



BIO SYSTEMS

# Novocastra™ IHC Diluent

## Product Code: RE7133

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



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

### Instructions for Use

Please read before using this product.

### Mode d'emploi

À lire avant d'utiliser ce produit.

### Istruzioni per L'uso

Si prega di leggere, prima di usare il prodotto.

### Gebrauchsanweisung

Bitte vor der Verwendung dieses Produkts lesen.

### Instrucciones de Uso

Por favor, leer antes de utilizar este producto.

### Instruções de Utilização

Leia estas instruções antes de utilizar este produto.

### Instruktioner vid Användning

Var god läs innan ni använder produkten.

### Οδηγίες Χρήσης

Παρακαλούμε διαβάστε τις οδηγίες πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν αυτό.

### Brugsanvisning

Læs venligst før produktet tages i brug.

### Gebruiksaanwijzing

Lezen vóór gebruik van dit product.

### Brugsanvisning

Vennligst les denne før du bruker produktet.

### Kullanım Talimatları

Lütfen bu ürünü kullanmadan önce okuyunuz.

### Инструкции за употреба

Моля, прочетете преди употреба на този продукт.

### Használati utasítás

A termék használatba vétele előtt olvassa el.

### Instruçiuni de utilizare

Citiți aceste instrucțiuni înainte de a utiliza produsul.

### Инструкция по применению

Прочтите перед применением этого продукта.

### Instrukcja obsługi

Przed użyciem tego produktu należy przeczytać instrukcję.

### Navodila za uporabo

Preberite pred uporabo tega izdelka.

### Návod k použití

Čtěte před použitím tohoto výrobku.

### Návod na použitie

Prosím, prečítajte si ho pred použitím produktov.

### Check the integrity of the packaging before use.

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

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

Vor dem Gebrauch die Verpackung auf

Unversehrtheit überprüfen.

Comprobar la integridad del envase, antes de usarlo.

Verifique a integridade da embalagem antes de utilizar o produto.

Kontrollera att paketet är obrutet innan användning.

Ελέγξτε την ακεραιότητα της συσκευασίας πριν από τη χρήση.

Kontroller, at pakken er ubeskadiget før brug.

Controleer de verpakking vóór gebruik.

Sjekk at pakningen er intakt før bruk.

Kullanmadan önce ambalajın bozulmamış olmasını kontrol edin.

Проверете целостта на опаковката преди употреба.

Használat előtt ellenőrizze a csomagolás épségét.

Verificați integritatea ambalajului înainte de a utiliza produsul.

Перед применением убедитесь в целостности упаковки.

Przed użyciem należy sprawdzić, czy opakowanie jest szczelne.

Pred uporabo preverite celovitost embalaže.

Před použitím zkontrolujte neporušenost obalu.

Pre použitím skontrolujte, či balenie nie je porušené.



# Novocastra™ IHC Diluent

## Product No: RE7133

### Intended Use

*For in vitro diagnostic use.*

Novocastra™ IHC Diluent RE7133 is intended for use as a diluent for Novocastra™ primary antibodies, Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 and Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 in immunohistochemical (IHC) procedures. 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 use of an antibody to detect an antigen in tissue cells was first described by Coons AH and Kaplan MH in 1950.<sup>1</sup> Since then, many developments have occurred leading to the immunoperoxidase procedures commonly used today (for IHC staining Principles of Procedure see appropriate detection system Instructions for Use). To obtain optimal staining in IHC procedures primary antibodies require dilution. The binding of antibodies to their epitopes can be readily dissociated by extreme pH and ionic strength. Therefore, an appropriate diluent must be used to obtain optimal staining. This product is used as a diluent for primary antibodies in IHC procedures, which allow the qualitative identification by light microscopy of antigens in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, via sequential steps with interposed washing steps. Novocastra™ IHC Diluent RE7133 helps maintain the specificity and stability of antibodies.

### Reagents Provided

IHC Diluent RE7133 (500ml). Tris-buffered saline, surfactant and protein stabilizer with 0.35% ProClin™ 950.

### Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

IHC Diluent RE7133 is a ready to use reagent. Reconstitution, mixing, dilution, or titration of this reagent is not recommended. Further dilution may result in loss of antigen staining. The user must validate any such change.

### Storage and Stability

Store at 2–8 °C. Do not freeze. Return to 2–8 °C immediately after use. Do not use after expiration date indicated on the product label. Storage conditions other than those specified must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product, therefore positive and negative controls should be run simultaneously with patient samples. Indications of contamination of IHC Diluent RE7133 are turbidity, odor development or the presence of a precipitate.

### Specimen Preparation

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

### Warnings and Precautions

For professional users.

**Do not use IHC Diluent RE7133 for the reconstitution of lyophilized antibodies.**

**Do not use IHC Diluent RE7133 if it becomes turbid, develops odor or contains precipitate.**

The concentration of ProClin™ 950, the preservative used in IHC Diluent RE7133 is 0.35%. It may cause irritation to the skin, eyes, mucus membranes and upper respiratory tract.

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

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

Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucus membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.

Consult Federal, State or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

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

### Procedure

#### A. Reagents required but not supplied

1. Standard solvents used in immunohistochemistry.
2. Antigen retrieval solution(s) (see **Recommendations on Use** for primary antibody).
3. Enzyme retrieval solution(s) (see **Recommendations on Use** for primary antibody).
4. Primary antibody.
5. Detection system.
6. Mounting medium.

#### B. Equipment required but not supplied

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

## C. Methodology

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

The combination of the primary antibody, its dilution and optimum conditions for Epitope Retrieval, together with the detection system should be validated by the user on a series of known positive and negative controls.

Mix appropriate volumes of primary antibody, Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 or Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 and IHC Diluent RE7133 to achieve the validated dilutions.

Store diluted antibody at 2-8 °C. Return all reagents to 2-8 °C immediately after use.

### Quality Control

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

### Positive Tissue Control

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

### Negative Tissue Control

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

### Negative Reagent Control

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

### Patient Tissue

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

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

### Performance Characteristics

The performance of Novocastra™ IHC Diluent RE7133 has been validated using a range of Novocastra™ primary antibodies and detection systems.

These products are stable up to the expiry date(s) indicated on the product labels.

### Bibliography

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.

6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

**Amendments to Previous Issue**

Not applicable.

**Date of Issue**

30 April 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Références des produits : RE7133

### Utilisation prévue

*Diagnostic in vitro.*

Le Novocastra™ IHC Diluent RE7133 est destiné à être utilisé comme diluant pour les anticorps primaires Novocastra™, le Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 et le Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 dans le cadre de procédures immunohistochimiques (IHC). L'interprétation clinique de tout marquage, ou absence de marquage, doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée par un pathologiste qualifié à la lumière des antécédents cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques.

### Principe de la procédure

L'emploi d'un anticorps pour détecter une antigène dans les cellules des tissus a été décrit pour la première fois par Coons AH et Kaplan MH en 1950.<sup>1</sup> Depuis lors, de nombreux développements se sont produits qui ont conduit aux procédures immunoperoxydasiques couramment utilisées de nos jours (pour les Principes de la procédure de marquage IHC, voir le Mode d'emploi du système de détection approprié). Pour obtenir un marquage optimal dans le cadre des procédures IHC, les anticorps primaires nécessitent une dilution. La liaison des anticorps à leurs épitopes peut être aisément dissociée par des pH et des forces ioniques extrêmes. Par conséquent, un diluant approprié doit être utilisé pour obtenir un marquage optimal.

Ce produit est utilisé comme diluant des anticorps primaires dans le cadre des procédures IHC qui permettent une identification qualitative des antigènes par microscopie optique, dans des coupes fixées au formol, incluses en paraffine, par l'intermédiaire d'étapes séquentielles comportant des étapes de lavage. Le Novocastra™ IHC Diluent RE7133 participe au maintien de la spécificité et de la stabilité des anticorps.

### Réactifs fournis

IHC Diluent RE7133 (500 ml). Solution saline tamponnée de Tris, surfactant et agent de stabilisation des protéines avec du ProClin™ 950 à 0,35 %.

### Reconstitution, Mélange, Dilution, Titrage

Le IHC Diluent RE7133 est un réactif prêt à l'emploi. Il n'est pas recommandé de reconstituer, mélanger, diluer, ou titrer ce réactif. 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. La turbidité, le développement d'odeurs et la présence d'un précipité, constituent des indications de la contamination du IHC Diluent RE7133.

### Préparation des spécimens

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

### Mises en garde et Précautions

Pour utilisateurs professionnels.

**Ne pas utiliser le IHC Diluent RE7133 pour la reconstitution des anticorps lyophilisés.**

**Ne pas utiliser le IHC Diluent RE7133 en présence d'une turbidité, du développement d'odeurs ou s'il contient un précipité.**

La concentration en ProClin™ 950, l'agent de conservation utilisé dans le IHC Diluent RE7133, est de 0,35 %. Elle est susceptible de provoquer une irritation de la peau, des yeux, des muqueuses et de l'appareil respiratoire supérieur.

Une fiche toxicologique (MSDS) est disponible sur demande.

Les spécimens, avant et après fixation, ainsi que tous les matériels ayant été en contact avec eux, doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et éliminés conformément aux précautions appropriées en vigueur.<sup>2</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(s) de restauration des antigènes (voir Recommandations d'utilisation de l'anticorps primaire).
3. Solution(s) de restauration de l'enzyme (voir Recommandations d'utilisation de l'anticorps primaire).
4. Anticorps primaire.
5. Système de détection.
6. 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 de conditions optimales de restauration de l'épitope ainsi que le système de détection doit être validée par l'utilisateur sur une série de contrôles négatifs et positifs connus.

Mélanger des volumes appropriés d'anticorps primaire, de Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 ou de Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 et de IHC Diluent RE7133 pour parvenir aux dilutions validées.

Conserver l'anticorps dilué à 2-8 °C. Remettre immédiatement tous les réactifs à 2-8 °C après utilisation.

### Contrôle de qualité

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

### Tissu de contrôle positif

Il est utilisé pour indiquer que les tissus ont été préparés correctement et que les techniques de marquage étaient appropriées. Un contrôle tissulaire positif doit être inclus dans toute opération de marquage pour chaque ensemble d'anticorps primaire/de conditions d'analyse. Un tissu présentant un marquage faiblement positif est plus adapté à un contrôle de qualité optimal qu'un tissu présentant un marquage fortement positif et il permet de détecter de moindres niveaux de dégradation du réactif.<sup>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, le Streptavidin-HRP, ou le polymère marqué et le substrat chromogène respectivement. Si un marquage spécifique se produit dans le tissu de contrôle négatif, les résultats des spécimens du patient doivent être considérés comme invalides.

### Réactif de contrôle négatif

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

### Tissu du patient

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

### Limites

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, un incorrect ou une contamination par d'autres tissus ou d'autres liquides sont susceptibles de conduire à la production d'artefacts, au piégeage de l'anticorps ou à des résultats faussement négatifs. Des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités propres au tissu, peuvent conduire à des résultats incohérents.<sup>6</sup>

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

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

Le Novocastra™ IHC Diluent RE7133 doit être utilisé sur des coupes incluses en paraffine avec des exigences spécifiques en matière de fixation.

Une expression antigénique inattendue est susceptible de se produire, en particulier au niveau des néoplasmes. L'interprétation clinique de toute coupe tissulaire marquée doit comporter une analyse morphologique et l'évaluation des contrôles appropriés.

## **Caractéristiques de performance**

Les performances du Novocastra™ IHC Diluent RE7133 ont été validées à l'aide d'une gamme d'anticorps primaires et de systèmes de détection Novocastra™.

Ce produit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit.

## **Bibliographie**

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## **Amendements apportés à la version précédente**

Non applicable.

## **Date de publication**

30 avril 2019



# Novocastra™ IHC Diluent

## Cod. prodotto: RE7133

### Uso previsto

*Per uso diagnostico in vitro.*

Novocastra™ IHC Diluent RE7133 è destinato all'uso nelle tecniche immunostochimiche (IHC) come diluente degli anticorpi primari Novocastra™, di Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 e di Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109. L'interpretazione clinica di ogni colorazione o della sua assenza va integrata da studi morfologici che utilizzino i controlli appropriati e deve essere valutata da un patologo qualificato, nel contesto della storia clinica del paziente e delle altre metodiche diagnostiche adoperate.

### Principio della procedura

L'uso di anticorpi nella determinazione di antigeni presenti nelle cellule di un tessuto è stato descritto per la prima volta da Coons AH e Kaplan MH nel 1950.1 A partire da quel momento sono stati fatti molti progressi, che hanno portato alle tecniche immunoperoxidasiche oggi comunemente in uso (per il Principio della procedura relativo alla colorazione IHC, vedere le Istruzioni per l'uso del sistema di determinazione corrispondente). Per ottenere una colorazione ottimale con le tecniche IHC, gli anticorpi primari richiedono la diluizione. Il legame degli anticorpi con i propri epitopi si può rompere facilmente in condizioni limite di pH e di forza ionica. Per questo, per ottenere una colorazione ottimale, bisogna usare un diluente adatto. Questo prodotto viene impiegato come diluente degli anticorpi primari, nel corso di tecniche immunostochimiche (IHC) che consentono l'identificazione qualitativa in microscopia ottica degli antigeni, in sezioni tissutali fissate in formalina e incluse in paraffina, attraverso fasi sequenziali intervallate da fasi di lavaggio. Novocastra™ IHC Diluent RE7133 favorisce il mantenimento della specificità e della stabilità anticorpale.

### Reagenti forniti

IHC Diluent RE7133 (500 ml). Tampono Tris, surfattante e stabilizzatore proteico con 0,35% di ProClin™ 950.

### Ricostituzione, miscelazione, diluizione, titolazione

IHC Diluent RE7133 è un reagente pronto all'uso. Non si consiglia la ricostituzione, la miscelazione, la diluizione o la titolazione di questo reagente. L'ulteriore diluizione potrebbe causare una perdita di colorazione dell'antigene. Tali eventuali variazioni devono essere convalidate dall'utente.

### Conservazione e stabilità

Conservare a 2-8 °C. Non congelare. Immediatamente dopo l'uso, riportare a 2-8 °C. Non usare dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto. Condizioni di conservazione diverse da quelle sopra specificate vanno verificate dall'utente. Non essendoci segni evidenti che indichino l'instabilità del prodotto, i controlli positivi e negativi vanno eseguiti in parallelo ai test sui campioni del paziente. Indicatori di contaminazione di IHC Diluent RE7133 sono l'intorbidimento, lo sviluppo di odore e la presenza di un precipitato.

### Preparazione del campione biologico

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

### Avvertenze e precauzioni

Per uso professionale.

### Non usare IHC Diluent RE7133 per la ricostituzione di anticorpi liofilizzati.

### Non usare IHC Diluent RE7133 se il prodotto s'intorbisce, se sviluppa odore o se è presente un precipitato.

La concentrazione di ProClin™ 950, il conservante utilizzato in IHC Diluent RE7133, è 0,35%. Questo prodotto può causare irritazioni della cute, degli occhi, delle mucose e delle vie respiratorie superiori.

La scheda di sicurezza del prodotto (MSDS) è disponibile su richiesta. Prima e dopo la fissazione, i campioni biologici e tutti i materiali ad essi esposti vanno trattati come potenzialmente infettanti e smaltiti con le appropriate precauzioni.<sup>2</sup>

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

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

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

### Procedura

#### A. Reagenti necessari ma non forniti

1. Solventi standard utilizzati in immunostochimica.
2. Soluzione/i per lo smascheramento antigenico (vedere Raccomandazioni per l'uso per l'anticorpo primario).
3. Soluzione/i per lo smascheramento con enzimi (vedere Raccomandazioni per l'uso per l'anticorpo primario).
4. Anticorpo primario.
5. Sistema di determinazione.
6. Mezzo di montaggio.

#### B. Attrezzature necessarie ma non fornite

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

## C. Metodologia

Prima di intraprendere questa metodologia, l'utente deve aver acquisito esperienza con le tecniche immunostochimiche. La combinazione dell'anticorpo primario, la sua diluizione in IHC Diluent RE7133, assieme al sistema di determinazione vanno convalidate dall'utente su una serie di controlli positivi negativi noti.

Per ottenere le diluizioni convalidate, miscelare volumi appropriati di anticorpo primario, di Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 o di Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 con IHC Diluent RE7133. Conservare l'anticorpo diluito a 2-8 °C. Immediatamente dopo l'uso, riportare tutti i reagenti a 2-8 °C.

### 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

### 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.<sup>3</sup> Per il tessuto raccomandato come controllo positivo, vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario. Se il controllo positivo del tessuto non dimostra colorazione positiva, i risultati con i campioni biologici del test vanno considerati non validi.

