένου με φορμόλη και εγκλεισμένου σε παραφίνη, μέσω διαδοχικών βημάτων με παρεμβαλλόμενα βήματα πλύσης. Εάν απαιτείται από το πρωτογενές αντίσωμα, οι τομές υποβάλλονται σε ανάκτηση επιπότου πριν από τη χρώση. Η δραστηριότητα της ενδογενούς υπεροξειδάσης εξουδετερώνεται με χρήση του Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Αυτό ακολουθείται από την εφαρμογή του Novocastra™ Protein Block RE7102 για τη μείωση της μη ειδικής δέσμευσης των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων. Η τομή ακολούθως επωάζεται με ένα βέλπια αραιωμένο πρωτογενές αντίσωμα. Το Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 ένα σκεύασμα δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένου με βιοτίνη που αναγνωρίζει ανοσοσφαιρίνες ποντικού και κουνελιού, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση τυχόν δεσμευμένου σε ιστό πρωτογενούς αντισώματος. Κατόπιν εφαρμόζεται το Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, ένα συζυγές στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης και δεσμεύεται στη βιοτίνη που υπάρχει στο δευτερογενές αντίσωμα. Οι τομές επωάζονται περαιτέρω με το υπόστρωμα/χρωμογόνο, 3,3'-διαμινοβενζιδίνη (DAB), που παρασκευάζεται από το Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 και το Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106, όπως περιγράφεται παρακάτω. Η αντίδραση με την υπεροξειδάση παράγει ένα ορατό καστανό ίζημα στη θέση του αντιγόνου. Οι τομές ανιχνωματοποιούνται με Novocastra™ Hematoxylin RE7107 και καλύπτονται με καλυπτρίδα. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με χρήση μικροσκοπίου φωτός και βοηθούν στη διαφορική διάγνωση παθολογικών εξεργασιών, οι οποίες ενδέχεται ή όχι να σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

## Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται λεπτομέρειες εκείνων των αντιδραστηρίων από την ακόλουθη λίστα που παρέχονται σε κάθε προϊόν.

1. Peroxidase Block RE7101. Υπεροξειδίο του υδρογόνου 3-4%
2. Protein Block RE7102. Καζείνη 0,4% σε ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα φωσφορικών, με σταθεροποιητές, επιφανειοδραστικό παράγοντα και 0,2% Bronidox L ως συντηρητικό.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Κεκαθαρμένη με συγγένεια IgM αντι-ποντικού αίμας (5 µg/ml), IgG αντι-ποντικού ίππου (10,5 µg/ml) και IgG αντι-κουνελιού ίππου (10,5 µg/ml) σε ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα Tris με σταθεροποιητή πρωτεΐνης και 0,35% ProClin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 έως 1,4 µg/ml σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα Tris με σταθεροποιητή πρωτεΐνης και 0,35% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74% w/v 3,3'-διαμινοβενζιδίνη, σε διάλυμα σταθεροποιητή.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει υπεροξειδίο του υδρογόνου ≤ 0.1% και συντηρητικό.
7. Hematoxylin RE7107. Αιματοξυλίνη < 0.1%.

Αντιδραστήριο	Κωδικός είδους	Peroxidase Detection System (250 tests) RE 7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	DAB (250 Slides) RE7190-K	Biotinylated Secondary Antibody RE7103	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml			
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml			

Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml		1 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml			1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	1 x 3 ml		
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	1 x 30ml	1 x 30ml		
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml			

## Ανασύσταση, ανάμειξη, αραιώση, τιτλοδότηση

Τα διαλύματα των Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 και Hematoxylin RE7107 είναι προαραιωμένα. Δε συνιστάται ανασύσταση, ανάμειξη, αραιώση ή τιτλοδότηση των αντιδραστηρίων αυτών. Περαιτέρω αραιώση ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα απώλεια χρώσης του αντιγόνου. Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει τυχόν τέτοια αλλαγή. Το DAB Chromogen RE7105 απαιτεί αραιώση σε αναλογία 1/20 σε DAB Substrate Buffer RE7106 πριν από τη χρήση. 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. Μη 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

### DAB CHROMOGEN

Περιέχει <10% Biphényl-3,3',4,4'-Tetrayltetraamine.

GHS08: Κίνδυνος για την υγεία.

Προειδοποιητές λέξεις: Κίνδυνος.

H341: Ύποπτο για πρόκληση γενετικών ελαττωμάτων.

H350: Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο.

P201: Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.

P202: Μην τα χρησιμοποιήσετε πριν διαβάσετε και κατανοήσετε τις οδηγίες προφύλαξης.

