

Peroxidase Detection System (250 tests)

Product No: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Product No: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Product No: RE7104

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



[EN](#) [FR](#) [IT](#) [DE](#) [ES](#) [PT](#) [SV](#) [EL](#) [DA](#) [NL](#)
[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.

Gebruiksaanwijzing

Lezen vóór gebruik van dit product.

Bruksanvisning

Vennligst les denne før du bruker produktet.

Kullanım Talimatları

Lütfen bu ürünü kullanmadan önce okuyunuz.

Инструкции за употреба

Моля, прочетете преди употреба на този продукт.

Használati utasítás

A termék használatba vétele előtt olvassa el.

Instruțiuni 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.

Peroxidase Detection System (250 tests)

Product No: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Product No: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Product No: RE7104

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K and (500 tests) RE7120-K are for the visualization of mouse IgG, mouse IgM and rabbit IgG primary antibodies. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 are component reagents of these systems that are intended for use in the procedure described below. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Principle of Procedure

The first immunoperoxidase technique was reported by Nakane and Pierce¹, since then many developments have occurred leading to the immunoperoxidase techniques commonly used today. The Novocastra™ Peroxidase Detection Systems are based upon the technique described by Guesdon.² These products are used in an immunohistochemical (IHC) procedure, which allows the qualitative identification by light microscopy of Epitopes in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, via sequential steps with interposed washing steps.

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

Reagents Provided

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

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

Reagent	Product Number	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25ml	2 x 25ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25ml	2 x 25ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25ml	2 x 25ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25ml	2 x 25ml	1 x 25ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3ml	1 x 3ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	2 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25ml	2 x 25ml	

Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

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

The DAB Chromogen RE7105 requires dilution to 1/20 in DAB Substrate Buffer RE7106 prior to use. Further dilution may result in loss of Epitope staining. The user must validate any such change.

Storage and Stability

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

Specimen Preparation

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

Warnings and Precautions

A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from www.LeicaBiosystems.com

For professional users.

Do not mix reagents from different detection systems.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.³

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

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

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

Procedure

A. Reagents required but not supplied

1. Standard solvents used in immunohistochemistry.
2. 50mM tris-buffered saline (TBS) pH7.6.
3. Epitope retrieval solution(s).
4. Enzyme retrieval solution(s).
5. Antibody diluent.
6. Primary antibody.
7. Mounting medium.

B. Equipment required but not supplied

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

C. Methodology

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

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

Unless indicated, all steps are performed at room temperature (25 °C).

1. Cut and mount sections on slides coated with a suitable tissue adhesive.
2. De-paraffinize sections in xylene or xylene substitutes.
3. Re-hydrate through graded alcohols.
4. Wash slides in running tap water.
5. Perform Epitope retrieval as required (see **Recommendations for Use** for primary antibody).
6. Wash slides in de-ionized water.
7. Neutralize endogenous peroxidase using Peroxidase Block RE7101 for 5 minutes.
8. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
9. Incubate with Protein Block RE7102 for 5 minutes.
10. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
11. Incubate with optimally diluted primary antibody (see **Recommendations for Use** for primary antibody).
12. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
13. Incubate with Biotinylated Secondary Antibody RE7103 for 30 minutes.
14. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
15. Incubate with Streptavidin-HRP RE7104 for 30 mins.
16. Wash in TBS for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
17. Develop peroxidase activity with DAB working solution (see **DAB Working Solution**) for 5 minutes.
18. Rinse slides in water.
19. Counterstain with Hematoxylin RE7107.
20. Rinse slides in water for 5 minutes.
21. Dehydrate, clear and mount sections.

DAB Working Solution

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

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures. Controls should be fresh autopsies/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.⁴ For recommended positive control tissue see primary antibody Instructions for Use. If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target Epitope by the primary antibody. For recommended negative control tissue see primary antibody instructions for Use. Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user. Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.⁵ 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 biotin⁶ (eg. liver, breast, brain, kidney). To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate-chromogen or Streptavidin-HRP, and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

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

Patient Tissue

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

Limitations

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

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.⁷

Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

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

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K or RE7120-K are for use on paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected Epitope expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

Performance Characteristics

The performance of Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 have been validated using a range of Novocastra™ mouse IgG, mouse IgM and rabbit IgG primary antibodies. These products are stable up to the expiry date(s) printed on the product label.

Bibliography

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Amendments to Previous Issue

Not applicable.

Date of Issue

19 February 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Référence du produit : RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Référence du produit : RE7120-K

Streptavidin-HRP

Référence du produit : RE7104

Utilisation prévue

Diagnostic in vitro.

Les Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K et (500 tests) RE7120-K sont destinés à la révélation des anticorps primaires de type IgG de souris, IgM de souris et IgG de lapin. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 sont des éléments réactifs de ces systèmes et sont destinés à être utilisés dans le cadre de la procédure décrite ci-dessous. L'interprétation clinique de tout marquage, ou absence de marquage, doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée par un pathologiste qualifié à la lumière des antécédents cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques.

Principe de la procédure

La première technique immunoperoxydasique a été décrite par Nakane et Pierce¹, depuis lors, elle a fait l'objet de nombreux développements qui ont conduit aux techniques immunoperoxydasiques communément utilisées aujourd'hui. Les Novocastra™ Peroxidase Detection Systems sont basés sur la technique décrite par Guesdon.² Ces produits sont utilisés dans le cadre d'une procédure immunohistochimique (IHC) qui permet une identification qualitative des antigènes par microscopie optique, dans des coupes fixées au formol, incluses en paraffine, par l'intermédiaire d'étapes séquentielles comportant des étapes de lavage.

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

Réactifs fournis

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

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

Réactif	Référence du produit	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104.
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml	1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 ml	2 x 30 ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml	

Reconstitution, Mélange, Dilution, Titrage

Les solutions de Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 et Hematoxylin RE7107 sont prédiluées. Il n'est pas recommandé de reconstituer, mélanger, diluer, ou titrer ces réactifs. Une dilution supplémentaire est susceptible de se traduire par une perte de marquage des antigènes. Toute modification de ce type doit être validée par l'utilisateur. Le DAB Chromogen RE7105 doit être dilué au 1/20 dans du DAB Substrate Buffer RE7106 avant emploi. Une dilution supplémentaire est susceptible de se traduire par une perte de marquage des antigènes. Toute modification de ce type doit être validée par l'utilisateur.

Conservation et Stabilité

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

Préparation des spécimens

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

Mises en garde et Précautions

Pour utilisateurs professionnels.

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

Les spécimens, avant et après fixation, ainsi que tous les matériels ayant été en contact avec eux, doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et éliminés conformément aux précautions appropriées en vigueur.³

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

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

Procédure

A. Réactifs nécessaires mais non fournis

1. Solvants standard utilisés en immunohistochimie.
2. Solution saline tamponnée de Tris (TBS) 50 mM, pH 7,6.
3. Solution(s) de restauration des antigènes.
4. Solution(s) de restauration des enzymes.
5. Diluant de l'anticorps.
6. Anticorps primaire.
7. Milieu de montage.

B. Equipements nécessaires mais non fournis

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

C. Méthodologie

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

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

Sauf mention contraire, toutes les étapes sont réalisées à température ambiante (25 °C).

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

Solution de travail DAB

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

Contrôle de qualité

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

Tissu de contrôle positif

Il est utilisé pour indiquer que les tissus ont été préparés correctement et que les techniques de marquage étaient appropriées. Un contrôle tissulaire positif doit être inclus dans toute opération de marquage pour chaque ensemble d'anticorps primaire/de conditions d'analyse. Un tissu présentant un marquage faiblement positif est plus adapté à un contrôle de qualité optimal qu'un tissu présentant un marquage fortement positif et il permet de détecter de moindres niveaux de dégradation du réactif.⁴ 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.⁵ 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 endogène⁶ (foie, sein, cerveau, rein, par exemple). Pour différencier l'activité des enzymes endogènes ou la liaison non spécifique d'enzymes de l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être marqués exclusivement avec le substrat chromogène ou le Streptavidin-HRP, et le substrat chromogène, respectivement. Si un marquage spécifique se produit dans le tissu de contrôle négatif, les résultats des spécimens du patient doivent être considérés comme invalides.

Réactif de contrôle négatif

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

Tissu du patient

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

Limites

L'immunohistochimie est un processus diagnostique constitué de plusieurs étapes qui nécessite une formation spécialisée relative au choix des réactifs appropriés ; au choix, à la fixation et au traitement des tissus ; à la préparation des lames IHC ; et à l'interprétation des résultats du marquage. Le marquage des tissus dépend de leur manipulation et de leur traitement avant le marquage. Une fixation, une congélation, une décongélation, un lavage, un séchage, un chauffage, une coupe, incorrects ou une contamination par d'autres tissus ou d'autres liquides sont susceptibles de conduire à la production d'artefacts, au piégeage de l'anticorps ou à des résultats faussement négatifs.

Des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités propres au tissu, peuvent conduire à des résultats incohérents.⁷ Une coloration de contraste excessive ou incomplète peut gêner l'interprétation correcte des résultats. L'interprétation clinique de tout marquage, ou absence de marquage, doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée par un pathologiste qualifié à la lumière des antécédents cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques. Les Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K ou RE7120-K doivent être utilisés sur des coupes incluses en paraffine avec des exigences spécifiques en matière de fixation. Une expression antigénique inattendue est susceptible de se produire, en particulier au niveau des néoplasmes. L'interprétation clinique de toute coupe tissulaire marquée doit comporter une analyse morphologique et l'évaluation des contrôles appropriés.

Caractéristiques de performance

Les performances des Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 ont été validées à l'aide d'une gamme d'anticorps primaires Novocastra™ de type IgG de souris, IgM de souris et IgG de lapin.

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

Bibliographie

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Amendements apportés à la version précédente

Non applicable.

Date de publication

19 février 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Cod. prodotto: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Cod. prodotto: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Cod. prodotto: RE7104

Uso previsto

Per uso diagnostico in vitro.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K e (500 tests) RE7120-K sono destinati alla visualizzazione degli anticorpi primari IgG di topo, IgM di topo e IgG di coniglio. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 sono reagenti componenti di tali sistemi, destinati all'uso nella tecnica descritta di seguito. L'interpretazione clinica di ogni colorazione o della sua assenza va integrata da studi morfologici che utilizzino i controlli appropriati e deve essere valutata da un patologo qualificato, nel contesto della storia clinica del paziente e delle altre metodiche diagnostiche adoperate.

Principio della procedura

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

Reagenti forniti

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

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

Reagente	Codice prodotto	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml	1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 ml	2 x 30 ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml	

Ricostituzione, miscelazione, diluizione, titolazione

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

Conservazione e stabilità

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

Preparazione del campione biologico

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

Avvertenze e precauzioni

Una scheda di sicurezza del prodotto (MSDS) è disponibile su richiesta o dal sito www.LeicaBiosystems.com
Per uso professionale.

Non miscelare con reagenti di altri sistemi di determinazione.

Prima e dopo la fissazione, i campioni biologici e tutti i materiali ad essi esposti vanno trattati come potenzialmente infettanti e smaltiti con le appropriate precauzioni.³ 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. Tampone Tris (TBS) 50 mM a pH 7,6.
3. Soluzione/i per lo smascheramento Epitopeico.
4. Soluzione/i per lo smascheramento con enzimi.
5. Diluente per anticorpi.
6. Anticorpo primario.
7. Mezzo di montaggio.

B. Attrezzature necessarie ma non fornite

1. Attrezzatura necessaria per lo smascheramento Epitopeico, se consigliato per l'anticorpo primario.
2. Attrezzatura di base del laboratorio di 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, assieme al sistema di determinazione vanno convalidate dall'utente su una serie di controlli positivi e negativi noti.

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

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

Soluzione di lavoro DAB

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

Controllo qualità

Differenze nella processazione del tessuto e nelle tecniche in uso presso il laboratorio dell'utente possono produrre una discrepanza significativa nei risultati, rendendo necessaria la regolare esecuzione di controlli interni, in aggiunta alle procedure descritte di seguito. I controlli devono essere costituiti da campioni biologici freschi autoptici/bioptici/chirurgici e devono essere il più rapidamente possibile fissati in formalina, processati ed inclusi in paraffina, allo stesso modo dei campioni biologici ottenuti dal paziente.

Controllo positivo del tessuto

È usato per indicare tessuti correttamente preparati e tecniche di colorazione appropriate. Per ogni gruppo di condizioni dei test/ anticorpo primario e per ogni ciclo di colorazione, deve essere incluso un controllo positivo del tessuto. Un tessuto a debole colorazione positiva è più adatto di uno a colorazione positiva intensa per un ottimale controllo qualità e per mettere in evidenza livelli inferiori di degradazione del reagente.* Per il tessuto raccomandato come controllo positivo, vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario. Se il controllo positivo del tessuto non dimostra colorazione positiva, i risultati con i campioni biologici del test vanno considerati non validi.

Controllo negativo del tessuto

Va esaminato dopo il controllo positivo, per verificare la specificità della marcatura dell'Epitopee bersaglio da parte dell'anticorpo primario. Per il tessuto raccomandato come controllo negativo, vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario. In alternativa, la varietà dei tipi cellulari presenti nella maggior parte delle sezioni tissutali offre spesso siti di controllo negativo, ma questo va verificato dall'utente. La colorazione aspecifica, se presente, assume di solito aspetto diffuso. La colorazione sporadica del tessuto connettivo può anche manifestarsi in seguito ad iperfissazione di sezioni di tessuto in formalina. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, usare cellule intatte. Le cellule necrotiche o degenerate si colorano spesso in maniera aspecifica.⁵ 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 endogena⁶ (es. fegato, mammella, cervello, rene). Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame enzimatico aspecifico dall'immunoattività specifica, possono essere colorati ulteriori tessuti del paziente esclusivamente e rispettivamente con substrato cromogeno o Streptavidin-HRP e con substrato cromogeno. Se nel controllo negativo del tessuto compare una colorazione specifica, i risultati sui campioni biologici ottenuti dal paziente devono essere considerati non validi.

Controllo negativo del reagente

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

Tessuto del paziente

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

Limitazioni

L'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.⁷ Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati. L'interpretazione clinica di ogni colorazione o della sua assenza va integrata da studi morfologici che utilizzino i controlli appropriati e deve essere valutata da un patologo qualificato, nel contesto della storia clinica del paziente e delle altre metodiche diagnostiche adoperate. Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K e RE7120-K sono destinati all'uso su sezioni tissutali incluse in paraffina con specifici requisiti di fissazione. Un'espressione Epitopeica inattesa può manifestarsi in particolare nelle neoplasie. L'interpretazione clinica di ogni sezione tissutale colorata deve includere l'analisi morfologica e la valutazione dei controlli appropriati.

Caratteristiche di rendimento

Il rendimento di Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 è stato convalidato utilizzando una gamma di anticorpi primari Novocastra™ IgG di topo, IgM di topo e IgG di coniglio. Questi prodotti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Riferimenti bibliografici

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, PA. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Modifiche alla pubblicazione precedente

Non applicabile.

Data di pubblicazione

19 febbraio 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Produkt Nr.: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Produkt Nr.: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Produkt Nr.: RE7104

Verwendungszweck

Für in-vitro-Diagnostik.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K und (500 tests) RE7120-K sind zur Visualisierung primärer Maus-IgG-, Maus-IgM- und Kaninchen-IgG-Antikörper bestimmt. Novocastra™ DAB (250 Slides) Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 sind Komponentenreagenzien dieser Systeme, die zur Verwendung im unten beschriebenen Verfahren bestimmt sind. Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Verfahrensgrundlage

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

Gelieferte Reagenzien

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

1. Peroxidase Block RE7101. 3-4% Wasserstoffperoxid.
2. Protein Block RE7102. 0,4% Casein in einer phosphatgepufferten physiologischen Kochsalzlösung mit Stabilisatoren, oberflächenaktiver Substanz und 0,2% Bronidox L als Konservierungsmittel.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Affinitätsgereinigtes, Anti-Maus-IgM (5 µg/ml) der Ziege, Anti-Maus-IgG (10,5 µg/ml) des Pferdes und Anti-Kaninchen-IgG (10,5 µg/ml) des Pferdes in Tris gepufferter physiologischer Kochsalzlösung mit Protein stabilisator und 0,35% ProClin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 bis 1,4 µg/ml in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung mit Protein stabilisator und 0,35% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74 Gew.-% 3,3'-Diaminobenzidin in einer Stabilisatorlösung.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Pufferlösung mit ≤ 0.1% Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel.
7. Hematoxylin RE7107. < 0.1% Hämatoxylin.

Reagenz	Produktnummer	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml	1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 ml	2 x 30 ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml	

Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration

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

Lagerung und Stabilität

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

Probenvorbereitung

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

Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

Ein Material Sicherheits-Datenblatt ist auf Anfrage von www.LeicaBiosystems.com erhältlich.

Für geschultes Fachpersonal.

Reagenzien aus unterschiedlichen Nachweissystemen dürfen nicht gemischt werden.

Vor und nach der Fixierung sind die Proben sowie alle Materialien, die mit ihnen in Kontakt gekommen sind, als potentiell infektiös zu behandeln und daher mit entsprechender Vorsicht zu entsorgen.³ Reagenzien dürfen niemals mit dem Mund pipettiert werden, und jeglicher Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden. Falls Reagenzien oder Proben mit empfindlichen Bereichen in Kontakt gekommen sind, müssen diese mit reichlich Wasser gespült werden. Die entsprechenden nationalen und lokalen Bestimmungen und Vorschriften zur Entsorgung potentiell giftiger Komponenten sind einzuhalten. Die mikrobielle Verunreinigung von Reagenzien ist zu minimieren, da ansonsten eine erhöhte unspezifische Färbung auftreten kann. Falls die spezifizierten Inkubationszeiten oder –temperaturen nicht eingehalten werden, kann es zu fehlerhaften Ergebnissen kommen. Jegliche Abweichungen von den angegebenen Werten müssen vom Benutzer verifiziert werden.

Verfahren

A. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Reagenzien

1. In der Immunhistochemie übliche Standardlösungsmittel.
2. 50 mmol/l Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (Tris-Buffered Saline, TBS) pH7,6.
3. Epitopedemaskierungslösung(en).
4. Enzymdemaskierungslösung(en).
5. Antikörperverdünnung.
6. Primärer Antikörper.
7. Aufbringungsmedium.

B. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Ausrüstung

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

C. Vorgehensweise

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

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

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

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

DAB-Arbeitslösung

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

Qualitätskontrolle

Unterschiede bei der 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.⁴ Informationen über das positive Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden. Falls das positive Kontrollgewebe keine positive Färbung nachweisen kann, sollten die mit den Testproben erzielten Ergebnisse als ungültig betrachtet werden.

Negative Gewebekontrolle

Die negative Gewebekontrolle sollte nach der positiven Gewebekontrolle erfolgen, um die Spezifität der ZielEpitopemarkierung durch den primären Antikörper zu verifizieren. Informationen über das empfohlene negative Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden. Alternativ bietet die Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen, die in den meisten Gewebeschnitten vorliegen, häufig Stellen für eine negative Kontrolle. Jedoch sollte dies vom Benutzer verifiziert werden. Liegt eine unspezifische Färbung vor, hat diese gewöhnlich ein diffuses Erscheinungsbild. Eine sporadische Färbung des Bindegewebes kann ebenfalls in Schnitten von übermäßig formalinfixierten Geweben beobachtet werden. Zur Bewertung der Färbeergebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.⁵ 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 Biotin⁶ (beispielsweise Leber, Mamma, Gehirn, Niere) hervorgerufen werden. Um eine endogene Enzymaktivität bzw. eine unspezifische Enzymbindung von einer spezifischen Immunreaktivität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substratchromogen bzw. Streptavidin-HRP plus Substratchromogen gefärbt werden. Falls im negativen Kontrollgewebe eine spezifische Färbung auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

Negative Reagenzkontrolle

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

Patientengewebe

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

Beschränkungen

Die Immunhistochemie ist ein mehrstufiger diagnostischer Prozess, der eine spezialisierte Ausbildung auf den folgenden Gebieten erfordert: Auswahl der entsprechenden Reagenzien; Gewebenauswahl, -fixierung und -verarbeitung; Vorbereitung des IHC-Objekträgers sowie Bewertung der Färbeergebnisse. Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor dem Färben ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder eine Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper-Trapping oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Abweichende Ergebnisse können aufgrund von Unterschieden bei der Fixierung und Einbettung oder intrinsischen Unregelmäßigkeiten im Gewebe selbst entstehen.⁷ Eine exzessive oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Bewertung von Ergebnissen gefährden.

Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden. Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K bzw. RE7120-K dienen zur Verwendung auf paraffineingebetteten Schnitten mit spezifischen Fixierungsanforderungen.