### Controllo negativo del tessuto

Va esaminato dopo il controllo positivo, per verificare la specificità della marcatura dell'antigene bersaglio da parte dell'anticorpo primario. Per il tessuto raccomandato come controllo negativo, vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario. In alternativa, la varietà dei tipi cellulari presenti nella maggior parte delle sezioni tissutali offre spesso siti di controllo negativo, ma questo va verificato dall'utente. La colorazione aspecifica, se presente, assume di solito aspetto diffuso. La colorazione sporadica del tessuto connettivo può anche manifestarsi in seguito ad iperfissazione di sezioni di tessuto in formalina. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, usare cellule intatte. Le cellule necrotiche o degenerate si colorano spesso in maniera aspecifica.<sup>4</sup> Si possono osservare risultati falsamente positivi, dovuti a legame non immunologico delle proteine o a prodotti di reazione del substrato. Tali falsi positivi possono essere anche causati da enzimi endogeni quali la pseudoperossidasi (eritrociti), la perossidasi endogena (citocromo C) o la biotina endogena<sup>5</sup> (es. fegato, mammella, cervello, rene). Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame enzimatico aspecifico dall'immunoreattività specifica, possono essere colorati ulteriori tessuti del paziente esclusivamente e rispettivamente con substrato cromogeno, con Streptavidin-HRP o con polimero marcato e substrato cromogeno. Se nel controllo negativo del tessuto compare una colorazione specifica, i risultati sui campioni biologici ottenuti dal paziente devono essere considerati non validi.

### Controllo negativo del reagente

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

### Tessuto del paziente

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

### Limitazioni

L'immunostochimica è un procedimento diagnostico a più passi (multistep) che richiede un'esperienza specifica nella selezione dei reagenti appropriati, nella selezione, fissazione e processazione dei tessuti, nella preparazione di vetrini IHC e nell'interpretazione dei risultati della colorazione. La colorazione del tessuto dipende dalle modalità di manipolazione e di processazione del tessuto stesso, adottate prima della colorazione. La fissazione, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento o la sezione condotti in modo non corretto, o la contaminazione con altri tessuti o liquidi, può produrre artefatti, intrappolamento (trapping) anticorpale o risultati falsamente negativi. Risultati incompatibili possono essere dovuti a modifiche dei metodi di fissazione e di inclusione o ad irregolarità intrinseche al tessuto.<sup>6</sup> Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati. L'interpretazione clinica di ogni colorazione o della sua assenza va integrata da studi morfologici che utilizzino i controlli appropriati e deve essere valutata da un patologo qualificato, nel contesto della storia clinica del paziente e delle altre metodiche diagnostiche adoperate. Novocastra™ IHC Diluent RE7133 è destinato all'uso su sezioni tissutali incluse in paraffina con specifici requisiti di fissazione. Un'espressione antigenica inattesa può manifestarsi in particolare nelle neoplasie. L'interpretazione clinica di ogni sezione tissutale colorata deve includere l'analisi morfologica e la valutazione dei controlli appropriati.

### Caratteristiche di rendimento

Il rendimento di Novocastra™ IHC Diluent RE7133 è stato convalidato utilizzando una gamma di anticorpi primari e di sistemi di determinazione Novocastra™.

Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

### **Riferimenti bibliografici**

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

### **Modifiche alla pubblicazione precedente**

Non applicabile.

### **Data di pubblicazione**

30 aprile 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Produkt Nr.: RE7133

### Verwendungszweck

Für *in-vitro*-Diagnostik.

Novocastra™ IHC Diluent RE7133 ist für die Verwendung als Verdünnungsmittel für primäre Novocastra™ Antikörper, Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 und Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 in immunhistochemischen (IHC-) Verfahren bestimmt. 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 Verwendung eines Antikörpers zum Nachweis eines Antigens in Gewebezellen wurde erstmals 1950 von Coons AH und Kaplan MH beschrieben.<sup>1</sup> Seitdem haben viele Entwicklungen auf diesem Gebiet zu den heute weit verbreitet verwendeten Immunperoxidasetechniken geführt (die **Verfahrensgrundlage** der IHC-Färbung ist in den Gebrauchsanweisungen des entsprechenden Nachweissystems beschrieben). Zum Erhalt einer optimalen Färbung müssen primäre Antikörper in IHC-Verfahren verdünnt werden. Die Bindung von Antikörpern an ihre Epitope kann durch einen extremen pH-Wert und ionische Kraft leicht gelöst werden. Daher muss zum Erhalt einer optimalen Färbung ein angemessenes Verdünnungsmittel verwendet werden. Dieses Produkt wird als Verdünnungsmittel für primäre Antikörper in immunhistochemischen (IHC-) Verfahren verwendet, die den qualitativen Nachweis von Antigenen in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebeschnitten in mehreren aufeinander folgenden Schritten mit dazwischen liegenden Waschschrritten mittels Lichtmikroskopie gestatten. Novocastra™ IHC Diluent RE7133 unterstützt den Erhalt der Spezifität und Stabilität von Antikörpern.

### Gelieferte Reagenzien

IHC Diluent RE7133 (500 ml). Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung, oberflächenaktive Substanz und Protein stabilisator mit 0,35% ProClin™ 950.

### Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration

IHC Diluent RE7133 ist ein gebrauchsfertiges Reagenz. Rekonstitution, Mischen, Verdünnung oder Titration dieses Reagenz wird nicht empfohlen. Eine weitere Verdünnung könnte zum Verlust der Antigenfärbung führen. Der Benutzer muss solche Änderungen zuvor validieren.

### Lagerung und Stabilität

Bei 2-8°C lagern. Nicht einfrieren. Nach Gebrauch sofort wieder bei 2-8°C lagern. Nach Ablauf des Verfallsdatums (auf dem Behälteretikett angezeigt) darf das Produkt nicht mehr verwendet werden. Lagerbedingungen, die von den oben genannten Bedingungen abweichen, müssen vom Benutzer verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für die Instabilität dieses Produkts. Daher sind die positiven und negativen Kontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben durchzuführen. Anzeichen einer Verunreinigung von IHC Diluent RE7133 sind Trübung, Geruchsentwicklung oder das Vorhandensein eines Präzipitats.

### Probenvorbereitung

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

### Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

Für geschultes Fachpersonal.

**IHC Diluent RE7133 nicht zur Rekonstitution lyophilisierter Antikörper verwenden.**

**IHC Diluent RE7133 nicht verwenden, wenn es trüb geworden ist, einen Geruch entwickelt oder Präzipitat enthält.**

Die Konzentration von ProClin™ 950, dem in IHC Diluent RE7133 verwendeten Konservierungsmittel, beträgt 0,35%. Es kann Reizungen von Haut, Augen, Schleimhäuten und oberen Atemwegen hervorrufen. Ein Sicherheitsdatenblatt (Material Safety Data Sheet (MSDS)) ist auf Anfrage erhältlich. Vor und nach der Fixierung sind die Proben sowie alle Materialien, die mit ihnen in Kontakt gekommen sind, als potentiell infektiös zu behandeln und daher mit entsprechender Vorsicht zu entsorgen.<sup>2</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 für 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. Antigendemaskierungslösung(en) (siehe **Gebrauchsempfehlungen** für den primären Antikörper).
3. Enzymdemaskierungslösung(en) (siehe **Gebrauchsempfehlungen** für den primären Antikörper).
4. Primärer Antikörper.
5. Nachweissystem.
6. Aufbringungsmedium.

## B. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Ausrüstung

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

## C. Vorgehensweise

Vor Anwendung dieser Vorgehensweise müssen die Benutzer mit immunhistochemischen Techniken vertraut sein. Die Kombination aus dem primären Antikörper und seiner Verdünnung in IHC Diluent RE7133 zusammen mit dem Nachweissystem ist vom Benutzer auf einer Reihe bekannter positiver und negativer Kontrollen zu validieren. Angemessene Volumina von primärem Antikörper, Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 bzw. Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 und IHC Diluent RE7133 mischen, um die validierten Verdünnungen zu erhalten. Verdünnten Antikörper bei 2-8 °C lagern. Alle Reagenzien nach Gebrauch sofort wieder bei 2-8 °C lagern. Qualitätskontrolle Unterschiede bei der Gewebeparbeitung und den technischen Verfahren im Labor des Benutzers können zu signifikanten Schwankungen bei den Ergebnissen führen. Daher ist es wichtig, zusätzlich zu den folgenden Verfahren regelmäßige laborinterne Kontrollen durchzuführen. Die Kontrollen sollten mit frischen Autopsie-/Biopsie-/chirurgischen Proben vorgenommen werden, die so bald wie möglich und auf dieselbe Weise wie die Patientenprobe(n) in Formalin fixiert, behandelt und in Paraffin eingebettet worden sind.

### Qualitätskontrolle

Unterschiede bei der Gewebeparbeitung und den technischen Verfahren im Labor des Benutzers können zu signifikanten Schwankungen bei den Ergebnissen führen. Daher ist es wichtig, zusätzlich zu den folgenden Verfahren regelmäßige laborinterne Kontrollen durchzuführen. Die Kontrollen sollten mit frischen Autopsie-/Biopsie-/chirurgischen Proben vorgenommen werden, die so bald wie möglich und auf dieselbe Weise wie die Patientenprobe(n) in Formalin fixiert, behandelt und in Paraffin eingebettet worden sind.

### Positive Gewebekontrolle

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an. In jedem Färbelauf sollte für jeden Satz Testbedingungen/ primärer Antikörper eine positive Gewebekontrolle durchgeführt werden. Gewebe mit schwach positiver Färbung ist für die optimale Qualitätskontrolle und den Nachweis kleiner Minderungen in der Reagenzleistung besser geeignet, als ein Gewebe mit stark positiver Färbung.<sup>3</sup> Informationen über das positive Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden. Falls das positive Kontrollgewebe keine positive Färbung nachweisen kann, sollten die mit den Testproben erzielten Ergebnisse als ungültig betrachtet werden.

### Negative Gewebekontrolle

Die negative Gewebekontrolle sollte nach der positiven Gewebekontrolle erfolgen, um die Spezifität der Zielantigenmarkierung durch den primären Antikörper zu verifizieren. Informationen über das empfohlene negative Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden. Alternativ bietet die Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen, die in den meisten Gewebeschnitten vorliegen, häufig Stellen für eine negative Kontrolle. Jedoch sollte dies vom Benutzer verifiziert werden. Liegt eine unspezifische Färbung vor, hat diese gewöhnlich ein diffuses Erscheinungsbild. Eine sporadische Färbung des Bindegewebes kann ebenfalls in Schnitten von übermäßig formalinfixierten Geweben beobachtet werden. Zur Bewertung der Färberegebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.<sup>4</sup> Falsch-positive Ergebnisse können aufgrund einer nichtimmunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten beobachtet werden. Solche Ergebnisse können auch durch endogene Enzyme wie Pseudoperoxidase (Erythrozyten), endogene Peroxidase (Zytochrom C) oder endogenes Biotin<sup>5</sup> (beispielsweise Leber, Mamma, Gehirn, Niere) hervorgerufen werden. Um eine endogene Enzymaktivität bzw. eine unspezifische Enzymbindung von einer spezifischen Immunreaktivität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substratchromogen, Streptavidin-HRP bzw. markiertem Polymer plus Substratchromogen gefärbt werden. Falls im negativen Kontrollgewebe eine spezifische Färbung auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

### Negative Reagenzkontrolle

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

### Patientengewebe

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

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

## **Leistungsmerkmale**

Die Leistung des Novocastra™ IHC Diluent RE7133 wurde mithilfe einer Reihe primärer Novocastra™ Antikörper und Nachweissysteme validiert. Dieses Produkt bleibt bis zum auf dem Behälteretikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

## **Literatur**

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## **Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe**

Keine.

## **Ausgabedatum**

30 April 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Referencia: RE7133

### Indicaciones de uso

*Para uso diagnóstico in vitro.*

El producto Novocastra™ IHC Diluent RE7133 está indicado como diluyente de anticuerpos primarios Novocastra™, de Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 y de Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 en procedimientos de inmunohistoquímica. 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

Coons AH and Kaplan MH fueron los primeros en describir, en 1950, el uso de un anticuerpo para detectar un antígeno en células tisulares.<sup>1</sup> Desde entonces, se han producido muchos avances, que han desembocado en los procedimientos de inmunoperoxidasa de uso habitual en la actualidad (los Principios del procedimiento de la tinción inmunohistoquímica se pueden consultar en las instrucciones de uso del sistema de detección correspondiente). Para obtener una tinción óptima en procedimientos de inmunohistoquímica, es necesario diluir los anticuerpos primarios. La unión de anticuerpos a sus epítomos se puede disociar fácilmente mediante un pH y una fuerza iónica extremos. Por lo tanto, se debe usar un diluyente apropiado para obtener la tinción óptima. Este producto se usa en procedimientos inmunohistoquímicos como diluyente de anticuerpos primarios, 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. El producto Novocastra™ IHC Diluent RE7133 facilita que se mantenga la especificidad y la estabilidad de los anticuerpos.

### Reactivos suministrados

IHC Diluent RE7133 (500 ml). Solución salina tamponada con Tris, agente tensioactivo y estabilizante de las proteínas con ProClin™ 950 al 0,35%.

### Reconstitución, mezclado, dilución y titulación

IHC Diluent RE7133 es un reactivo listo para su uso. No se recomienda reconstituir, mezclar, diluir ni titular este reactivo. Una mayor dilución puede provocar la pérdida de la tinción del antígeno. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo.

### Almacenamiento y estabilidad

Almacénelo a una temperatura de 2 a 8 °C. No lo congele. Devuélvalo a 2 a 8 °C inmediatamente después de su uso. No lo utilice después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto. Cualesquiera condiciones de almacenamiento que no sean las especificadas deben ser verificadas por el usuario. No existe ningún signo evidente que indique la inestabilidad de este producto; por lo tanto, deberán realizarse simultáneamente controles positivos y negativos con muestras de paciente. La contaminación del producto IHC Diluent RE7133 está indicada por la presencia de turbidez, la aparición de olor o la presencia de un precipitado.

### Preparación de las muestras

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

### Advertencias y precauciones

Para usuarios profesionales.

**No use el producto IHC Diluent RE7133 para reconstituir anticuerpos liofilizados.**

**No use tampoco IHC Diluent RE7133 si se enturbia, aparece olor o muestra un precipitado.**

La concentración de ProClin™ 950, el conservante usado en IHC Diluent RE7133, es del 0,35%. Puede causar irritación en la piel, los ojos, las mucosas y en el tracto respiratorio altas. Si la solicita, existe una hoja de información sobre la seguridad del material (MSDS) a su disposición. Las muestras, antes y después de ser fijadas, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como capaces de transmitir una infección, y se deben desechar tomando las precauciones adecuadas.<sup>2</sup> No pipeteo nunca los reactivos con la boca, y evite el contacto de la piel y de las membranas mucosas con los reactivos y las muestras. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas sensibles, lave éstas con abundante agua. Consulte las normativas nacionales, estatales, provinciales o municipales acerca de cómo desechar cualquier componente potencialmente tóxico. Reduzca al mínimo la contaminación microbiana de los reactivos; de lo contrario, podría producirse un aumento de la tinción no específica. Cualquier tiempo o temperatura de incubación que no sean los aquí especificados pueden conducir a resultados erróneos. Cualquier cambio de tal naturaleza debe ser validado por el usuario.

### Procedimiento

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

1. Disolventes estándar utilizados en inmunohistoquímica.
2. Soluciones de recuperación de antígenos (vea en **Recomendaciones de uso** del anticuerpo primario).
3. Soluciones de recuperación de enzimas (vea en **Recomendaciones de uso** del anticuerpo primario).
4. Anticuerpo primario.
5. Sistema de detección.
6. 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 en IHC Diluent RE7133, junto con el sistema de detección, deberá ser validada por el usuario, en una serie de controles positivos y negativos conocidos.

Mezcle el volumen correcto de anticuerpo primario y de los productos Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 o Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 e IHC Diluent RE7133 para lograr las diluciones validadas. Almacene el anticuerpo diluido a una temperatura de 2 a 8 °C. Devuelva todos los reactivos a 2 a 8 °C inmediatamente después de su uso.

### 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>3</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>4</sup> También pueden observarse falsos positivos causados por la unión no inmunológica a proteínas o a 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>5</sup> (por ejemplo, de hígado, mama, cerebro o riñón). Para diferenciar la actividad de las enzimas endógenas o la unión inespecífica de las enzimas de la inmunorreactividad específica, pueden teñirse otros tejidos del paciente exclusivamente con cromógeno sustrato, Streptavidin-HRP o polímeros marcados, y con cromógeno sustrato, respectivamente. Si se produce tinción específica del control tisular negativo, los resultados de las muestras de los pacientes deben considerarse no válidos.