P281: Χρησιμοποιείτε μέσα ατομικής προστασίας όταν απαιτείται.

P308+313: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό.

P501: Διάθεση του περιεχομένου/περιέκτη σε.

Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού διατίθεται κατόπιν αιτήματος ή από τη διεύθυνση [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Για επαγγελματίες χρήστες.

Μην αναμειγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικά συστήματα ανίχνευσης.

Τα δείγματα, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, καθώς και όλα τα υλικά που εκτίθενται σε αυτά, πρέπει να υποβάλλονται σε χειρισμό ως δυνητικά μεταδότηση λοίμωξης και να απορρίπτονται με κατάλληλες προφυλάξεις.<sup>3</sup>

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.

Συμβουλευθείτε 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 επώασης 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. Πρώτυποι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημεία.
2. 50 mM αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος Tris (TBS) pH 7,6.
3. Διάλυμα(τα) ανάκτησης αντιγόνων.
4. Διάλυμα(τα) ανάκτησης ενζύμων.
5. Αραιωτικό αντισώματος.
6. Πρωτοταγές αντίσωμα.
7. 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.

## Γ. Μεθοδολογία

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



**Ο συνδυασμός του πρωτοταγούς αντι σώματος, της αραίωσής του, σε συνδυασμό με το σύστημα ανίχνευσης πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη σε σειρά γνωστών θετικών και αρνητικών μαρτύρων.**

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

1. Κόψτε και στερεώστε τις τομές σε αντικειμενοφόρους πλάκες επιστρωμένες με κατάλληλο μέσο συγκόλλησης ιστών.
2. Αφαιρέστε την παραφίνη από τις τομές σε ξυλένιο ή υποκατάστατα ξυλενίου.
3. Επανενυδατώστε μέσω διαβαθμισμένων αλκοολών.
4. Πλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε τρεχούμενο νερό βρύσης.
5. Εκτελέστε ανάκτηση αντιγόνων όπως απαιτείται (δείτε την ενότητα **Συστάσεις για τη χρήση** για το πρωτοταγές αντίσωμα).
6. Πλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με αποιονισμένο νερό.
7. Εξουδετερώστε την ενδογενή υπεροξειδάση με χρήση του Peroxidase Block RE7101 επί 5 λεπτά.
8. Πλύνετε σε TBS επί 2 x 5 λεπτά.
9. Επωάστε με Protein Block RE7102 επί 5 λεπτά.
10. Πλύνετε σε TBS επί 2 x 5 λεπτά.
11. Επωάστε με βέλτιστα αραιωμένο πρωτοταγές αντίσωμα (δείτε την ενότητα **Συστάσεις για τη χρήση** για το πρωτοταγές αντίσωμα).
12. Πλύνετε σε TBS επί 2 x 5 λεπτά.
13. Επωάστε με Biotinylated Secondary Antibody RE7103 επί 30 λεπτά.
14. Πλύνετε σε TBS επί 2 x 5 λεπτά.
15. Επωάστε με Streptavidin-HRP RE7104 επί 30 λεπτά.
16. Πλύνετε σε TBS επί 2 x 5 λεπτά με απαλή ανακίνηση.
17. Αναπτύξτε δραστηριότητα υπεροξειδάσης με διάλυμα εργασίας DAB (δείτε την ενότητα **Διάλυμα εργασίας DAB**) επί 5 λεπτά.
18. Εκπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με νερό.
19. Αντιχρωματίστε με Hematoxylin RE7107.
20. Εκπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με νερό επί 5 λεπτά.
21. Αφυδατώστε, διαυγάστε και στερεώστε τις τομές.

### **Διάλυμα εργασίας DAB**

Προσθέστε 50 μl DAB Chromogen RE7105 σε 1 ml DAB Substrate Buffer RE7106. Χρησιμοποιήστε εντός 6 ωρών από την παρασκευή.

### **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 επιπλέον των ακόλουθων διαδικασιών. Οι μάρτυρες θα πρέπει να είναι φρέσκα δείγματα νεκροφίας/βιοψίας/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 και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόθησης των αντιδραστηρίων.<sup>4</sup> Για τον 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 το 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 συνδετικού 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 συχνά μη ειδική χρώση.<sup>5</sup> Ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ανοσολογικής δέσμωσης των πρωτεϊνών ή των προϊόντων αντίδρασης του υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδοϋπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη<sup>6</sup> (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός). Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμωσης των ενζύμων από ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπλέον ιστοί ασθενών με υπόστρωμα-χρωμογόνο ή στρεπταβιδίνη-HRP 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 αντιδραστηρίου**

Χρησιμοποιείτε έναν μη ειδικό αρνητικό μάρτυρα αντιδραστηρίου 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 αντιδραστηρίου. 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.