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

Leistungsmerkmale

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

Literatur

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Nicht zutreffend.

Ausgabedatum

19 Februar 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Referencia: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Referencia: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Referencia: RE7104

Indicaciones de uso

Para uso diagnóstico in vitro.

Los sistemas de detección Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K y (500 tests) RE7120-K están indicados para visualizar anticuerpos primarios IgG e IgM de ratón, e IgG de conejo. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 son reactivos componentes de estos sistemas, cuyo uso está indicado en el procedimiento descrito más abajo. La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia se debe complementar con estudios morfológicos utilizando los controles adecuados, y un patólogo cualificado debe evaluarla en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Principio del procedimiento

La primera técnica de la inmunoperoxidasa fue descrita por Nakane and Pierce¹; desde entonces, se han producido muchos avances que han dado lugar a las técnicas de la inmunoperoxidasa utilizadas actualmente. Los productos Novocastra™ Peroxidase Detection Systems se basan en la técnica descrita por Guesdon². Estos productos se usan en un procedimiento inmunohistoquímico, lo que permite la identificación cualitativa, por microscopía óptica, de antígenos en secciones de tejidos fijadas con formol e incluidas en parafina, mediante pasos sucesivos, con pasos intermedios de lavado. Si se necesita a causa del anticuerpo primario, las secciones se someten a recuperación de epítomos antes de la tinción. La actividad de la peroxidasa endógena se neutraliza con Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Esto va seguido de la aplicación de Novocastra™ Protein Block RE7102 para reducir la unión inespecífica de anticuerpos primarios y secundarios. A continuación, la sección se incuba con anticuerpo primario, con una dilución óptima. Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 una formulación de anticuerpo secundario conjugado con biotina que reconoce inmunoglobulinas murinas y de conejo, se usa para detectar cualquier anticuerpo primario unido al tejido. Seguidamente, se aplica Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, y se une a la biotina presente en el anticuerpo secundario. Las secciones se incuban más tiempo con substrato-cromógeno, 3,3'-diaminobenzidina (DAB), preparado a partir de Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 y Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106 tal y como se describe más abajo. La reacción con la peroxidasa produce un precipitado pardo, visible en el lugar donde se encuentra el antígeno. Las secciones se someten a contratinción con Novocastra™ Hematoxylin RE7107 y se coloca un cubreobjetos. Los resultados se interpretan utilizando un microscopio óptico y son de ayuda en el diagnóstico diferencial de los procesos fisiopatológicos, que pueden estar o no vinculados a un determinado antígeno.

Reactivos suministrados

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

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

Reactivo	Referencia	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml	1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 ml	2 x 30 ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25ml	2 x 25 ml	

Reconstitución, mezcla, dilución y titulación

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

Almacenamiento y estabilidad

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

Preparación de las muestras

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

Advertencias y precauciones

Está disponible una Hoja de información sobre la seguridad del material, previa petición, o en www.LeicaBiosystems.com Para usuarios profesionales.

No mezcle reactivos procedentes de sistemas de detección diferentes.

Las muestras, antes y después de ser fijadas, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como capaces de transmitir una infección, y se deben desechar tomando las precauciones adecuadas.³ No pipetee nunca los reactivos con la boca, evite el contacto de la piel y de las membranas mucosas con los reactivos y las muestras. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas sensibles, lave éstas con abundante agua. Consulte las normativas nacionales, estatales, provinciales o municipales acerca de cómo desechar cualquier componente potencialmente tóxico. Reduzca al mínimo la contaminación microbiana de los reactivos; de lo contrario, podría producirse un aumento de la tinción no específica. Cualquier tiempo o temperatura de incubación que no sean los aquí especificados pueden conducir a resultados erróneos. Cualquier cambio de tal naturaleza debe ser validado por el usuario.

Procedimiento

A. Reactivos necesarios que no se suministran

1. Disolventes estándar utilizados en inmunohistoquímica.
2. Solución salina tamponada con Tris 50 mM (TBS), pH 7,6.
3. Soluciones de recuperación del antígeno.
4. Soluciones de recuperación de la enzima.
5. Diluyente de anticuerpos.
6. Anticuerpo primario.
7. Medio de montaje.

B. Equipo necesario que no se suministra

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

C. Metodología

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

La combinación del anticuerpo primario, su dilución, junto con el sistema de detección lo debe validar el usuario sobre una serie de controles positivos y negativos conocidos.

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

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

Solución de trabajo DAB

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

Control de calidad

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

Control tisular positivo

Se utiliza para indicar la preparación correcta de los tejidos y las técnicas de tinción adecuadas. Debe incluirse un control tisular positivo por cada conjunto de condiciones de ensayo y anticuerpo primario en cada tinción o serie de tinciones realizada. Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado que un tejido con una tinción positiva intensa para un control de calidad óptimo y para detectar niveles bajos de degradación del reactivo.⁴ 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.⁶ También pueden observarse falsos positivos causados por la unión no inmunológica de proteínas o de productos de reacción del sustrato. Estos falsos positivos pueden estar causados también por enzimas endógenas tales como la pseudoperoxidasa (eritrocitos), la peroxidasa endógena (citocromo C), o la biotina endógena⁶ (por ejemplo, de hígado, mama, cerebro o riñón). Para diferenciar la actividad de las enzimas endógenas o la unión inespecífica de las enzimas de la inmunoreactividad específica, pueden teñirse otros tejidos del paciente exclusivamente con cromógeno-sustrato o Streptavidin-HRP, y con sustrato-cromógeno, respectivamente. Si se produce tinción específica del control tisular negativo, los resultados de las muestras de los pacientes deben considerarse no válidos.

Control de reactivo negativo

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

Tejido del paciente

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

Limitaciones

La inmunohistoquímica es un proceso de diagnóstico en varias fases, que abarca: formación especializada en la selección de los reactivos apropiados; selección, fijación y procesamiento de tejidos; preparación del portaobjeto para IHQ, e interpretación de los resultados de la tinción. La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento del tejido previos a la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o seccionamiento incorrectos, o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede generar artefactos, atrapamiento del anticuerpo o falsos negativos. La aparición de resultados incoherentes puede deberse a variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, o a irregularidades inherentes al tejido.⁷ Una contraindicación excesiva o incompleta puede poner en peligro la interpretación correcta de los resultados. La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia se debe complementar con estudios morfológicos utilizando los controles adecuados, y un patólogo cualificado debe evaluarla en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Los productos Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K o RE7120-K están pensados para su empleo en secciones incluidas en parafina con requisitos de fijación específicos. Puede producirse una expresión inesperada del antígeno, especialmente en las neoplasias. La interpretación clínica de cualquier sección de tejido teñida debe incluir un análisis morfológico y la evaluación de los controles apropiados.

Características del rendimiento

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

Bibliografía

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, TERNYNCK T and AVRAMEAS S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Correcciones a la publicación anterior

No aplicable.

Fecha de publicación

19 de febrero de 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

N.º do produto: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

N.º do produto: RE7120-K

Streptavidin-HRP

N.º do produto: RE7104

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos in vitro.

Os sistemas Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K e (500 tests) RE7120-K são próprios para a visualização de anticorpos primários da IgG de rato, da IgM de rato e da IgG de coelho. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 são reagentes componentes destes sistemas, concebidos para serem utilizados no procedimento descrito a seguir. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos que empreguem os devidos controlos, e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto dos antecedentes clínicos do doente e de outros testes de diagnóstico.

Princípio do procedimento

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

Reagentes fornecidos

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

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

Reagente	Número do produto	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25ml	2 x 25ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25ml	2 x 25ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25ml	2 x 25ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25ml	2 x 25ml	1 x 25ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3ml	1 x 3ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	2 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25ml	2 x 25ml	

Reconstituição, mistura, diluição, titulação

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

Armazenamento e estabilidade

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

Preparação das amostras

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

Avisos e precauções

Encontra-se disponível uma Ficha de Dados de Segurança do Material, mediante pedido ou através do site www.LeicaBiosystems.com
Apenas para utilizadores profissionais.

Não misturar reagentes de diferentes sistemas de detecção.

As amostras, antes e depois da sua fixação, bem como todos os materiais expostos às mesmas, devem ser processados tal como se tivessem a capacidade de transmitir infecções e devem ser descartados com as devidas precauções³. Nunca pipetar os reagentes com a boca e evitar o contacto da pele e membranas mucosas com os reagentes e amostras. Caso os reagentes ou amostras entrem em contacto com áreas sensíveis, lavar com grandes quantidades de água. Consultar a legislação nacional ou europeia em relação ao descarte de quaisquer componentes potencialmente tóxicos. Minimizar a contaminação microbiana dos reagentes, para evitar a possibilidade do aumento da coloração não específica. Os períodos de incubação ou temperaturas diferentes dos que foram especificados poderão dar azo a resultados errados. Todas as alterações desse tipo devem ser validadas pelo utilizador.

Procedimento

A. Reagentes necessários mas não fornecidos

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

B. Equipamento necessário não fornecido

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

C. Metodologia

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

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

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

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

Solução de trabalho DAB

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

Controlo da qualidade

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

Controlo de tecido positivo

Usado para assinalar os tecidos correctamente preparados e as técnicas de coloração indicadas. Por cada conjunto de condições de testes, em cada processo de coloração, deve incluir-se um controlo de tecido positivo. Os tecidos com uma coloração positiva fraca são mais indicados do que os têm uma coloração positiva forte para proporcionarem um controlo de qualidade óptimo, bem como para detectar níveis reduzidos de degradação dos reagentes⁴. 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 específica⁵. 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 endógena⁶ (p. ex. no fígado, mama, cérebro ou rim). Para diferenciar entre a actividade das enzimas endógenas ou as ligações não específicas de enzimas e as imunoreactividades específicas, podem colorir-se tecidos adicionais dos doentes exclusivamente com substrato cromogénio ou com Streptavidin-HRP e substrato-cromogénio, respectivamente. Se ocorrer a coloração específica no controlo de tecido negativo, os resultados dos testes feitos com as amostras do doente devem ser considerados inválidos.

Controlo de reagente negativo

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

Tecido do doente

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

Limites

A imunohistoquímica é um processo diagnóstico em múltiplas etapas, que consta de: uma formação especializada na selecção dos reagentes apropriados; selecção, fixação e processamento de tecidos; preparação das lâminas de IHQ; e interpretação dos resultados das colorações. A coloração de tecidos depende do seu manuseamento e processamento antes da sua coloração. A fixação, congelação, descongelação, lavagem, secagem, aquecimento ou corte incorrectos das amostras, ou a sua contaminação com outros tecidos ou fluidos, pode produzir artefactos, retenção de anticorpos, ou resultados falso-negativos. Os resultados inconsistentes podem dever-se a variações nos métodos de fixação e envolvimento, ou a irregularidades inerentes ao tecido⁷. Uma contraacção excessiva ou incompleta pode comprometer a devida interpretação dos resultados. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos que empreguem os devidos controlos, e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto dos antecedentes clínicos do doente e de outros testes de diagnóstico.

Os produtos Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K ou RE7120-K são próprios para ser utilizados em secções envolvidas em parafina com requisitos de fixação específicos. Pode ocorrer uma expressão inesperada de antígeno, especialmente em neoplasmas. A interpretação clínica de qualquer secção de tecido colorido deverá incluir a análise morfológica e a avaliação de controlos apropriados.

Características de desempenho

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

Bibliografia

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Emendas da edição anterior

Não aplicável.

Data de emissão

19 de Fevereiro de 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Produktnr.: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Produktnr.: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Produktnr.: RE7104

Avsedd användning

För in vitro diagnostisk användning.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K och (500 tests) RE7120-K är till för visualiseringen av mus IgG, mus IgM och kanin IgG primära antikroppar. Novocastra™ DAB (250 Slides) Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 är ingående reagens i dessa system som är avsedda för användning i nedan beskrivna procedur. Den kliniska tolkningen av all färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar som använder korrekta kontroller och utvärderas av kvalificerad patolog inom ramen för patientens kliniska anamnes och andra diagnostiska tester.

Metodens princip

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

Tillhandahållna reagens

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

1. Peroxidase Block RE7101. 3-4 % Väteperoxid.
2. Protein Block RE7102. 0,4 % kasein i fosfatbuffrad koksalltösning med stabiliseringsmedel, ytaktivt medel och 0,2 % Bronidox L som konserveringsmedel.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Affinitetsrenad get antimus IgM (5µg/ml), häst antimus IgG (10,5µg/ml) och häst antikanin IgG (10,5µg/mL) i trisbuffrad koksalltösning med proteinstabilisator och 0,35 % ProClin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 till 1,4µg/ml i trisbuffrad koksalltösning med proteinstabilisator och 0,35 % ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74 % w/v 3,3' -diaminobenzidin, i en stabiliseringslösning.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Buffrad lösning innehållandes ≤ 0.1% väteperoxid och konserveringsmedel.
7. Hematoxylin RE7107. < 0.1 % Hematoxylin.

Reagens	Produkt-numme	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25ml	2 x 25 ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25ml	2 x 25 ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25ml	2 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25ml	2 x 25ml	1 x 25ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3ml	1 x 3ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	2 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25ml	2 x 25ml	

Rekonstitution, blandning, spädning, titrering

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

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

Förvaring och stabilitet

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

Preparation av prov

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

Varningar och försiktighetsåtgärder

Materialsäkerhetsdatablad finns att få på begäran eller från www.LeicaBiosystems.com

För professionella användare.

Blanda inte reagens från olika detektionssystem.

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

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

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

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

Procedur

A. Reagens som krävs men inte tillhandahålls

1. Standardlösningar som används inom immunhistokemi.
2. 50mM tris-buffrad koksallösning (TBS) pH7,6.
3. Epitopeätverningslösningar.
4. Enzymätverningslösningar.
5. Antikroppslosning.
6. Primär antikropp.
7. Monteringsmedium.

B. Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

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

C. Metod

Innan metoden tillämpas måste användarna vara utbildade i immunhistokemiska tekniker.

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

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

1. Klipp och montera sektionerna på objektglas beklädda med lämplig vävnadsklister.
2. Avparaffinera sektionerna i xylene eller xylenersättningsmedel.
3. Avhydratisera genom graderad sprit.
4. Tvätta objektglasen under rinnande kranvatten.
5. Utför Epitopeätverning enligt behov (se **Rekommendationer vid användning** för primära antikroppar).
6. Tvätta objektglasen i avjoniserat vatten.
7. Neutralisera endogent peroxidase med Peroxidase Block RE7101 i 5 minuter.
8. Tvätta i TBS i 2 x 5 minuter.
9. Inkubera med Protein Block RE7102 i 5 minuter.
10. Tvätta i TBS i 2 x 5 minuter.
11. Inkubera med optimalt spädd primär antikropp (se **Rekommendationer vid användning** för primär antikropp).
12. Tvätta i TBS i 2 x 5 minuter.
13. Inkubera med Biotinylated Secondary Antibody RE7103 i 30 minuter.
14. Tvätta i TBS i 2 x 5 minuter.
15. Inkubera med Streptavidin-HRP RE7104 i 30 minuter.
16. Tvätta i TBS 2 x 5 minuter och gunga varsamt.
17. Utveckla peroxidaseaktivitet med DAB brukslösning (se **DAB brukslösning**) i 5 minuter.
18. Skölj objektglasen i vatten.
19. Kontrastfärga med Hematoxylin RE7107.
20. Skölj objektglasen i vatten i 5 minuter.
21. Avhydratisera, rensa och montera sektionerna.

DAB brukslösning

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

Kvalitetskontroll

Skilnader i vävnadsbehandling och tekniska metoder i användarens laboratorium kan ge stor variation i resultaten vilket kan göra det nödvändigt att genomföra regelbundna interna kontroller utöver följande metoder. Kontroller bör vara färska obduktions-/biopsi-/kirurgi prover som snarast möjligt formalinfixeras, bearbetas och paraffinbäddas på samma sätt som patientprover.

Positiv vävnadskontroll

Används för att ange korrekt förberedda vävnader och rätt färgningstekniker. En positiv vävnadskontroll bör ingå i varje uppsättning av testförhållanden/primär antikropp vid varje färgningskörning. En vävnad med svag positiv färgning är mer passande för optimal kvalitetskontroll och för att upptäcka låga nivåer av reagensdegradering än en vävnad med stark positiv färgning.⁴ 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 målEpiteoet med den primära antikroppen. För rekommenderad negativ kontrollvävnad se primär antikropp Instruktioner vid användning. Alternativt ger ofta en mängd olika celltyper som finns i de flesta vävnadssnitt negativa kontrollområden men detta bör kontrolleras av användaren. Ospezifisk färgning, om det förekommer, har ofta ett diffust utseende. Sporadisk färgning av bindväv kan också observeras i snitt från överflödigt formalinfixerade vävnader. Använd intakta celler för tolkning av färgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler färgar ofta ospezifiskt.⁵ Falskt positiva resultat kan ses p.g.a. icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erythrocyter), endogent peroxididas (cytokrom C), eller endogent biotin⁶ (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure). För att skilja endogen enzymaktivitet eller ospezifisk oxybindning från specifik immunreaktivitet kan ytterligare patientvävnader färgas exklusivt med respektive substratkromogen eller Streptavidin-HRP, och substrat-kromogen. Om specifik färgning sker i den negativa vävnadskontrollen bör resultat med patientprover anses vara ogiltiga.

Negativ reagenskontroll

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

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 Epiteoet 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-objektglas 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.⁷

Överflödigt eller ofullständig kontrastfärgning kan äventyra korrekt tolkning av resultat.

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

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

Prestanda

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

Bibliografi

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Rättelser av tidigare utgivning

Gäller inte.

Utgivningsdatum

19 februari 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Κωδικός είδους: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Κωδικός είδους: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Κωδικός είδους: RE7104

Χρήση για την οποία προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Τα Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K και (500 tests) RE7120-K προορίζονται για την οπτικοποίηση πρωτοταγών αντισωμάτων IgG ποντικού, IgM ποντικού και IgG κουνελιού. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 είναι συστατικό αντιδραστήρια των συστημάτων αυτών, τα οποία προορίζονται για χρήση στη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν σωστούς μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογοανατόμο.

Αρχή της διαδικασίας

Η πρώτη τεχνική ανοσοπεροξειδάσης αναφέρθηκε από τους Nakane και Pierce.¹ Έκτοτε, έχουν σημειωθεί πολλές εξελίξεις που οδήγησαν στις τεχνικές ανοσοπεροξειδάσης, οι οποίες χρησιμοποιούνται συνήθως σήμερα. Τα συστήματα ανίχνευσης υπεροξειδάσης Novocastra™ βασίζονται στην τεχνική που περιγράφεται από τον Guesdon.² Τα προϊόντα αυτά χρησιμοποιούνται σε μια ανοσοϊστοχημική (IHC) διαδικασία, η οποία επιτρέπει την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός αντιγόνων σε τομές ιστού μονιμοποιημένου με φορμόλη και εγκλεισμένου σε παραφίνη, μέσω διαδοχικών βημάτων με παρεμβλλόμενα βήματα πλύσης. Εάν απαιτείται από το πρωτοταγές αντίσωμα, οι τομές υποβάλλονται σε ανάκτηση επιπότου πριν από τη χρώση. Η δραστηκότητα της ενδογενούς υπεροξειδάσης εξουδετερώνεται με χρήση του Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Αυτό ακολουθείται από την εφαρμογή του Novocastra™ Protein Block RE7102 για τη μείωση της μη ειδικής δέσμευσης των πρωτοταγών και δευτεροταγών αντισωμάτων. Η τομή ακολούθως επωάζεται με ένα βέλτιστα αραιωμένο πρωτοταγές αντίσωμα. Το Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 ένα σκεύασμα δευτεροταγούς αντισώματος συζευγμένο με βιοτίνη που αναγνωρίζει ανοσοσφαιρίνες ποντικού και κουνελιού, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση τυχόν δεσμευμένου σε ιστό πρωτοταγούς αντισώματος. Κατόπιν εφαρμόζεται το Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, ένα συζυγές στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης και δεσμεύεται στη βιοτίνη που υπάρχει στο δευτεροταγές αντίσωμα. Οι τομές επωάζονται περαιτέρω με το υπόστρωμα/χρωμογόνο, 3,3'-διαμινοβενζιδίνη (DAB), που παρασκευάζεται από το Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 και το Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106, όπως περιγράφεται παρακάτω. Η αντίδραση με την υπεροξειδάση παράγει ένα ορατό καστανό ίζημα στη θέση του αντιγόνου. Οι τομές αντιχρωματίζονται με Novocastra™ Hematoxylin RE7107 και καλύπτονται με καλυπτρίδα. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με χρήση μικροσκοπίου φωτός και βοηθούν στη διαφορική διάγνωση παθολογιολογικών εξεργασιών, οι οποίες ενδέχεται ή όχι να σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

Παρεχόμενα αντιδραστήρια

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

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

Αντιδραστήριο	Κωδικός είδους	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml	1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	1 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml	

Ανασύσταση, ανάμειξη, αραίωση, τιτλοδότηση

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

Φύλαξη και σταθερότητα

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

Παρασκευή δείγματος

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

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού διατίθεται κατόπιν αιτήματος ή από τη διεύθυνση www.LeicaBiosystems.com

Για επαγγελματίες χρήστες.