### Control de reactivo negativo

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

### Tejido del paciente

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

### Limitaciones

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 IHC; e interpretación de los resultados de la tinción. La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento del tejido previos a la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o seccionamiento incorrectos, o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede generar artefactos, atrapamiento del anticuerpo o falsos negativos. La aparición de resultados incoherentes puede deberse a variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, o a irregularidades inherentes al tejido.<sup>6</sup> Una contratinción excesiva o incompleta puede poner en peligro la interpretación correcta de los resultados. La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia se debe complementar con estudios morfológicos utilizando los controles adecuados, y un patólogo cualificado debe evaluarla en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas. Novocastra™ IHC Diluent RE7133 está indicado en secciones incluidas en parafina con requisitos de fijación específicos. Puede producirse una expresión inesperada del antígeno, especialmente en las neoplasias. La interpretación clínica de cualquier sección de tejido teñida debe incluir un análisis morfológico y la evaluación de los controles apropiados.

### Características del rendimiento

La eficacia de Novocastra™ IHC Diluent RE7133 se ha validado usando una gama de anticuerpos primarios y sistemas de detección Novocastra™. Este producto es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto.



## **Bibliografía**

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## **Correcciones a la publicación anterior**

Se ha añadido incluido información en la sección Advertencias y precauciones.

## **Fecha de publicación**

30 de abril de 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## N.º do produto: RE7133

### Utilização prevista

*Para utilização em diagnósticos in vitro.*

O produto Novocastra™ IHC Diluent RE7133 foi concebido para ser utilizado como diluente dos anticorpos primários Novocastra™, de Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 e de Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 em procedimentos de imunohistoquímica (IHQ). A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos empregando os devidos controlos, e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico.

### Princípio do procedimento

A utilização de um anticorpo para detectar um antígeno nas células de tecidos foi descrita pela primeira vez por Coons AH e Kaplan MH em 1950<sup>1</sup>. Daí em diante deram-se muitos desenvolvimentos que culminaram nos procedimentos de imunoperoxidase normalmente utilizados actualmente (para determinar os **Princípios do procedimento** da coloração IHQ, consultar as instruções de utilização do sistema de detecção apropriado). Para obter um nível óptimo de coloração nos procedimentos de IHQ, é necessário diluir os anticorpos primários. A ligação de anticorpos aos seus epítomos pode-se desassociar prontamente através de um pH extremo e da potência iónica. Por conseguinte, deve utilizar-se um diluente apropriado para se obter uma coloração ideal. Este produto é utilizado como diluente de anticorpos primários em procedimentos imunohistoquímicos (IHQ), os quais permitem a identificação qualitativa de antígenos, por microscopia óptica, em secções de tecido fixado com formal e envolvido em parafina, através de etapas sequenciais intercaladas com etapas de lavagem. O Novocastra™ IHC Diluent RE7133 ajuda a manter a especificidade e estabilidade dos anticorpos.

### Reagentes fornecidos

IHC Diluent RE7133 (500ml). Soro tamponado com tris, um produto tenso-activo e um estabilizador de proteína com ProClin™ 950 a 0,35%.

### Reconstituição, mistura, diluição, titulação

O produto IHC Diluent RE7133 é um reagente pronto para ser utilizado. Não se recomenda a reconstituição, mistura, diluição ou titulação deste reagente. Qualquer diluição adicional poderá resultar na perda de coloração do antígeno. O utilizador deve validar quaisquer alterações dessa natureza. Armazenamento e estabilidade Armazenar a 2-8 °C. Não congelar. Retornar à temperatura de 2-8 °C imediatamente após a utilização. Não utilizar após o prazo de validade indicado no rótulo do produto. As condições de armazenamento que difirirem 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. Os sinais de contaminação do produto IHC Diluent RE7133 são um aspecto turvo, o desenvolvimento de um odor ou a presença de um precipitado.

### Preparação das amostras

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

### Avisos e precauções

Apenas para utilizadores profissionais.

**Não utilizar o diluente IHC Diluent RE7133 para a reconstituição de anticorpos liofilizados.**

**Não utilizar o IHC Diluent RE7133 caso tenha um aspecto turvo, desenvolva um odor ou contenha um precipitado.**

A concentração de ProClin™ 950, o conservante utilizado no IHC Diluent RE7133, é de 0,35%. Este pode causar irritação da pele, olhos, membranas mucosas e tracto respiratório superior.

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

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

1. Solventes comuns utilizados em imunohistoquímica.
2. Solução ou soluções de recuperação de antígenos (consultar a secção **Recomendações sobre a utilização** para obter informações sobre o anticorpo primário).
3. Solução ou soluções de recuperação das enzimas (consultar a secção **Recomendações sobre a utilização** para obter informações sobre o anticorpo primário).
4. Anticorpo primário.
5. Sistema de detecção.
6. 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 em IHC Diluent RE7133, juntamente com o sistema de detecção, deve ser validada pelo utilizador numa série de controlos positivos e negativos conhecidos.

Misturar volumes apropriados de anticorpo primário, Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 ou Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 e IHC Diluent RE7133 para alcançar as diluições validadas.

Armazenar o anticorpo diluído a 2-8 °C. Retornar todos os reagentes à temperatura de 2-8 °C imediatamente após a sua utilização.

#### Controlo da qualidade

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

#### Controlo de tecido positivo

Usado para assinalar os tecidos correctamente preparados e as técnicas de coloração indicadas. Por cada conjunto de condições de testes, em cada processo de coloração, deve incluir-se um controlo de tecido positivo. Os tecidos com uma coloração positiva fraca são mais apropriados do que os têm uma coloração positiva forte para proporcionarem um nível ideal de controlo da qualidade, bem como para detectarem níveis reduzidos de degradação dos reagentes<sup>3</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>4</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>5</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, Streptavidin-HRP ou com polímero etiquetado e substrato-cromogénio, respectivamente. Se ocorrer a coloração específica no controlo de tecido negativo, os resultados dos testes feitos com as amostras do doente devem ser considerados inválidos.

#### Controlo de reagente negativo

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

#### Tecido do doente

Examinar as amostras coloridas do doente em último lugar. A intensidade da coloração positiva deve ser avaliada dentro do contexto de qualquer coloração não específica de fundo do controlo de reagente negativo. Tal como com qualquer teste imunohistoquímico, um resultado negativo significa que o antígeno não foi detectado, e não que o antígeno se encontrava ausente das células ou tecido analisados. Se necessário, deve utilizar-se um painel de anticorpos para identificar reacções 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>6</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 empregando os devidos controlos, e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico. Novocastra™ IHC Diluent RE7133 serve para ser utilizado em secções envolvidas em parafina com requisitos especiais de fixação. Pode ocorrer uma expressão inesperada de antígeno, especialmente em neoplasmas. A interpretação clínica de qualquer secção de tecido colorido deverá incluir a análise morfológica e a avaliação de controlos apropriados.

#### Características de desempenho

O desempenho do Novocastra™ IHC Diluente RE7133 foi validado através da utilização de uma série de anticorpos primários e sistemas de detecção Novocastra™.

Este produto é estável até ao prazo de validade indicado no seu rótulo.

#### Bibliografia

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.

3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

**Emendas da edição anterior**

Não é aplicável.

**Data de emissão**

30 de Abril de 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Product No: RE7133

### Avsedd användning

*För in vitro diagnostisk användning.*

Novocastra™ IHC Diluent RE7133 är avsedd som ett spädningsmedel för Novocastra™ primära antikroppar, Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 och Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 i immunhistokemiska (IHC) procedurer. 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

Användningen av en antikropp för att detektera ett antigen i vävnadens celler beskrevs först av Coons AH och Kaplan MH 1950.<sup>1</sup> Sedan dess har mycket utvecklets vilket har lett till den immunperoxididasproceduren som är vanlig idag (för IHC färgning Metodens princip se Instruktioner vid användning för lämpligt detektionssystem). För att erhålla optimal färgning vid IHC procedurer måste primära antikroppar spädas. Bindningen av antikroppar till deras epitoper kan lätt lösas up vid extrem pH och jonisk styrka. Därför måste ett lämpligt utspädningsmedel användas för att erhålla optimal färgning. Denna produkt används som spädningsmedel för primära antikroppar vid IHC procedurer vilket tillåter kvalitativ identifikation med ljusmikroskopi av antigener i sektioner av formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad via sekvenssteg med inlagda tvättsteg. Novocastra™ IHC Diluent RE7133 hjälper till att upprätthålla antikropparnas specificitet och stabilitet.

### Tillhandahållna reagens

IHC Diluent RE7133 (500ml), Trisbuffrad koksaltlösning, ytaktivt medel och proteinstabiliseringsmedel med 0,35 % ProClin™ 950.

### Rekonstitution, blandning, spädning, titrering

IHC Diluent RE7133 är ett bruksfärdigt reagens. Rekonstitution, blandning, spädning eller titrering av dessa reagens rekommenderas inte. Fortsatt spädning kan resultera i förlust av antigenfärgning. Användaren måste kontrollera sådana förändringar.

### Förvaring och stabilitet

Förvara vid 2-8 °C. 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. Indikationer på kontaminering av IHC Diluent RE7133 är turbiditet, utveckling av lukt eller närvaro av precipitat.

### Preparation av prov

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

### Varningar och försiktighetsåtgärder

För professionella användare.

**Använd inte IHC Diluent RE7133 för rekonstitution av frystorkade antikroppar.**

**Använd inte IHC Diluent RE7133 om det blir turbid, utvecklar lukt eller innehåller precipitat.**

Koncentrationen av ProClin™ 950, konserveringsmedlet som används i IHC Diluent RE7133 är 0,35 %. Det kan orsaka irritation på hud, ögon, slemhinnor and övre luftvägar.

Varuinformationsblad (MSDS) finns att få på begäran.

Prover, innan och efter fixering samt all material som utsätts för dem bör hanteras som om de överför infektioner och kastas enligt gällande försiktighetsåtgärder.<sup>2</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. Antigenåtervinningslösningar (se **Rekommendationer vid användning** för primära antikroppar).
3. Enzymåtervinningslösningar (se **Rekommendationer vid användning** för primära antikroppar).
4. Primär antikropp.
5. Detektionssystem.
6. Monteringsmedium.

### B. Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

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

### C. Metod

Innan metoden tillämpas måste användarna vara utbildade i immunhistokemiska tekniker.

Kombinationen av primär antikropp, dess spädning i IHC Diluent RE7133, tillsammans med detektionssystemet bör kontrolleras av användaren genom en serie kända positiva och negativa kontroller.

Blanda lämpliga volymer primär antikropp, Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 eller Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 och IHC Diluent RE7133 för att erhålla rätt spädningstrycka.

Förvara spädd antikropp vid 2-8 °C. Låt alla reagens återgå till 2-8 °C direkt efter användning.

## Kvalitetskontroll

Skilnader i vävnadsbehandling och tekniska metoder i användarens laboratorium kan ge stor variation i resultaten vilket kan göra det nödvändigt att genomföra regelbundna interna kontroller utöver följande metoder. Kontroller bör vara färskas obduktions-/biopsi-/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>3</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 målantigenet med den primära antikroppen. För rekommenderad negativ kontrollvävnad se primär antikropp Instruktioner vid användning. Alternativt ger ofta en mängd olika celltyper som finns i de flesta vävnadssnitt negativa kontrollområden men detta bör kontrolleras av användaren. 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 ospecifikt.<sup>4</sup> Falskt positiva resultat kan ses p.g.a. ickeimmunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erythrocyter), endogent peroxidase (cytokrom C), eller endogent biotin<sup>5</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, Streptavidin-HRP eller märkt polymer, och substratkromogen. Om specifik färgning sker i den negativa vävnadskontrollen bör resultat med patientprover anses vara ogiltiga.

## Negativ reagenskontroll

Använd en 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 antigenområdet.

## 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 antigenet 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>6</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™ IHC Diluent RE7133 är avsedd för användning på paraffinbäddade sektioner med specifika fixeringskrav. Övåntat antigenuttryck kan ske, speciellt i neoplasmer. Morfologisk analys och utvärdering av lämpliga kontroller måste ingå i den kliniska tolkningen av alla färgade vävnadssnitt.

## Prestanda

Novocastra™ IHC Diluent RE7133 prestanda har kontrollerats med en rad Novocastra™ primära antikroppar och detektionssystem.

Denna produkt är stabil fram till utgångsdatumet på produktens etikett.

## Bibliografi

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## Rättelser av tidigare utgivning

Gäller inte.

## Utgivningsdatum

30 april 2019

RE7133

Page 21

# Novocastra™ IHC Diluent

## Κωδικός είδους: RE7133

### Χρήση για την οποία προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Το Novocastra™ IHC Diluent RE7133 προορίζεται για χρήση ως αραιωτικό για πρωτοταγή αντισώματα Novocastra™, το Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 και το Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 σε ανοσοϊστοχημικές (IHC) διαδικασίες. 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 χρήση ενός αντισώματος για την ανίχνευση ενός αντιγόνου σε κύτταρα ιστού περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Coons AH και Kaplan MH το 1950.<sup>1</sup> Έκτοτε, έχουν σημειωθεί πολλές εξελίξεις που οδήγησαν στις διαδικασίες ανοσοσυμπροεξιδόσης, οι οποίες χρησιμοποιούνται συνήθως σήμερα (για τις **Αρχές της διαδικασίας** της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, δείτε τις οδηγίες χρήσης του κατάλληλου συστήματος ανίχνευσης). Για την επίτευξη βέλτιστης χρώσης σε ανοσοϊστοχημικές (IHC) διαδικασίες, τα πρωτοταγή αντισώματα απαιτούν αραιώση. Η δέσμευση των αντισωμάτων στους επιτόπους τους είναι δυνατό να διασπαστεί άμεσα από ακραίες τιμές του pH και της ιοντικής ισχύος. Επομένως, για την επίτευξη βέλτιστης χρώσης πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα κατάλληλο αραιωτικό. Το προϊόν αυτό χρησιμοποιείται ως αραιωτικό για πρωτοταγή αντισώματα σε ανοσοϊστοχημικές (IHC) διαδικασίες, οι οποίες επιτρέπουν την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός αντιγόνων σε τομές ιστού μονιμοποιημένου με φορμόλη και εγκλεισμένου σε παραφίνη, μέσω διαδοχικών βημάτων με παρεμβλλόμενα βήματα πλύσης. Το Novocastra™ IHC Diluent RE7133 βοηθά στη διατήρηση της ειδικότητας και της σταθερότητας των αντισωμάτων.

### Παρεχόμενα αντιδραστήρια

IHC Diluent RE7133 (500 ml). Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα Tris, επιφανειοδραστικός παράγοντας και σταθεροποιητής πρωτεΐνης με 0,35% ProClin™ 950.

### Ανασύσταση, ανάμειξη, αραιώση, τιτλοδότηση

Το IHC Diluent RE7133 είναι ένα έτοιμο προς χρήση αντιδραστήριο. Δε συνιστάται ανασύσταση, ανάμειξη, αραιώση ή τιτλοδότηση του αντιδραστήριου αυτού. Περαιτέρω αραιώση ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα απώλεια χρώσης του αντιγόνου. Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει τυχόν τέτοια αλλαγή.

### Φύλαξη και σταθερότητα

Φυλάσσετε στους 2-8 °C. Μην καταψύχετε. Επαναφέρετε στους 2-8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Μη χρησιμοποιείτε μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην επικέτα του προϊόντος. Τυχόν συνθήκες φύλαξης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται πρέπει να επαληθεύονται από τον 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. Οι ενδείξεις μόλυνσης του IHC Diluent RE7133 είναι θαλερότητα, εμφάνιση οσμής ή η παρουσία ιζήματος.

### Παρασκευή δείγματος

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

### Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για επαγγελματίες χρήστες.

**Μη χρησιμοποιείτε το IHC Diluent RE7133 για την ανασύσταση λυοφιλοποιημένων αντισωμάτων.**

**Μη χρησιμοποιείτε το IHC Diluent RE7133 εάν καταστεί θελωρό, εμφανίσει οσμή ή περιέχει ιζήμα.**

Η συγκέντρωση του ProClin™ 950, το συντηρητικό που χρησιμοποιείται στο IHC Diluent RE7133, είναι 0,35%. Ενδέχεται να προκαλέσει ερεθισμό του δέρματος, των οφθαλμών, των βλεννογόνων και της άνω αναπνευστικής οδού.

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

Τα δείγματα, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, καθώς και όλα τα υλικά που εκτίθενται σε αυτά, πρέπει να υποβάλλονται σε χειρισμό ως δυνητικά μετάδοσης λοίμωξης και να απορρίπτονται με κατάλληλες προφυλάξεις.<sup>2</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. Συμβουλευτείτε τους ομοσπονδιακούς, πολιτειακούς ή τοπικούς κανονισμούς για απόρριψη τυχόν δυνητικών τοξικών συστατικών. Ελαχιστοποιήστε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διότι ενδέχεται να συμβεί αύξηση της μη ειδικής χρώσης. Χρόνοι ή θερμοκρασίες επιάσης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται ενδέχεται να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τυχόν τέτοια μεταβολή πρέπει να επικυρώνεται από τον χρήστη.