## 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>7</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.

Τα Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K ή RE7120-K προορίζονται για χρήση σε τομές εγκλεισμένες σε παραφίνη με ειδικές απαιτήσεις μονιμοποίησης. Ενδέχεται να παρουσιαστεί μη αναμενόμενη έκφραση αντιγόνου, ειδικά σε νεοπλασμάτα. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε κερχωσμένης τομής ιστού πρέπει να περιλαμβάνει μορφολογική ανάλυση και την αξιολόγηση των κατάλληλων μαρτύρων.

## Χαρακτηριστικά απόδοσης

Η απόδοση των Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/(500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 και Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 έχει επικυρωθεί με χρήση σειράς πρωτοταγών αντισωμάτων IgG ποντικού, IgM ποντικού και IgG κουνελίου Novocastra™. Τα προϊόντα αυτά είναι σταθερά έως την(ις) ημερομηνία(ες) λήξης που αναγράφεται(ονται) στην ετικέτα του προϊόντος.

## Βιβλιογραφία

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979; 27:1131.
3. 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.
4. 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.
5. Nadj M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

## Ημερομηνία έκδοσης

27 Φεβρουαρίου 2015

# Peroxidase Detection System (250 tests)

Produkt nr.: RE7110-K

# Peroxidase Detection System (500 tests)

Produkt nr.: RE7120-K

# DAB (250 slides)

Produkt nr.: RE7190-K

# Biotinylated Secondary Antibody

Produkt nr.: RE7103

# Streptavidin-HRP

Produkt nr.: RE7104

## Tilsigtet anvendelse

Til in vitro diagnostisk anvendelse.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K og (500 tests) RE7120-K er beregnet til visualisering af primære muse-IgG-, muse-IgM- og kanin-IgG-antistoffer. Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 og Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 er reagenskomponenter i disse systemer, som er beregnet til anvendelse i proceduren beskrevet nedenfor. 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.

## Procedureprincip

Den første immunoperoxidaseteknik blev rapporteret af Nakane og Pierce.<sup>1</sup> Siden da er teknikken udviklet flere gange og er ført frem til de immunoperoxidaseteknikker, der almindeligvis bruges i dag. Novocastra™ Peroxidase Detection Systems er baset på teknikken beskrevet af Guesdon.<sup>2</sup> Produkterne anvendes i en immunhistokemisk (IHC) procedure, der muliggør kvalitativ identifikation af Epitopeer ved lysmikroskopi i vævssnit af formalinfixeret, paraffinindstøbt væv via sekventielle trin med indskudte vasketrin. Hvis krævet af det primære antistof underkastes vævsnittene epitopgenfindning inden farvning. Endogen peroxidaseaktivitet neutraliseres med Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Dette efterfølges af tilsætning af Novocastra™ Protein Block RE7102 for at reducere uspecifik binding af primære og sekundære antistoffer. Vævsnittet inkuberes herefter med optimalt fortyndet primært antistof. Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 en formulering af et biotinkonjugeret sekundært antistof, der genkender muse- og kaninimmunoglobuliner, anvendes til detektion af hvilket som helst vævsbundet primært antistof. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, et streptavidin-peroxidase-konjugat, tilsættes derefter og binder til biotinet til stede på det sekundære antistof. Vævsnittene inkuberes yderligere med substrat/kromogenet, 3,3' - diaminobenzidin (DAB) fremstillet ud fra Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 og Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106 som beskrevet herunder. Reaktionen med peroxidasen frembringer et synligt, brunt præcipitat på stedet for Epitopet. Vævsnittene kontrastfarves med Novocastra™ Hematoxylin RE7107 og dækkes med et dækglas. Resultaterne fortolkes ved anvendelse af et lysmikroskop og medvirker til differentiell diagnose af patofysiologiske processer, som muligvis kan være associeret med et bestemt Epitope.

## Leverede reagenser

Detaljer om reagenserne fra følgende liste, der leveres sammen med hver produkt, er givet i tabellen nedenfor.