Μην αναμειγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικά συστήματα ανίχνευσης.

Τα δείγματα, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, καθώς και όλα τα υλικά που εκτίθενται σε αυτά, πρέπει να υποβάλλονται σε χειρισμό ως δυνητικά μεταδόσης λοιμωξης και να απορρίπτονται με κατάλληλες προφυλάξεις.³

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 επώασης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται ενδέχεται να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τυχόν τέτοια μεταβολή πρέπει να επικυρώνεται από το χρήστη.

Διαδικασία

A. Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

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

B. Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

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

Γ. Μεθοδολογία

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

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

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

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

Διάλυμα εργασίας DAB

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

Ποιοτικός έλεγχος

Τυχόν διαφορές στην επεξεργασία των ιστών και τις τεχνικές διαδικασίες στο εργαστήριο του χρήστη ενδέχεται να προκαλέσουν σημαντική μεταβλητότητα στα αποτελέσματα, καθιστώντας αναγκαία την τακτική εκτέλεση εσωτερικών ελέγχων επιπλέον των ακόλουθων διαδικασιών. Οι μάρτυρες θα πρέπει να είναι φρέσκα δείγματα νεκροψίας/βιοψίας/χειρουργικά δείγματα, τα οποία είναι μονιμοποιημένα με φορμολίνη, επεξεργασμένα και εγκλεισμένα σε κηρό παραφίνη, το συντομότερο δυνατό με τον ίδιο τρόπο με το(α) δείγμα(τα) του ασθενούς.

Θετικός μάρτυρας ιστού

Χρησιμοποιείται για να υποδεικνύει σωστά παρασκευασμένους ιστούς και σωστές τεχνικές χρώσης. Θα πρέπει να περιλαμβάνεται ένας θετικός μάρτυρας ιστού για κάθε σύνολο συνθηκών εξέτασης/πρωτοταγούς αντισώματος σε κάθε εκτέλεση χρώσης. Ένας ιστός με ασθενή θετική χρώση είναι πιο κατάλληλος από έναν ιστό με ισχυρή θετική χρώση για βέλτιστο ποιοτικό έλεγχο και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόμησης των αντιδραστηρίων.⁴ Για τον συνιστώμενο ιστό θετικού μάρτυρα, δείτε τις οδηγίες χρήσης του πρωτοταγούς αντισώματος. Εάν ο θετικός μάρτυρας ιστού δεν παρουσιάζει θετική χρώση, τα αποτελέσματα με τα δείγματα της εξέτασης θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Αρνητικός μάρτυρας ιστού

Θα πρέπει να εξετάζεται μετά τον θετικό μάρτυρα ιστού για την επαλήθευση της ειδικότητας της επισήμανσης του αντιγόνου-στόχου από το πρωτοταγές αντίσωμα. Για το συνιστώμενο ιστό αρνητικού μάρτυρα, δείτε τις οδηγίες χρήσης του πρωτοταγούς αντισώματος. Εναλλακτικά, η ποικιλία διαφόρων κυτταρικών τύπων που υπάρχουν στις περισσότερες τομές ιστών παρέχει συχνά θέσεις αρνητικού μάρτυρα, αλλά αυτό πρέπει να επαληθεύεται από το χρήστη. Μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, έχει συνήθως διάχυτη εμφάνιση. Ενδέχεται επίσης να παρατηρηθεί σποραδική χρώση του συνδεδεμένου ιστού σε τομές από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με υπερβολική ποσότητα φορμολίνης. Χρησιμοποιείτε άθικτα κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης. Νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα παρουσιάζουν συχνά μη ειδική χρώση.⁵ 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 ψευδοϊπεροξειδάση (ερυθροκυτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη⁶ (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 ή στρεπταβιδίνη-HRP και υπόστρωμα-χρωμογόνο, αντίστοιχα. Εάν παρουσιαστεί ειδική χρώση στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενούς θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Αρνητικός μάρτυρας 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, πλύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να παράγει μορφώματα, παγίδευση αντισώματος ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τυχόν ασυνεπή αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται σε παραλλαγές των μεθόδων μονιμοποίησης και εγκλεισμού ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.⁷ Τυχόν υπερβολική ή ατελής αντιχρώση ενδέχεται να διακυβευτεί τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν συνιστώμενες μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογοανατόμο.

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

Χαρακτηριστικά απόδοσης

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

Βιβλιογραφία

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

Ημερομηνία έκδοσης

19 Φεβρουαρίου 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Produkt nr.: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Produkt nr.: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Produkt nr.: RE7104

Tilsigtet anvendelse

Til in vitro diagnostisk anvendelse.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K og (500 tests) RE7120-K er beregnet til visualisering af primære muse-IgG-, muse-IgM- og kanin-IgG-antistoffer. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 er reagenskomponenter i disse systemer, som er beregnet til anvendelse i proceduren beskrevet nedenfor. Klinisk fortolkning af farvning eller mangel derpå skal suppleres med morfologiske undersøgelser under anvendelse af passende kontroller og bør evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests af en kvalificeret patolog.

Procedureprincip

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

Leverede reagenser

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

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

Reagens	Produkt nr.:	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104.
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml	1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 ml	2 x 30 ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml	

Rekonstituering, blanding, fortynding, titrering

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

Opbevaring og holdbarhed

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

Prøveklargøring

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

Advarsler og forholdsregler

Et datablad for materialesikkerhed kan fås efter anmodning eller er tilgængeligt på www.LeicaBiosystems.com

Må kun anvendes af uddannet fagpersonale.

Bland ikke reagenser fra forskellige detektionssystemer sammen.

Prøver skal før og efter fiksering, lige som alle materialer eksponeret mod prøverne, håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler³.

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

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

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

Procedure

A. Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

1. Standardopløsningsmidler anvendt i immunhistokemi.
2. 50 mM trisbufferjusteret saltvandsopløsning (TBS) pH 7,6.
3. Epitopegenfindingsopløsning(er).
4. Enzymgenfindingsopløsning(er).
5. Antistofdiluent.
6. Primært antistof.
7. Monteringsmedium.

B. Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

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

C. Metodologi

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

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

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

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

DAB brugsopløsning

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

Kvalitetskontrol

Forskelle i behandlingen af væv og forskelle i tekniske procedurer i brugerens laboratorium kan frembringe betydeligt varierende resultater og nødvendiggøre regelmæssig udførelse af kontroller på stedet ud over nedenstående procedurer. Kontrollerne skal være riske 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 farvnings teknikker. 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 reagensnedbrydning⁴. 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 målEpiteoet specifikt. Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede negative kontrolvæv. Alternativt frembyder de mange forskellige celletyper, der er til stede i de fleste vævssnit, ofte negative kontrolsteder, men dette skal verificeres af brugeren. Uspecifik farvning har, hvis til stede, ofte et diffus udseende. Sporadisk farvning af bindevæv kan ligeledes observeres i vævssnit af væv, der er fikseret for kraftigt i formalin. Anvend intakte celler til fortolkning af farvningsresultaterne. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte mere uspecifikt.⁵ 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 biotin⁶ (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre). For at differentiere mellem endogen enzymaktivitet eller uspecifik enzymbinding og specifik immunreaktivitet kan yderligere patientvæv eventuelt farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen eller Streptavidin-HRP og substratkromogen. Hvis der optræder specifik farvning i den negative vævskontrol, skal resultaterne af patientprøverne kasseres.

Negativ reagenskontrol

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

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 Epiteoet ikke blev påvist. Ikke at Epiteoet 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.⁷ For kraftig eller ukomplet kontrastfarvning kan gøre korrekt fortolkning af resultaterne vanskelig. Klinisk fortolkning af farvning eller mangel derpå skal suppleres med morfologiske undersøgelser under anvendelse af passende kontroller og bør evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests af en kvalificeret patolog. Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K or RE7120-K er beregnet til anvendelse på paraffinindstøbte vævssnit med specifikke krav til fiksering. Der kan forekomme uventet Epiteoekspression, navnlig i neoplasmer. Den kliniske fortolkning af alle farvede vævssnit skal indbefatte morfologisk analyse og evaluering af passende kontroller.

Ydeevne

Ydeevnen af Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 er blevet kontrolleret ved anvendelse af en række primære Novocastra™ muse-IgG-, muse-IgM- og kanin-IgG-antistoffer. Produkterne er stabile til udløbsdatoen trykt på produkternes etiketter.

Bibliografi

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Rettelser til tidligere udgave

Ingen rettelser.

Udgivelsesdato

19 februar 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Productnr.: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Productnr.: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Productnr.: RE7104

Beoogd gebruik

Voor diagnostisch gebruik *in-vitro*.

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

Principe van de procedure

De eerste immunoperoxidasetechniek is beschreven door Nakane en Pierce¹. De daarop volgende ontwikkelingen hebben geleid tot de nu gebruikelijke immunoperoxidasetechnieken. De Novocastra™ Peroxidase Detection Systems zijn gebaseerd op de door Guesdon beschreven techniek². Deze producten wordt gebruikt in een immunohistochemische (IHC) procedure waarbij met een lichtmicroscop een kwalitatieve identificatie kan worden uitgevoerd van Epitopeen in coupes van in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel, via opeenvolgende behandelingen met tussendoor spoelen. Als dit vanwege het primaire antilichaam nodig is wordt er vóór de kleuring met de coupes een epitooptretnival uitgevoerd. Endogene peroxidaseactiviteit wordt geneutraliseerd met Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Vervolgens wordt Novocastra™ Protein Block RE7102 opgebracht waarmee de niet-specifieke binding van primaire en secundaire antilichamen wordt verminderd. Vervolgens wordt de coupe geïncubeerd met optimaal verdund primair antilichaam. Voor het detecteren van eventueel weefselgebonden primair antilichaam wordt Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 gebruikt; dit is een biotinegeconjugeerd secundair antilichaammedium dat immunoglobulinen van muis en konijn herkent. Vervolgens wordt Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 aangebracht; dit is een streptavidineperoxidaseconjugaat dat bindt aan het op het secundaire antilichaam aanwezige biotine. Daarna worden de coupes geïncubeerd met substraat/chromogeen, 3,3' - diaminobenzidine (DAB), bereid van Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 en Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106, zoals hieronder beschreven. Door de reactie met peroxidase wordt op de antigeenplaats een zichtbaar bruin precipitaat gevormd. De coupes worden tegengekleurd met Novocastra™ Hematoxylin RE7107 en afgedekt. De resultaten worden geïnterpreteerd met een lichtmicroscop en ondersteunen de differentiële diagnose van pathofysiologische processen die al dan niet verband houden met een bepaald antigeen.

Geleverde reagentia

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

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

Reagens	Productnummer	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml	1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 ml	2 x 30 ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml	

Reconstitutie, mengen, verdunnen, titreren

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

Specimenbereiding

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

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Op verzoek is een veiligheidsinformatieblad leverbaar dat ook kan worden gedownload van www.LeicaBiosystems.com Beroepsmatig gebruik.

Meng geen reagentia van verschillende detectiesystemen.

Voor en na fixatie moeten specimens en alle eraan blootgestelde materialen worden behandeld alsof ze infectieus zijn; daarom moeten ze ook met de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd³. Pipetteer reagentia nooit met de mond en zorg dat de huid en slijmvliezen niet met reagentia en specimens in aanraking komen. Spoel overvloedig met water als er contact is geweest met reagentia of specimens. Werk volgens de plaatselijke of landelijke voorschriften voor het afvoeren van mogelijk giftige stoffen. Beperk de microbiële verontreiniging van reagentia tot een minimum zodat niet-specifieke kleuring wordt voorkomen. Het afwijken van de aangegeven incubatietijden of -temperaturen kan leiden tot foutieve resultaten. Eventuele wijzigingen moeten door de gebruiker worden gevalideerd.

Procedure

A. Benodigde maar niet geleverde reagentia

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

B. Benodigde maar niet geleverde apparatuur

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

C. Methodologie

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

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

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

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

DAB Working Solution

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

Kwaliteitscontrole

Door verschillen in het bewerken van weefsel en technische procedures in het laboratorium van de gebruiker kunnen de resultaten sterk verschillen; daarom is het noodzakelijk om, naast de volgende procedures, regelmatig intern controles uit te voeren. Controles moeten bestaan uit verse 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 kleuring⁴. Zie voor aanbevolen positief controleweefsel de Gebruiksaanwijzing voor primair antilichaam. Als het positieve controleweefsel geen positieve kleuring vertoont moeten de resultaten van de testspecimens als ongelidig beschouwd worden.

Negatief controleweefsel

Dit moet na het positieve controleweefsel worden onderzocht zodat de specificiteit van de labeling van het targetantigeen door het primaire antilichaam kan worden geverifieerd. Zie voor aanbevolen negatief controleweefsel de Gebruiksaanwijzing voor primair antilichaam. Door de variëteit van verschillende celtypes in de meeste weefselcoupes komen er vaak negatieve controleplaatsen voor; dit moet door de gebruiker worden geverifieerd. Eventuele niet-specifieke kleuring ziet er vaak diffuus uit. Ook in weefselcoupes die zeer sterk in formaline gefixeerd zijn kan sporadisch kleuring van bindweefsel worden waargenomen. Gebruik intacte cellen voor de interpretatie van de kleuringresultaten. Necrotische of gedegenereerde cellen kleuren vaak niet-specifiek⁵. Niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten kan leiden tot vals-positieve resultaten. Zulke resultaten kunnen ook worden veroorzaakt door endogene enzymen zoals pseudoperoxidase (erythrocyten), endogeen peroxidase (cytochroom C) of endogeen biotine⁶ (bv. lever, borst, hersenen, nier). Om te kunnen differentiëren tussen enerzijds endogene enzymactiviteit of niet-specifieke binding van enzymen en anderzijds specifieke immunoreactiviteit kan extra patiëntweefsel worden gekleurd met respectievelijk uitsluitend substraatchromogeen of Streptavidin-HRP, en substraatchromogeen. Als bij het negatieve controleweefsel specifieke kleuring optreedt moeten de resultaten van de patiëntspecimens als ongelidig worden beschouwd.

Negatief controleereagens

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

Patiëntweefsel

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

Beperkingen

Immunohistochemie is een diagnostisch proces van meerdere stappen; hiervoor is een gespecialiseerde opleiding vereist in het kiezen van de juiste reagentia; de keuze, fixatie en bewerking van weefsel; de voorbehandeling van IHC-glaasjes en de interpretatie van de kleuringresultaten. De kleuring van het weefsel is afhankelijk van de manier waarop het weefsel vóór de kleuring is behandeld en bewerkt. Het onjuist fixeren, invriezen, ontdooien, spoelen, drogen, verwarmen, snijden en besmetting met andere weefsels of vloeistoffen kan leiden tot artefacten, antilichaam-trapping of vals-negatieve resultaten. Inconsistente resultaten zijn mogelijk te wijten aan variaties in de methodes van fixeren en inbedden of aan weefseleigen afwijkingen⁷. Een te sterke of onvolledige tegenkleuring kan de juiste interpretatie van de resultaten in gevaar brengen. De klinische interpretatie van elke kleuring of het ontbreken ervan moet worden aangevuld door morfologische onderzoeken met correcte controles en moet binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests worden geëvalueerd door een deskundig patholoog. Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K of RE7120-K zijn bedoeld voor gebruik op in paraffine ingebedde coupes die een specifieke fixatie vereisen. Er kan onverwachte antigeenexpressie optreden, met name bij neoplasmata. Tot het totaal van de klinische interpretatie van elke gekleurde weefselcoupe behoort ook de morfologische analyse en evaluatie van de overeenkomstige controles.

Eigenschappen

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

Literatuurlijst

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Wijzigingen ten opzichte van de voorgaande uitgave

Niet van toepassing.

Datum van uitgave

19 februari 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Produktnr.: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Produktnr.: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Produktnr.: RE7104

Tiltenkt bruk

Til in vitro-diagnostisk bruk.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K og (500 tests) RE7120-K er til visualisering av primære antistoffer for mus-IgG, mus-IgM og kanin-IgG. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 er en komponentreagen for disse systemene som er beregnet til bruk i prosedyren som beskrives nedenfor. 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 kliniske historie og andre diagnostiske tester.

Prinsipp for prosedyren

Den første immunperoksidaseteknikken ble rapportert av Nakane og Pierce,¹ og siden denne gangen har det vært mange utviklinger som har ført til de immunperoksidaseteknikkene som er vanlige i bruk i dag. Novocastra™ Peroxidase Detection Systems er basert på teknikken som beskrives av Guesdon.² Disse produktene brukes i en immunhistokjemisk (IHC) prosedyre, som gjør det mulig med kvalitativ identifisering med lysmikroskopi av epitoper i snitt av formalinfiksert, parafininnstøpt vev, via sekvensielle trinn med mellomliggende vasketrinn.

Hvis det kreves av det primære antistoffet, utsettes snittene for epitop-demaskering før farging. Endogen peroksidaseaktivitet nøytraliseres ved bruk av Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Dette følges av påføring av Novocastra™ Protein Block RE7102 for å redusere ikke-spesifikk binding av primære og sekundære antistoffer. Dette snittet inkuberes deretter med optimalt fortynt primært antistoff. Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103, en biotinkonjugert sekundært antistoff-formel som gjenkjenner immunoglobuliner fra mus og kanin, brukes for å påvise vevbundet primært antistoff. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, et streptavidinperoksidasekonjugat, påføres deretter og bindes til biotin som finnes på det sekundære antistoffet. Snittene inkuberes videre med substrate/kromogenet, 3,3'-diaminobenzidin (DAB), klargjort fra Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 og Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106 som beskrevet nedenfor. Reaksjon katalysert av peroksidase produserer et synlig brunt presipitat ved epitopstedet. Snitt kontrastfarges med Novocastra™ Hematoxylin RE7107 og påføres dekkglass. Resultatene tolkes ved hjelp av lysmikroskop og bidrar til differensialdiagnosen for patofysiologiske prosesser, som kan være tilknyttet et spesielt epitop eller ikke.

Medfølgende reagenser

Detaljer for reagensene fra følgende liste som medfølger i hvert produkt, er gitt i tabellen nedenfor.

1. Peroxidase Block RE7101. 3–4 % hydrogenperoksid.
2. Protein Block RE7102. 0,4 % kasein i fosfatbufret saltvann, med stabilisatorer, overflateaktivt stoff og 0,2 % Bronidox L som et konserveringsmiddel.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Affinitetsrenset anti-mus-IgM (5 µg/ml) fra geit, anti-mus-IgG (10,5 µg/ml) fra hest og anti-kanin-IgG (10,5 µg/ml) fra hest i tris-bufret saltvann med proteinstabilisator og 0,35 % ProCin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 til 1,4 µg/ml i tris-bufret saltvann med proteinstabilisator og 0,35 % ProCin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74 % w/v 3,3'-diaminobenzidin, i en stabilisatorløsning.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Bufret løsning som inneholder ≤ 0,1 % hydrogenperoksid og konserveringsmiddel.
7. Hematoxylin RE7107 < 0,1 % hematoksylin.

Reagens	Produkt Antall	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25ml	2 x 25ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25ml	2 x 25ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25ml	2 x 25ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25ml	2 x 25ml	1 x 25ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3ml	1 x 3ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	2 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25ml	2 x 25ml	

Rekonstitusjon, blanding, fortynning, titrering

Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103, Streptavidin-HRP RE7104 og Hematoxylin RE7107-løsninger er forhåndsfortynnet. Det anbefales ikke noen rekonstitusjon, blanding, fortynning eller titrering av disse reagensene. Ytterligere fortynning kan forårsake tap av epitopfarging. Brukeren må validere enhver slik endring.

DAB Chromogen RE7105 krever fortynning 1:20 i DAB Substrate Buffer RE7106 før bruk. Ytterligere fortynning kan forårsake tap av epitopfarging. Brukeren må validere enhver slik endring.

Oppbevaring og stabilitet

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

Prøveklargjøring

Anbefalt fiksativ er 10 % nøytralt bufret formalin for parafininnstøpte vevsnett.

Advarsler og forholdsregler

Materialsikkerhetsdatablad er tilgjengelig på forespørsel eller tilgjengelig fra www.LeicaBiosystems.com

For helsepersonell.