### Διαδικασία

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

1. Πρότυποι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημεία.
2. Διάλυμα(τα) ανάκτησης αντιγόνων (δείτε την **ενότητα Συστάσεις για τη χρήση** για το πρωτοταγές αντίσωμα).
3. Διάλυμα(τα) ανάκτησης ενζύμων (δείτε την **ενότητα Συστάσεις για τη χρήση** για το πρωτοταγές αντίσωμα).
4. Πρωτοταγές αντίσωμα.
5. Σύστημα ανίχνευσης.
6. 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 αντισώματος, της αραίωσής του σε IHC Diluent RE7133, σε συνδυασμό με το σύστημα ανίχνευσης, πρέπει να επικυρώνονται από τη χρήση σε σειρά γνωστών θετικών και αρνητικών μαρτύρων.

Αναμείξτε κατάλληλους όγκους πρωτοταγούς αντισώματος, Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 ή Concentrated Streptavidin- HRP RE7109 και IHC Diluent RE7133 για την επίτευξη των επικυρωμένων αραιώσεων.

Φυλάσσετε το αραιωμένο αντίσωμα στους 2-8 °C. Επαναφέρετε όλα τα αντιδραστήρια στους 2-8 °C αμέσως μετά τη χρήση.

## Ποιοτικός έλεγχος

Τυχόν διαφορές στην επεξεργασία των ιστών και τις τεχνικές διαδικασίες στο εργαστήριο του χρήστη ενδέχεται να προκαλέσουν σημαντική μεταβλητότητα στα αποτελέσματα, καθιστώντας αναγκαία την τακτική εκτέλεση εσωτερικών ελέγχων επιπέδων των ακόλουθων διαδικασιών. Οι μάρτυρες θα πρέπει να είναι φρέσκα δείγματα νεκροψίας/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 για βέλτιστο ποιοτικό έλεγχο και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν απόδοσης των αντιδραστηρίων.<sup>3</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 τον συνιστώμενο ιστό αρνητικού μάρτυρα, δείτε τις οδηγίες χρήσης του πρωτοταγούς αντισώματος. Εναλλακτικά, η ποικιλία διαφόρων κυτταρικών τύπων που υπάρχουν στις περισσότερες τομές ιστών παρέχει συχνά θέσεις αρνητικού μάρτυρα, αλλά αυτό πρέπει να επαληθεύεται από το χρήστη. Μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, έχει συνήθως διάχυτη εμφάνιση. Ενδέχεται επίσης να παρατηρηθεί σποραδική χρώση του 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>4</sup> Ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ανοσολογικής δέσμευσης των πρωτεϊνών ή των προϊόντων αντίδρασης του υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδουπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη<sup>5</sup> (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός). Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμευσης των ενζύμων από ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπλέον ιστοί ασθενών με υπόστρωμα- χρωμογόνο, στρεπταβιδίνη-HRP ή σηματοδότη πολυμερές και υπόστρωμα-χρωμογόνο, αντίστοιχα. Εάν παρουσιαστεί ειδική χρώση στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενούς θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

## Αρνητικός μάρτυρας αντιδραστήριου

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

## Ιστός ασθενούς

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

## 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, πύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να παράγει μορφωμένα, παγιδευση αντισώματος ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τυχόν ασυνεπή αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται σε παραλλαγές των μεθόδων μονιμοποίησης και εγκλεισμού ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.<sup>6</sup>

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

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

Το Novocastra™ IHC Diluent RE7133 προορίζεται 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 κεχρωσμένης τομής ιστού πρέπει να περιλαμβάνει μορφολογική ανάλυση και την αξιολόγηση των κατάλληλων μαρτύρων.

## Χαρακτηριστικά απόδοσης

Η απόδοση του Novocastra™ IHC Diluent RE7133 έχει επικυρωθεί με χρήση μιας σειράς πρωτοταγών αντισωμάτων και συστημάτων ανίχνευσης Novocastra™.

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



## **Βιβλιογραφία**

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## **Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση**

Δεν έχει εφαρμογή.

## **Ημερομηνία έκδοσης**

30 Απριλίου 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Produkt nr.: RE7133

### Tilsigtet anvendelse

*Til in vitro diagnostisk anvendelse.*

Novocastra™ IHC Diluent RE7133 er beregnet som diluent for primære Novocastra™ antistoffer, Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 og Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 i immunhistokemiske (IHC) procedurer. 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

Anvendelse af antistof til påvisning af et antigen i vævsceller blev først beskrevet af Coons AH og Kaplan MH i 1950.<sup>1</sup> Siden da har der fundet mange udviklinger sted, der har ført til de immunoperoxidaseprocedurer, der almindeligvis anvendes i dag (vedrørende Procedureprincip for IHCfarvning, se brugsvejledningen for det passende detektionssystem). For at opnå optimal farvning i IHC-procedurer kræver de primære antistoffer fortynding. Binding af antistoffer til deres epitoper kan let dissocieres ved ekstremt pH og ionstyrke. Derfor skal der anvendes et passende diluent for at opnå optimal farvning.

Dette produkt anvendes som diluent i immunhistokemiske (IHC) procedurer, der muliggør kvalitativ identifikation af antigener ved lysmikroskopi i vævssnit af formalinfixeret, paraffinindstøbt væv via sekventielle trin med indskudte vasketrin. Novocastra™ IHC Diluent RE7133 medvirker til at opretholde antistoffernes specificitet og stabilitet.

### Leverede reagenser

IHC Diluent RE7133 (500 ml). Trisbufferjusteret saltvandsopløsning, overfladeaktivt middel og proteinstabilisator med 0,35 % ProClin™ 950.

### Rekonstituering, blanding, fortynding, titrering

IHC Diluent RE7133 er et brugsklart reagens. Rekonstituering, blanding, fortynding eller titrering af dette reagens anbefales ikke. Yderligere fortynding kan resultere i tab af antigenfarvning. Brugeren skal kontrollere alle sådanne ændringer.

### Opbevaring og holdbarhed

Opbevares ved 2-8 °C. Må ikke fryses. Sættes tilbage til 2-8 °C umiddelbart efter brug. Må ikke anvendes efter udløbsdatoen angivet på produktets etikette. Andre opbevaringsbetingelser end de angivne skal verificeres af brugeren. Der er ingen tydelige tegn, der indikerer at produktet er ustabil. Der skal derfor udføres positive og negative kontroller samtidigt med patientprøver. Indikationer på kontaminering af IHC Diluent RE7133 er turbiditet, udvikling af lugt eller tilstedeværelse af et præcipitat.

### Prøveklargøring

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

### Advarsler og forholdsregler

Må kun anvendes af uddannet fagpersonale.

**Anvend ikke IHC Diluent RE7133 til rekonstituering af lyophiliserede antistoffer.**

**Anvend ikke IHC Diluent RE7133, hvis den bliver turbid, udvikler lugt eller indeholder et præcipitat.**

Koncentrationen af ProClin™ 950, konserveringsmidlet anvendt i IHC Diluent RE7133, er 0,35 %. Det kan forårsage irritation af hud, øjne, slimhinder og de øvre luftveje.

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

Prøver skal før og efter fiksering, lige som alle materialer eksponeret mod prøverne, håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler<sup>2</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. Antigengennfindingsopløsning(er) (se **Anbefalinger vedrørende anvendelse** for primært antistof).
3. Enzymgennfindingsopløsning(er) (se **Anbefalinger vedrørende anvendelse** for primært antistof).
4. Primært antistof.
5. Detektionssystem
6. Monteringsmedium.

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

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

### C. Metodologi

Inden ibrugtagning af denne metodologi, skal brugere være oplært i immunhistokemiske teknikker. Kombinationen af primært antistof og dets fortyndning i IHC Diluent RE7133 sammen med detektionssystemet skal valideres af brugeren på en serie kendte positive og negative kontroller.

Bland passende volumener af primært antistof, Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 eller Concentrated Streptavidin-HRP

RE7109 og IHC Diluent RE7133 med henblik på at opnå de validerede fortyndinger.

Opbevar det fortyndede antistof ved 2-8°C. Sæt alle reagenser tilbage til 2-8°C umiddelbart efter brug.

#### 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 farvningssteknikker. Der bør inkluderes en positiv vævskontrol for hvert sæt testbetingelser/primært antistof i hver farvekørsel. Svagt positivt farvet væv er mere egnet end kraftigt positivt farvet væv til optimal kvalitetskontrol og påvisning af små niveauer af reagensnedbrydning<sup>3</sup>. Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede positive kontrolvæv. Hvis den positive vævskontrol ikke udviser positiv farvning, skal resultater af testprøverne kasseres.

#### Negativ vævskontrol

Skal undersøges efter den positive vævskontrol for at sikre, at det primære antistof mærker målantigenet specifikt. Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede negative kontrolvæv. Alternativt frembyder de mange forskellige celletyper, der er til stede i de fleste vævssnit, ofte negative kontrolsteder, men dette skal verificeres af brugeren. Uspecifik farvning har, hvis til stede, ofte et diffust udseende. Sporadisk farvning af bindevæv kan ligeledes observeres i vævssnit af væv, der er fikseret for kraftigt i formalin. Anvend intakte celler til fortolkning af farvningsresultaterne. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte mere uspecifikt.<sup>4</sup> Der kan eventuelt ses falske positive resultater, der skyldes non-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. Dette kan ligeledes skyldes endogene enzymer, såsom pseudoperoxidase (erythrocytter), endogen peroxidase (cytochrom C) eller endogent biotin<sup>5</sup> (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre). For at differentiere mellem endogen enzymaktivitet eller uspecifik enzybinding og specifik immunoreaktivitet kan yderligere patientvæv eventuelt farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen, Streptavidin-HRP eller mærket polymer og substratkromogen. Hvis der optræder specifik farvning i den negative vævskontrol, skal resultaterne af patientprøverne kasseres.

#### Negativ reagenskontrol

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

#### Patientvæv

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 antigenet ikke blev påvist. Ikke at antigenet 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>6</sup> For kraftigt 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™ IHC Diluent RE7133 er beregnet til anvendelse på paraffinindstøbte vævssnit med specifikke krav til fiksering. Der kan forekomme uventet antigenekspression, navnlig i neoplasmer. Den kliniske fortolkning af alle farvede vævssnit skal indbefatte morfologisk analyse og evaluering af passende kontroller.

#### Ydeevne

Ydelsen af Novocastra™ IHC Diluent RE7133 er blevet valideret ved anvendelse af en række primære Novocastra™ antistoffer og detektionssystemer.

Produktet er stabilt til udløbsdatoen angivet på produktets etikette.

## **Bibliografi**

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## **Rettelser til tidligere udgave**

Ingen rettelser.

## **Udgivelsesdato**

30 april 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Productnr.: RE7133

### Beoogd gebruik

Voor diagnostisch gebruik in-vitro.

Novocastra™ IHC Diluent RE7133 is bedoeld voor gebruik in immunohistochemische (IHC) procedures als verdunningsvloeistof voor Novocastra™ primaire antilichamen, Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 en Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109. 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

Het gebruik van een antilichaam om daarmee een antigeen te detecteren in weefselcellen is als eerste beschreven door Coons AH en Kaplan MH in 1950<sup>1</sup>. De daarop volgende ontwikkelingen hebben geleid tot de nu gebruikelijke immunoperoxidasetechnieken (zie voor het Principe van de procedure bij IHC-kleuring de gebruiksaanwijzing van het betreffende detectiesysteem). Voor een optimale kleuring in IHC-procedures moeten primaire antilichamen verdund worden. De binding van antilichamen aan hun epitopen kan gemakkelijk worden verbroken door een hoge pH en ionenconcentratie. Voor de optimale kleuring moet daarom een passende verdunningsvloeistof worden gebruikt. Dit product wordt gebruikt als verdunningsvloeistof voor primaire antilichamen in IHC-procedures waarmee via een lichtmicroscop een kwalitatieve identificatie kan worden uitgevoerd in coupes van in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel, via opeenvolgende stappen, met tussendoor spoelen. Novocastra™ IHC Diluent RE7133 ondersteunt het behouden van de specificiteit en stabiliteit van antilichamen.

### Geleverde reagentia

IHC Diluent RE7133 (500 ml), Tris-gebufferde fysiologische zoutoplossing, surfactants en eiwitstabilisator met 0,35% ProClin™ 950.

### Reconstitutie, mengen, verdunnen, titreren

IHC Diluent RE7133 is een gebruiksklaar reagens. Reconstitutie, mengen, verdunnen of titreren van dit reagens wordt niet aanbevolen. Verder verdunnen leidt mogelijk tot verlies aan antigeenkleuring. 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. Indicaties voor besmetting van IHC Diluent RE7133 zijn troebelheid, het ontstaan van een geur of het optreden van precipitaat.

### Specimenbereiding

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

### Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Beroepsmatig gebruik.

**Gebruik IHC Diluent RE7133 niet voor de reconstitutie van gelyofiliseerde antilichamen.**

**Gebruik IHC Diluent RE7133 niet als het troebel wordt, als er een geur ontstaat of er precipitaat in voorkomt.**

De concentratie van ProClin™ 950, het in IHC Diluent RE7133 gebruikte conserveermiddel, is 0,35%. Het kan irriterend zijn voor de huid, ogen, slijmvliezen en bovenste luchtwegen.

Op verzoek is er een veiligheidsinformatieblad (MSDS) beschikbaar.

Voor en na fixatie moeten specimen en alle eraan blootgestelde materialen worden behandeld alsof ze infectieus zijn; daarom moeten ze ook met de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd<sup>2</sup>.

Pipetteer reagentia nooit met de mond en zorg dat de huid en slijmvliezen niet met reagentia en specimen in aanraking komen. Spoel overvloedig met water als er contact is geweest met reagentia of specimen.

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. Antigeenretrievaloplossing(en) (zie **Aanbevelingen voor gebruik** voor primair antilichaam).
3. Enzymretrievaloplossing(en) (zie **Aanbevelingen voor gebruik** voor primair antilichaam).
4. Primair antilichaam.
5. Detectiesysteem.
6. 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 in IHC Diluent RE7133, samen met het detectiesysteem moet door de gebruiker worden gevalideerd op een reeks bekende positieve en negatieve controles.

Meng de juiste volumes primair antilichaam, Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 of Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 en IHC Diluent RE7133 om de gevalueerde verdunningen te krijgen.

Bewaar verdund antilichaam bij 2 - 8 °C. Bewaar alle reagentia onmiddellijk na gebruik weer bij 2 - 8 °C.

### 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 autopsie-/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>3</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 ongeldig 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>4</sup>. Niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten kan leiden tot valspositieve resultaten. Zulke resultaten kunnen ook worden veroorzaakt door endogene enzymen als pseudoperoxidase (erythrocyten), endogeen peroxidase (cytochrom C) of endogeen biotine<sup>5</sup> (bv. lever, borst, hersenen en 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, Streptavidin-HRP of gelabelde polymeer, en substraatchromogeen. Als bij het negatieve controleweefsel specifieke kleuring optreedt moeten de resultaten van de patiëntspecimens als ongeldig worden beschouwd.

### Negatief controle reagens

Behandel een coupe van elk patiëntspecimen met een niet-specifiek negatief controle reagens 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 controle reagens. 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 zonodig 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 weefselafwijkingen<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™ IHC Diluent RE7133 is bedoeld voor gebruik op 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™ IHC Diluent RE7133 zijn gevalideerd met een reeks Novocastra™ primaire antilichamen en detectiesystemen.

Dit product is stabiel tot de uiterste gebruiksdatum die op het etiket van het product staat vermeld.

## Literatuurlijst

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## Wijzigingen ten opzichte van de voorgaande uitgave

Niet van toepassing.

## Datum van uitgave

30 april 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Produktnr.: RE7133

### Tiltenkt bruk

*Til in vitro-diagnostisk bruk.*

Novocastra™ IHC Diluent RE7133 er tenkt brukt som fortynningsmiddel for Novocastra™ primære antistoffer, Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 og Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 i immunhistokjemiske (IHC) prosedyrer. Den kliniske tolkningen av en farging eller uteblitt farging skal suppleres av morfologiske studier ved bruk av riktige kontroller og skal evalueres av en kvalifisert patolog innenfor sammenhengen av pasientens sykehistorie og andre diagnostiske tester.

### Prinsipp for prosedyren

Bruken av et antistoff for å detektere et antigen i vevceller ble først beskrevet av Coons AH og Kaplan MH i 1950.<sup>1</sup> Siden da har mye utvikling skjedd som har ført til immunperoksidaseprosedyrene som i dag er i vanlig bruk (for IHC fargings prinsipper for prosedyren, se bruksanvisningen for det aktuelle deteksjonssystemet). For å oppnå optimal farging ved IHC-prosedyrer, krever primærtantistoffene fortynning. Bindingen av antistoffer til sine epitoper kan uten problemer skilles med ekstrem pH og ionisk styrke. Derfor må et passende fortynningsmiddel brukes for å oppnå optimal farging. Dette produktet brukes som fortynningsmiddel for primære antistoffer i IHC-prosedyrer, som gjør det mulig med kvalitativ identifisering med lysmikroskopering av antigener i snitt av formalinfixert, parafinnstøpt vev, via sekvensielle trinn med mellomliggende vasketrinn. Novocastra™ IHC Diluent RE7133 bidrar til å opprettholde antistoffenes spesifisitet og stabilitet.

