



BIO SYSTEMS

# Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Epidermal Growth Factor Receptor

**Product Code: NCL-L-EGFR**

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

## Instructions for Use

Please read before using this product.

## Mode d'emploi

À lire avant d'utiliser ce produit.

## Istruzioni per L'uso

Si prega di leggere, prima di usare il prodotto.

## Gebrauchsanweisung

Bitte vor der Verwendung dieses Produkts lesen.

## Instrucciones de Uso

Por favor, leer antes de utilizar este producto.

## Instruções de Utilização

Leia estas instruções antes de utilizar este produto.

## Instruktioner vid Användning

Var god läs innan ni använder produkten.

## Οδηγίες χρήσης

Παρακαλούμε διαβάστε τις οδηγίες πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν αυτό.

## Brugsanvisning

Læs venligst før produktet tages i brug.

## 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.

[www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)



# Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Epidermal Growth Factor Receptor

## Product Code: NCL-L-EGFR

### Intended Use

*For in vitro diagnostic use.*

NCL-L-EGFR is intended for the qualitative identification by light microscopy of Epidermal Growth Factor Receptor molecules in paraffin sections. 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

Immunohistochemical (IHC) staining techniques allow for the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody to the antigen (primary antibody), a secondary antibody to the primary antibody and an enzyme complex with a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained 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 antigen.

### Clone

EGFR.113

### Immunogen

Prokaryotic fusion protein corresponding to the external domain of the epidermal growth factor receptor molecule.

### Specificity

External domain of the human epidermal growth factor receptor.

### Reagent Composition

NCL-L-EGFR is a liquid tissue culture supernatant containing 15 mM sodium azide as a preservative.

### Ig Class

IgG2a

### Total Protein Concentration Total Protein

1.0–8.0 g/L. Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

### Antibody Concentration

Greater than or equal to 93.6 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

### Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:10–1:20 for 60 minutes at 25 °C. High temperature antigen retrieval using 0.01 M citrate retrieval solution (pH 6.0) is recommended. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

### 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 vial label. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

### Specimen Preparation

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

### Warnings and Precautions

This reagent has been prepared from the supernatant of cell culture. As it is a biological product, reasonable care should be taken when handling it.

The molarity of sodium azide in this reagent is 15 mM. A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request for sodium azide. Consult federal, state or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.<sup>1</sup> Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice.

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 changes must be validated by the user.

### Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures.

Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

## Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

One positive tissue control should be included for each set of test conditions in each staining run.

A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.<sup>2</sup>

Recommended positive control tissue is skin.

If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

## Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody. Recommended negative control tissue is cerebellum.

Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user.

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.<sup>3</sup> False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin (eg. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used. 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 enzyme complexes (avidin-biotin, streptavidin, labeled polymer) and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

## Negative Reagent Control

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

## Patient Tissue

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

## Results Expected

### Normal Tissues

Clone EGFR.113 detects the epidermal growth factor receptor antigen on the cell surface in a variety of normal tissues. Strong membrane staining was found in the basal cells of skin epidermis and in stratified squamous epithelium of cervix and tonsil. In the skin, eccrine and sebaceous glands were also positive. Immunostaining was observed in the pseudostratified columnar epithelium of the bronchi and the transitional epithelium of the urinary tract. Strong expression was observed in syncytiotrophoblasts of the placenta. Endometrial glands were also variably positive.

### Abnormal Tissues

Clone EGFR.113 stained a variety of neoplasias (n=67/132), including 9/12 bladder carcinomas, 17/18 squamous cell carcinomas, 18/32 breast carcinomas, 3/3 colorectal tumors, 2/4 prostate carcinomas, 6/12 lung adenocarcinomas, 2/2 endometrial carcinomas, 0/4 small cell lung carcinomas and 0/5 lymphomas. Cytoplasmic positivity may be observed in some tumors.