Ikke bland reagenser fra ulike deteksjonssystemer.

Prøver, før og etter fiksering, samt alle materialer som kommer i kontakt med dem, skal behandles som om de kan overføre infeksjon og må bortskaffes med egnede forholdsregler.³

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, skyll med rikelige mengder vann.

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

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

Prosedyre

A. Nødvendige reagenser som ikke følger med

1. Standard løsemidler som brukes innen immunhistokjemi.
2. 50 mM tris-bufret saltvann (TBS) pH 7,6.
3. Epitop-demaskeringsløsning(er).
4. Enzym-demaskeringsløsning(er).
5. Antistofffortynner.
6. Primært antistoff.
7. Monteringsmedium.

B. Nødvendig utstyr som ikke følger med

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

C. Metode

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

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

Med mindre annet er angitt, utføres alle trinn ved romtemperatur (25 °C).

1. Kutt og monter snitt på objektglass belagt med et egnet vevlim.
2. Deparaffiner snitt i xylen eller xylen substitutter.
3. Rehydrer gjennom graderte alkoholer.
4. Vask objektglassene i rennende vann fra springen.
5. Utfør epitop-demaskering etter behov (se Anbefalinger for bruk for primært antistoff).
6. Vask objektglassene i deionisert vann.
7. Nøytraliser endogen peroksidase ved bruk av Peroxidase Block RE7101 i 5 minutter.
8. Vask i TBS i 2 x 5 minutter.
9. Inkuber med Protein Block RE7102 i 5 minutter.
10. Vask i TBS i 2 x 5 minutter.
11. Inkuber med optimalt fortynnet primært antistoff (se **Anbefalinger for bruk** for primært antistoff).
12. Vask i TBS i 2 x 5 minutter.
13. Inkuber med Biotinylated Secondary Antibody RE7103 i 30 minutter.
14. Vask i TBS i 2 x 5 minutter.
15. Inkuber med Streptavidin-HRP RE7104 i 30 minutter.
16. Vask i TBS i 2 x 5 minutter med forsiktig vugging.
17. Utvikle peroksidaseaktivitet med DAB-virkeløsning (se **DAB-virkeløsning**) i 5 minutter.
18. Skyll objektglassene i vann.
19. Utfør kontrastfarging med Hematoxylin RE7107.
20. Skyll objektglassene i vann i 5 minutter.
21. Dehydrer, klarer og monter snitt.

DAB-virkeløsning

Tilsett 50 µl med DAB Chromogen RE7105 i 1 ml DAB Substrate Buffer RE7106. Brukes innen seks timer etter tillaging.

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. Kontrollene skal være ferske prøver fra obduksjon/ biopsi/kirurgi som er formalinfiksert, behandlet og parafinvoxsinnstøpt så snart som mulig på samme måte som pasientprøven(e).

Positiv vevkontroll

Brukes for å indikere riktig klargjorte vev og riktige fargingsteknikker. En positiv vevkontroll skal inkluderes for hvert sett av testbetingelser / primært antistoff i hver fargekjøring. Vev med svakt positiv farging er mer egnet til optimal kvalitetskontroll og til deteksjon av en eventuell mindre degradering av reagensene enn vev med sterk positiv farging.⁴ For anbefalt positivt kontrollvev, se bruksanvisningen for primært antistoff. Hvis den positive vevkontrollen ikke gir positiv farging, skal resultater med testprøvene betraktes som ugyldige.

Negativ vevkontroll

Skal undersøkes etter den positive vevkontrollen for å verifisere spesifisiteten i merkingen av målepitopet med det primære antistoffet. For anbefalt negativt kontrollvev, se bruksanvisningen for primært antistoff. Alternativt gir variasjonen av forskjellige cellyper som kan finnes i de fleste vevsnitt ofte rom for negativ kontroll, men dette må verifiseres av brukeren. Ikke-spesifikk farging, hvis dette forekommer, har vanligvis et diffust utseende. Sporadisk farging av bindevev vil også kunne observeres i vevsnitt som er fiksert i for mye formalin. Bruk intakte celler til tolkning av fargingsresultater. Nekrotiske eller degenererte celler gir ofte ikke-spesifikk farging.⁵ 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 biotin6 (f.eks. lever, bryst, hjerte, nyre). For å differensiere endogen enzymaktivitet eller ikke-spesifikk binding av enzymer fra spesifikk immunreaktivitet kan ekstra pasientvev farges eksklusivt med henholdsvis substratkromogen eller Streptavidin-HRP og substratkromogen. Hvis det forekommer spesifikk farging i de negative vevkontrollene, skal resultater med pasientprøvene betraktes som ugyldige.

Negativ reagenskontroll

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

Pasientvev

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

Begrensninger

Immunhistokjemi er en flertrinns diagnostisk prosess som innebærer spesialisert opplæring i valg av passende reagenser, valg av vev, fiksering og prosessering, klargjøring av IHC-objektglasset og tolkning av fargeresultatene.

Vevfargingen er avhengig av håndteringen og behandlingen av vevet før det farges. Uriktig fiksering, dyppfrysing, opptining, vasking, tørking, oppvarming, snitting eller kontaminering med annet vev eller væsker kan frembringe artefakter, farging av antistoff eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpingsmetoder eller uregelmessigheter i vevet.⁷ Overdreven eller ufullstendig kontrastfarging kan hindre riktig tolkning av resultater.

All klinisk tolking av farging eller fraværende farging skal komplementeres av morfologiske undersøkelser ved bruk av egnede kontroller og skal evalueres i lys av pasientens sykehistorie og andre diagnostiske tester utført av en kvalifisert patolog.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K eller RE7120-K er til bruk på parafininnstøpte snitt med spesifikke fikseringskrav. Det kan forekomme uventet epitoputtrykk, spesielt i neoplasmer. Den kliniske tolkningen av ethvert farget vevsnitt må inkludere morfologisk analyse og evaluering av egnede kontroller.

Karakteristikker for yteeve

Ytelsen til Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) / (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, og Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 har blitt validert ved bruk av en rekke Novocastra™ primære antistoffer for mus-IgG, mus-IgM og kanin-IgG.

Disse produktene er stabile inntil utløpsdatoen(e) som er trykket på produktets etikett.

Bibliografi

8. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14 :929-931.
9. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1979; 27:1131.
10. 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.
11. 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.
12. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
13. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
14. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Endringer på tidligere utgave

Tiltenkt bruk, Medfølgende reagenser, Rekonstitusjon, blanding, fortykning, titrering, Karakteristikker for yteevne.

Utstedelsesdato

19 februar 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Ürün No: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Ürün No: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Ürün No: RE7104

Kullanım Amacı

In vitro diagnostik kullanım içindir.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K ve (500 tests) RE7120-K fare IgG, fare IgM ve tavşan IgG primer antikorlarının görüntülenmesi içindir. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 bu sistemlerin aşağıda tanımlanan işlemde kullanılması amaçlanmış bileşen reaktiflerdir. Herhangi bir boyanmanın veya yokluğunun klinik yorumlaması hastanın klinik öyküsü ve diğer diagnostik testler bağlamında vasıflı bir patoloji uzmanı tarafından değerlendirilmeli ve uygun kontroller kullanılarak morfolojik çalışmalarla desteklenmelidir.

İşlemin Prensiibi

İlk immünoperoksidaz tekniği Nakane ve Pierce tarafından bildirilmiştir ve sonrasında günümüzde sıklıkla kullanılan immünoperoksidaz tekniklerine yol açan birçok gelişme olmuştur. Novocastra™ Peroxidase Detection Systems Guesdon tarafından tanımlanan tekniği temel alır. Bu ürünler arada yıkama adımlarıyla sıralı adımlar yoluyla formalin fiksasyonlu parafine gömülü doku kesitlerinde Epitoplarn ışık mikroskopisi yoluyla kalitatif olarak tanımlanmasını mümkün kılan bir immünohistokimyasal (IHK) işlemde kullanılır.

Primer antikor gerektiriyorsa kesitler boyanma öncesinde Epitop geri alınmasına tabi bırakılır. Endojen peroksidaz aktivitesi Novocastra™ Peroxidase Block RE7101 kullanılarak nötralize edilir. Bunun sonrasında primer ve sekonder antikorların nonspesifik bağlanmasını azaltmak üzere Novocastra™ Protein Block RE7102 uygulaması yapılır. Kesit daha sonra optimum seyreltilmiş primer antikorla inkübe edilir. Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 fare ve tavşan immünglobulinlerini taşıyan biyotin konjuge bir sekonder antikor formülasyonudur ve herhangi bir dokuya bağlı primer antikorı saptamak için kullanılır. Sonra Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 adlı streptavidin-peroksidaz konjugatı uygulanır ve sekonder antikorla bulunan biyotine bağlanır. Kesitler aşağıda tanımlandığı şekilde Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106 ve Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 ten hazırlanan substrat/kromojen 3,3' - diaminobenzidin (DAB) ile daha fazla inkübasyona tabi tutulur. Peroksidazın katalize ettiği reaksiyon Epitop bölgesinde görünür bir kahverengi presipitat oluşturur. Kesitlerde Novocastra™ Hematoxylin RE7107 ile karşı boyama yapıp üzerine lamel örtülür. Sonuçlar bir ışık mikroskobu kullanılarak yorumlanır ve belirli bir Epitop ile ilişkili olabilecek veya olmayabilecek patofizyolojik süreçlerin ayrıncı tanısına yardımcı olur.

Sağlanan Reaktifler

Aşağıdaki listede her ürnle sağlanan reaktiflerin ayrıntıları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

1. Peroxidase Block RE7101. %3-4 Hidrojen peroksit.
2. Protein Block RE7102. Fosfat tamponlu salinde %0,4 kazein, stabilizörler, sürfaktan ve koruyucu olarak %0,2 Bronidox L ile.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Afinite saflaştırılmış keçi anti-fare IgM (5 µg/ml), at anti-fare IgG (10,5 µg/ml) ve at anti tavşan IgG (10,5 µg/ml) protein stabilizörü ve %0,35 ProClin™ 950 ile Tris tamponlu salinde.
4. Streptavidin-HRP RE7104. Protein stabilizörü ve %0,35 ProClin™ 950 ile tris tamponlu salinde 1 - 1,4 µg/ml.
5. DAB Chromogen RE7105. Stabilizör solüsyonda %1,74 a/h 3,3' diaminobenzidin.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. ≤ %0,1 hidrojen peroksit ve koruyucu madde içeren tamponlanmış solüsyon.
7. Hematoxylin RE7107 < %0,1 hematoksilen.

Reaktif	Ürün Numarası	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25ml	2 x 25ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25ml	2 x 25ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25ml	2 x 25ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25ml	2 x 25ml	1 x 25ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3ml	1 x 3ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	2 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25ml	2 x 25ml	

Sulandırma, Karıştırma, Seyreltme, Titrasyon

Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103, Streptavidin-HRP RE7104 ve Hematoxylin RE7107 solüsyonları önceden seyreltilmiştir. Bu reaktifler için sulandırma, karıştırma, seyreltme veya titrasyon önerilmez. Daha fazla seyreltme Epitop boyanması kaybına yol açabilir. Bu tür herhangi bir değişiklik kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

DAB Chromogen RE7105, kullanmadan önce DAB Substrate Buffer RE7106 içinde 1/20 oranında seyreltme gerektirir. Daha fazla seyreltme Epitop boyanması kaybına yol açabilir. Bu tür herhangi bir değişiklik kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Saklama ve Stabilité

2–8 °C'de saklayın. Dondurmayın. Kullanımdan sonra hemen 2–8 °C'ye tekrar koyun. Ürün etiketinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın. Yukarıda belirtilenler dışında saklama koşulları kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Ürünün stabilite eksikliğini belirtecek belirgin bir bulgu yoktur ve bu nedenle hasta örnekleriyle aynı zamanda pozitif ve negatif kontroller çalışmalıdır.

Numune Hazırlama

Parafine gömülü doku kesitleri için önerilen fiksatif %10 nötr tamponlanmış formalindir.

Uyarılar ve Önlemler

A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from www.LeicaBiosystems.com

Profesyonel kullanıcılar içindir.

Farklı saptama sistemlerinden reaktifleri karıştırmayın.

Fiksasyon öncesinde ve sonrasında numuneler ve bunlara maruz kalmış tüm materyallere enfeksiyon bulaştırılabilir gibi davranılması ve uygun önlemlerle atılmaları gerekir.

Reaktifleri asla ağızınızla pipetlemeyin ve cilt ve müköz membranların reaktifler veya numunelere temas etmesinden kaçının. Reaktifler veya numuneler hassas bölgelere temas ederse bol miktarda suyla yıkayın.

Herhangi bir toksik olabilecek bileşenin atılması açısından yerel, bölgesel veya ulusal düzenlemelere başvurun.

Reaktiflerin mikrobiyel kontaminasyonunu minimuma indirin yoksa nonspesifik boyanmada bir artış olabilir. Belirtilenler dışında inkübasyon süreleri veya sıcaklıklar hatalı sonuçlara yol açabilir. Bu tür herhangi bir değişiklik kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

İşlem

A. Gereken ama sağlanmayan reaktifler

1. İmmünohistokimya kullanılan standart çözücüler.
2. 50 mM tris tamponlu salin (TBS) pH 7,6.
3. Epitop geri alma solüsyonu/solüsyonları.
4. Enzim geri alma solüsyonu/solüsyonları.
5. Antikor seyreltici.
6. Primer antikor.
7. Kapama solüsyonu.

B. Gereken ama sağlanmayan ekipman

1. Primer antikor için önerildiyse Epitop geri alma için gerekli ekipman.
2. Genel immünohistokimya laboratuvar ekipmanı.

C. Metodoloji

Bu metodolojiye başlamadan önce kullanıcılar immünohistokimya teknikleri konusunda eğitilmiş olmalıdır.

Primer antikor, seyreltilmiş hali ve saptama sistemi kombinasyonu kullanıcı tarafından bir dizi bilinen pozitif ve negatif kontrole doğrulanmalıdır.

Aksi belirtilmedikçe tüm adımlar oda sıcaklığında (25 °C) yapılır.

1. Kesitleri kesin ve uygun doku yapışkanıyla kaplı lamlara monte edin.
2. Kesitleri ksilen veya ksilen yerini alan maddelerde deparafinize edin.
3. Dereceli alkol solüsyonları içinde rehidrate edin.
4. Lamları akan musluk suyunda yıkayın.
5. Gerektiği şekilde Epitop geri almayı gerçekleştirin (bakınız primer antikor için **Kullanım Önerileri**).
6. Lamları deiyonize suda yıkayın.
7. Endojen peroksidazı 5 dakika boyunca Peroxidase Block RE7101 kullanarak nötralize edin.
8. TBS'de 2 x 5 dakika yıkayın.
9. 5 dakika boyunca Protein Block RE7102 ile inkübe edin.
10. TBS'de 2 x 5 dakika yıkayın.
11. Optimum şekilde seyreltilmiş primer antikor ile inkübe edin (bakınız primer antikor için **Kullanım Önerileri**).
12. TBS'de 2 x 5 dakika yıkayın.
13. 30 dakika boyunca Biotinylated Secondary Antibody RE7103 ile inkübe edin.
14. TBS'de 2 x 5 dakika yıkayın.

15. 30 dakika boyunca Streptavidin-HRP RE7104 ile inkübe edin.
16. TBS içinde hafif sallamayla 2 x 5 dakika yıkayın.
17. DAB çalışma solüsyonuyla (bakınız **DAB Çalışma Solüsyonu**) 5 dakika boyunca peroksidaz aktivitesini görünür hale getirin.
18. Lamları suda durulayın.
19. Hematoxylin RE7107 ile karşı boyama yapın.
20. Lamları 5 dakika suda durulayın.
21. Kesitleri dehidrate edin, saydamlaştırın ve monte edin.

DAB Çalışma Solüsyonu

1 ml DAB Substrate Buffer RE7106'ya 50 µl DAB Chromogen RE7105 ekleyin. Hazırladıktan sonra altı saat içinde kullanın.

Kalite Kontrol

Kullanıcının laboratuvarında doku işleme ve teknik işlemlerdeki farklar sonuçlarda önemli değişkenliğe neden olabilir ve aşağıdaki işlemlere ek olarak düzenli şekilde tesis içi kontrollerin kullanılmasını gerektirir. Kontroller, hasta örneği/örnekleriyle aynı şekilde mümkün olduğunca kısa süre içinde formalin fiksasyonlu, işlenmiş ve parafine gömülü taze otopsi/biyopsi/cerrahi materyal olmalıdır.

Pozitif Doku Kontrolü

Doğru hazırlanmış dokuları ve uygun boyama tekniklerini belirtmek için kullanılır. Her boyama çalışmasında her test koşulu/primer antikör seti için bir pozitif doku kontrolü dahil edilmelidir. Zayıf pozitif boyamalı bir doku optimum kalite kontrol için ve hafif reaktif bozulması seviyelerini saptamak için kuvvetli pozitif boyanan bir dokudan daha uygundur. Önerilen pozitif kontrol dokuları için bakınız primer antikör Kullanma Talimatı. Pozitif doku kontrolü pozitif boyanma göstermezse test numunelerinin sonuçları geçersiz kabul edilmelidir.

Negatif Doku Kontrolü

Primer antikör tarafından hedef Epitopun etiketlenmesinin özgüllüğünü doğrulamak üzere pozitif doku kontrolü sonrasında incelenmelidir. Önerilen negatif kontrol doku için primer antikör Kullanma Talimatına bakınız. Alternatif olarak çoğu doku kesitinde bulunan farklı hücre tiplerinin çeşitliliği sıklıkla negatif kontrol bölgeleri sunar ama bu durum kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Eğer varsa nonspesifik boyanmanın görünümü genellikle difüzdür. Aşırı formalin fiksasyonlu dokulardan kesitlerde bağ dokusunun sporadik boyanması da görülebilir. Boyanma sonuçlarının yorumlanması için sağlam hücreler kullanın. Nekrotik veya dejenera hücreler sıklıkla nonspesifik şekilde boyanır.⁵ Proteinler veya substrat reaksiyon ürünlerinin immünojenik olmayan bağlanması nedeniyle yalnızca pozitif sonuçlar görülebilir. Bunlar ayrıca psödoperoksidaz (eritrosiller), endojen peroksidaz (sitokrom C) veya endojen biotin (örn. karaciğer, meme, beyin, böbrek) gibi endojen enzimler nedeniyle oluşabilir. Endojen enzim aktivitesini veya nonspesifik enzim bağlanmasını spesifik immünoreaktiveden ayırmak için ek hasta dokuları sadece substrat kromojen ya da Streptavidin HRP ve substrat kromojen ile boyanabilir. Negatif doku kontrolünde spesifik boyanma olursa hasta numuneleri sonuçları geçersiz kabul edilmelidir.

Negatif Reaktif Kontrolü

Nonspesifik boyanmayı değerlendirmek ve Epitop bölgesinde spesifik boyanmayı daha iyi yorumlayabilmek için her hasta numunesi kesitinde primer antikör yerine nonspesifik bir negatif reaktif kontrolü kullanın.

Hasta Dokusu

Boyanmış hasta numunelerini son olarak inceleyin. Pozitif boyanma şiddeti negatif reaktif kontrolünün herhangi bir nonspesifik arka alan boyanması bağlamında değerlendirilmelidir. Her immünohistokimyasal testle olduğu gibi negatif bir sonuç Epitopun saptanmadığı anlamına gelir ve Epitopun çalışılan hücrelerde/dokuda bulunmadığı anlamına gelmez. Gerekirse yalnızca negatif reaksiyonları tanımlamak için bir antikör paneli kullanın.

Sınırlamalar

İmmünohistokimya, uygun reaktiflerin seçilmesi; doku seçme, fiksasyon ve işleme; İHK laminin hazırlanması ve boyanma sonuçlarının yorumlanması için özel eğitim gerektiren çok adımlı bir diagnostik süreçtir.

Doku boyama, boyamanın öncesinde dokunun muamele ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer dokular veya sıvılarla kontaminasyon artefaktlara, antikör tutulmasına veya yalnızca negatif sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçların nedeni fiksasyon ve gömme yöntemlerinde değişiklikler veya dokunun tabiatına bağlı düzenlilikler olabilir.

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

Herhangi bir boyanmanın veya yokluğunun klinik yorumlaması hastanın klinik öyküsü ve diğer diagnostik testler bağlamında vasıflı bir patoloji uzmanı tarafından değerlendirilmeli ve uygun kontroller kullanılarak morfolojik çalışmalarla desteklenmelidir.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K veya RE7120-K spesifik fiksasyon gereklilikleri olan parafine gömülü kesitlerde kullanın içindir. Özellikle neoplazmlarda beklenmeyen Epitop ekspresyonu oluşabilir. Herhangi bir boyanmış doku kesitinin klinik yorumu morfolojik analizi ve uygun kontrollerin değerlendirilmesini içermelidir.