### Medfølgende reagenser

IHC Diluent RE7133 (500 ml). Tris-bufret saltvann, surfaktant og proteinstabilisator med 0,35 % ProClin™ 950.

### Rekonstitusjon, blanding, fortynning, titrering

IHC Diluent RE7133 er en reagens som er klar til bruk. Rekonstitusjon, blanding, fortynning eller titrering av denne reagensen er ikke anbefalt. Ytterligere fortynning kan forårsake tap av antigenfarging. Brukeren må validere enhver slik endring.

### Oppbevaring og stabilitet

Oppbevares ved 2–8 °C. Skal ikke fryses. Returner til 2–8 °C umiddelbart etter bruk. Må ikke brukes etter utløpsdatoen som er angitt på produktetiketten. Andre oppbevaringsforhold enn de som er spesifisert, må verifiseres av brukeren. Det finnes ikke åpenbare tegn som indikerer ustabilitet for dette produktet. Derfor skal det kjøres positive og negative kontroller samtidig med pasientprøver. Indikasjoner på kontaminering av IHC Diluent RE7133 er turbiditet, utvikling av lukt eller tilstedeværelse av bunnfall.

### Prøveklargjøring

Anbefalt fiksativ er 10 % nøytralbufret formalin for parafinnstøpte vevsnitt.

### Advarsler og forholdsregler

For helsepersonell.

**Ikke bruk IHC Diluent RE7133 til rekonstituering av lyofiliserte antistoffer.**

**Ikke bruk IHC Diluent RE7133 hvis den blir turbid, utvikler lukt eller inneholder bunnfall.**

Konsentrasjonen av ProClin™ 950, konserveringsmiddelet som brukes i IHC Diluent RE7133, er 0,35 %. Det kan forårsake irritasjon på hud, øyne, slimhinner og øvre luftveier.

Et sikkerhetsdatablad (SDS) er tilgjengelig på forespørsel.

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

Pipetter aldri reagenser med munnen, og unngå at hud og slimhinner kommer i kontakt med reagenser og prøver. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skyl med rikelige mengder vann.

Se lokale, regionale eller statlige forskrifter for avfallshåndtering av eventuelle potensielle giftkomponenter.

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

### Prosedyre

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

1. Standard løsemidler som brukes innen immunhistokjemi.
2. Antigen-demaskeringsoppløsning(er) (se **Anbefalinger for bruk** for primært antistoff).
3. Enzym-demaskeringsoppløsning(er) (se **Anbefalinger for bruk** for primært antistoff).
4. Primært antistoff.
5. Deteksjonssystem.
6. Monteringsmedium.

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

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



## C. Metodikk

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

Kombinasjonen av primært antistoff, dets fortyning og optimale betingelser for epitop demaskering skal, sammen med deteksjonssystemet, valideres av brukeren på en rekke kjente positive og negative kontroller.

Bland passende volumer med primært antistoff, Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 eller Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 og IHC Diluent RE7133 for å oppnå de validerte fortyningene.

Oppbevar fortynt antistoff ved 2–8 °C. Returner alle reagenser til 2–8 °C umiddelbart etter bruk.

### Kvalitetskontroll

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

### Positivt kontrollvev

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

### Negativt kontrollvev

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

### Negativ reagenskontroll

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

### Pasientvev

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

### Begrensninger

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

Vevfargingen er avhengig av håndteringen og behandlingen av vevet før det farges. Uriktig fiksering, dyppfrysing, opptining, vasking, tørking, oppvarming, snitting eller kontaminering med annet vev eller væsker kan frembringe artefakter, fanging av antistoff eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpingsmetoder eller uregelmessigheter i vevet<sup>7</sup>

Overdreven eller ufullstendig kontrastfarging kan hindre riktig tolkning av resultater.

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

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

### Ytelseegenskaper

Ytelsen til Novocastra™ IHC Diluent RE7133 har blitt validert ved bruk av en rekke Novocastra™ primære antistoffer og deteksjonssystemer.

Disse produktene er stabile inntil utløpsdatoen(e) som er vist på produktetikettene.

### Bibliografi

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.

6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

### **Endringer på tidligere utgave**

Ikke relevant.

### **Utstedelsesdato**

30 april 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Ürün No: RE7133

### Kullanım Amacı

*In vitro* diagnostik kullanım içindir.

Novocastra™ IHC Diluent RE7133, immünohistokimyasal (IHC) prosedürlerde Novocastra™ primer antikoları Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 ve Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 için seyreltiler olarak kullanım içindir. Herhangi bir boyamanın veya boyama yokluğunun klinik yorumu, morfolojik çalışmalar ve uygun kontrollerle tamamlanmalıdır ve nitelikli bir patoloj tarafından hastanın klinik öyküsü ve diğer tanı testleri bağlamında değerlendirilmelidir.

### Prosedür İlkeleri

Doku hücrelerindeki antijenin saptanması için antikor kullanımı Coons AH ve Kaplan MH tarafından 1950 yılında ilk kez açıklanmıştır.<sup>1</sup> O zamandan beri bugün yaygın bir şekilde kullanılan immünooperoksidaz prosedürlere yol açan birçok gelişme olmuştur (IHC boyaması). Prosedür ilkeleri için uygun saptama sisteminin Kullanım Talimatlarına bakın). IHC prosedürlerinde optimal boyamayı elde etmek için primer antikoların seyreltilmesi gerekmektedir. Antikoların antikor epitoplarına bağlanması, aşırı pH'la ve iyonik kuvvetle kolaylıkla ayrıştırılabilir. Bundan dolayı, optimal boyamayı elde etmek için uygun seyreltilici kullanılmalıdır. Bu ürün, bir araya getirilmiş yıkama adımları ile sıralı basamaklar yoluyla formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş dokunun bölümlerindeki antijenlerin ışık mikroskopisi ile kalitatif tanımlamaya izin veren IHC prosedürlerinde primer antikor seyreltilicisi olarak kullanılır. Novocastra™ IHC Diluent RE7133, antikoların spesifikliğinin ve stabilitesinin korunmasına yardımcı olur.

### Sağlanan Reaktifler

IHC Diluent RE7133 (500 ml). Tris tamponlu salin, sürfaktan ve %0,35 ProClin™ 950'li protein stabilizatörü.

### Sulandırma, Karıştırma, Seyreltme, Titrasyon

IHC Diluent RE7133, kullanıma hazır bir reaktiftir. Bu reaktifin karıştırılması, seyreltilmesi veya titre edilmesi önerilmemektedir. Fazla seyreltme antijen boyanması kaybına yol açabilir. Bu tür herhangi bir değişiklik kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

### Saklama ve Stabilite

2-8 °C'de saklayın. Dondurmayın. Kullanımdan hemen sonra 2-8 °C'ye geri alın. Ürün etiketinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın. Yukarıda belirtilenler dışında saklama koşulları kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Ürünün instabilitesini gösteren belirgin bulgular yoktur, bu nedenle pozitif ve negatif kontroller hasta numunelerine eş zamanlı olarak çalışılmalıdır. IHC Diluent RE7133'ün kontaminasyon endikasyonları, bulanıklık, koku gelişimi ve presipitat varlığıdır.

### Örnek Hazırlama

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

### Uyarılar ve Önlemler

Profesyonel kullanıcılar içindir.

**IHC Diluent RE7133'ü liyofilize antikoların sulandırılması için kullanmayın.**

**IHC Diluent RE7133'ü bulanıklık varsa, koku oluşmuşsa ve presipitat içeriyorsa kullanmayın.**

IHC Diluent RE7133'te kullanılan koruyucu ProClin™ 950'nin konsantrasyonu %0.35'tir. Ciltte, gözlerde, mukoz membranlarda ve üst solunum yolunda iritasyona neden olabilir.

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

Fiksasyondan önce ve sonra örnekler ve bunlara maruz kalmış bütün materyaller, enfeksiyon yayabilecekmış gibi işlem görmelidir ve gerekli önlemler alınarak imha edilmelidir.<sup>2</sup>

Reaktifleri hiçbir zaman ağızla pipetlemeyin. Cildin ve mukoz membranların reaktifler ve örneklerle temas etmesini önleyin. Reaktifler veya örnekler hassas bölgelere temas ederse bol miktarda suyla yıkayın.

Potansiyel olarak toksik bileşenlerin atılmasıyla ilgili yerel, ulusal veya bölgesel düzenlemeleri dikkate alın.

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

### Prosedür

#### A. Gereken ancak sağlanmayan reaktifler

1. İmmünohistokimya kullanılan standart çözücüler.
2. Antijen geri kazanım çözeltilisi/çözeltileri (bkz. primer antikor için **Kullanım Önerileri**).
3. Enzim geri kazanım çözeltilisi/çözeltileri (bkz. primer antikor için **Kullanım Önerileri**).
4. Primer antikor.
5. Saptama sistemi.
6. Montaj ortamı.

#### B. Gereken ancak sağlanmayan ekipman

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

## C. Metodoloji

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

Epitop Geri Kazanımı için primer antikor kombinasyonu, seyreltisi ve optimum koşullar, saptama sistemiyle birlikte, bilinen bir dizi pozitif ve negatif kontrollerle kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Valide edilmiş seyreltileri elde etmek için uygun hacimli primer antikor, Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 veya Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 ve IHC Diluent RE7133'ü karıştırın.

Seyreltilmiş antikor 2-8°C'de saklayın. Kullanımdan hemen sonra bütün reaktifleri 2-8°C'ye geri alın.

### Kalite Kontrol

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

### Pozitif Doku Kontrolü

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

### Negatif Doku Kontrolü

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

### Negatif Reaktif Kontrolü

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

### Hasta Dokusu

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

### Sınırlamalar

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

Doku boyama, boyama öncesinde dokunun kullanımına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer dokular veya sıvıların kontaminasyon artefaktlara, antikor tutulmasına veya yanlış negatif sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçların nedeni, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki değişiklikler veya dokunun yapısından kaynaklanan düzenlilikler olabilir.<sup>7</sup>

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

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

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

### Performans Özellikleri

Novocast™ IHC Diluent RE7133 performansı, bir dizi Novocast™ primer antikorları ve saptama sistemleri kullanılarak doğrulanmıştır. Bu ürünler, ürün etiketinde belirtilen son geçerlilik tarihi/tarihlerine kadar stabildir.

### Kaynakça

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Fluorescent in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. Journal of Experimental Medicine 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.

5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

### **Önceki Sayıya Göre Değişiklikler**

Geçerli değildir.

### **Düzenlenme Tarihi**

30 Nisan 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Продуктов №: RE7133

### Предназначение

*За употреба при in vitro диагностика.*

Novocastra™ IHC Diluent RE7133 е предназначен за употреба като разредител за Novocastra™ първични антитела, Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 и Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 при имунохистохимични (IHC) процедури. Клиничната интерпретация на всяко оцветяване или неговата липса следва да бъде допълнена от морфологични проучвания с помощта на подходящи контроли и трябва да се оценява в контекста на клиничната история на пациента и други диагностични изследвания от квалифициран патолог.

### Принцип на процедурата

Използването на анти тяло за откриване на антиген в тъканни клетки е било описано за пръв път от Коонс АХ и Каплан МХ през 1950 г.<sup>1</sup> От тогава насам се появяват множество разработки, които водят до имунопероксидазните процедури, използвани днес (за принципа на процедурата за имунохистохимично оцветяване вижте инструкциите за употреба на съответната система за откриване). За да постигнете оптимално оцветяване при имунохистохимични процедури, първичното анти тяло трябва да се разреди. Свързването на анти тяла към техните епитопи може да се разпадне заради крайно рН и от йонната сила. Следователно трябва да се използва подходящ разредител за постигане на оптимално оцветяване. Този продукт се използва като разредител за първични антитела при имунохистохимични процедури, които позволяват качествена идентификация чрез с оптична микроскопия на антигени в срези на фиксирана във формалин и вградена в парафин тъкан, чрез последователни междинни стъпки на промиване. Novocastra™ IHC Diluent RE7133 спомага за поддържане на специфичността и стабилността на анти телата.

### Предоставени реактиви

IHC Diluent RE7133 (500 mL). Трометамин-буфериран физиологичен разтвор, повърхностно активно вещество и стабилизиращ протеин с 0,35% ProClin™ 950.

### Възстановяване, смесване, разреждане, титриране

IHC Diluent RE7133 е готов за употреба реактив. Не се препоръчва възстановяване, смесване, разреждане или титриране на този реактив. По-нататъшното разреждане може да доведе до загуба на оцветяване на антигена. Всички подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя.

### Съхранение и стабилност

Да се съхранява при температура 2 – 8 °С. Да не се замразява. Да се върне на температура 2 – 8 °С веднага след употреба. Не използвайте след срока на годност, отбелязан върху етикета на продукта. Другите условия на съхранение, освен посочените по-горе, трябва да бъдат проверени от потребителя. Не са налице очевидни признаци, указващи нестабилност на този продукт, ето защо позитивните и негативните контроли трябва да бъдат обработвани едновременно с проби на пациента. Признаците за замърсяване на IHC Diluent RE7133 са мътност, проява на мирис и наличие на утайка.

### Подготовка на спесимени

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

### Предупреждения и предпазни мерки

За професионална употреба.

**Не използвайте IHC Diluent RE7133 за възстановяване на лиофилизирани антитела.**

**Не използвайте IHC Diluent RE7133, ако стане мътен, има проява на мириса или съдържа утайка.**

Концентрацията на ProClin™ 950, консервантът, използван в IHC Diluent RE7133, е 0,35%. Това може да причини раздразнение на кожата, очите, лигавиците и горните дихателни пътища.

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

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

Никога не пипетирайте реактиви с уста и избягвайте контакт на кожата и лигавиците с реактиви или спесимени. В случай че реактиви или спесимени влязат в контакт с чувствителни участъци, промийте с обилно количество вода.

Консултирайте се с федералните, държавните или местните регламенти относно изхвърлянето на потенциално токсични компоненти.

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

### Процедура

#### A. Необходими, но непредоставени реактиви

1. Стандартни разтворители, използвани с имунохистохимията.
2. Разтвор(и) за извличане на антиген – вж. Препоръки за употреба за първично анти тяло).
3. Разтвор(и) за извличане на ензим – вж. Препоръки за употреба за първично анти тяло).
4. Първично анти тяло.
5. Система за откриване.
6. Микроскопски препарат.

## **В. Необходимо, но непредоставено оборудване**

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

## **С. Методология**

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

Комбинацията от първичното анти тяло, неговия разтвор и оптималните условия за извличане на епитоп, заедно със системата за откриване, трябва да бъде валидирана от потребителя посредством поредица от известни позитивни и негативни контроли.

Смесете подходящи обеми от първични анти тела, концентриран Biotinylated Secondary Antibody RE7108 или Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 и IHC Diluent RE7133, за да постигнете валидирани разтвори.

Анти тялото да се съхраняване при температура 2 – 8 °С. Всички реактиви да се върнат на температура 2 – 8 °С веднага след употреба.

## **Качествен контрол**

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

## **Позитивна тъканна контрола**

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

## **Негативна тъканна контрола**

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

## **Негативна контрола на реактива**

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

## **Тъкан от пациента**

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

## **Ограничения**

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

Тъканното оцветяване зависи от боравенето с тъканта и нейната обработка преди оцветяването. Неправилната фиксация, замразяване, размразяване, промиване, изсушаване, затопляне, срязване или контаминацията с други тъкани или течности може да причини поява на артефакти, блокиране на анти телата или неверни негативни резултати. Несъвместимите резултати може да са причинени от отклонения във фиксацията и методите на вграждане в парафина или от присъщи нередности вътре в тъканта.<sup>7</sup>

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

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

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

## **Работни характеристики**

Действието на Novocastra™ IHC Diluent RE7133 е валидирано чрез използване на редица Novocastra™ първични антитела и системи за откриване.

Тези продукти са стабилни до изтичане на срока на годност, отпечатан на етикетите им.

## **Библиография**

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## **Изменения на предишно издание**

Не е приложимо.

## **Дата на издаване**

30 Април 2019



# Novocastra™ IHC Diluent

## Termékszám: RE7133

### Alkalmazási terület

#### *In vitro* diagnosztikai használatra.

A Novocastra™ IHC Diluent RE7133 immunhisztokémiai (IHC) eljárások során oldószerként használható a Novocastra™ elsődleges antitestekhez, a Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 készítményhez és a Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 készítményhez. Minden festődés meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollokkal kell kiegészíteni, valamint az értékelést a beteg klinikai kórtörténete és egyéb diagnosztikai vizsgálatok figyelembevételével, képzett patológusnak kell elvégeznie.