**NCL-L-EGFR is recommended for determining the epidermal growth factor receptor status of normal and neoplastic tissues.**

## General Limitations

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

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.<sup>4</sup>

Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

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

Antibodies from Leica Biosystems Newcastle Ltd are for use, as indicated, on either frozen or paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

## Bibliography - General

1. 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.
2. 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.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ et al. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. Journal of Clinical Pathology. 2003; 56(4):300–304.

6. Sriplakich S, Jahnsen S and Karlsson MG. Epidermal growth factor receptor expression: predictive value for the outcome after cystectomy for bladder cancer? *BJU Int.* 1999; 83(4):498–503.
7. Inoue K, Chikazawa M, Karashima T et al. Overexpression of c-Met/hepatocyte growth factor receptors in human prostatic adenocarcinoma. *Acta Med Okayama* 1998; 52(6):305–310.
8. Tungekar MF and Linehan J. Patterns of expressions of transforming growth factor and epidermal growth factor receptor in squamous cell lesions of the urinary bladder. *Journal of Clinical Pathology.* 1998; 51:583–587.

**Amendments to Previous Issue**

Not applicable.

**Date of Issue**

20 June 2008 (NCL-L-EGFR/CE/UK).

# Immunohistochemistry methodology for using Novocastra™ antibodies on paraffin-embedded tissue utilizing the high temperature antigen retrieval technique with ABC technique.

## A. Reagents required but not supplied

1. Standard solvents used in immunohistochemistry.
2. 0.5% v/v hydrogen peroxide.
3. 50 mM Tris-buffered saline (TBS) pH 7.6.
4. Antigen retrieval solution(s) - see Recommendations on Use.
5. Antibody diluent - optimally diluted normal serum.
6. Normal sera from the species in which the secondary antibody is raised.
7. Secondary biotinylated antibody - prepare as recommended by manufacturer.
8. Avidin/Biotin Complex-Horseradish peroxidase (ABC-HRP) - prepare as recommended by manufacturer.
9. 3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) - prepare as recommended by manufacturer.
10. Hematoxylin counterstain - prepare as recommended by manufacturer.
11. Mounting medium - use as recommended by manufacturer.

## B. Equipment required but not supplied

1. Incubator set to 25 °C.
2. Stainless Steel Pressure cooker (Novocastra™ recommends that the gaskets are changed at regular intervals to maintain optimum unmasking conditions).
3. General immunohistochemistry laboratory equipment.

### Safety Note

To ensure the correct and safe use of your pressure cooker, PLEASE READ THE MANUFACTURER'S INSTRUCTIONS.

## C. Antigen retrieval solutions (see Recommendations on Use)

### 0.01 M citrate retrieval solution (pH 6.0)

Add 3.84 grams Citric acid (anhydrous) to 1.8 L distilled water. Adjust to pH 6.0 using 1 M NaOH. Make up to 2 L with distilled water.

### 1 mM EDTA retrieval solution (pH 8.0)

Add 0.37 g EDTA (SIGMA product code E-5134) to 1 L of distilled water. Adjust pH to 8.0 using 0.1 M NaOH.

### 20 mM Tris/0.65 mM EDTA/0.0005% Tween 20 retrieval solution (pH 9.0)

Dissolve 14.4 g Tris (BDH product code 271197K) and 1.44 g EDTA (SIGMA product code E-5134) in 0.55 L distilled water. Adjust pH to 9 with 1 M HCl and add 0.3 mL Tween 20 (SIGMA product code P-1379). Make up to 0.6 L with distilled water. This is a 10x concentrate which should be diluted with distilled water as required (eg 0.15 L diluted with 1.35 L distilled water).

## D. Methodology

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

Customers should determine optimal dilutions for antibodies. 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. Neutralize endogenous peroxidase using 0.5% v/v hydrogen peroxide/methanol for 10 minutes.
5. Wash slides in running tap water.