Performans Özellikleri

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/(500 tests) RE7110-K/RE7120-K, ve Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 performansı bir dizi Novocastra™ fare IgG, fare IgM ve tavşan IgG primer antikörü kullanılarak doğrulanmıştır.

Bu ürünler ürün etiketinde basılı son kullanma tarihine/tarihlerine kadar stabildir.

Bibliyografya

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Önceki Sayıdan Değişiklikler

Kullanım Amacı, Sağlanan Reaktifler, Sulandırma, Karıştırma, Seyreltme, Titrasyon, Performans Özellikleri.

Yayın Tarihi

19 Şubat 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Продуктов №: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Продуктов №: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Продуктов №: RE7104

Предназначение

За употреба при *in vitro* диагностика.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K и (500 tests) RE7120-K служат за визуализация на IgG, миши IgM и заешки IgG първични антитела. Novocastra™ DAB (250 Slides) Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 са реактиви компоненти на тези системи, които са предназначени за употреба при описаната по-долу процедура. 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

Първата техника за имунопероксидаза е докладвана от Накейн и Пиърс¹, оттогава насам се появяват множество разработки, водещи до техниките за имунопероксидаза, познати днес. Системите за откриване Novocastra™ Peroxidase са основани на техниката, описана от Госдон.² Тези продукти се използват при имунохистомична (IHC) процедура, която позволява качествена идентификация чрез оптична микроскопия на епитопи в срези от фиксирани във формалин и вградени в парафин тъкани, чрез последователни междинни стъпки на измиване.

Ако това е необходимо за първичното антитяло, срезите трябва предварително да преминат през извличане на епитоп преди оцветяване. Действието на ендогенната пероксидаза се неутрализира с помощта на Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. След това се прилага Novocastra™ Protein Block RE7102, за да се намали неспецифичното свързване на първични и вторични антитела. Срезът впоследствие се инкубира с оптимално разрежено първично антитяло. Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103, формула на биотин коногирано вторично антитяло, което разпознава миши и заешки имуноглобулини, се използва за откриване на свързани с тъканите първични антитела. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, стрептавадин пероксидазен конюгат бива прилаган след това, който се свързва с биотин, наличен върху вторичното антитяло. Срезите се инкубират допълнително със субстрата/хромогена, 3,3' – диаминобензидин (DAB), приготвен от Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 и Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106, както е описано по-долу. Катализирана от пероксидазата реакция образува видима кафява утайка на мястото на епитопа. Срезите са контраоцветени с Novocastra™ Hematoxylin RE7107 и с поставено върху тях покривно стъкло. Резултатите се интерпретират с използване на оптичен микроскоп и са в помощ при диференциалната диагностика на патофизиологични процеси, които може да са или да не са свързани с определен епитоп.

Предоставени реактиви

Подробности за тези реактиви от следващия списък, които се доставят с всеки продукт, са предоставени в таблицата по-долу.

1. Peroxidase Block RE7101. 3 – 4% водороден пероксид.
2. Protein Block RE7102. 0,4% казеин във фосфатно буферизиран физиологичен разтвор със стабилизатори, повърхностно активно съединение и 0,2% Bronidox L като консервант.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Афинитетно пречистен кози анти-миши IgM (5 µg/mL), конски анти-миши IgG (10,5 µg/mL) и конски анти-заешки IgG (10,5 µg/mL) в триметамин-буферизиран физиологичен разтвор със стабилизиращ протеин и 0,35% ProClin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 до 1,4 µg/mL в триметамин-буферизиран физиологичен разтвор със стабилизиращ протеин и 0,35% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74% w/v 3,3' – диаминобензидин, в стабилизирания разтвор.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Буферизиран разтвор, съдържащ ≤ 0,1% водороден пероксид и консервант.
7. Hematoxylin RE7107 <0,1% hematoxylin.

Реактив	Продуктов номер	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 mL	2 x 25 mL	
Protein Block	RE7102	1 x 25 mL	2 x 25 mL	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 mL	2 x 25 mL	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 mL	2 x 25 mL	1 x 25 mL
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 mL	1 x 3 mL	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 mL	2 x 30 mL	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 mL	2 x 25 mL	

Възстановяване, смесване, разреждане, титриране

Разтворите на Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 и Hematoxylin RE7107 са предварително разреждени. Не се препоръчва възстановяване, смесване, разреждане или титриране на тези реактиви. По-нататъшното разреждане може да доведе до загуба на оцветяване на епитопа. Всички подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя.

DAB Chromogen RE7105 се нуждае от разреждане до 1/20 в DAB Substrate Buffer RE7106 преди употреба. По-нататъшното разреждане може да доведе до загуба на оцветяване на епитопа. Всички подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя.

Съхранение и стабилност

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

Подготовка на спесимени

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

Предупреждения и предпазни мерки

Информационният лист за безопасност на материалите може да се получи при поискване или е на разположение от www.LeicaBiosystems.com

За професионална употреба.

Не смесвайте реактиви от различни системи за откриване.

Спесиментите 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.³

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. 50 mM трометамин-буфериран физиологичен разтвор (TBS) pH 7,6.
3. Разтвор(и) за извличане на епитоп.
4. Разтвор(и) за извличане на ензим.
5. Разредител за антитела.
6. Първично антитяло.
7. Микроскопски препарат.

B. Необходимо, но непредоставено оборудване

1. Необходимо оборудване за извличане на епитоп, ако се изисква за първичното антитяло.
2. Общо имунохистохимично лабораторно оборудване.

C. Методология

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

Комбинацията от първичното антитяло, неговия разтвор, заедно със системата за откриване, трябва да бъде валидирана от потребителя посредством поредица от известни позитивни и негативни контроли.

Освен ако не е указано друго, всички стъпки се извършват при стайна температура (25 °C).

1. Срежете и поставете срезите на предметни стъкла, покрити със съответния тъканен адхезив.
2. Делпарафинизирайте срезите в ксилен или ксиленови заместители.
3. Рехидрирайте със степенувани алкохоли.
4. Измийте предметните стъкла с течаща чешмяна вода.
5. Извършете извличане на епитоп, както се изисква (вж. „Препоръки за употреба за първично антитяло“).
6. Измийте предметните стъкла с дейонизирана вода.
7. Неутрализирайте ендогенната пероксидаза, използвайки Peroxidase Block RE7101 за 5 минути.
8. Промийте в TBS (трометамин-буфериран физиологичен разтвор) за 2 x 5 минути.
9. Инкубирайте с Protein Block RE7102 за 5 минути.
10. Промийте в TBS (трометамин-буфериран физиологичен разтвор) за 2 x 5 минути.
11. Инкубирайте с оптимално разрежено първично антитяло (вж. „Препоръки за употреба за първично антитяло“).
12. Промийте в TBS (трометамин-буфериран физиологичен разтвор) за 2 x 5 минути.
13. Инкубирайте с Biotinylated Secondary Antibody RE7103 за 30 минути.
14. Промийте в TBS (трометамин-буфериран физиологичен разтвор) за 2 x 5 минути.
15. Инкубирайте с Streptavidin-HRP RE7104 за 30 минути.
16. Промийте в TBS (трометамин-буфериран физиологичен разтвор) за 2 x 5 минути, разклащайки внимателно.
17. Развийте пероксидазна дейност с DAB работен разтвор (вж. „DAB работен разтвор“) за 5 минути.

18. Изплакнете предметните стъкла във вода.
19. Контраоцветете с Hematoxylin RE7107.
20. Изплакнете предметните стъкла във вода за 5 минути.
21. Дехидрирайте, изчистете и поставете срезите върху предметното стъкло.

DAB работен разтвор

Добавете 50 µl от DAB Chromogen RE7105 към 1 mL от DAB Substrate Buffer RE7106. Използвайте в рамките на шест часа след подготовяне.

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 антияло 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.⁴ За препоръчителна позитивна контролна тъкан вижте инструкциите за употреба за първично антияло. Ако позитивната тъканна контрола не показва позитивно оцветяване, резултатите от спесиментите, 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 епитоп от първичното антияло. За препоръчителна негативна контролна тъкан вижте инструкциите за употреба за първично антияло. Алтернативно, разнообразие от различни видове клетки, присъстващи в повечето тъкани 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.⁵ 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 C) или ендогенен биотин⁶ (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 или Streptavidin-HRP и субстрат-хромоген. Ако се появи специфично оцветяване в негативната тъканна контрола, резултатите от спесиментите на пациентите трябва да се считат за невалидни.

Негативна контрола на реактива

Използвайте неспецифична негативна контрола на реактива, вместо първичното антияло, със срез от всяка проба на пациента, за да се направи оценка на неспецифичното оцветяване и да се даде по-добра интерпретация на специфичното оцветяване на мястото на епитопа.

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 епитопът не е открит, а не че епитопът отсъства в анализираните клетки/тъкан. Ако се налага, използвайте панел от антитела 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, сръзване или контаминацията с други тъкани или течности може да причини поява на артефакти, блокиране на антителата или неверни негативни резултати. Несъместимите резултати може да са причинени от отклонения във фиксацията и методите на вграждане в парафина или от присъщи нередности вътре в тъканта.⁷

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.

Системите за откриване Novocastra™ Peroxidase RE7110-K или RE7120-K са предназначени за употреба с вградени в парафин срези със специфични изисквания за фиксация. Възможно е да настъпи неочаквана епитопна 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™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 е валидирано чрез използването на поредица от Novocastra™ миши IgG, миши IgM и заешки IgG първични антитела.

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

Библиография

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Изменения на предишно издание

Не е приложимо.

Дата на издаване

19 Февруари 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Termékszám: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Termékszám: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Termékszám: RE7104

Alkalmazási terület

In vitro diagnosztikai használatra.

A Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K és (500 tests) RE7120-K az egér IgG, egér IgM és nyúl IgG elsődleges antitestek megjelenítését szolgálják. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 e rendszerek alábbi ismertetett eljárásához használandó reagenskomponensei. 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

Az első immunperoxidáz-eljárást Nakane és Pierce írta le¹, és azóta számos fejlesztés vezetett el a napjainkban elterjedt immunperoxidáz-eljárásokhoz. A Novocastra™ Peroxidase Detection Systems rendszerek a Guesdon által leírt eljárás alapulnak.² A termékeket olyan immunhisztokémiai (IHC) eljárás során alkalmazzák, amelyek meghatározott sorrendben végzett lépések során, közbeiktatott mosási lépésekkel lehetővé teszik a formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmetszetekben lévő epitópok fénymikroszkópos vizsgálattal végzett kvalitatív azonosítását.

Amennyiben az elsődleges antitest ezt szükségessé teszi, a metszeteken a festés előtt epitópfeltárást kell végezni. Az endogén peroxidázaktivitás semlegesítése Novocastra™ Peroxidase Block RE7101 alkalmazásával történik. Ezt a Novocastra™ Protein Block RE7102 alkalmazása követi az elsődleges és másodlagos antitestek nem specifikus kötődésének csökkentése céljából. A metszetet ezután inkubálni kell optimális hígítású elsődleges antitesttel. A Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 az egér és nyúl immunoglobulinokat felismerő, biotinnal konjugált másodlagosantitest-készítmény, amely a szövethez kötött elsődleges antitestek kimutatására alkalmazható. Ezután a Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 nevű streptavidin-peroxidáz konjugátumot kell alkalmazni, amely a másodlagos antitesten lévő biotinhoz kötődik. A metszeteket ezután tovább kell inkubálni a Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 és Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106 felhasználásával az alábbi ismertetett módon előállított 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromogén szubsztráttal. A peroxidáz által katalizált reakció látható barna csapadékot hoz létre az epitópok megfelelő területen. A metszeteken Novocastra™ Hematoxylin RE7107 alkalmazásával kontrasztfestést kell végezni, majd fedőlemezzel lefedni. Az eredmények fénymikroszkóp használatával értelmezhetők, és segítségül használhatók a konkrét epitóphoz kapcsolódó, illetve nem kapcsolódó kórleletani folyamatok differenciáldiagnózisához.

Biztosított reagensok

Az egyes termékekhez mellékelt alábbi felsorolásban szereplő reagensekkel kapcsolatos részletek az alábbi táblázatban szerepelnek.

1. Peroxidase Block RE7101. 3–4% hidrogén-peroxid.
2. Protein Block RE7102. 0,4% kazein foszfátpufferes sóoldatban stabilizátorokkal, felületaktív anyaggal és tartósítószerként 0,2% Bronidox L-lel.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Affinitás kromatográfiával tisztított, kecskében termelt egér ellenes IgM (5 µg/ml), lóban termelt egér ellenes IgG (10,5 µg/ml) és lóban termelt nyúl ellenes IgG (10,5 µg/ml) tris-pufferelt sóoldatban fehérjestabilizálóval és 0,35% ProClin™ 950-nel.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1–1,4 µg/ml tris-pufferelt sóoldatban fehérjestabilizálóval és 0,35% ProClin™ 950-nel.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74 vegyesszázalék 3,3'-diaminobenzidin, stabilizáló oldatban.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. ≤0,1% hidrogén-peroxidot és tartósítószer tartalmazó pufferelt oldat.
7. Hematoxylin RE7107 <0,1% hematoxilin.

Reagens	Termékszám	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml	1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3ml	1 x 3ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	2 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml	

Feloldás, elegyítés, hígítás és titrálás

A Peroxidase Block RE7101, a Protein Block RE7102, a Biotinylated Secondary Antibody RE7103, a Streptavidin-HRP RE7104 és a Hematoxylin RE7107 készítmények előre hígított oldatok. Nem javasolt a reagensek feloldása, elegyítése, hígítása vagy titrálása. A további hígítás az epitópfestődés elvesztését okozhatja. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatás validálnia kell.

A DAB Chromogen RE7105 a felhasználás előtt DAB Substrate Buffer RE7106 alkalmazásával 1:20 arányú hígítást igényel. A további hígítás az epitópfestődés 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.

A minták előkészítése

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

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Az anyagbiztonsági adatlapot igény esetén rendelkezésre bocsátjuk, illetve elérhető a www.LeicaBiosystems.com weboldalon is. Szakemberek általi használatra.

Ne keverje össze a különböző detektáló rendszerekből származó reagenseket.

A mintákat fixálás előtt és után, valamint a velük érintkező összes anyagot fertőzések terjesztésére képes anyagként kell kezelni, és megfelelő körültekintéssel kell ártalmatlanítani.³

Soha ne pipettázza szájával 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.

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

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

Eljárás

A. Szükséges, de nem szállított reagensek

1. Az immunhisztokémiában alkalmazott standard oldószerek.
2. 50 mM tris-pufferelt sóoldat (Tris-buffered saline, TBS), pH 7,6.
3. Epitópfeltároló oldat(ok).
4. Enzimes feltároló oldat(ok).
5. Antitesthígító.
6. Elsődleges antitest.
7. Fedőanyag.

B. Szükséges, de nem szállított felszerelés

1. Az epitópfeltáráshoz 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 és a detektáló rendszer kombinációját a felhasználónak kell validálnia ismert pozitív és negatív kontrollsorozat alkalmazásával.

Ha nincs másként feltüntetve, minden lépést szobahőmérsékleten (25 °C) kell végrehajtani.

1. Vágja le és helyezze megfelelő szövegragasztóval bevont tárgylemezre a metszeteket.
2. Xilolban vagy xilolszubsztituensekben paraffinmentesítse a metszeteket.
3. Felszálló alkoholsorban végezze el a rehidratálást.
4. Mossa le a tárgylemezeket folyó csapvíz alatt.
5. Szükség esetén végezzen epitópfeltárást (lásd az elsődleges antitestre vonatkozó **Felhasználási javaslatokat**).
6. Mossa le a tárgylemezeket ionmentes vízben.
7. Peroxidase Block RE7101 5 percig tartó alkalmazásával semlegesítse az endogén peroxidázt.
8. Mossa őket TBS-ben 2 x 5 percig.
9. Inkubálja Protein Block RE7102 készítménnyel 5 percen keresztül.
10. Mossa őket TBS-ben 2 x 5 percig.
11. Inkubálja optimálisan hígított elsődleges antitesttel (lásd az elsődleges antitestre vonatkozó **Felhasználási javaslatokat**).
12. Mossa őket TBS-ben 2 x 5 percig.
13. Inkubálja Biotinylated Secondary Antibody RE7103 készítménnyel 30 percen keresztül.
14. Mossa őket TBS-ben 2 x 5 percig.
15. Inkubálja Streptavidin-HRP RE7104 készítménnyel 30 percen keresztül.
16. Finoman rázogatva mossa 2 x 5 percig TBS-ben.
17. DAB munkaoldat 5 percig tartó alkalmazásával hívja elő a peroxidázaktivitást (lásd **DAB munkaoldat**).
18. Öblítse le a tárgylemezeket vízben.
19. Végezzen kontrasztfestést Hematoxylin RE7107 használatával.
20. Öblítse le a tárgylemezeket vízben 5 percen keresztül.
21. Víztelenítse és tisztítsa meg a metszeteket, majd helyezze őket tárgylemezre.

DAB munkaoidat

Adjon 1 ml DAB Substrate Buffer RE7106 készítményhez 50 µl DAB Chromogen RE7105 készítményt. Az elkészítést követő hat órán belül használja fel.

Minőség-ellenőrzés

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

Pozitív szövetkontroll

A megfelelő szövet-előkészítés és festési technikák ellenőrzésére használatos. Minden tesztelési körülményegyettes / elsődleges antitest esetében és minden megfestési sorozatban kell alkalmazni egy pozitív szövetkontrollt. A gyengén pozitív festődésű szövet alkalmasabb az erősebben pozitív festődésű szövetnél az optimális minőség-ellenőrzéshez, valamint a kismértékű reagensbomlás észleléséhez.⁴ A javasolt pozitív kontrollszóvettel 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 epitóp elsődleges antitest segítségével történő jelölésének specifikitását ellenőrizni lehessen. A javasolt negatív kontrollszóvettel kapcsolatban lásd az elsődleges antitest használati útmutatóját. Ezenkívül a legtöbb szövetszövetben jelen lévő különböző sejttípusok gyakran használhatók negatív kontrollként, de ezeket a felhasználónak kell ellenőriznie. Ha van nem specifikus festődés, az rendszerint diffúz megjelenésű. A formalinban túlfixált szövetekből származó metszeteknél a kötőszövet szórányos festődése is megfigyelhető. A festési eredmények értelmezésére ép sejteket használjon. A nekrotizált vagy degenerálódott sejtek gyakran nem specifikusan festődnek meg.⁵ A fehérjék 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 biotin⁶ (pl. máj, emlő, agy, vese). Az endogén enzim aktivitásának vagy a specifikus immunreaktivitásból származó enzimek nem specifikus kötődésének a megkülönböztetésére további betegszövetek festhető kizárólag kromogén szubsztráttal, illetve Streptavidin-HRP-vel és kromogén szubsztráttal. Ha a negatív szövetkontroll specifikus festődést mutat, a betegminták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Negatív reagenskontroll

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

Betegszóvet

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 epitóp nem volt kimutatható, nem pedig azt, hogy az epitóp nem volt jelen a vizsgált sejtekben/szóvetben. 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 szóvetek kiválasztása, fixálása és feldolgozása; az IHC tárgyilemez előkészítése; és a festési eredmények értelmezése.

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

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™ Peroxidase Detection System RE7110-K, illetve RE7120-K készítmények paraffinba ágyazott metszeteken történő alkalmazásra szolgálnak meghatározott fixálási követelmények mellett. Időnként váratlan epitóp-expresszió fordulhat elő, különösen daganatok esetében. Bármely festett szövetszövet klinikai értelmezéséhez morfológiai elemzés is kell végezni, és ki kell értékelni a megfelelő kontrollokat.

Tejlesztítményjellemzők

A Novocastra™ Peroxidase Detection System (250 tests) / (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 tejlesztítményt különféle Novocastra™ egér IgG, egér IgM és nyúl IgG elsődleges antitestek alkalmazásával validálták.

Ezek a termékek a termék címkére nyomtatott lejárati dátum(ok)ig stabilak.

Szakirodalom

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Módosítások az előző változathoz képest

Nem alkalmazható.