### Az eljárás elve

A szöveti sejtekben lévő antigének kimutatására történő antitest-alkalmazást elsőként Coons AH és Kaplan MH írta le 1950-ben.<sup>1</sup> Azóta számos fejlesztés vezetett el a napjainkban elterjedten alkalmazott immunperoxidáz módszerekhez (az IHC-festés eljárási elveit lásd az adott detektáló rendszer használati útmutatójában). Ahhoz, hogy optimális festődést érjünk el az IHC-eljárásokban, az elsődleges antitesteket hígítani kell. Az antitestek és epitópjaik kötődését extrém pH és ionerősség alkalmazásával fel lehet bontani. Következésképp az optimális festődéshez megfelelő oldószert használnia szükséges. Ez a termék az elsődleges antitestek oldószereként szolgál IHC-eljárásokban, ami meghatározott sorrendben végrehajtott lépések során, közbeiktatott mosási lépésekkel lehetővé teszi a formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmetszetekben lévő antigének fénymikroszkópos vizsgálattal végzett kvalitatív azonosítását. A Novocastra™ IHC Diluent RE7133 segít az antitestek specifikitásának és stabilitásának fenntartásában.

### Biztosított reagensek

IHC Diluent RE7133 (500ml). Tris-pufferelt sóoldat, felületaktív anyag és fehérjestabilizáló 0,35% ProClin™ 950-nel.

### Feloldás, elegyítés, hígítás és titrálás

Az IHC Diluent RE7133 használatra kész reagens. Nem javasolt a reagens feloldása, elegyítése, hígítása vagy titrálása. A további hígítás az antigénfestődés elvesztését okozhatja. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatás validálnia kell.

### Tárolás és stabilitás

2–8 °C-on tárolandó. Tilos lefagyasztani. Felhasználás után azonnal tegye vissza 2–8 °C közötti hőmérsékletre. Ne használja a termék címkéjén feltüntetett lejárati dátum után. Az előírtaktól eltérő tárolási feltételeket a felhasználónak ellenőriznie kell. Nincsenek a termék instabilitására utaló egyértelmű jelek, ezért a betegmintákkal egy időben a megfelelő pozitív és negatív kontrollok futtatását is el kell végezni. Az IHC Diluent RE7133 szennyeződésére utaló jelek a következők: az oldat zavarossága, szag kialakulása és csapadék jelenléte.

### A minták előkészítése

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

### Figyelmeztetések és óvintézkedések

Szakemberek általi használatra.

**Ne használja az IHC Diluent RE7133 készítményt liofilizált antitestek feloldására.**

**Ne használja az IHC Diluent RE7133 készítményt, ha zavaros, szaga van vagy csapadékot tartalmaz.**

Az IHC Diluent RE7133 készítményben lévő ProClin™ 950 nevű tartósítószer koncentrációja 0,35%. A bőr, a szem, a nyálkahártyák és a felső légutak irritációját okozhatja.

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

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

Soha ne pipettázza szájjal a reagenseket, továbbá kerülje a bőr és a nyálkahártyák érintkezését a reagensekkel és a mintákkal. Ha a reagensek vagy minták érzékeny területtel érintkeznek, bő vízzel mossa le az érintett területet.

Minden potenciálisan toxikus összetevő ártalmatlanításával kapcsolatban kövesse a szövetségi, állami és helyi előírásokat.

Minimálisan kell csökkenteni a reagensek mikrobiális szennyeződését, különben megnövekedhet a nem specifikus festődés. A megadottaktól eltérő inkubációs idők és hőmérsékletek hibás eredményekhez vezethetnek. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatást validálnia kell.

### Eljárás

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

1. Az immunhisztokémiában alkalmazott standard oldószerek.
2. Antigénfeltároló oldat(ok) – (az elsődleges antitesttel kapcsolatban lásd **Felhasználási javaslatok**).
3. Enzimes feltároló oldat(ok) – (az elsődleges antitesttel kapcsolatban lásd **Felhasználási javaslatok**).
4. Elsődleges antitest.
5. Detektáló rendszer.
6. Fedőanyag.

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

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

## C. Módszer

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

Az elsődleges antitest, a hígítás, a detektáló rendszer és az epitópfeltárás optimális körülményeinek kombinációját a felhasználónak kell validálnia ismert pozitív és negatív kontrollsorozat alkalmazásával.

A validált hígítások eléréséhez keverjen össze megfelelő térfogatú elsődleges antitestet, Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 vagy Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 készítményt, illetve IHC Diluent RE7133 oldószert.

A hígított antitestet tárolja 2–8 °C-on. Használat után az összes reagenst haladéktalanul tegye vissza 2–8 °C-ra.

## Mínőség-ellenőrzés

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

## Positív szövetkontroll

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

## Negatív szövetkontroll

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

## Negatív reagenskontroll

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

## Betegszövet

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

## Korlátozások

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

A szövet festődése függ a szövet festés előtti kezelésétől és feldolgozásától. A nem megfelelő fixálás, a fagyasztás, olvasztás, mosás, szárítás, melegítés, metszetkészítés, illetve a más szövetekkel vagy folyadékokkal történő szennyezés műtermékeket, az antitestek befogását, illetve álnegatív eredményeket okozhat. Ellentmondó eredményekhez vezethetnek a fixálási vagy beágyazási módszerek eltérései, illetve a szövet eredendő rendellenességei.<sup>7</sup>

A túlzott vagy hiányos kontrasztfestés ronthatja az eredmények megfelelő értelmezését.

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

A Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions oldatok paraffinba ágyazott metszeteken történő alkalmazásra szolgálnak meghatározott fixálási követelmények mellett. Időnként váratlan antigén-expresszió fordulhat elő, különösen daganatok esetében. Bármely festett szövetmetszet klinikai értelmezéséhez morfológiai elemzést is kell végezni, és ki kell értékelni a megfelelő kontrollokat.

## Tejlesztésmintajellemzők

A Novocastra™ IHC Diluent RE7133 tejlesztésmintáját különféle Novocastra™ elsődleges antitestek és a detektáló rendszerek alkalmazásával validálták.

Ezek a termékek a termék címkén feltüntetett lejárati dátumig stabilak.

## Szakirodalom

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.

3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

### **Módosítások az előző változathoz képest**

Nem alkalmazható.

### **Kiadás dátuma**

30 április 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Nr. produs RE7133

### Utilizare prevăzută

*Pentru diagnosticare in vitro.*

Novocastra™ IHC Diluent RE7133 este destinat utilizării ca diluant pentru anticorpii primari Novocastra™, Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 și Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 în proceduri imunohistochimice (IHC). Interpretarea clinică a oricărei colorări sau a absenței acesteia trebuie completată cu studii morfologice utilizând controale adecvate și trebuie evaluată în contextul antecedentelor clinice ale pacientului, precum și al altor teste de diagnosticare efectuate de către un patolog calificat.

### Principiul procedurii

Utilizarea unui anticorp pentru a detecta un antigen în celulele țesutului a fost descrisă prima oară de Coons AH și Kaplan MH în anul 1950.<sup>1</sup> De atunci au avut loc multe evoluții care au dus la procedurile cu imunoperoxidază utilizate pe larg în prezent (pentru Principiul Procedurii de colorație IHC a se vedea Instrucțiunile de Utilizare ale sistemului de detecție corespunzător). Pentru a obține colorație optimă în procedurile IHC, anticorpii primari trebuie diluați. Legarea anticorpilor la epitopii acestora poate fi ușor disociată de pH extrem și putere ionică. Prin urmare trebuie utilizat un diluant adecvat pentru a obține colorația optimă. Acest produs este utilizat ca diluant pentru anticorpii primari în proceduri IHC, care permit identificarea calitativă prin microscopie optică a antigenilor în secțiuni de țesut fixat cu formalină, încorporat în parafină, prin etape secvențiale cu etape de spălare intercalate. Novocastra™ IHC Diluent RE7133 ajută la menținerea specificității și stabilității anticorpilor.

### Reactivi furnizați

IHC Diluent RE7133 (500ml). Soluție salină tamponată cu trometamină, surfactant și stabilizator de proteine cu 0,35% ProClin™ 950.

### Reconstituire, amestecare, diluare, titrare

IHC Diluent RE7133 este un reactiv gata de utilizare. Reconstituirea, amestecarea, diluarea sau titrarea acestui reactiv nu sunt recomandate. Diluarea poate duce la pierderea colorării antigenilor. Utilizatorul trebuie să valideze orice astfel de schimbare.

### Depozitare și stabilitate

A se depozita la 2–8 °C. A nu se congela. A se returna la 2–8 °C imediat după utilizare. A nu se utiliza după data expirării indicată pe eticheta produsului. Alte condiții de depozitare decât cele specificate trebuie verificate de către utilizator. Nu există semne evidente care să indice instabilitatea acestui produs, astfel că trebuie rulate controale pozitive și negative simultan cu eșantioanele pacientului. Semnele care indică contaminarea și/sau instabilitatea Diluantului IHC RE7133 sunt turbiditatea soluției, formarea de mirosuri și prezența precipitatului.

### Pregătirea specimenului

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

### Avertismente și precauții

Pentru utilizatori profesioniști.

**Nu utilizați Diluantul IHC RE7133 pentru reconstituirea anticorpilor liofilizați.**

**Nu utilizați Diluantul IHC RE7133 dacă a devenit tulbure, a dezvoltat mirosuri sau conține precipitat.**

Concentrația ProClin™ 950, conservantul utilizat în Diluantul IHC RE7133 este 0,35%. Poate cauza iritații ale pielii, ochilor, mucoaselor și căilor respiratorii superioare.

O Fișă tehnică de securitate a materialului (FTSM) este disponibilă la cerere.

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

Nu pipetați niciodată reactivii cu gura și evitați contactul reactivilor și specimenelor cu pielea și membranele mucoase. Dacă reactivii sau probele vin în contact cu suprafețele sensibile, spălați cu apă din abundență.

Consultați reglementările naționale, județene sau locale pentru informații privind eliminarea la deșeurii a oricăror componente cu potențial toxic.

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

### Procedură

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

1. Solvenți standard folosiți în imunohistochimie.
2. Soluție(i) de recuperare cu antigeni (vezi **Recomandările de utilizare** pentru anticorpul primar).
3. Soluție(i) de recuperare cu enzime (vezi **Recomandările de utilizare** pentru anticorpul primar)
4. Anticorp primar.
5. Sistem de detecție.
6. Mediu de montare.

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

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

## C. Metodologie

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

Combinăția între anticorpurile primare, diluția acestuia și condițiile optime pentru recuperarea epitopilor, împreună cu sistemul de detecție, trebuie validată de utilizator pe o serie de controale pozitive și negative cunoscute.

Amestecați volume adecvate de anticorpurile primare, Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 sau Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 și IHC Diluent RE7133 pentru a obține diluțiile validate.

A se depozita anticorpurile diluate la 2-8 °C. Returnați toți reactivii la 2-8 °C imediat după utilizare.

### Controlul calității

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

### Țesutul de control pozitiv

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

### Țesutul de control negativ

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

### Reactivul de control negativ

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

### Țesutul pacientului

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

### Limitări

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

Colorația tisulară depinde de manipularea și procesarea țesutului înainte de colorație. Fixarea, congelarea, dezghețarea, spălarea, uscarea, încălzirea, secționarea necorespunzătoare sau contaminarea cu alte țesuturi ori fluide pot cauza artefacte, captura anticorpurilor sau rezultate fals negative. Rezultatele inconsecvente pot fi atribuite diferențelor în ceea ce privește metodele de fixare și încorporare, ori neregularităților inerente ale țesutului.<sup>7</sup>

Contracolorația excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea adecvată a rezultatelor.

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

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

### Caracteristici de performanță

Performanța Novocastra™ IHC Diluent RE7133 a fost validată utilizând o gamă de anticorpurile primare și sisteme de detecție Novocastra™. Aceste produse sunt stabile până la data expirării indicată pe etichetele produselor.

### Bibliografie

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. Journal of Experimental Medicine 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.

3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

#### **Amendamente la ediția anterioară**

Nu este cazul.

#### **Data publicării**

30 aprilie 2019

# Разбавитель для иммуногистохимических исследований

## Novocastra™ IHC Diluent

### Продукция №: RE7133

#### Назначение

*Для диагностики in vitro.*

Разбавитель для иммуногистохимических исследований Novocastra™ IHC Diluent RE7133 предназначен для использования в качестве разбавителя первичных антител Novocastra™, концентрированного биотинилированного вторичного антитела Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 и концентрированного стрептавидина Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 при проведении иммуногистохимических исследований. Клиническая интерпретация любого окрашивания или его отсутствия должна быть дополнена морфологическими исследованиями с надлежащими контролями и должна быть оценена квалифицированным патологом с учетом анамнеза пациента и других диагностических тестов.

#### Принцип процедуры

Использование антитела для обнаружения антигена в клетках тканей было впервые описано Кунсом АГ и Капланом МХ в 1950 году<sup>1</sup>. С этого момента появилось множество разработок, которые привели к иммунопероксидазным процедурам, которые широко используются в наши дни (Принципы процедур иммуногистохимического окрашивания приведены в соответствующих инструкциях по использованию систем обнаружения). Для получения оптимального окрашивания в процедурах иммуногистохимических исследований для первичных антител требуется разведение. Связывание антител к их эпитопам может быть нарушено высоким рН и ионной силой раствора. Поэтому необходимо использовать соответствующий растворитель для получения оптимального окрашивания. Этот продукт используется как разбавитель для первичных антител в иммуногистохимических процедурах, что позволяет получить количественное определение световой микроскопией антигенов на зафиксированных в формалине и залитых в парафине срезах ткани посредством выполнения последовательных этапов с промежуточными этапами промывки. Разбавитель Novocastra™ IHC Diluent RE7133 помогает поддерживать специфичность и стабильность антител.

#### Реактивы, входящие в комплект поставки

Разбавитель IHC Diluent RE7133 (500 мл). Трис-солевой буферный раствор, ПАВ и стабилизатор протеина с 0,35 % ProClin™ 950.

#### Восстановление, смешивание, разведение, титрование

Разбавитель IHC Diluent RE7133 представляет собой реактив, готовый к использованию. Этот реактив не требует восстановления, смешивания, разведения или титрования. Дальнейшее разведение может привести к потере окрашивания антигена. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.

#### Хранение и стабильность

Хранить при температуре 2–8 °С. Не замораживать. После использования незамедлительно вернуть на хранение при температуре 2–8 °С. Не используйте по истечении срока годности, который указан на маркировке продукции. Условия хранения, отличающиеся от указанных, должны быть верифицированы пользователем. Не существует явных признаков, указывающих на нестабильность данной продукции, поэтому положительные и отрицательные контроли следует готовить одновременно с образцами, взятыми у пациента. Признаками, которые указывают на контаминацию и/или нестабильность разбавителя IHC Diluent RE7133, являются: помутнение раствора, появление запаха и наличие преципитата (осадка).

#### Подготовка образцов

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

#### Предупреждения и меры предосторожности

Только для профессионального использования.

**Не используйте разбавитель IHC Diluent RE7133 для восстановления лиофилизированных антител.**

**Не используйте разбавитель IHC Diluent RE7133, если он становится мутным и в нем появляется запах или осадок.**

Концентрация ProClin™ 950, консерванта, используемого в разбавителе IHC Diluent RE7133, составляет 0,35 %. Растворы активатора и субстрата могут вызвать раздражение кожи, глаз, слизистых оболочек и верхних отделов дыхательных путей.

Паспорт безопасности химической продукции предоставляется по запросу.

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

Никогда не набирайте реактивы в пипетку ртом и не допускайте контакта реактивов и образцов с кожей и слизистыми оболочками. В случае контакта реактивов или образцов с чувствительными зонами промойте их большим количеством воды.

По вопросам утилизации любых возможно токсических компонентов выполняйте требования федеральных, региональных или местных нормативных документов.

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

#### Процедура

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

1. Стандартные растворители, используемые в иммуногистохимических исследованиях.
2. Растворы для демаскировки антигенов (смотрите «Рекомендации по использованию, касающиеся первичных антител»).
3. Ферментные восстанавливающие растворы (смотрите «Рекомендации по использованию, касающиеся первичных антител»).

4. Первичные антитела.
5. Системы обнаружения.
6. Заливочная среда препаратов.

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

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

## **С. Методика**

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

Комбинация первичных антител, их разведение и оптимальные условия для демаскирования эпитопов должны быть валидированы пользователем наряду с системой детекции с использованием серий известных положительных и отрицательных контролей.

Смешивают необходимые количества первичного антитела, концентрированного биотинилированного вторичного антитела Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 или концентрированного стрептавидина Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 и разбавитель IHC Diluent RE7133 для достижения валидированных разбавлений.

Хранят разведенное антитело при 2-8 °C. Возвращают все реактивы в температуру 2-8 °C немедленно после использования.