1. Peroxidase Block RE7101. 3-4 % hydrogenperoxid.
2. Protein Block RE7102. 0,4 % Casein i fosfatbufferjusteret saltvandsopløsning med stabilisatorer, overfladeaktivt middel og 0,2 % Bronidox L som konserveringsmiddel.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Affinitetsoprenset gedde-antimuse-IgM (5 µg/ml), heste-antimuse-IgG (10,5 µg/ml) og heste-antikinin-IgG (10,5 µg/ml) i Trisbufferjusteret saltvandsopløsning med proteinstabilisator og 0,35 % ProClin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 til 1,4 µg/ml i trisbufferjusteret saltvandsopløsning med proteinstabilisator og 0,35 % ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74 % vægt/vol. 3,3' - diaminobenzidin i stabiliserende opløsning.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Bufferjusteret opløsning indeholdende ≤ 0,1% hydrogenperoxid og konserveringsmiddel.
7. Hematoxylin RE7107. < 0,1 % Hæmatoxylin.

Reagens	Produkt nr.:	eroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	DAB (250 Slides) RE7190-K	Biotinylated Secondary Antibody RE7103	Streptavidin-HRP RE7104.
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml			
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml			
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml		1 x 25 ml	

Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml			1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	1 x 3 ml		
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 ml	2 x 30 ml	1 x 30 ml		
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml			

### Rekonstituering, blanding, fortynding, titrering

Opløsningerne med Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 og Hematoxylin RE7107 fortyndes. Rekonstituering, blanding, fortynding eller titrering af disse reagenser anbefales ikke. Yderligere fortynding kan resultere i tab af Epitopefarvning. Brugeren skal kontrollere alle sådanne ændringer. DAB Chromogen RE7105 skal fortyndes 1/20 i DAB Substrate Buffer RE7106 inden brug. Yderligere fortynding kan resultere i tab af Epitopefarvning. 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

#### DAB CHROMOGEN

Indeholder <10% Biphényl-3,3', 4,4'-Tetrayltetraamine.

GHS08: Sundhedsfarer.

Signalord: Fare.

H341: Mistænkt for at forårsage genetiske defekter.  
H350: Kan fremkalde kræft.

P201: Indhent særlige anvisninger før brug.

P202: Anvend ikke produktet, før alle advarsler er læst og forstået.

P281: Anvend de påkrævede personlige værnemidler.

P308+313: VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp.

P501: Indholdet/Beholderen bortskaffes i.

Et datablad for materialesikkerhed kan fås efter anmodning eller er tilgængeligt på [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Må kun anvendes af uddannet fagpersonale.

Bland ikke reagenser fra forskellige detektionssystemer sammen.

Prøver skal før og efter fiksering, lige som alle materialer eksponeret mod prøverne, håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler<sup>3</sup>.

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 trisbufferjusteret saltvandsopløsning (TBS) pH 7,6.
3. Epitopegenfindingsopløsning(er).
4. Enzymgenfindingsopløsning(er).
5. Antistofdiluent.
6. Primært antistof.
7. Monteringsmedium.

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

1. Udstyr nødvendigt til Epitopegenfindning 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 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).

1. Snit og monter vævssnittene på objektglas coatet med en passende vævsadhæsiiv.
2. Afparaffiner snittene i xylen eller xylensubstituent.
3. Rehydrer med klassificeret alkohol.
4. Vask vævssnittene i rindende vandhænevand.

5. Udfør Epitopegenfinding som nødvendigt (se **Anbefalinger vedrørende anvendelse** for primært antistof).
6. Vask objektglassene i deioniseret vand.
7. Neutraliser endogen peroxidase med Peroxidase Block RE7101 i 5 minutter.
8. Vask i TBS i 2 x 5 minutter.
9. Inkuber med Protein Block RE7102 i 5 minutter.
10. Vask i TBS i 2 x 5 minutter.
11. Inkuber med optimalt fortyndet primært antistof (se **Anbefalinger vedrørende anvendelse** for primært antistof).
12. Vask i TBS i 2 x 5 minutter.
13. Inkuber med Biotinylated Secondary Antibody RE7103 i 30 minutter.
14. Vask i TBS i 2 x 5 minutter.
15. Inkuber med Streptavidin-HRP RE7104 i 30 minutter.
16. Vask i TBS i 2 x 5 minutter, mens de vugges forsigtigt.
17. Fremkald peroxidaseaktiviteten med DAB-brugsopløsning (se **DAB brugsopløsning**) i 5 minutter.
18. Skyl vævssnittene i vand.
19. Kontrastfarv med Hematoxylin RE7107.
20. Skyl objektglassene i vand i 5 minutter.
21. Tør, klar og monter vævssnittene.

## DAB brugsopløsning

Tilsæt 50 µl DAB Chromogen RE7105 til 1 ml DAB Substrate Buffer RE7106. Skål anvendes senest seks timer efter fremstillingen.