Kiadás dátuma

19 február 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Nr. produs RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Nr. produs RE7120-K

Streptavidin-HRP

Nr. produs RE7104

Utilizare prevăzută

Pentru diagnosticare in vitro.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K și (500 tests) RE7120-K sunt pentru vizualizarea anticorpilor primari de șoarece IgG, șoarece IgM și iepure IgG. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 sunt reactivi componenți ai acestor sisteme destinați utilizării în procedura descrisă mai jos. 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

Prima tehnică cu imunoperoxidază a fost raportată de Nakane și Pierce¹, iar de atunci au avut loc multe evoluții care au dus la tehnicile de imunoperoxidază utilizate pe larg în prezent. Sistemele de detecție cu peroxidază Novocastra™ sunt bazate pe tehnica descrisă de Guesdon.² Aceste produse sunt utilizate într-o procedură imunohistochimică (IHC), care permite identificarea calitativă prin microscopie optică a Epitopilor în secțiuni de țesut fixat cu formalină, încorporat în parafină, prin etape secvențiale cu etape de spălare intercalate.

Dacă este necesar pentru anticorul primar, secțiunile sunt supuse recuperării epitopilor înainte de colorație. Activitatea peroxidazei endogene este neutralizată utilizând Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Acesta este urmat de aplicarea Novocastra™ Protein Block RE7102 pentru a reduce legarea nespecifică a anticorpilor primari și secundari. Secțiunea este apoi incubată cu anticor primar în diluție optimă. Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103, o formulă de anticorp secundar conjugat cu biotină care recunoaște imunoglobulinele de șoarece și iepure, este utilizat pentru a detecta orice anticor primar legat de țesut. Apoi se aplică Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, un conjugat streptavidină-peroxidază, iar acesta se leagă la biotina prezentă pe anticorul secundar. Secțiunile sunt apoi incubate în continuare cu substratul/cromogen, 3,3' - diaminobenzidină (DAB), preparat din Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 și Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106 după cum se descrie mai jos. Reacția catalizată de peroxidază produce un precipitat cafeniu vizibil la situl Epitopului. Secțiunile sunt contracolorate cu Novocastra™ Hematoxylin RE7107 și acoperite cu lamelă. Rezultatele sunt interpretate folosind un microscop optic și ajută la diagnosticul diferențial al proceselor patofiziologice, care pot sau nu să fie asociate cu un Epitop specific.

Reactivi furnizați

Detalii reactivilor din lista următoare care sunt furnizați în fiecare produs sunt date în tabelul de mai jos.

1. Peroxidase Block RE7101. Apă oxigenată 3-4%.
2. Protein Block RE7102. 0,4% caseină în soluție salină tamponată cu fosfat, cu stabilizatori, surfactant și 0,2% Bronidox L drept conservant.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. IgM purificat prin afinitate capră anti-șoarece (5μg/ml), IgG cal anti-șoarece (10,5μg/ml) și IgG cal anti-iepure (10,5μg/ml) în soluție salină tamponată cu trometamină cu stabilizator de proteine și 0,35% ProClin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 - 1,4μg/ml în soluție salină tamponată cu trometamină cu stabilizator de proteine și 0,35% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74% w/v 3,3' - diaminobenzidină, în soluție stabilizatoare.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Soluție tamponată conținând apă oxigenată ≤ 0,1% și conservant.
7. Hematoxylin RE7107 Hematoxylin <0.1%.

Reactiv	Număr produs	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml	1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 ml	1 x 3 ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 ml	2 x 30 ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml	

Reconstituire, amestecare, diluare, titrare

Soluțiile Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 și Hematoxylin RE7107 sunt prediluare. Reconstituirea, amestecarea, diluarea sau titrarea acestor reactivi nu sunt recomandate. Diluarea suplimentară poate duce la pierderea colorării epitopilor. Utilizatorul trebuie să valideze orice astfel de schimbare.

DAB Chromogen RE7105 necesită diluare la 1/20 în DAB Substrate Buffer RE7106 înainte de utilizare. Diluarea suplimentară poate duce la pierderea colorării epitopilor. Utilizatorul trebuie să valideze orice astfel de schimbare.

Depozitare și stabilitate

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

Pregătirea specimenului

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

Avertismente și precauții

O Fișă tehnică de securitate a materialului este disponibilă la cerere sau poate fi obținută de pe site-ul www.LeicaBiosystems.com

Pentru utilizatori profesioniști.

Nu amestecați reactivi din sisteme de detecție diferite.

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.³

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

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

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

Procedură

A. Reactivi necesari care nu sunt însă furnizați

1. Solvenți standard folosiți în imunohistochimie.
2. Soluție salină tamponată cu trometamină 50 mM (TBS) pH 7,6.
3. Soluție(i) de recuperare a epitopilor.
4. Soluție(i) de recuperare cu enzime.
5. Diluant pentru anticorpi.
6. Anticorp primar.
7. Mediu de montare.

B. Echipamente necesare care nu sunt însă furnizate

1. Echipament necesar pentru recuperarea epitopilor, dacă este recomandată pentru anticorpii primari.
2. Echipament de laborator general pentru imunohistochimie.

C. Metodologie

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

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

Dacă nu se indică altfel, toate etapele se efectuează la temperatura camerei (25 °C).

1. Taiăți și montați secțiunile pe lame acoperite cu un adeziv tisular adecvat.
2. Deparafinați secțiunile în xilen sau substituite de xilen.
3. Rehidrați cu ajutorul alcoolilor cu gradăție descrescătoare.
4. Spălați lamele cu apă de la robinet.
5. Realizați recuperarea epitopilor după cum este necesar (a se vedea **Recomandări de utilizare** pentru anticorpii primari).
6. Spălați lamelele în apă deionizată.
7. Neutralizați peroxidaza endogenă utilizând Peroxidase Block RE7101 timp de 5 minute.
8. Spălați în TBS timp de 2 x 5 minute.
9. Incubați cu Protein Block RE7102 timp de 5 minute.
10. Spălați în TBS timp de 2 x 5 minute.
11. Incubați cu anticorp primar diluat optim (a se vedea **Recomandări de utilizare** pentru anticorpii primari).
12. Spălați în TBS timp de 2 x 5 minute.
13. Incubați cu Biotinylated Secondary Antibody RE7103 timp de 30 de minute.
14. Spălați în TBS timp de 2 x 5 minute.
15. Incubați cu Streptavidin-HRP RE7104 timp de 30 de minute.
16. Spălați în soluție tampon TBS timp de 2 x 5 minute, legănând ușor.
17. Dezvoltați activitatea peroxidazei cu soluție de lucru DAB (a se vedea **Soluție de lucru DAB**) timp de 5 minute.
18. Clătiți lamele în apă.
19. Contracolorați cu Hematoxylin RE7107.
20. Clătiți lamelele în apă timp de 5 minute.
21. Deshidrați, curățați și montați secțiunile.

Soluție de lucru DAB

Adăugați 50μl de DAB Chromogen RE7105 la 1ml de DAB Substrate Buffer RE7106. Utilizați în maxim șase ore de la preparare.

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/anticorp primar în fiecare etapă de colorație. Un țesut cu colorație pozitivă slabă este mai adecvat decât un țesut cu colorație pozitivă puternică pentru controlul optim al calității și pentru a detecta nivele minore de degradare a reactivilor.⁴ Pentru țesutul de control pozitiv recomandat a se vedea Instrucțiunile de utilizare ale reactivului primar. Dacă țesutul de control pozitiv nu demonstrează colorația pozitivă, rezultatele obținute cu acele probe de testare trebuie considerate nevalide.

Țesutul de control negativ

Trebuie examinat după țesutul de control pozitiv pentru a verifica specificitatea etichetării Epitopului țintă de către anticorpul primar. Pentru țesutul de control negativ recomandat, a se vedea Instrucțiunile de utilizare pentru anticorpul primar Ca alternativă, varietatea de tipuri diferite de celule prezente în majoritatea secțiunilor tisulare oferă frecvent locuri de control negativ, dar acest lucru trebuie verificat de către utilizator. Colorația nespecifică, dacă este prezentă, are, de obicei, un aspect difuz. Colorația sporadică a țesutului conjunctiv poate fi observată, de asemenea, în secțiuni de țesuturi fixate în mod excesiv în formalină. Folosiți celule intacte pentru interpretarea rezultatelor de colorație. Celulele necrotice sau degenerate se colorează deseori într-un mod nespecific.⁶ 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 endogenă⁹ (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 sau respectiv Streptavidin-HRP și substrat cromogen. În cazul în care colorația specifică are loc în țesutul de control negativ, rezultatele obținute pe eșantioanele pacientului trebuie să fie considerate nevalide.

Reactivul de control negativ

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

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 epitopul nu a fost detectat, și nu că epitopul a fost absent în celulele/țesuturile analizate. Dacă este necesar, folosiți un panel de anticorpi 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 anticorpilor sau rezultate fals negative. Rezultatele inconsecvente pot fi atribuite diferențelor în ceea ce privește metodele de fixare și încorporare, ori neregularităților inerente ale țesutului.⁷

Contra-colorația 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™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K sau RE7120-K sunt pentru utilizare pe secțiuni încorporate în parafină cu cerințe specifice de fixare. Poate apărea expresie neașteptată a epitopilor, 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™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 a fost validată utilizând o gamă de anticorpi primari Novocastra™ IgG de șoarece, IgM de șoarece și IgG de iepure.

Aceste produse sunt stabile până la data expirării indicată pe eticheta produsului.

Bibliografie

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Amendamente la ediția anterioară

Nu este cazul.

Data publicării

19 februarie 2020

Система обнаружения пероксидазы Peroxidase Detection System (250 tests)

Продукция №: RE7110-K

Система обнаружения пероксидазы Peroxidase Detection System (500 tests)

Продукция №: RE7120-K

Стрептавидин Streptavidin-HRP

Продукция №: RE7104

Назначение

Для диагностики *in vitro*.

Системы детекции на основе пероксидазы Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K и (500 tests) RE7120-K предназначены для визуализации первичных антител к мышинным иммуноглобулинам IgG, IgM и иммуноглобулину кролика IgG. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 являются компонентами данных систем, которые предназначены для использования в соответствии с описанной выше процедурой. 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

Первая техника на основе иммунопероксидазы была описана Накане и Пирсом.¹С этого момента появилось множество разработок на основе техник иммунопероксидазы, широко распространенных в настоящее время. Система обнаружения на основе концентрированной пероксидазы нейтрализуется блоком пероксидазы Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Далее следует процедура применения блока протеинов Novocastra™ Protein Block RE7102 для снижения неспецифического связывания первичных и вторичных антител. В дальнейшем срезы инкубируются с использованием оптимально разведенных первичных антител. Концентрированное биотинилированное вторичное антитело Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103, биотин-конъюгированное вторичное антитело, которое распознает иммуноглобулины мыши и кролика, используется для детекции первичных антител, связанных с тканями. Концентрированный стрептавидин Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, конъюгат стрептавидин-пероксидазы, применяется на следующем этапе для связывания с биотином, присутствующим во вторичном антителе. Затем срезы инкубируют субстратом / хромогеном, 3,3'-диаминобензидином (DAB), приготовленным из хромогена Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 и субстратного буферного раствора Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106, как описано далее. Реакцию катализируют пероксидазой, в результате чего появляется видимый коричневый осадок на участке эпитопа. Срезы тканей окрашивают гематоксилином Novocastra™ Hematoxylin RE7107 и покрывают предметными стеклами. Интерпретацию результатов выполняют под световым микроскопом и используют для дифференциальной диагностики патофизиологических процессов, которые могут быть связаны или не связаны с конкретным эпитопом.

Реактивы, входящие в комплект поставки

Информация по реактивам из следующего списка, которые поставляются в каждом продукте, представлена в таблице далее.

1. Блок пероксидазы Peroxidase Block RE7101. 3-4% перексид водорода.
2. Блок протеинов Protein Block RE7102. 0,4 % казеин в фосфатно-солевом буферном растворе в присутствии стабилизаторов, сурфактанта и 0,2 % Bronidox L в качестве консерванта.
3. Биотинилированные вторичные антитела Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Аффинно-очищенное антитело козы к иммуноглобулину IgM мыши (5 мкг/млб), антитело лошади к иммуноглобулину IgG мыши (10,5 мкг/млб) и антитело лошади к иммуноглобулину IgG кролика (10,5 мкг/млб) в фосфатно-солевом буферном растворе со стабилизатором протеина и 0,35 % ProClim™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104 1-1,4 мкг/млб в трис-забуферном физрастворе со стабилизатором протеина и 0,35 % ProClim™ 950.
5. Хромоген DAB Chromogen RE7105. 1,74% в/о 3,3'-диаминобензидин в растворе стабилизатора.
6. Буферный раствор субстрата DAB Substrate Buffer RE7106. Буферный раствор, содержащий ≤ 0,1 % пероксида водорода и консерванта.
7. Hematoxylin RE7107: <0,1 % гематоксилина.

Реактив	Номер продукта	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	(Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 мл	2 x 25 мл	
Protein Block	RE7102	1 x 25 мл	2 x 25 мл	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 мл	2 x 25 мл	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 мл	2 x 25 мл	1 x 25 мл
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3 мл	1 x 3 мл	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30 мл	2 x 30 мл	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 мл	2 x 25 мл	

Восстановление, смешивание, разведение, титрование

Растворы следующих реактивов: блок пероксидазы Peroxidase Block RE7101, блок протеинов Protein Block RE7102, биотинилированное вторичное антитело Biotinylated Secondary Antibody RE7103, стрептавидин Streptavidin-HRP RE7104 и гематоксилин Hematoxylin RE7107 — предварительно разбавляются. Восстановление, смешивание, разведение или титрование этих реактивов не рекомендуется. Дальнейшее разведение может привести к потере окрашивания эпитопа. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.

Для хромогена DAB Chromogen RE7105 перед использованием требуется разведение в соотношении 1/20 в буферном растворе субстрата DAB Substrate Buffer RE7106. Дальнейшее разведение может привести к потере окрашивания эпитопа. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.

Хранение и стабильность

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

Подготовка образцов

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

Предупреждения и меры предосторожности

Паспорт безопасности химической продукции предоставляется по запросу или доступен на сайте: www.LeicaBiosystems.com
Только для профессионального использования.

Не смешивайте реактивы, предназначенные для различных систем обнаружения.

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 предосторожности³.

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 продолжительностью, которые отличаются от указанных в инструкции, может дать ошибочные результаты. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.

Процедура

А. Необходимые реактивы, не входящие в комплект поставки

1. Стандартные растворители, использующиеся в иммуногистохимических исследованиях.
2. 50 мМ трис-солевой буферный раствор (TBS), pH 7,6.
3. Растворы для демаскировки эпитопов.
4. Ферментные восстанавливающие растворы.
5. Разбавитель антител.
6. Первичные антитела.
7. Заливочная среда препаратов.

В. Необходимое оборудование, не входящее в комплект поставки

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

С. Методика

Прежде чем применять эту методику, пользователи должны научиться проводить иммуногистохимические исследования. Комбинация первичных антител и их разведение должны быть валидированы пользователем наряду с системой детекции с использованием серий известных положительных и отрицательных контролей.

Если не указано иное, выполняйте все этапы при комнатной температуре (25 °C).

1. Сделайте срезы и закрепите их на предметных стеклах, покрытых клеем, предназначенным для ткани.
2. Депарафинизируйте срезы, используя ксилол или его заменители.
3. Регидратируйте, используя спирты определенной степени очистки.
4. Промойте препараты проточной водой.
5. Проведите демаскировку эпитопа в соответствии с требованиями (см. "Рекомендации по использованию для первичного антитела").
6. Промойте предметные стекла деионизированной водой.
7. В течение 5 минут проводите нейтрализацию эндогенной пероксидазы, используя блок пероксидазы Peroxidase Block RE7101.
8. 2 раза по 5 минут промывайте в буферном растворе TBS.
9. В течение 5 минут инкубируйте с использованием блока протеинов Protein Block RE7102.
10. 2 раза по 5 минут промывайте в буферном растворе TBS.
11. Инкубируйте с оптимально разведенным первичным антителом (см. "Рекомендации по использованию первичного антитела").
12. 2 раза по 5 минут промывайте в буферном растворе TBS.
13. Инкубируйте с разведенным биотинилированным вторичным антителом Biotinylated Secondary Antibody RE7103 в течение 30 минут.
14. 2 раза по 5 минут промывайте в буферном растворе TBS.
15. Инкубируйте с разведенным стрептавидином Streptavidin-HRP RE7104 в течение 30 минут.
16. 2 раза по 5 минут промывайте препараты в буферном растворе TBS, осторожно покачивая.
17. Активируйте пероксидазу при помощи рабочего раствора DAB (см. "Рабочий раствор DAB Working Solution") в течение 5 минут.
18. Промойте препараты водой.
19. Выполните контрастирование гематоксилином Hematoxylin RE7107.
20. В течение 5 минут промывайте препараты водой.
21. Дегидратируйте, очистите и закрепите срезы.

Рабочий раствор DAB Working Solution

Добавьте 50 мкл хромогена DAB Chromogen RE7105 к 1 млб буферного субстрата DAB Substrate Buffer RE7106. Используйте в течение шести часов после подготовки.

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.⁴ 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 меченая целевого эпитопа 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. Что касается некротизированных или разрушенных клеток, часто можно наблюдать неспецифическое окрашивание.⁵ Связывание белков или продуктов реакции субстрата, происходящее неиммунологическим способом, может привести к ложноположительным результатам. Они могут быть обусловлены активностью эндогенных ферментов, таких как псевдопероксидаза (эритроцитов), эндогенная пероксидаза (цитохром С) или эндогенный биотин⁶ (например, в печени, молочной железе, головном мозге, почках). Чтобы отличить активность эндогенных ферментов или неспецифическое связывание ферментов от специфической иммунореактивности, можно выполнить окрашивание дополнительных тканей, взятых у пациента, с использованием исключительно хромогенного субстрата или с применением Стрептавидина, ковалентно конъюгированного с пероксидазой хрена (Streptavidin-HRP), или меченого полимера и хромогенного субстрата соответственно. При наличии специфического окрашивания в отрицательном контроле ткани результаты исследования полученных у пациентов образцов считаются недействительными.

Отрицательный контроль реактива

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

Ткань, полученная у пациента

Исследуйте окрашенные образцы ткани, взятой у пациента, в последнюю очередь. Интенсивность положительного окрашивания следует оценивать с учетом любого неспецифического фонового окрашивания отрицательного контроля реактива. Как и при любом иммуногистохимическом исследовании, отрицательный результат означает необнаружение эпитопа, 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 IGH 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.⁷

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.

Системы обнаружения на основе пероксидазы Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K или RE7120-K предназначены для использования на залитых парафинном срезах с особыми требованиями к фиксации. Возможная непредвиденная экспрессия эпитопа, особенно в опухолях. Клиническая интерпретация любого окрашенного среза ткани должна включать морфологический анализ и оценку соответствующих контролей.

Эксплуатационные характеристики

Эффективность систем обнаружения на основе пероксидазы Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 была валидирована с использованием ряда первичных антител к иммуноглобулинам IgG и IgM мышей и антител к иммуноглобулинам IgG кроликов Novocastra™.

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

Список литературы

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Дополнения к предыдущему выпуску

Не применимо.

Дата выпуска

19 Февраль 2020

Peroxidase Detection System (250 testów)

Nr produktu: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 testów)

Nr produktu: RE7120-K

Streptawidyna-HRP

Nr produktu: RE7104

Przeznaczenie

Do diagnostyki in vitro.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 testów) RE7110-K i (500 testów) RE7120-K służą do wizualizacji mysich przeciwciał IgG, mysich przeciwciał IgM i króliczych przeciwciał IgG. Novocastra™ Streptawidyn-HRP RE7104 to odczynnik będący częścią tych systemów, przeznaczonymi do zastosowania w procedurze opisanej poniżej. Kliniczną interpretację barwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. Ocena powinna przeprowadzić wykwalifikowany patolog w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych.

Zasady postępowania

Po raz pierwszy technika immunoperoxydazowa została opisana przez Nakanego i Pierce'a¹, od tamtej pory nastąpiło wiele zmian, na skutek których techniki immunoperoxydazowe weszły do powszechnego użytku. Systemy Novocastra™ Peroxidase Detection Systems oparte są na technice opisanej przez Guesdon.² Produkty te są wykorzystywane w badaniu immunohistochemicznym (IHC), które składa się z kilku etapów przedzielonych przemywaniem i pozwala na jakościową ocenę za pomocą mikroskopii świetlnej epitopów w skrawkach utwalonej w formalinie i zatopionej w parafinie tkanki.