## **Контроль качества**

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

## **Положительный контроль ткани**

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

## **Отрицательный контроль ткани**

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

## **Отрицательный контроль реактива**

Для оценки неспецифического окрашивания и лучшей интерпретации специфического окрашивания в области связывания антигена, исследуя срезы каждого образца, взятого у пациента, вместо первичных антител используйте реактив, служащий в качестве неспецифического отрицательного контроля.

## **Ткань, полученная у пациента**

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

## **Ограничения**

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

Окрашивание тканей зависит от обращения с тканями и их обработки перед окрашиванием. Неправильные процедуры фиксации, замораживания, оттаивания, промывки, сушки, нагрева, приготовления срезов, а также загрязнение другими тканями или жидкостями могут приводить к артефактам, захвату антител или ложноотрицательным результатам. Противоречивые результаты могут быть обусловлены различиями методов фиксации и заливки препарата или присущей тканям внутренней неравномерностью структуры.<sup>7</sup>

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



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

Растворы для демаскировки эпитопов Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions предназначены для использования с залитыми в парафин срезами, подготовленными с учетом определенных требований к фиксации. Возможна непредвиденная экспрессия антигена, особенно в опухолях. Клиническая интерпретация любого окрашенного среза ткани должна включать морфологический анализ и оценку соответствующих контролей.

### **Эксплуатационные характеристики**

Эффективность разбавителя Novocastra™ IHC Diluent RE7133 была валидирована при использовании линейки первичных антител и систем обнаружения Novocastra™.

Данные препараты остаются стабильными до истечения срока (сроков) годности, указанных на их этикетках.

### **Список литературы**

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

### **Дополнения к предыдущему выпуску**

Не применимо.

### **Дата выпуска**

30 Апрель 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Nr produktu: RE7133

### Przeznaczenie

*Do diagnostyki in vitro.*

Preparat Novocastra™ IHC Diluent RE7133 jest przeznaczony do stosowania jako rozcieńczalnik dla przeciwciał pierwszorzędowych Novocastra™, Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 i Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 w procedurach immunohistochemicznych (IHC). Klinczną interpretację barwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. Ocenę powinien przeprowadzić wykwalifikowany patolog w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych.

### Zasady postępowania

Zastosowanie przeciwciała do wykrywania antygenu w komórkach tkankowych zostało po raz pierwszy opisane przez A.H. Coonsa i M.H. Kaplana w 1950<sup>1</sup> roku. Od tego czasu zaszło wiele zmian, dzięki którym procedury immunoperoksydazy są powszechnie stosowane (powszechnie stosowane zasady barwienia IHC są opisane w Instrukcji stosowania konkretnego systemu detekcji). Aby uzyskać optymalne wybarwienie w procedurach IHC (badań immunochemicznych), przeciwciała pierwszorzędowe należy rozcieńczyć. Wiązanie przeciwciał z ich epitopami można łatwo rozdzielić za pomocą ekstremalnych warunków pH i siły jonowej. Dlatego dla uzyskania optymalnego zabarwienia należy użyć odpowiedniego rozcieńczalnika. Produkt ten jest stosowany jako rozcieńczalnik dla przeciwciał pierwszorzędowych w procedurach IHC, które pozwalają na jakościową identyfikację przy pomocy mikroskopii świetlnej antygenów w skrawkach utrwalonej w formalinie i zatopionej w parafinie tkanki w kolejnych etapach przedzielonych przemywaniem. Novocastra™ IHC Diluent RE7133 pomaga zachować swoistość i stabilność przeciwciał.

### Odczynniki znajdujące się w zestawie

IHC Diluent RE7133 (500ml). Roztwór soli fizjologicznej buforowany odczynnikiem Tris, surfaktant i stabilizator białka z 0,35% ProClin™ 950.

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

IHC Diluent RE7133 jest gotowym do użycia odczynnikiem. W przypadku tego odczynnika nie jest konieczne dodawanie wody, mieszanie, rozcieńczanie ani miareczkowanie. Dalsze rozcieńczanie może prowadzić do niemożliwości przeprowadzenia barwienia antygenu. Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

### Przechowywanie i trwałość

Przechowywać w temperaturze 2-8 °C. Nie zamrażać. Niewłócznie po użyciu ponownie umieścić w temperaturze 2-8 °C. Nie używać po upływie daty ważności podanej na etykiecie produktu. Przechowywanie w warunkach innych od wskazanych wymaga weryfikacji użytkownika. Nie ma wyraźnych oznak niestabilności tego produktu; w związku z tym kontrole pozytywne i negatywne powinny być prowadzone jednocześnie z badaniem próbek pobranych od pacjenta. Objawy zanieczyszczenia IHC Diluent RE7133 są następujące: zmętnienie, pojawienie się zapachu lub obecność osadu.

### Przygotowanie próbek

Zalecany utrwalaczem jest 10-procentowa obojętna buforowana formalina do tkanek zatopionych w parafinie.

### Ostrzeżenia i środki ostrożności

Dla profesjonalnych użytkowników.

**Nie stosować IHC Diluent RE7133 do uzupełniania przeciwciał liofilizowanych.**

**Nie używać IHC Diluent RE7133, jeśli preparat zmętniał, ma nieprzyjemny zapach lub zawiera osad.**

Stężenie ProClin™ 950, konserwantu stosowanego w IHC Diluent RE7133 wynosi 0,35%. Może on powodować podrażnienie skóry, oczu, błon śluzowych i górnych dróg oddechowych.

Karta charakterystyki (MSDS) jest udostępniana na żądanie.

Próbki przed i po utrwaleniu oraz wszelkie materiały narażone na kontakt z nimi należy traktować jak materiały potencjalnie zakaźne i należy je utylizować z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności.<sup>2</sup>

Podczas pobierania pipetą odczynników nie wolno nigdy zasysać ustami i należy unikać kontaktu odczynników i preparatów ze skórą oraz błonami śluzowymi. W razie kontaktu odczynników lub próbek ze szczególnie narażonymi miejscami przemyć miejsce kontaktu dużą ilością wody.

Wszelkie potencjalnie toksyczne składniki należy utylizować zgodnie z krajowymi lub lokalnymi przepisami.

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

### Procedura

#### A. Odczynniki wymagane, lecz niedostarczane

1. Standardowe rozpuszczalniki stosowane w immunohistochemii.
2. Roztwór/Roztwory do odmaskowywania antygenu (zob. **Zalecenia dotyczące stosowania**)
3. Roztwór/Roztwory do odmaskowywania enzymu (zob. **Zalecenia dotyczące stosowania**)
4. Przeciwciała pierwszorzędowe.
5. System detekcji.
6. Środek do zamykania preparatów mikroskopowych

## B. Sprzęt wymagany, lecz niedostarczany

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

## C. Metodologia

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

Zastosowanie przeciwciała pierwszorzędowego, jego rozcieńczenia i optymalnych warunków dla odmaskowywania epitopu w systemie detekcji powinny zostać zweryfikowane przez użytkownika w serii stosowanych wcześniej kontroli pozytywnych i negatywnych.

Wymieszać odpowiednie objętości przeciwciała pierwszorzędowego, Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 lub Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 i IHC Diluent RE7133, aby uzyskać zatwierdzone rozcieńczenie.

Przechowywać rozcieńczone przeciwciała w temperaturze 2-8 °C. Natychmiast po użyciu wszystkie odczynniki ponownie umieścić w temperaturze 2-8 °C.

### Kontrola jakości

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

### Tkankowa kontrola pozytywna

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

### Tkankowa kontrola negatywna

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

### Negatywna kontrola odczynnika

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

### Tkanka pacjenta

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

### Ograniczenia

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

Barwienie tkanek zależy od postępowania z tkanką i jej przetwarzania przed barwieniem. Nieprawidłowe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, podgrzewanie, ścinanie skrawków lub skażenie innymi tkankami lub płynami może powodować artefakty, zatrzymywanie przeciwciał lub wyniki fałszywie negatywne. Niespójność wyników może być spowodowana zastosowaniem różnych metod utrwalania i zatapiania lub przez nieprawidłowości samego materiału tkankowego.<sup>7</sup>

Nadmierne lub niepełne barwienie ujemne może pogarszać interpretację wyników.

Kliniczną interpretację barwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. Ocenę powinien przeprowadzić wykwalifikowany patolog w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych.

Preparaty Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions są przeznaczone do skrawków zatopionych w parafinie o określonych wymogach dotyczących utrwalania. Może wystąpić nieoczekiwana ekspresja antygeny, szczególnie w przypadku nowotworów. Interpretacja kliniczna wybarwionych skrawków musi obejmować analizę morfologiczną oraz ocenę przeprowadzoną w ramach odpowiednich kontroli.

## **Charakterystyka działania**

Skuteczność Novocastra™ IHC Diluent RE7133 została zweryfikowana przy użyciu szeregu przeciwciał pierwszorzędowych Novocastra™ i systemów detekcji.

Produkt zachowuje stabilność do upływu dat(y) ważności umieszczonej(-nych) na etykiecie.

## **Bibliografia**

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## **Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania**

Nie dotyczy.

## **Data publikacji**

30 kwietnia 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Kataloška številka: RE7133

### Predvidena uporaba

*Za diagnostično uporabo in vitro.*

Izdelek Novocastra™ IHC Diluent RE7133 je namenjen uporabi kot redčilo za primarna protitelesa Novocastra™, sekundarna protitelesa Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 in izdelek Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 pri imunohistokemijskih postopkih (IHC). Klinično razlago obarvanja ali odsotnosti le-tega morajo dopolnjevati morfološke študije ustreznih kontrolnih vzorcev, ki jih v okviru klinične anamneze bolnika in drugih diagnostičnih testov oceni usposobljen patolog.

### Načelo postopka

Uporabo protiteles za zaznavanje antigena v tkivnih celicah sta prva opisala Coons A. H. in Kaplan M. H. leta 1950.<sup>1</sup> Od takrat se je metoda večkrat izboljšala, kar je pripeljalo do imunskih postopkov s peroksidazo, ki se ponavadi uporabljajo danes (za načela postopka barvanja IHC glejte navodila za uporabo ustreznega sistema za zaznavanje). Za optimalno obarvanje pri postopkih IHC je treba primarna protitelesa razredčiti. Vežavo protiteles na njihove epitope lahko pretrgajo ekstremne vrednosti pH in ionske moči. Zato je za optimalno obarvanje treba uporabiti ustrezno redčilo. Ta izdelek se uporablja kot redčilo za primarna protitelesa pri postopkih IHC, ki omogočajo kvalitativno svetlobno-mikroskopsko identifikacijo antigenov v rezinah tkiva, fiksiranih s formalinom in vstavljenih v parafin, z zaporednimi koraki in vmesnimi koraki izpiranja. Redčilo Novocastra™ IHC Diluent RE7133 pomaga ohraniti specifičnost in stabilnost protiteles.

### Priloženi reagenti

IHC Diluent RE7133 (500 ml). Fiziološka raztopina s pufrom tris, surfaktantom in stabilizatorjem za beljakovine z 0,35 % ProClin™ 950.

### Rekonstitucija, mešanje, redčenje, titracija

IHC Diluent RE7133 je reagent, pripravljen za uporabo. Rekonstitucija, mešanje, redčenje ali titracija tega reagenta niso priporočljivi. Nadaljnje redčenje lahko privede do neobarvanja antigena. Uporabnik mora potrditi vsako takšno spremembo.

### Shranjevanje in stabilnost

Hraniti pri temperaturi 2–8 °C. Ne zamrzujte. Takoj po uporabi ohladite na temperaturo 2–8 °C. Ne uporabite po datumu izteka roka uporabnosti, ki je naveden na oznaki na izdelku. Uporabnik mora potrditi ustreznost pogojev shranjevanja, če se ti razlikujejo od navedenih. Ni očitnih znakov, ki bi nakazovali nestabilnost tega izdelka, zato morate hkrati z vzorci bolnikov testirati tudi pozitivne in negativne kontrole. Znaki kontaminacije izdelka IHC Diluent RE7133 so motnost, prisotnost vonja in prisotnost oborine.

### Priprava vzorcev

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

### Opozorila in previdnostni ukrepi

Za poklicne uporabnike.

**Redčila IHC Diluent RE7133 ne uporabljajte za rekonstitucijo liofiliziranih protiteles.**

**Redčila IHC Diluent RE7133 ne uporabljajte, če postane motno, če se pojavi vonj ali če vsebuje oborino.**

Konzracija izdelka ProClin™ 950, konzervansa, ki se uporablja v redčilu IHC Diluent RE7133, je 0,35 %. Lahko povzroči draženje kože, oči, sluznic in zgornjih dihal.

Na zahtevo je na voljo varnostni list.

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

Nikoli ne pipetirajte reagentov z usti. Pazite, da reagenti in vzorci ne pridejo v stik s kožo ali sluznicami. Če reagenti ali vzorci pridejo v stik z občutljivimi deli, jih izperite z obilo vode.

Sledite zveznim, državnim ali lokalnim predpisom za odstranjevanje katerih koli morebitno strupenih sestavin.

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

### Postopek

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

1. Standardna topila, ki se uporabljajo v imunohistokemiji.
2. Raztopine za pridobivanje antigenov (glejte priporočila za uporabo primarnega protitelesa).
3. Raztopine za pridobivanje encimov (glejte priporočila za uporabo primarnega protitelesa).
4. Primarno protitelo.
5. Sistem za zaznavanje.
6. Medij za pritrjevanje.

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

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

## C. Metodologija

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

Kombinacijo primarnega protitelesa, njegove redčitve, optimalnih pogojev pridobivanja epitopa in sistema za zaznavanje mora uporabnik validirati na vrsti znanih pozitivnih in negativnih kontrol.

Zmešajte ustrezne prostornine primarnega protitelesa, protitelesa Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 ali izdelka Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 in redčila IHC Diluent RE7133, da dosežete validirane razredčitve.

Razredčena protitelesa shranjujte pri temperaturi 2–8 °C. Takoj po uporabi vse reagente ohladite na 2–8 °C.

### Kontrola kakovosti

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

### Positivni kontrolni vzorci tkiva

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

### Negativni kontrolni vzorci tkiva

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

### Negativni kontrolni reagent

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

### Bolnikovo tkivo

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

### Omejitve

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

Obarvanje tkiva je odvisno od rokovanja s tkivom in njegovo obdelavo pred barvanjem. Nepravilno fiksiranje, zamrzovanje, odtajanje, izpiranje, sušenje, segrevanje, rezanje ali okužba z drugimi tkivi ali tekočinami lahko povzroči nastanek artefaktov, lovljenje protitelesa ali lažne negativne rezultate. Nedosledni rezultati so lahko posledica razlik pri metodah fiksiranja in vstavljanja ali pa so del nepravilnosti tkiva samega.<sup>7</sup>

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

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

Raztopine Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions so namenjene uporabi pri rezinah, vstavljenih v parafin, s posebnimi zahtevami glede fiksiranja. Lahko pride do nepričakovanega izražanja antigena, zlasti pri neoplazmah. Pri klinični razlagi obarvane rezine tkiva morate upoštevati morfološko analizo in oceno ustreznih kontrol.

### Značilnosti učinkovitosti

Učinkovitost redčila Novocastra™ IHC Diluent RE7133 so validirali s številnimi primarnimi protitelesi Novocastra™ in sistemi za zaznavanje. Izdelki so stabilni do datuma izteka roka uporabnosti, ki je naveden na oznaki izdelkov.

## **Literatura**

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

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

Navedba smiselno ni potrebna.

## **Datum izdaje**

30 april 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Výrobek č.: RE7133

### Zamýšlené použití

*Pro diagnostické použití in vitro.*

Ředící roztok Novocastra™ IHC Diluent RE7133 je určen k ředění primárních protilátek Novocastra™, koncentrovaných biotinylovaných sekundárních protilátek Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 a koncentrovaného streptavidinu Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 při imunohistochemických postupech (IHC). Klinická interpretace zbarvení či nezbarvení by měla být doplněna morfologickými studiiemi s využitím řádných kontrol a vyhodnocen by mělo být provedeno kvalifikovaným patologem v kontextu klinické historie pacienta a dalších diagnostických zkoušek.

### Princip postupu

Použití protilátek při detekci antigenu v tkáňových buňkách poprvé popsali Coons AH a Kaplan MH v roce 1950.<sup>1</sup> Od té doby došlo k rozvoji těchto metod, které vedly k současnému rozsáhlému rozšíření metod s využitím imunoperoxidázy. (Princip postupu pro imunohistochemické (IHC) barvení viz Návod k použití příslušného detekčního systému). K získání optimálního zbarvení při IHC postupu je nutné ředit primární protilátky. Vazbu protilátek na jejich epitopy je možné snadno disociovat pomocí extrémního pH a iontové síly. Proto je k získání optimálního zbarvení nutné použít vhodný ředící roztok. Tento výrobek se používá jako ředící roztok pro primární protilátky při imunohistochemických postupech, které umožňují kvalitativní identifikaci antigenů pomocí optického mikroskopu na tkáňových řezech fixovaných formalinem a zalitých do parafínu, prostřednictvím postupných kroků s vloženými kroky promývání. Ředící roztok Novocastra™ IHC Diluent RE7133 napomáhá zachovat specifitu a stabilitu protilátek.