## 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>4</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 målEpitopeet 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 diffus 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>5</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 endogen biotin<sup>6</sup> (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre). For at differentiere mellem endogen enzymaktivitet eller uspecifik enzymbinding og specifik immunoreaktivitet kan yderligere patientvæv eventuelt farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen eller Streptavidin-HRP 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 Epitopestedet.

## Patientvæv

Eksaminer farvede patientprøver sidst. Intensiteten af positiv farvning bør vurderes i sammenhæng med eventuel uspecifik baggrundsfarvning af den negative reagenskontrol. Som med alle immunhistokemiske tests betyder et negativt resultat, at Epitopeet ikke blev påvist. Ikke at Epitopeet var fraværende i de analyserede celler eller det analyserede væv. Hvis nødvendigt anvendes et panel af antistoffer til identifikation af falske negative reaktioner.

## 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 irregulariteter 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™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K or RE7120-K er beregnet til anvendelse på paraffinindstøbt vævssnit med specifikke krav til fiksering. Der kan forekomme uventet Epitopeekspression, navnlig i neoplasmers. Den kliniske fortolkning af alle farvede vævssnit skal indbefatte morfologisk analyse og evaluering af passende kontroller.

## Ydeevne

Ydeevnen af Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ DAB (250 Slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 og Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 er blevet kontrolleret ved anvendelse af en række primære Novocastra™ muse-IgG-, muse-IgM- og kanin-IgG-antistoffer.

Produkterne er stabile til udløbsdatoen trykt på produkternes etiketter.

## **Bibliografi**

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1979; 27:1131.
3. 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.
4. 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.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

## **Rettelser til tidligere udgave**

Ingen rettelser.

## **Udgivelsesdato**

27 februar 2015

# Peroxidase Detection System (250 tests)

Productnr.: RE7110-K

# Peroxidase Detection System (500 tests)

Productnr.: RE7120-K

# DAB (250 slides)

Productnr.: RE7190-K

# Biotinylated Secondary Antibody

Productnr.: RE7103

# Streptavidin-HRP

Productnr.: RE7104

## Beoogd gebruik

*Voor diagnostisch gebruik in-vitro.*

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K en (500 tests) RE7120-K zijn bedoeld voor het visualiseren van muis IgG, muis IgM en konijn IgG primaire antilichamen. Novocastra™ DAB (250 slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 en Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 zijn componentreagentia van deze systemen die zijn bedoeld voor gebruik in de onderstaand beschreven procedure. De klinische interpretatie van elke kleuring of het ontbreken ervan moet worden aangevuld door morfologische onderzoeken met correcte controles en moet binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests worden geëvalueerd door een deskundig patholoog.

## Principe van de procedure

De eerste immunoperoxidasetechniek is beschreven door Nakane en Pierce<sup>1</sup>. De daarop volgende ontwikkelingen hebben geleid tot de nu gebruikelijke immunoperoxidasetechnieken. De Novocastra™ Peroxidase Detection Systems zijn gebaseerd op de door Guesdon beschreven techniek<sup>2</sup>. Deze producten wordt gebruikt in een immunohistochemische (IHC) procedure waarbij met een lichtmicroscop een kwalitatieve identificatie kan worden uitgevoerd van Epitopeen in coupes van in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel, via opeenvolgende behandelingen met tussendoor spoelen. Als dit vanwege het primaire antilichaam nodig is wordt er vóór de kleuring met de coupes een epitooptretrieval uitgevoerd. Endogene peroxidaseactiviteit wordt geneutraliseerd met Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Vervolgens wordt Novocastra™ Protein Block RE7102 opgebracht waarmee de niet-specifieke binding van primaire en secundaire antilichamen wordt vermindert. Vervolgens wordt de coupe geïncubeerd met optimaal verdund primair antilichaam. Voor het detecteren van eventueel weefselgebonden primair antilichaam wordt Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 gebruikt; dit is een biotinegeconjugeerd secundair antilichaammedium dat immunoglobulinen van muis en konijn herkent. Vervolgens wordt Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 aangebracht; dit is een streptavidineperoxidaseconjugaat dat bindt aan het op het secundaire antilichaam aanwezige biotine. Daarna worden de coupes geïncubeerd met substraat/chromogeen, 3,3' - diaminobenzidine (DAB), bereid van Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 en Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106, zoals hieronder beschreven. Door de reactie met peroxidase wordt op de antigeenplaats een zichtbaar bruin precipitaat gevormd. De coupes worden tegengekleurd met Novocastra™ Hematoxylin RE7107 en afgedekt. De resultaten worden geïnterpreteerd met een lichtmicroscop en ondersteunen de differentiële diagnose van pathofysiologische processen die al dan niet verband houden met een bepaald antigeen.