Jeżeli wymaga tego przeciwciało pierwszorzędowe, przed barwieniem skrawki należy poddać odmaskowywaniu epitopów. Endogenna aktywność peroksydazy jest neutralizowana przy pomocy Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Następnie stosuje się Novocastra™ Protein Block RE7102 w celu zmniejszenia niespecyficznego wiązania przeciwciał pierwszorzędowych i drugorzędowych. Następnie skrawek jest inkubowany przy użyciu optymalnie rozcieńczonego przeciwciała pierwszorzędowego. Novocastra™ Biotynylated Secondary Antibody RE7103 to preparat zawierający pierwszorzędowe przeciwciała sprzężone z biotyną, który rozpoznaje immunoglobuliny myszy i królika, jest stosowane do wykrywania jakiegokolwiek pierwotnego przeciwciała związanego z tkanką. Następnie stosuje się preparat Novocastra™ Streptawidyn-HRP RE7104, koniugat streptawidyny i peroksydazy, który wiąże się z biotyną obecną na przeciwciele drugorzędowym. Skrawki są następnie inkubowane przy pomocy substratu-chromogenu z 3,3'-diaminobenzydyną (DAB), przygotowanego z Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 i Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106 w sposób opisany poniżej. Produktem reakcji katalizowanej przez peroksydazę jest widoczny brązowy osad w miejscu epitopu. Skrawki wybarwiane są kontrastowo przy pomocy Novocastra™ Hematoxylin RE7107 i przykrywa szkiełkami nakrywkowymi. Wyniki są interpretowane przy użyciu mikroskopu świetlnego i uzupełniane diagnostyką różnicową procesów patofizjologicznych, które mogą być związane z konkretnym epitopem.

Odczynniki znajdujące się w zestawie

Szczegółowe informacje dotyczące odczynników z poniższej listy, które są dołączone do każdego produktu, znajdują się w poniższej tabeli.

1. Peroxidase Block RE7101. nadtlenek wodoru 3-4%.
2. Protein Block RE7102. 0,4% kazeiny w soli fizjologicznej buforowanej fosforanem, ze stabilizatorami, środkiem powierzchniowo czynnym i konserwowanej 0,2% preparatu Bronidox L.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Oczyszczona metodą powinowactwa kozia anti-mysia IgM (5 µg/ml), końska anti-mysia IgG (10,5 µg/ml) i końska anti-królicze IgG (10,5 µg/ml) w roztworze soli fizjologicznej buforowanym odczynnikiem Tris ze stabilizatorem białka i 0,35% ProClin™ 950.
4. Streptawidyn-HRP RE7104. 1 do 1,4 µg/ml w roztworze soli fizjologicznej buforowanym odczynnikiem Tris ze stabilizatorem białka i 0,35% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74% w/v 3,3'-diaminobenzydyna w roztworze stabilizatora.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Roztwór buforowany zawierający ≤ 0,1% nadtlenu wodoru i środka konserwującego.
7. Hematoxylin RE7107 <0,1% hematoksyliny.

Odczynnik	Numer produktu	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptawidyn-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25ml	2 x 25ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25ml	2 x 25ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25ml	2 x 25ml	
Streptawidyn-HRP	RE7104	1 x 25ml	2 x 25ml	1 x 25ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3ml	1 x 3ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	2 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25ml	2 x 25ml	

Dodawanie wody, mieszanie, rozcieńczanie, miareczkowanie.

Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 i Hematoxylin RE7107 roztwory są wstępnie rozpuszczone. W przypadku tych odczynników nie jest konieczne dodawanie wody, mieszanie, rozcieńczanie ani miareczkowanie. Dalsze rozcieńczanie może prowadzić do niemożliwości przeprowadzenia barwienia epitopu. Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Przed użyciem DAB Chromogen RE7105 wymaga rozcieńczenia do 1/20 w DAB Substrate Buffer RE7106. Dalsze rozcieńczanie może prowadzić do niemożliwości przeprowadzenia barwienia epitopu. Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Przechowywanie i trwałość

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

Przygotowanie próbek

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

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Karta charakterystyki jest udostępniana na żądanie lub można ją pobrać ze strony www.LeicaBiosystems.com

Dla profesjonalnych użytkowników.

Nie mieszać odczynników z różnych systemów detekcji.

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.³

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 przemycić 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. 50 mM roztworu soli fizjologicznej buforowanego odczynnikiem Tris (TBS) pH 7.6.
3. Roztwór/Roztwory do odmaskowywania epitopu.
4. Roztwór/Roztwory do odmaskowywania enzymów.
5. Rozcieńczalnik do przeciwciał.
6. Przeciwciało pierwszorzędowe.
7. Środek do zamykania preparatów mikroskopowych

B. Sprzęt wymagany, lecz niedostarczany

1. Sprzęt wymagany do odmaskowywania epitopu, 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, w systemie detekcji powinny zostać zweryfikowane przez użytkownika w serii stosowanych wcześniej kontroli pozytywnych i negatywnych.

O ile nie wskazano inaczej, wszystkie etapy należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej (25 °C).

1. Ściąć i zamknąć skrawki na szkiełkach pokrytych odpowiednim klejem tkankowym.
2. Odparafinować skrawki w ksylenu lub zamiennikach ksylenu.
3. Ponownie nawodnić, używając malejącego szeregu alkoholi.
4. Wypłukać preparaty w bieżącej wodzie z kranu.
5. Wykonać odmaskowywanie epitopu zgodnie z wymaganiami (zob. **Zalecenia dotyczące stosowania** dla przeciwciała pierwszorzędowego).
6. Przepłukać preparaty w dejonizowanej wodzie.
7. Zneutralizować endogenną peroksydazę, stosując Peroxidase Block RE7101 przez 5 minut.
8. Przemycać w TBS (roztworze soli fizjologicznej buforowanej odczynnikiem Tris) przez 2 x 5 minut.
9. Inkubować w Protein Block RE7102 przez 5 minut.
10. Przemycać w TBS (roztworze soli fizjologicznej buforowanej odczynnikiem Tris) przez 2 x 5 minut.
11. Inkubować z optymalnie rozcieńczonym przeciwciałem pierwszorzędowym (zob. **Zalecenia dotyczące stosowania** dla przeciwciała pierwszorzędowego).
12. Przemycać w TBS (roztworze soli fizjologicznej buforowanej odczynnikiem Tris) przez 2 x 5 minut.
13. Inkubować z Biotinylated Secondary Antibody RE7103 przez 30 minut.
14. Przemycać w TBS (roztworze soli fizjologicznej buforowanej odczynnikiem Tris) przez 2 x 5 minut.
15. Inkubować ze Streptavidin-HRP RE7104 przez 30 minut.

16. Przemycać w TBS (roztworze soli fizjologicznej buforowanej odczynnikiem Tris) przez 2 x 5 minut, delikatnie potrząsaając.
17. Rozwijać aktywność peroksydazy przy pomocy roztworu roboczego DAB (zob. **DAB Working Solution**) przez 5 minut.
18. Przepłukać preparaty w wodzie.
19. Przeprowadzić barwienie kontrastowe przy użyciu Hematoxylin RE7107.
20. Płukać preparaty w wodzie przez 5 minut.
21. Skrawki odvodnić, oczyścić i zamknąć.

DAB Working Solution

Dodać 50µl DAB Chromogen RE7105 do 1ml DAB Substrate Buffer RE7106. Zużyć w ciągu sześciu godzin od przygotowania.

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/przeciwciał pierwszorzędowych powinien uwzględniać jedną tkankową kontrolę pozytywną. Do optymalnej kontroli jakości i do wykrywania niewielkich poziomów degradacji odczynników bardziej nadaje się tkanka o słabym barwieniu pozytywnym niż tkanka o silnym barwieniu pozytywnym.⁴ 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 epitopu 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 nieuszkodzonych komórek. Komórki martwiczce lub zdegenerowane często powodują barwienie niespecyficzne.⁵ 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), peroksydaza endogenna (cytochrom C) lub endogenna biotylna⁶ (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 lub preparatem Streptavidin-HRP i substratem-chromogenem. Jeśli w trakcie tkankowej kontroli negatywnej nastąpi barwienie niespecyficzne, wyniki testu przeprowadzonego na próbkach pobranych od pacjenta należy uznać za nieważne.

Negatywna kontrola odczynnika

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

Tkanka pacjenta

Wybarwione próbki pobrane od pacjenta należy zbadać na końcu. Intensywność barwienia pozytywnego należy oceniać w kontekście ewentualnego barwienia niespecyficznego tła podczas negatywnej kontroli odczynnika. Tak jak we wszystkich innych badaniach immunohistochemicznych wynik ujemny oznacza, że epitop nie został wykryty, co jednak nie oznacza, że jest on nieobecny w badanych komórkach/tkankach. W razie konieczności do identyfikacji reakcji fałszywie negatywnych należy wykorzystać 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.⁷

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.

Systemy Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K lub RE7120-K są przeznaczone do skrawków zatopionych w parafinie o określonych wymagach dotyczących utrwalania. Może wystąpić nieoczekiwana ekspresja epitopu, szczególnie w przypadku nowotworów. Interpretacja kliniczna wybarwionych skrawków musi obejmować analizę morfologiczną oraz ocenę przeprowadzoną w ramach odpowiednich kontroli.

Charakterystyka działania

Skuteczność Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 testów)/ (500 testów) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 została skontrolowana przy użyciu szeregu przeciwciał pierwszorzędowych mysich IgG, mysich IgM oraz króliczych Novocastra™.

Produkty zachowują stabilność do upływu dat(y) ważności umieszczonej(-nych) na etykiecie.

Bibliografia

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Nie dotyczy.

Data publikacji

19 lutego 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Kataloška številka: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Kataloška številka: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Kataloška številka: RE7104

Predvidena uporaba

Za diagnostično uporabo *in vitro*.

Izdelka Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K in (500 tests) RE7120-K sta namenjena vizualizaciji primarnih protiteles proti mišjim IgG, mišjim IgM in kunčjim IgG. Novocastra™ DAB (250 Slides) Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 so reagenti v teh sistemih, ki so namenjeni uporabi po spodaj opisanem postopku. Klinično razlago obarvanja ali odsotnosti le-tega morajo dopoljevati morfološke študije ustreznih kontrolnih vzorcev, ki jih v okviru klinične anamneze bolnika in drugih diagnostičnih testov oceni usposobljen patolog.

Načelo postopka

O prvi imunski tehniki s peroksidazo sta poročala Nakane in Pierce.¹ Od takrat se je metoda večkrat izboljšala, kar je pripeljalo do imunskih postopkov s peroksidazo, ki se ponavadi uporabljajo danes. Sistema Novocastra™ Peroxidase Detection System temeljita na tehniki, ki jo je opisal Guesdon.² Ta izdelka se uporabljata pri imunohistokemijskem (IHC) postopku, ki omogoča kvalitativno svetlobno-mikroskopsko identifikacijo epitopov v rezinah tkiva, fiksiranega s formalinom in vstavljenega v parafin, z zaporednimi koraki in vmesnimi koraki izpiranja.

Če to zahteva primarno protiteleso, morate na rezinah pred barvanjem izvesti pridobivanje epitopov. Aktivnost endogene preoksidaze nevtralizira blokator Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Temu sledi uporaba blokatorja Novocastra™ Protein Block RE7102, ki zmanjša nespecifično vezavo primarnih in sekundarnih protiteles. Rezino nato inkubirate z optimalno razredčenim primarnim protitelesom. Za zaznavanje vseh primarnih protiteles, vezanih na tkivo, se uporablja izdelek Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103, formulacija sekundarnega protitelesa, konjugiranega z biotinom, ki prepozna mišje in kunčje imunoglobuline. Nato je treba dodati izdelek Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, konjugat streptavidina in peroksidaze, ki se veže na biotin na sekundarnih protitelesih. Rezine je treba nato dodatno inkubirati s substratom/kromogenom, 3,3'-diaminobenzidinom (DAB), pripravljenim iz izdelkov Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 in Novocastra DAB™ Substrate Buffer RE7106, kot je opisano spodaj. Pri reakciji, ki jo katalizira peroksidaza nastane vidna rjava oborina na mestu epitopa. Rezine nasprotno obarvajte z izdelkom Novocastra™ Hematoxylin RE7107 in pokrijte s krovnim stekelcem. Rezultate nato obdelamo s pomočjo svetlobnega mikroskopa in jih uporabimo pri diferencialni diagnozi patološko-fizioloških procesov, ki so morda povezani z določenim epitopom ali pa tudi ne.

Priloženi reagenti

Podrobnosti o teh reagentih z naslednjega seznama, ki so priloženi posameznim izdelkom, so navedene v spodnji preglednici.

1. Peroxidase Block RE7101. 3-4% vodikov peroksid.
2. Protein Block RE7102. 0,4 % kazeina v fiziološki raztopini s fosfatnim pufrom in stabilizatorji, površinsko aktivnim sredstvom in 0,2 % Bronidox L kot konzervansom.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Afinitetno prečiščena kozja protitelesa proti mišjim IgM (5 µg/ml), konjska protitelesa proti mišjim IgG (10,5 µg/ml) in konjska protitelesa proti kunčjim IgG (10,5 µg/ml) v fiziološki raztopini s pufrom tris s stabilizatorjem za beljakovine in 0,35 % ProClin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 do 1,4 µg/ml v fiziološki raztopini s pufrom tris s stabilizatorjem za beljakovine in 0,35 % ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74 % m/v 3,3'-diaminobenzidin v raztopini stabilizatorja.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Pufrena raztopina, ki vsebuje ≤0,1 % vodikovega peroksida in konzervans.
7. Hematoxylin RE7107 <0,1-% hematoksiilin.

Reagent	Šifra izdelka	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml	1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3ml	1 x 3ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	2 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml	

Rekonstitucija, mešanje, redčenje, titracija

Raztopine Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 in Hematoxylin RE7107 so predhodno razredčene. Rekonstitucija, mešanje, redčenje ali titracija teh reagentov niso potrebni. Nadaljnje redčenje lahko privede do neobarvanja epitopov. Uporabnik mora potrditi vsako takšno spremembo.

Izdelek DAB Chromogen RE7105 je treba pred uporabo razredčiti v razmerju 1/20 v izdelku DAB Substrate Buffer RE7106. Nadaljnje redčenje lahko privede do neobarvanja epitopov. Uporabnik mora potrditi vsako takšno spremembo.

Shranjevanje in stabilnost

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

Priprava vzorcev

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

Opozorila in previdnostni ukrepi

Varnostni list je na voljo na zahtevo ali na spletnem mestu www.LeicaBiosystems.com.

Za poklicne uporabnike.

Ne mešajte reagentov različnih sistemov za zaznavanje.

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.³

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 okužbe reagentov, saj lahko povzroči nespecifično barvanje. Če uporabite čas ali temperature inkubacije, ki se razlikujejo od navedenih, lahko pridobite napačne rezultate. Uporabnik mora validirati morebitne spremembe.

Postopek

A. Potrebni reagenti, ki niso priloženi

1. Standardna topila, ki se uporabljajo v imunohistokemiji.
2. Fiziološka raztopina s 50 mM pufra tris (TBS) pH 7,6.
3. Raztopine za pridobivanje epitopa.
4. Raztopine za pridobivanje z encimi.
5. Redčilo za protitelesa.
6. Primarno protiteleso.
7. Medij za pritrjevanje.

B. Potrebna oprema, ki ni priložena

1. Oprema, potrebna za pridobivanje epitopa, če je priporočljiva za primarno protiteleso.
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 in sistema za zaznavanje mora uporabnik validirati na vrsti znanih pozitivnih in negativnih kontrol.

Vse korake izvajajte pri sobni temperaturi (25 °C), razen če je navedeno drugače.

1. Odrežite in namestite rezine na objektna stekelca, prevlečena z ustreznim lepilom za tkivo.
2. Odstranite parafin iz rezin s ksilenom ali nadomestkom za ksilen.
3. Rehidrirajte skozi vrsto raztopin alkohola.
4. Izperite preparate pod tekočo vodo.
5. Pridobivanje epitopa izvedite kot je zahtevano (glejte **priporočila za uporabo** primarnega protitelesa).
6. Preparate operite v deionizirani vodi.
7. Neutralizirajte endogeno peroksidazo z izdelkom Peroxidase Block RE7101 5 minut.
8. Izpirajte v TBS 2 X 5 minut.
9. Inkubirajte 5 minut z izdelkom Protein Block RE7102.
10. Izpirajte v TBS 2 X 5 minut.
11. Inkubirajte z optimalno razredčenim primarnim protitelesom (glejte **priporočila za uporabo** primarnega protitelesa).
12. Izpirajte v TBS 2 X 5 minut.
13. Inkubirajte 30 minut z izdelkom Biotinylated Secondary Antibody RE7103.
14. Izpirajte v TBS 2 X 5 minut.
15. Inkubirajte 30 minut z izdelkom Streptavidin-HRP RE7104.
16. Izpirajte v pufru TBS 2 x 5 minut in pri tem nežno stresajte.
17. Razvijajte aktivnost peroksidaze z delovno raztopino DAB 5 minut (glejte poglavje **Delovna raztopina DAB**).
18. Izperite preparate v vodi.
19. Kontrastno barvajte s sredstvom Hematoxylin RE7107.
20. Izpirajte preparate v vodi 5 minut.
21. Dehidrirajte, očistite in pritrdite rezine.

Delovna raztopina DAB

Dodajte 50 µl izdelka DAB Chromogen RE7105 v 1 ml izdelka DAB Substrate Buffer RE7106. Uporabite v šestih urah po pripravi.

Kontrola kakovosti

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

Pozitivni kontrolni vzorci tkiva

Uporabite jih za opredelitev pravilno pripravljenih tkiv in ustreznih tehnik barvanja. Pri vsakem postopku barvanja morate vsakemu sklopu preizkusnih pogojev/primarnega protitelesa dodati en pozitiven kontrolni vzorec tkiva. Za kar najboljšo kontrolo kakovosti in boljše zaznavanje manjših stopenj razkroja reagenta je tkivo s šibkim pozitivnim obarvanjem bolj primerno kot tkivo z močnim pozitivnim obarvanjem.⁴ 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 testiranju pozitivnih kontrolnih vzorcev tkiva, da preverite specifičnost označevanja ciljnega epitopa s primarnim protitelesom. 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.⁵ Lažna pozitivni rezultati se lahko pojavijo zaradi ne-immunološke vezave beljakovin ali produktov reakcije substrata. Povzročijo jih lahko tudi endogeni encimi, kot so psevdoperoksidaza (eritrociti), endogena peroksidaza (citokrom C) ali endogeni biotin⁶ (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 ali streptavidin-HRP in kombinacijo 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 mestu epitopa 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 epitop ni bil zaznan, ne pa tudi odsotnosti epitopa 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.⁷

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.

Izdelka Novocastra™ Peroxidase Detection System RE7110-K ali RE7120-K sta namenjena uporabi pri rezinah, vstavljenih v parafin, s specifičnimi zahtevami za fiksacijo. Lahko pride do nepričakanega izražanja epitopa, zlasti pri neoplazmah. Pri klinični razlagi obarvane rezine tkiva morate upoštevati morfološko analizo in oceno ustreznih kontrol.

Značilnosti učinkovitosti

Učinkovitost sistemov za zaznavanje Novocastra™ Peroxidase Detection System (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 so validirali z nizom primarnih protiteles proti mišjim IgG, mišjim IgM in kunčjim IgG Novocastra™.

Izdelki so stabilni do datuma izteka roka uporabnosti, ki je natisnjen na oznaki izdelka.

Literatura

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji

Navedba smiselno ni potrebna.

Datum izdaje

19 februar 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Č. výrobku: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Č. výrobku: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Č. výrobku: RE7104

Zamýšlené použití

Pro diagnostické použití in vitro.

Detekční systémy Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K a (500 tests) RE7120-K jsou určeny k vizualizaci primárních protilátek myší IgG, myší IgM a králíčí IgG. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 představují součásti těchto systémů, které jsou určeny k níže popsaným postupům. Klinickou interpretaci jakéhokoli barvení nebo jeho nepřítomnosti je nutné doplnit morfologickým vyšetřením s použitím správných kontrol a zhodnotit je musí kvalifikovaný patolog v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a jinými diagnostickými testy.

Princip metody

První imunoperoxidázovou techniku zveřejnil Nakane a Pierce¹. Od té doby došlo k velkému vývoji, díky kterému se dnes běžně využívá mnoho imunoperoxidázových technik. Systémy Novocastra™ Peroxidase Detection Systems jsou založeny na technice popsané Guesdonem.² Tyto produkty se používají v rámci postupu imunohistochemického (IHC) barvení, který umožňuje kvalitativní identifikaci epitopů světelnou mikroskopii ve tkáni fixované formalíнем a zalité v parafínu prostřednictvím sekvenčních kroků s interponovanými omývacími kroky.