### Dodávaná činidla

Ředící roztok IHC Diluent RE7133 (500 ml). Tris-pufrovaný fyziologický roztok, povrchově aktivní činidlo a proteinový stabilizátor s 0,35% ProClin™ 950.

### Rekonstituce, míchání, ředění, titrace

Zředovací činidlo IHC Diluent RE7133 je reagent připravený k přímému použití. Rekonstituce, míchání, ředění nebo titrace tohoto činidla se nedoporučují. Další ředění může mít za následek ztrátu zbarvení antigenu. Každou takovou změnu musí uživatel validovat.

### Skladování a stabilita

Skladujte při 2-8 °C. Nezmrazujte. Po použití okamžitě uložte na místo s teplotou 2-8 °C. Nepoužívejte po datu použitelnosti, které je uvedeno na štítku výrobku. Jiné než specifikované skladovací podmínky musí být uživatelem ověřeny. Neexistují zjevné známky naznačující nestabilitu tohoto výrobku, a proto je třeba společně s vzorky pacientů zpracovávat pozitivní i negativní kontrolní vzorky. Známkami kontaminace zředovacího činidla IHC Diluent RE7133 jsou zákal, vývoj zápachu nebo přítomnost sraženiny.

### Příprava vzorku

Doporučený fixační prostředek je 10% neutrálně pufrovaný formalin pro tkáňové řezy zalité do parafínu.

### Varování a upozornění

Určeno pouze pro použití odbornými pracovníky.

**Nepoužívejte zředovací činidlo IHC Diluent RE7133 pro rekonstituci lyofilizovaných protilátek.**

**Nepoužívejte zředovací činidlo IHC Diluent RE7133, pokud se v něm objeví zákal, pokud zapáchá nebo obsahuje sraženinu.**

Konzentrace konzervačního činidla ProClin™ 950, které je v ředícím roztoku IHC Diluent RE7133 obsaženo, je 0,35 %. Činidlo může způsobit podráždění kůže, očí, sliznic a horních cest dýchacích.

Bezpečnostní list (MSDS) je k dispozici na požádání.

Likvidace vzorků před a po fixaci a všech materiálů, které s nimi přišly do styku, by měla probíhat za řádných bezpečnostních opatření.<sup>2</sup> Nikdy nepipetujte činidla ústy a zabraňte kontaktu pokožky a sliznic s činidly a vzorky. Pokud dojde ke kontaktu činidel nebo vzorků s citlivými plochami, omyjte postižené místo velkým množstvím vody. Pokyny k likvidaci libovolných potenciálně toxických komponent vyhledejte ve federálních, státních nebo místních předpisech o likvidaci. Minimalizujte mikrobiální kontaminaci činidel, protože může dojít ke zvýšení nespecifického zbarvení. Jiné než specifikované inkubační časy nebo teploty mohou mít za následek chybné výsledky. Každou takovou změnu musí uživatel validovat.

### Postup

#### A. Potřebná činidla, která nejsou součástí dodávky

1. Standardní rozpouštědla používaná v imunohistochemii.
2. Odmaskovací roztok(y) pro antigen. (viz **Návod k použití** pro primární protilátku).
3. Odmaskovací roztok(y) pro enzym. (viz **Návod k použití** pro primární protilátku).
4. Primární protilátka
5. Detekční systém
6. Fixační médium.

#### B. Potřebná zařízení, která nejsou součástí dodávky

1. Zařízení potřebné pro odmaskování antigenu, pokud je doporučeno pro primární protilátku.
2. Obecné zařízení pro imunohistochemickou laboratoř.



## C. Metodologie

Před provedením těchto metod musí být uživatelé vyškoleni v imunohistochemických technikách.

Kombinace primární protilátky a jejího zředění ve zředovacím činidlu IHC Diluent RE7133 společně s detekčním systémem by měly být validovány uživatelem na řadě známých pozitivních a negativních kontrolních vzorků.

Smíchejte odpovídající objemy primární protilátky, Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 nebo Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 a ředícího roztoku IHC Diluent RE7133 tak, abyste dosáhli validovaných zředění.

Zředěnou protilátku skladujte při teplotě 2-8 °C. Po použití okamžitě uložte všechna činidla na místo s teplotou 2-8 °C.

### Řízení jakosti

Rozdíly ve zpracování tkání a v technických postupech v laboratoři uživatele mohou mít za následek významnou variabilitu výsledků, což kromě dále uvedených postupů vyžaduje pravidelné provádění interních kontrol. Při kontrolách by měly být používány čerstvé vzorky z pitev/biopsií/chirurgických výkonů, fixované ve formalínu, zpracované a zalité do parafínu, a to co nejdříve a stejným způsobem, jako vzorky od pacientů.

### Pozitivní tkáňová kontrola

Používá se ke zjištění správnosti zpracování tkání a řádných metod barvení. Pro každou skupinu zkušebních podmínek/ primární protilátky v každé dávce barvení by měla být provedena jedna kontrola pozitivní tkáň. Tkáň se slabým pozitivním zabarvením je vhodnější než tkáň se silným pozitivním zabarvením, protože umožňuje optimální kontrolu jakosti a zjištění nízkých hodnot degradace činidel.<sup>3</sup> Doporučené tkáně pro pozitivní kontrolu jsou uvedeny v Pokynech k použití pro primární protilátku. Jestliže kontrola pozitivní tkáň neprokáže pozitivní zabarvení, je nutné považovat výsledky získané na testovaných vzorcích za neplatné.

### Negativní tkáňová kontrola

Negativní tkáňová kontrola by měla být provedena po kontrole pozitivní tkáň k ověření specifity označení cílového antigenu primární protilátkou. Doporučené tkáně pro negativní kontrolu jsou uvedeny Návodu k použití pro primární protilátku. Alternativně i rozmanitost různých typů buněk přítomných ve většině tkáňových řezů často nabízí místa pro negativní kontrolu, ale tuto možnost by měl uživatel ověřit. Pokud se objeví nespecifické zabarvení, obvykle má difúzní vzhled. Sporadické zabarvení pojivové tkáně může být rovněž pozorováno na řezech z tkání fixovaných v příliš velkém množství formalínu. Pro interpretaci výsledků zabarvení použijte intaktní buňky. Nekrotické nebo zdegenerované buňky se často zabarvují nespecificky.<sup>4</sup> Falešné pozitivní výsledky lze pozorovat v důsledku neimunologického navázání proteinů nebo produktů reakce se substrátem. Mohou být způsobeny také endogenními enzymy, jako například pseudoperoxidázou (erythrocyty), endogenní peroxidázou (cytochrom C), nebo endogenním biotinem<sup>5</sup> (např. játra, prs, mozek, ledvina). K odlišení aktivity endogenního enzymu nebo nespecifického navázání enzymů od specifické imunoreaktivity lze provést barvení další tkáň pacienta výhradně pomocí substrátu-chromogenu, streptavidinu-HRP nebo značeného polymeru a substrátu-chromogenu, v uvedeném pořadí. Jestliže se specifické zabarvení objeví u negativní tkáňové kontroly, je třeba výsledky na vzorcích pacientů považovat za neplatné.

### Negativní kontrola činidlem

K vyhodnocení nespecifického zabarvení a pro lepší interpretaci specifického zabarvení v místě antigenu použijte negativní kontrolu nespecifickým činidlem namísto primární protilátky s využitím řezu z každého vzorku pacienta.

### Tkáň pacienta

Jako poslední vyhodnocujte zabarvené vzorky od pacienta. Intenzitu pozitivního zabarvení je třeba posuzovat v kontextu jakéhokoli nespecifického zabarvení na pozadí, které vyplývá z negativní kontroly činidlem. Jako u každé imunohistochemické zkoušky negativní výsledek znamená, že antigen nebyl zjištěn a nikoli že nebyl v analyzovaných buňkách/tkáni přítomen. Podle potřeby využijte k identifikaci falešných negativních reakcí panel protilátek.

### Omezení

Imunohistochemie je víceokrový diagnostický proces, který zahrnuje specializované školení ve volbě vhodných činidel; volbu tkání, fixaci a zpracování; přípravu IHC sklíčka a interpretaci výsledků barvení. Zabarování tkání závisí na manipulaci a zpracování tkáně před jejím obarvením. Nevhodná fixace, zmrazení, rozmrazení, praní, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi nebo tekutinami mohou mít za následek vznik artefaktů, zachytávání protilátek nebo falešné negativní výsledky. Nekonzistentní výsledky mohou být způsobeny odchylkami v metodách fixace a zalévání vzorků nebo přirozenými nepravidelnostmi tkáně.<sup>7</sup> Rádnou interpretaci výsledků může ohrozit i nadměrné nebo neúplné kontrastní zabarvení. Klinická interpretace jakéhokoli zabarvení nebo jeho nepřítomnosti by měla být doplněna morfológickými studii s využitím řádných kontrol a výsledky by měly být vyhodnoceny v kontextu klinické historie pacienta a dalších diagnostických zkoušek kvalifikovaným patologem. Zředovací činidlo Novocastra TM IHC Diluent RE7133 se používá na řezech zalitých do parafínu se specifickými požadavky na fixaci. Může dojít k neočekávané expresi antigenu, zvláště u novotvarů. Klinická interpretace jakýchkoli zabarvených tkáňových řezů musí zahrnovat morfológickou analýzu a vyhodnocení odpovídajících kontrol.

### Pracovní charakteristiky

Pracovní charakteristiky zředovacího činidla Novocastra™ IHC Diluent RE7133 byly validovány pomocí řady primárních protilátek a detekčních systémů Novocastra™. Tento výrobek je stabilní až do data použitelnosti uvedeného na štítku.

## Literatura

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine* 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## Změny oproti předchozímu vydání

Nepoužity.

## Datum vydání

30 duben 2019

# Novocastra™ IHC Diluent

## Č. produktu: RE7133

### Zamýšľané použitie

*Na diagnostické použitie in vitro.*

Prípravok Novocastra™ IHC Diluent RE7133 je určený na použitie ako riediaci roztok pre primárne protilátky Novocastra™, roztok Novocastra™ Concentrated Biotinylated Secondary Antibody RE7108 a Novocastra™ Concentrated Streptavidin-HRP RE7109 pri imunohistochemických postupoch (IHC). Klinická interpretácia akéhokoľvek farbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými vyšetreniami za použitia zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a iných diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.

### Princíp postupu

Použitie protilátky na detekciu antigénov v bunkách tkaniva prvýkrát popísal Coons AH a Kaplan MH v roku 1950.1 Odvtedy bolo vyvinutých mnoho ďalších techník, ktoré viedli k tomu, že v súčasnosti sa bežne používajú techniky založené na imunoperoxidáze (princípy postupu farbenia IHC nájdete v návode na použitie k príslušnému detekčnému systému). Na dosiahnutie optimálneho zafarbenia pri postupe IHC sa vyžaduje zriedenie primárnych protilátok. Naviazanie protilátok na príslušné epitopy sa dá okamžite oddeliť použitím extrémnej hodnoty pH a iónovej intenzity. Z tohto dôvodu je na dosiahnutie optimálneho zafarbenia potrebné použiť vhodný riediaci roztok. Tento produkt sa používa pri postupoch IHC ako riediaci roztok pre primárne protilátky, čo umožňuje kvalitatívnu identifikáciu prostredníctvom svetelnej mikroskopie antigénov v rezoch tkaniva zaliatého do parafínu a fixovaného formálnom postupnými krokmi a medzikrokmi umývania. Prípravok Novocastra™ IHC Diluent RE7133 pomáha zachovávať špecifickosť a stabilitu protilátok.

### Dodané činidlá

IHC Diluent RE7133 (500 ml). Tris-pufrovaný fyziologický roztok, povrchovo aktívne činidlo a proteínový stabilizátor s 0,35 % prípravkom ProClin™ 950.

### Rekonštitúcia, miešanie, riedenie, titrácia

IHC Diluent RE7133 je činidlo pripravené na použitie. Rekonštitúcia, miešanie, riedenie ani titrácia tohto činidla sa neodporúčajú. Ďalšie zriedenie môže viesť k strate antigénového zafarbenia. Každú takúto zmenu musí validovať používateľ.

### Uskladnenie a stabilita

Skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Nezmrazujte. Okamžite po použití vráťte do teploty 2 – 8 °C. Nepoužívajte po uplynutí dátumu expirácie uvedeného na štítku produktu. Iné než uvedené podmienky skladovania si vyžadujú validáciu používateľom. Neexistujú evidentné známky signalizujúce nestabilitu tohto produktu, s patientskymi vzorkami sa preto musia súběžne testovať pozitívne aj negatívne kontroly. Indikácie kontaminácie prípravku IHC Diluent RE7133 sú: zakalenie, vznik zápachu alebo prítomnosť zrazeniny.

### Príprava vzorky

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

### Varovania a bezpečnostné opatrenia

Určené pre odborníkov.

**Prípravok IHC Diluent RE7133 nepoužívajte na rekonštitúciu lyofilizovaných protilátok.**

**Prípravok IHC Diluent RE7133 nepoužívajte, ak je zakalený, vydáva zápach alebo obsahuje zrazeniny.**

Konzentrácia konzervačného prípravku ProClin™ 950 použitého s prípravkom IHC Diluent RE7133 je 0,35 %. Môže spôsobiť podráždenie pokožky, očí, sliznic a horných dýchacích ciest.

Materiálový bezpečnostný list (KBÚ) je k dispozícii na požiadanie.

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

Činidlá nikdy nepipetujte ústami a zabráňte kontaktu činidiel a vzoriek s kožou a sliznicami. Ak sa činidlá alebo vzorky dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, umyte ich veľkým množstvom vody.

Likvidáciu prípadných potenciálne toxických súčastí definujú federálne, štátne alebo miestne predpisy.

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

### Postup

#### A. Požadované, ale nedodávané činidlá

1. Štandardné rozpúšťadlá používané v imunohistochemii
2. Antigénový záchytný roztok (roztoky) (pozri časť **Odporúčania k použitiu** primárnej protilátky).
3. Enzymatický záchytný roztok (roztoky) (pozri časť **Odporúčania k použitiu** primárnej protilátky).
4. Primárna protilátka
5. Detekčný systém
6. Upevňovacie médium

#### B. Požadované, ale nedodávané vybavenie

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

## C. Metóda

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

Používateľ musí validovať kombináciu primárnej protilátky, jej riedenia a optimálnych podmienok pre záchyt epitopu spolu s detekčným systémom na rade známych pozitívnych a negatívnych kontrol.

Zmiešajte primerané množstvo primárnej protilátky s koncentrátom Biotinylated Secondary Antibody RE7108 alebo koncentrátom Streptavidin-HRP RE7109 a činidlom IHC Diluent RE7133 na dosiahnutie overeného riedenia.

Zriedenú protilátku skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Okamžite po použití ochlaďte všetky činidla na teplotu 2 – 8 °C.

### Kontrola kvality

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

### Positívna kontrola tkanivom

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

### Negatívna kontrola tkanivom

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

### Negatívna kontrola činidlom

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

### Tkanivo pacienta

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

### Obmedzenia

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

Farbenie tkaniva závisí od manipulácie s tkanivom a od jeho spracovania pred farbením. Nesprávna fixácia, zmrazovanie, rozmrazovanie, premývanie, sušenie, ohrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými tkanivami či tekutinami môžu viesť k vzniku artefaktov, záchytu protilátok alebo falošne negatívnym výsledkom. Inkonzistentné výsledky môžu byť spôsobené zmenami metód fixácie a montáže preparátov alebo inherentnými nepravidosťami v tkanive.<sup>7</sup>

Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže narušiť správnosť interpretácie výsledkov.

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

Prípravky Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions sú určené na použitie na rezoch zaliatých do parafínu so špecifickými požiadavkami na fixáciu. Najmä pri neopláziách môže dôjsť k nečakanéj expresii antigénov. Klinická interpretácia akýchkoľvek farbených tkanivových rezov musí zahŕňať morfológickú analýzu a vyhodnotenie zodpovedajúcich kontrol.

### Parametre výkonu

Výkonnosť prípravku Novocastra™ IHC Diluent RE7133 bola overená pomocou spektra primárnych protilátok a detekčných systémov Novocastra™.

Tieto produkty sú stabilné až do dátumu (dátumov) expirácie, ktorý je uvedený na štítku produktu.

### Literatúra

1. Coons AH and Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in method of detection of antigen by means of fluorescent antibody. Journal of Experimental Medicine 1950; 91: 1-13.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.

3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

### **Úpravy predchádzajúceho vydania**

Neuplatňuje sa.

### **Dátum vydania**

30 apríl 2019

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

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

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

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