## Geleverde reagentia

Details over de reagentia op de onderstaande lijst die deel uitmaken van een product staan vermeld in de onderstaande tabel.

1. Peroxidase Block RE7101. 3-4% waterstofperoxide.
2. Protein Block RE7102. 0,4% caseïne in fosfaatgebufferde fysiologische zoutoplossing, met stabilisatoren, surfactans en 0,2% Bronidox L als conserveermiddel.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Via affiniteit gezuiverd geit anti-muis IgM (5 µg/ml), paard anti-muis IgG (10,5 µg/ml) en paard anti-konijn IgG (10,5 µg/ml) in tris-gebufferde fysiologische zoutoplossing met eiwitstabilisator en 0,35% ProClin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 tot 1,4 µg/ml in tris-gebufferde fysiologische zoutoplossing met eiwitstabilisator en 0,35% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74% g/v 3,3' - diaminobenzidine, in een stabilisatoroplossing.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Gebufferde oplossing, bevat ≤ 0.1% waterstofperoxide en conserveermiddel.
7. Hematoxylin RE7107. < 0.1% hematoxyline.

Reagens	Productnummer	Peroxidase Detection System (250 tests) RE 7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	DAB (250 slides) RE7190-K	Biotinylated Secondary Antibody RE7103	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml			
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml			

Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml		1 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml			1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	1 x 3 ml		
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 ml	2 x 30 ml	1 x 30 ml		
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml			

### Reconstitutie, mengen, verdunnen, titreren

De oplossingen Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 en Hematoxylin RE7107 zijn voorverdund. Reconstitutie, mengen, verdunnen of titreren van deze reagentia wordt niet aanbevolen. Verder verdunnen leidt mogelijk tot verlies aan antieenkleuring. De gebruiker moet eventuele wijzigingen valideren. DAB Chromogen RE7105 moet vóór gebruik 1 : 20 worden verdund in DAB Substrate Buffer RE7106. Verder verdunnen leidt mogelijk tot verlies aan antieenkleuring. De gebruiker moet eventuele wijzigingen valideren.

### Bewaren en stabiliteit

Bewaren bij 2 - 8 °C. Niet invriezen. Onmiddellijk na gebruik weer bewaren bij 2 - 8 °C. Niet gebruiken na de op het etiket van het product vermelde houdbaarheidsdatum. Andere dan de aangegeven bewaarcondities moeten door de gebruiker worden geverifieerd. Er zijn geen duidelijke tekenen waaraan de instabiliteit van dit product is te herkennen; daarom moeten naast de monsters van de patiënt ook steeds positieve en negatieve controles worden getest.

### Specimenbereiding

Het aanbevolen fixatief voor in paraffine ingebedde weefselcoupes is 10% neutraalgebufferde formaline.

### Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

#### DAB CHROMOGEN

Bevat <10% Biphenyl-3,3', 4,4'-Tetrayl-tetraamine.  
GHS08: Gezondheidsgevaar.  
Signaalwoorden: Gevaar.

H341: Verdacht van het veroorzaken van genetische schade.  
H350: Kan kanker veroorzaken.

P201: Alvorens te gebruiken de speciale aanwijzingen raadplegen.  
P202: Pas gebruiken nadat u alle veiligheidsvoorschriften gelezen en begrepen heeft.  
P281: De nodige persoonlijke beschermingsuitrusting gebruiken.  
P308+313: NA (mogelijke) blootstelling: een arts raadplegen.  
P501: Inhoud/Verpakking afvoeren naar.

Op verzoek is een veiligheidsinformatieblad leverbaar dat ook kan worden gedownload van [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)  
Beroepsmatig gebruik.

Meng geen reagentia van verschillende detectiesystemen.

Voor en na fixatie moeten specimens en alle eraan blootgestelde materialen worden behandeld alsof ze infectieus zijn; daarom moeten ze ook met de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd<sup>3</sup>. Pipetteer reagentia nooit met de mond en zorg dat de huid en slijmvliezen niet met reagentia en specimens in aanraking komen. Spoel overvloedig met water als er contact is geweest met reagentia of specimens. Werk volgens de plaatselijke of landelijke voorschriften voor het afvoeren van mogelijk giftige stoffen. Beperk de microbiële verontreiniging van reagentia tot een minimum zodat niet-specifieke kleuring wordt voorkomen. Het afwijken van de aangegeven incubatietijden of -temperaturen kan leiden tot foutieve resultaten. Eventuele wijzigingen moeten door de gebruiker worden gevalideerd.