Pokud je to požadováno pro primární protilátku, řezy podstoupí před barvením odmaskování epitopu. Aktivita endogenní peroxidázy se neutralizuje pomocí reagentie Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Následuje použití reagentie Novocastra™ Protein Block RE7102 za účelem redukce vzniku nespecifických vazeb primárních a sekundárních protilátek. Tkáň je postupně inkubována s optimálně zředěnou primární protilátkou. Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103, biotinem konjugovaná sekundární protilátka, která rozpoznává myší a králíčí imunoglobulin, se používá k detekci primárních protilátek navázaných na tkáň. Poté se použije Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, konjugát streptavidinu s peroxidázou, který se naváže na biotin přítomný na sekundární protilátce. Řezy se dále inkubují v substrátu/chromogenu, 3,3' diaminobenzidinu tetrahydrochloridu (DAB), připraveném z roztoku Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 a substrátového pufru Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106, jak je popsáno níže. Reakce katalyzovaná peroxidázou vytváří viditelný hnědý precipitát v místě epitopu. Řezy se kontrastně barví produktem Novocastra™ Hematoxylin RE7107 a překryjí se krycím sklíčkem. Výsledky se interpretují ve světelném mikroskopu; jsou pomůckou v diferenciální diagnostice patofyziologických procesů, které mohou, ale nemusí, souviset s příslušným antigenem.

Dodávané reagentie

Podrobnosti o reagentiích z následujícího seznamu, který je dodáván ke každému produktu, jsou uvedeny v tabulce níže.

1. Peroxidase Block RE7101. 3–4% peroxid vodíku.
2. Protein Block RE7102. 0,4% kasein ve fosfátém pufovaném fyziologickém roztoku, se stabilizátory, surfaktantem a jako konzervační prostředek obsahující 0,2% Bronidox L.
3. Biotinylated Secondary Antibody RE7103. Afinityně purifikovaná koží anti-myší IgM (5 µg/ml), koňská anti-myší IgG (10,5 µg/ml) a koňská anti-králíčí IgG (10,5 µg/ml) ve fyziologickém roztoku pufovaném roztokem tris-pufu se stabilizátorem proteinu a 0,35% ProClin™ 950.
4. Streptavidin-HRP RE7104. 1 až 1,4 µg/ml ve fyziologickém roztoku pufovaném roztokem tris-pufu se stabilizátorem proteinu a 0,35% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74% obj. 3,3' diaminobenzidinu, ve stabilizačním roztoku.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Pufovaný roztok obsahuje ≤ 0,1 % peroxidu vodíku a konzervační prostředek.
7. Hematoxylin RE7107 <0,1% hematoxylin.

Reagenční	Číslo výrobku	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml	1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3ml	1 x 3ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	2 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml	

Rekonstituce, Míchání, Ředění, Titrace

Roztoky Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103 Streptavidin-HRP RE7104 a Hematoxylin RE7107 jsou předředěné. Rekonstituce, míchání, ředění ani titrace těchto reagensů nejsou doporučeny. Další ředění může vést k ztrátě barvení epitopu. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

DAB Chromogen RE7105 vyžaduje před použitím ředění 1/20 v substrátovém pufru DAB Substrate Buffer RE7106. Další ředění může vést k ztrátě barvení epitopu. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

Skladování a stabilita

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

Příprava vzorku

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

Varování a bezpečnostní opatření

Bezpečnostní list materiálu je k dispozici na požádání nebo na webu www.LeicaBiosystems.com

Pro profesionální uživatele.

Nemíchejte reagensy z různých detekčních systémů.

Se vzorky, před fixací i po fixaci, a se všemi materiály, které s nimi přišly do kontaktu, je nutno zacházet, jako by mohly přenášet infekci, a zlikvidovat je s použitím příslušných bezpečnostních opatření.³

Nikdy reagensy nepipetujte ústy a zabraňte kontaktu reagensů a vzorků s kůží a sliznicemi. Pokud se reagensy nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody.

Údaje o likvidaci jakýchkoli potenciálně toxických komponent prostudujte ve federálních, státních nebo místních nařízeních.

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

Postup

A. Potřebné reagensy, které nejsou součástí dodávky

1. Standardní rozpouštědla používaná v imunohistochemii.
2. Fyziologický roztok pufovaný 50mM roztokem tris-pufu (TBS), pH 7,6.
3. Odmaskovací roztok (roztoky) pro enzym.
4. Odmaskovací roztok (roztoky) pro enzym.
5. Ředící roztok na protilátky.
6. Primární protilátka.
7. Fixační médium.

B. Potřebné vybavení, které není dodáno

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

Metodika

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

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

Pokud není uvedeno jinak, provádějí se všechny kroky při pokojové teplotě (25 °C).

1. Řezy nakrájejte a namontujte na podložní skříčka potažená vhodným tkáňovým lepidlem.
2. Řezy deparafinujte xylenem nebo látkou nahrazující xylem.
3. Rehydratujte alkoholem v odstupňované koncentraci.
4. Skříčka omyjte tekoucí vodou z vodovodu.
5. Proveďte odmaskování epitopu (viz **Doporučení k použití** primární protilátky).
6. Skříčka omyjte deionizovanou vodou.
7. Endogenní peroxidázu neutralizujte pomocí Peroxidase Block RE7101 po dobu 5 minut.
8. Omyvejte v TBS po dobu 2 x 5 minut.
9. Inkubujte s Protein Block RE7102 po dobu 5 minut.
10. Omyvejte v TBS po dobu 2 x 5 minut.
11. Inkubujte v optimálně naředěné primární protilátce (viz **Doporučení k použití** primární protilátky).
12. Omyvejte v TBS po dobu 2 x 5 minut.
13. Inkubujte s Biotinylated Secondary Antibody RE7103 po dobu 30 minut.
14. Omyvejte v TBS po dobu 2 x 5 minut.
15. Inkubujte s reagensí Streptavidin-HRP RE7104 po dobu 30 minut.
16. Omyvejte v pufru TBS po dobu 2 x 5 minut s lehkým kýváním.
17. Pomocí pracovního roztoku 3,3' diaminobenzidinu tetrahydrochloridu (DAB) vyvolejte aktivitu peroxidázy (viz **DAB Working Solution**) po dobu 5 minut.
18. Skříčka opláchněte ve vodě.
19. Proveďte kontrastní barvení hemtaoxylinem Hematoxylin RE7107.
20. Skříčka oplachujte vodou po dobu 5 minut.
21. Řezy odvodněte, projasněte a namontujte.

DAB Working Solution

Přidejte 50 µl reagentie DAB Chromogen RE7105 do 1 ml substrátového pufru DAB Substrate Buffer RE7106. Použijte do šesti hodin po přípravě.

Kontrola jakosti

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

Positivní tkáňová kontrola

Používá se k průkazu správně připravených tkání a správných barvicích technik. V každém barvicím cyklu musí být použita jedna pozitivní tkáňová kontrola pro každý soubor testovacích podmínek/primárních protilátek. Pro optimální kontrolu jakosti a k detekci menšího stupně degradace reagentie je vhodnější tkáň se slabým pozitivním barvením než tkáň se silným pozitivním barvením.⁴

Doporučená pozitivní tkáňová kontrola je stanovena v návodu k použití primární protilátky. Pokud pozitivní tkáňová kontrola nevykazuje pozitivní barvení, musí být výsledky testovaných vzorků považovány za neplatné.

Negativní tkáňová kontrola

Musí být vyšetřena po pozitivní tkáňové kontrole k ověření specificity označení cílového epitopu primární protilátkou. Doporučená negativní tkáňová kontrola je stanovena v návodu k použití primární protilátky. Alternativně často představuje místa negativní kontroly řada různých typů buněk přítomných ve většině tkáňových řezů, to ale musí uživatel validovat. Nespecifické barvení, je-li přítomno, má obvykle difúzní vzhled. V řezech ze tkání nadměrně fixovaných formalinem může být také zjištěno sporadické barvení pojivové tkáně. K interpretaci výsledků barvení použijte neporušené buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky se často barví nespecificky.⁵ Falešně pozitivní výsledky mohou být důsledkem neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakčního substrátu. Mohou být také způsobeny endogenními enzymy, jako je např. pseudoperoxidáza (erythrocyty), endogenní peroxidáza (cytochrom C) nebo endogenní biotin⁶ (např. játra, prs, mozek, ledviny). K odlišení aktivity endogenních enzymů či nespecifické vazby enzymů od specifické imunoreaktivity mohou být barveny další tkáně pacienta vylučně chromogenním substrátem, Streptavidin-HRP nebo značeným polymerem a chromogenním substrátem, v tomto pořadí. Pokud dojde v negativní tkáňové kontrole ke specifickému barvení, musí být výsledky vzorků pacienta považovány za neplatné.

Negativní reagenční kontrola

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

Tkáň pacienta

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

Omezení

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

Barvení tkáně závisí na manipulaci s tkání a jejím zpracování před barvením. Nesprávným postupem při fixaci, zmrazení, omývání, sušení, zahřívání, krájení řezů nebo kontaminací jinými tkáněmi či tekutinami mohou vzniknout artefakty, může dojít k vychytávání protilátek nebo k falešně negativním výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem odchylek ve fixačních metodách a metodách zalití v konzervačním médiu, nebo přirozených odchylek ve tkání.⁷

Nadměrné nebo nedostatečné kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.

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

Roztoky Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K nebo RE7120-K jsou určeny k použití s řezy zalitými v parafinu se specifickými fixačními požadavky. Může dojít k expresi neočekávaných epitopů, zejména u nádorů. Klinická interpretace jakéhokoliv barveného tkáňového řezu musí zahrnovat morfoloogickou analýzu a zhodnocení příslušných kontrol.

Vlastnosti výkonu

Výkonnost systémů Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 byla validována pomocí řady primárních protilátek Novocastra™ (myši IgG, myši IgM a králíci IgG).

Tyto produkty jsou stabilní až do datumu expirace uvedeného na štítcích výrobků.

Literatura

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Opravy předchozího vydání

Nevztahuje se.

Datum vydání

19 únor 2020

Peroxidase Detection System (250 tests)

Č. produktu: RE7110-K

Peroxidase Detection System (500 tests)

Č. produktu: RE7120-K

Streptavidin-HRP

Č. produktu: RE7104

Zamýšľané použitie

Na diagnostické použitie in vitro.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests) RE7110-K a (500 tests) RE7120-K sú určené na vizualizáciu primárnych protilátok myšiacich IgG, myšiacich IgM a králičích IgG. Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 sú komponentné činidlá týchto systémov, ktoré sú určené na použitie pri postupoch opísaných nižšie. 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

Prvú techniku použitím imunoperoxidázy zverejnili Nakane a Pierce¹ a odvtedy bolo vyvinutých mnoho ďalších techník, ktoré viedli k tomu, že v súčasnosti sa bežne používajú techniky založené na imunoperoxidáze. Systémy Novocastra™ Peroxidase Detection Systems sú založené na technike, ktorú opísal Guesdon.² Tieto produkty sa používajú pri imunohistochemických (IHC) postupoch, ktoré použitím svetelnej mikroskopie umožňujú kvalitatívnu identifikáciu epitopov v rezoch tkaniva zaliateho do parafínu a fixovaného formalínom prostredníctvom postupných krokov s medzikrokmí umývania.

Ak si to primárna protilátka vyžaduje, jednotlivé rezy sa pred zafarbením vystavia záchytu epitopov. Aktivita endogénnej peroxidázy je neutralizovaná použitím prípravku Novocastra™ Peroxidase Block RE7101. Nasleduje použitie prípravku Novocastra™ Protein Block RE7102 na redukciu nespecifickej väzby primárnych a sekundárnych protilátok. Tento rez sa následne inkubuje s optimálne zriedenou primárnou protilátkou. Novocastra™ Biotinylated Secondary Antibody RE7103 je biotínom konjugovaná sekundárna protilátka, ktorá rozpoznáva myšacie a králičie imunoglobulíny a slúži na detekciu primárnych protilátok viazaných na tkanivo. Následne sa použije streptavidín-peroxidázový konjugát Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104, ktorý sa naviaže na biotín prítomný v sekundárnej protilátke. Rezy sa ďalej inkubujú použitím substrátu/chromogénu, 3,3'-diaminobenzidínu (DAB), pripraveného z prípravkov Novocastra™ DAB Chromogen RE7105 a Novocastra™ DAB Substrate Buffer RE7106 podľa popisu nižšie. Katalytická reakcia pomocou peroxidázy vytvára viditeľnú hnedú zrazeninu na mieste epitopu. Rezy sa kontrastne zafarbia použitím prípravku Novocastra™ Hematoxylin RE7107 a zakryjú krycím sklíčkom. Výsledky sa interpretujú pomocou svetelného mikroskopu a napomáhajú pri diferenciálnej diagnostike patofyziologických procesov, ktoré môžu, ale nemusia byť spojené s konkrétnym epitopom.

Dodané činidlá

Podrobné údaje o činidlách uvedených v nasledujúcom zozname dodávanom ku každému produktu sú uvedené v tabuľke nižšie.

1. Peroxidase Block RE7101. 3 – 4 % peroxid vodíka.
2. Protein Block RE7102. 0,4 % kazeín v roztoku chloridu sodného pufovaného fosfátom, so stabilizátormi, surfaktantom a 0,2 % Bronidoxom L ako konzervačnou látkou.
3. Sekundárna biotinylovaná protilátka (Biotinylated Secondary Antibody) RE7103 Príbuzné prečistené kozie myšacie IgM (5 µg/ml), kónské myšacie IgG (10,5 µg/ml) a kónské králičie IgG (10,5 µg/ml) v tris-pufovanom fyziologickom roztoku s proteínovým stabilizátorom a 0,35 % prípravkom ProClin™ 950.
4. Streptavidín-HRP RE7104. 1 až 1,4 µg/ml v tris-pufovanom fyziologickom roztoku s proteínovým stabilizátorom a 0,35 % prípravkom ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen RE7105. 1,74 % w/v 3,3'-diaminobenzidín v roztoku stabilizátora.
6. DAB Substrate Buffer RE7106. Pufovaný roztok s obsahom ≤ 0,1 % peroxidu vodíka a konzervačného prípravku.
7. Hematoxylin RE7107 <0,1 % hematoxylin.

Činidlo	Číslo produktu	Peroxidase Detection System (250 tests) RE7110-K	Peroxidase Detection System (500 tests) RE7120-K	Streptavidin-HRP RE7104
Peroxidase Block	RE7101	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Protein Block	RE7102	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Biotinylated Secondary Antibody	RE7103	1 x 25 ml	2 x 25 ml	
Streptavidin-HRP	RE7104	1 x 25 ml	2 x 25 ml	1 x 25 ml
DAB Chromogen	RE7105	1 x 3ml	1 x 3ml	
DAB Substrate Buffer	RE7106	1 x 30ml	2 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107	1 x 25 ml	2 x 25 ml	

Rekonštitúcia, miešanie, riedenie, titrácia

Roztoky Peroxidase Block RE7101, Protein Block RE7102, Biotinylated Secondary Antibody RE7103, Streptavidin-HRP RE7104 a Hematoxylin RE7107 sú vopred zriedené. Rekonštitúcia, miešanie, riedenie ani titrácia týchto činidiel sa neodporúčajú. Ďalšie zriedenie môže viesť k strate zafarbenia epitopu. Každú takúto zmenu musí validovať používateľ.

DAB Chromogen RE7105 vyžaduje pred použitím zriedenie 1/20 s prípravkom DAB Substrate Buffer RE7106. Ďalšie zriedenie môže viesť k strate zafarbenia epitopu. Každú takúto zmenu musí validovať používateľ.

Ukladenie a stabilita

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

Príprava vzorky

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

Varovania a bezpečnostné opatrenia

Materiálový bezpečnostný list je k dispozícii na požiadanie alebo na stránkach www.LeicaBiosystems.com

Určené pre odborníkov.

Nemiešajte činidlá z rôznych detekčných systémov.

So vzorkami pred fixáciou a po nej a všetkými materiálmi, ktoré s nimi prišli do kontaktu, je nutné manipulovať ako s potenciálne infekčnými a zlikvidovať ich pri dodržaní zodpovedajúcich bezpečnostných opatrení.³

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 nespecifického zafarbenia. Nedodržanie predpísaných inkubačných dôb alebo teplôt môže viesť k nesprávnym výsledkom. Všetky takéto zmeny si vyžadujú validáciu používateľom.

Postup

A. Požadované, ale nedodávané činidlá

1. Štandardné rozpúšťadlá používané v imunohistochemii
2. 50 mM tris-pufovaný fyziologický roztok (TBS), pH 7,6.
3. Epitopový záchytný roztok (roztoky).
4. Enzymatický záchytný roztok (roztoky).
5. Zriedovadlo protilátok
6. Primárna protilátka
7. Upevňovacie médium

B. Požadované, ale nedodávané vybavenie

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

C. Metóda

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

Používateľ musí validovať kombináciu primárnej protilátky a jej riedenia spolu s detekčným systémom na rade známych pozitívnych a negatívnych kontrol.

Ak nie je uvedené inak, všetky kroky sa vykonávajú pri izbovej teplote (25 °C).

1. Rezy narežte a upevnite na sklíčka pokryté vhodnou vrstvou tkanivového lepidla.
2. Rezy deparafinizujte v xyléne alebo substitútoch xylénu.
3. Reehydratujte pomocou odstupňovaných alkoholov.
4. Sklíčka umyte pod tečúcou vodou z vodovodu.
5. Vykonajte požadovaný záchyt epitopu (pozrite si časť **Odporúčania na použitie** pre primárnu protilátku).
6. Sklíčka umyte v deionizovanej vode.
7. Pomocou prípravku Peroxidase Block RE7101 neutralizujte endogénnu peroxidázu po dobu 5 minút.
8. Premyte v TBS 2-krát po 5 minút.
9. Inkubujte 5 minút s prípravkom Protein Block RE7102.
10. Premyte v TBS 2-krát po 5 minút.
11. Inkubujte s optimálne zriedenou primárnou protilátkou (pozrite si časť **Odporúčania na použitie** pre primárnu protilátku).
12. Premyte v TBS 2-krát po 5 minút.
13. Inkubujte 30 minút s prípravkom Biotinylated Secondary Antibody RE7103.
14. Premyte v TBS 2-krát po 5 minút.
15. Inkubujte 30 minút s prípravkom Streptavidin-HRP RE7104.
16. Premyte v prípravku TBS 2-krát po 5 minút pri miernom premiešavaní.
17. Vyviňte aktivitu peroxidázy s pracovným roztokom DAB (pozrite si časť **Pracovný roztok DAB**) na 5 minút.
18. Sklíčka opláchnite vo vode.
19. Sklíčka kontrastne zafarbte prípravkom Hematoxylin RE7107.
20. Sklíčka 5 minút oplachujte vo vode.
21. Dehydratujte, očistite a upevnite rezy.

Pracovný roztok DAB

Pridajte 50 µl prípravku DAB Chromogen RE7105 do 1 ml prípravku DAB Substrate Buffer RE7106. Použite do šiestich hodín od prípravy.

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/biopsické/chirurgické vzorky fixované čo najskôr formálnom a spracované zaliatím do parafínu rovnakým spôsobom ako vzorky pacienta.

Pozitívna kontrola tkanivom

Identifikuje správne pripravené tkanivá a správne techniky zafarbenia. Každá súprava testových podmienok/prímárnej 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.⁴ 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 epitopu 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 používateľom. Prípadné nešpecifické farbenie má obvykle difúzny vzhľad. V rezoch tkanív silne fixovaných formálnom môže byť pozorované sporadické farbenie spojiva. Na interpretáciu výsledkov farbenia používajte intaktné bunky. Nekrotické alebo degenerované bunky sa často farbja nešpecificky.⁵ 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 biotínom⁶ (napr. pečene, 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 alebo prípravkom Streptavidin-HRP a 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 epitopu.

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 epitop nebol detegovaný. Nepotvrzuje 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 nepravidelnosťami v tkanive.⁷

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.

Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K alebo RE7120-K sú určené na použitie na rezoch zaliatých do parafínu so špecifickými požiadavkami na fixáciu. Najmä pri neopláziách môže dôjsť k nečakanej expresii epitopu. Klinická interpretácia akýchkoľvek farbených tkanivových rezov musí zahŕňať morfológickú analýzu a vyhodnotenie zodpovedajúcich kontrol.

Parametre výkonu

Výkonnosť systémov Novocastra™ Peroxidase Detection Systems (250 tests)/ (500 tests) RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Streptavidin-HRP RE7104 bola overená použitím série primárnych protilátok Novocastra™ myšacích IgG, myšacích IgM a králičích IgG. Tieto produkty sú stabilné do dátumu expirácie, ktorý je uvedený na štítku produktu.

Literatúra

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of Epitopes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1967; 14 :929-931.
2. Guesdon JL, Ternynck T and Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.1979; 27:1131.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL and Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Non-immunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface Epitope: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Úpravy predchádzajúceho vydania

Neuplatňuje sa.

Dátum vydania

19 február 2020

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