### Procedure

#### A. Benodigde maar niet geleverde reagentia

1. Standaard oplosmiddelen die in de immunohistochemie gebruikt worden.
2. 50 mM tris-gebufferde fysiologische zoutoplossing (TBS) pH 7,6.
3. Antigeenretrievaloplossing(en).
4. Enzymretrievaloplossing(en).
5. Verdunningsvloeistof voor antilichaam.
6. Primair antilichaam.
7. Plakmiddel.

#### B. Benodigde maar niet geleverde apparatuur

1. Voor antigeenretrieval benodigde apparatuur, indien dit voor het primaire antilichaam aanbevolen wordt.
2. Algemene laboratoriumapparatuur voor immunohistochemie.

#### C. Methodologie

Gebruikers moeten opgeleid zijn in immunohistochemische technieken voordat ze deze methodologie toepassen.

Het geheel van het primaire antilichaam en de verdunning ervan, samen met het detectiesysteem moet door de gebruiker worden gevalideerd op een reeks bekende positieve en negatieve controles.



Tenzij anders aangegeven worden alle stappen uitgevoerd bij kamertemperatuur (25 °C).

1. Snij de coupes en plak ze op glaasjes, gecoat met een geschikt plakmiddel voor weefsel.
2. Deparaffiniseer coupes in xyleen of xyleenvervangers.
3. Rehydreer in aflopende alcoholreeks.
4. Spoel de glaasjes onder stromend kraanwater.
5. Voer een antigeenretrieval uit zoals vereist (zie **Aanbevelingen voor gebruik** voor primair antilichaam).
6. Spoel de glaasjes in gedemineraliseerd water.
7. Neutraliseer endogeen peroxidase met Peroxidase Block RE7101 gedurende 5 minuten.
8. Spoel 2 x 5 minuten in TBS.
9. Incubeer 5 minuten met Protein Block RE7102.
10. Spoel 2 x 5 minuten in TBS.
11. Incubeer met optimaal verdund primair antilichaam (zie **Aanbevelingen voor gebruik** voor primair antilichaam).
12. Spoel 2 x 5 minuten in TBS.
13. Incubeer 30 minuten met Biotinylated Secondary Antibody RE7103.
14. Spoel 2 x 5 minuten in TBS.
15. Incubeer 30 minuten met Streptavidin-HRP RE7104.
16. Spoel 2 x 5 minuten in TBS met voorzichtig schudden.
17. Ontwikkel peroxidaseactiviteit met DAB werkoplossing (zie **DAB Working Solution**) gedurende 5 minuten.
18. Spoel glaasjes in water.
19. Tegenkleuren met Hematoxylin RE7107.
20. Spoel glaasjes 5 minuten in water.
21. Dehydreer de coupes, maak ze schoon en plak ze op.

#### **DAB Working Solution**

Voeg 50 µl DAB Chromogen RE7105 toe aan 1 ml DAB Substrate Buffer RE7106. Gebruik binnen zes uur na bereiding.

#### **Kwaliteitscontrole**

Door verschillen in het bewerken van weefsel en technische procedures in het laboratorium van de gebruiker kunnen de resultaten sterk verschillen; daarom is het noodzakelijk om, naast de volgende procedures, regelmatig intern controles uit te voeren. Controles moeten bestaan uit verse autopsy-/biopsie-/chirurgiespecimens die zo spoedig mogelijk op dezelfde wijze in formaline zijn gefixeerd, bewerkt en in paraffine ingebed als het/de patiëntmonster(s).

#### **Positief controleweefsel**

Dit wordt gebruikt ter controle van correct bereide weefsels en juist uitgevoerde kleuringstechnieken. Bij elke kleuringstest behoort een positief controleweefsel deel uit te maken van elke set testcondities/primair antilichaam. Weefsel met een zwakke positieve kleuring is beter geschikt voor een goede kwaliteitscontrole en voor het detecteren van lage niveaus van reagensafbraak dan weefsel met een sterke positieve kleuring<sup>4</sup>. Zie voor aanbevolen positief controleweefsel de Gebruiksaanwijzing voor primair antilichaam. Als het positieve controleweefsel geen positieve kleuring vertoont moeten de resultaten van de testspecimens als ongelidig beschouwd worden.

#### **Negatief controleweefsel**

Dit moet na het positieve controleweefsel worden onderzocht zodat de specificiteit van de labeling van het targetantigeen door het primaire antilichaam kan worden geverifieerd. Zie voor aanbevolen negatief controleweefsel de Gebruiksaanwijzing voor primair antilichaam. Door de variëteit van verschillende celtypes in de meeste weefselcoupes komen er vaak negatieve controleplaatsen voor; dit moet door de gebruiker worden geverifieerd. Eventuele niet-specifieke kleuring ziet er vaak diffuus uit. Ook in weefselcoupes die zeer sterk in formaline gefixeerd zijn kan sporadisch kleuring van bindweefsel worden waargenomen. Gebruik intacte cellen voor de interpretatie van de kleuringresultaten. Necrotische of gedegenereerde cellen kleuren vaak niet-specifiek<sup>5</sup>. Niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten kan leiden tot vals-positieve resultaten. Zulke resultaten kunnen ook worden veroorzaakt door endogene enzymen zoals pseudoperoxidase (erythrocyten), endogeen peroxidase (cytochroom C) of endogeen biotine<sup>6</sup> (bv. lever, borst, hersenen, nier). Om te kunnen differentiëren tussen enerzijds endogene enzymactiviteit of niet-specifieke binding van enzymen en anderzijds specifieke immunoreactiviteit kan extra patiëntweefsel worden gekleurd met respectievelijk uitsluitend substraatchromogeen of Streptavidin-HRP, en substraatchromogeen. Als bij het negatieve controleweefsel specifieke kleuring optreedt moeten de resultaten van de patiëntspecimens als ongelidig worden beschouwd.

#### **Negatief controleereagens**

Behandel een coupe van elk patiëntspecimen met een niet-specifiek negatief controleereagens in plaats van met het primaire antilichaam; daardoor kan niet-specifieke kleuring worden vastgesteld en kan de specifieke kleuring op de antigeenplaats beter worden geïnterpreteerd.

#### **Patiëntweefsel**

Onderzoek gekleurde patiëntspecimens als laatste. Bij de bepaling van de positieve kleuringsintensiteit moet rekening gehouden worden met alle eventuele niet-specifieke achtergrondkleuring van het negatieve controleereagens. Zoals bij elke immunohistochemische test geeft een negatief resultaat aan dat het antigeen niet is gedetecteerd, maar niet dat het antigeen niet in de onderzochte cellen of het onderzochte weefsel voorkomt. Gebruik voor het identificeren van vals-negatieve reacties zonnodig een panel antilichamen.

#### **Beperkingen**

Immunohistochemie is een diagnostisch proces van meerdere stappen; hiervoor is een gespecialiseerde opleiding vereist in het kiezen van de juiste reagentia; de keuze, fixatie en bewerking van weefsel; de voorbehandeling van IHC-glaasjes en de interpretatie van de kleuringresultaten. De kleuring van het weefsel is afhankelijk van de manier waarop het weefsel vóór de kleuring is behandeld en bewerkt. Het onjuist fixeren, invriezen, ontdooien, spoelen, drogen, verwarmen, snijden en besmetting met andere weefsels of vloeistoffen kan leiden tot artefacten, antilichaam-trapping of vals-negatieve resultaten. Inconsistente resultaten zijn mogelijk te wijten aan variaties in de methodes van fixeren en inbedden of aan weefseleigen afwijkingen<sup>7</sup>. Een te sterke of onvolledige tegenkleuring kan

de juiste interpretatie van de resultaten in gevaar brengen. De klinische interpretatie van elke kleuring of het ontbreken ervan moet worden aangevuld door morfologische onderzoeken met correcte controles en moet binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests worden geëvalueerd door een deskundig patholoog. Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K of RE7120-K zijn bedoeld voor gebruik op in paraffine ingebedde coupes die een specifieke fixatie vereisen. Er kan onverwachte antigeenexpressie optreden, met name bij neoplasmata. Tot het totaal van de klinische interpretatie van elke gekleurde weefselcoupe behoort ook de morfologische analyse en evaluatie van de overeenkomstige controles.

#### **Eigenschappen**

De prestaties van Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/(500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ DAB (250 slides) RE7190-K, Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 en Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 zijn gevalideerd met een reeks Novocastra™ muis IgG, muis IgM en konijn IgG primaire antilichamen. Deze producten zijn stabiel tot de uiterste gebruiksdatum die op het etiket van de producten vermeld staat.

#### **Literatuurlijst**

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979; 27:1131.
3. 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.
4. 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.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

#### **Wijzigingen ten opzichte van de voorgaande uitgave**

Niet van toepassing.

#### **Datum van uitgave**

27 februari 2015



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