Pretreat the sections as follows:

6. Heat 1.5 L of the recommended retrieval solution (see Recommendations on Use) until boiling in a pressure cooker. Cover but do not lock lid. Position slides into metal staining racks (do not place slides close together as uneven staining may occur) and lower into pressure cooker ensuring slides are completely immersed in retrieval solution. Lock lid. When the pressure cooker reaches operating temperature and pressure, time for 1 minute (unless otherwise indicated in Recommendations on Use). Remove pressure cooker from heat source and run under cold water with lid on. DO NOT OPEN LID UNTIL THE INDICATORS SHOW THAT PRESSURE HAS BEEN RELEASED. Open lid, remove slides and place immediately in cool tap water.
7. Wash sections in TBS for 1 x 5 minutes with gentle rocking.
8. Cover sections with diluted normal serum for 10 minutes.
9. Incubate sections with optimally diluted primary antibody (see Recommendations on Use).
10. Wash in TBS buffer for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
11. Incubate sections in appropriate biotinylated secondary antibody.
12. Wash in TBS buffer for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
13. Incubate slides in ABC-HRP.
14. Wash in TBS buffer for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
15. Incubate slides in DAB.
16. Rinse slides in water.
17. Counterstain with hematoxylin.
18. Dehydrate, clear and mount sections.

## E. Amendments to Previous Issue

Amendments have been made to layout only. No text has been altered from the previous issue.

## F. Date of Issue

4 February 2008 (CEprotocol/HTAUT).

# Novocastra™ Anticorps Monoclonal liquide de Souris

## Epidermal Growth Factor Receptor

### Référence du Produit: NCL-L-EGFR

#### Utilisation Prévue

*Diagnostic in vitro.*

Le NCL-L-EGFR est destiné à l'identification qualitative par microscopie optique de la molécule Epidermal Growth Factor Receptor sur des coupes en paraffine. 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

Les techniques de marquage immunohistochimique (IHC) permettent la visualisation des antigènes via l'application séquentielle d'un anticorps spécifique sur un antigène (anticorps primaire), d'un anticorps secondaire sur l'anticorps primaire et d'un complexe enzymatique comportant un substrat chromogène, avec des étapes de lavage intercalées. L'activation enzymatique du chromogène se traduit par la présence d'un produit de réaction visible au niveau du site de l'antigène. Le spécimen peut ensuite faire l'objet d'une coloration de contraste et être placé 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.

#### Clone

EGFR.113

#### Immunogène

Protéine procaryote de fusion correspondant au domaine externe de la molécule du récepteur du facteur de croissance épidermique.

#### Spécificité

Domaine externe du récepteur du facteur de croissance épidermique humain.

#### Composition du Réactif

Le NCL-L-EGFR est un surneigeant de culture tissulaire liquide contenant une solution d'azide de sodium 15 mM comme conservateur.

#### Classe d'Ig

IgG2a

#### Concentration Totale en Protéines Total Protein

1,0–8,0 g/l. La concentration totale en protéines, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

#### Concentration en Anticorps

Supérieure ou égale à 93,6 mg/l, déterminée par la méthode ELISA. La concentration totale en Ig, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

#### Recommandations d'utilisation

Immunohistochimie (voir **D. Méthodologie**) sur des coupes en paraffine. Dilution préconisée : 1:10–1:20 pendant 60 minutes à 25 °C. L'emploi d'une solution de citrate 0,01 M (pH 6,0) pour la restauration des antigènes à haute température est recommandé. Ceci n'est donné qu'à titre indicatif et les utilisateurs doivent déterminer leurs propres dilutions de travail optimales.

#### 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 récipient. Les conditions de conservation autres que celles qui sont spécifiées ci-dessus doivent faire l'objet d'une vérification par l'utilisateur.

#### Préparation des Spécimens

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

#### Mises en Garde et Précautions

Ce réactif a été préparé à partir du surneigeant d'une culture cellulaire. Du fait de sa nature de produit biologique, sa manipulation doit faire l'objet du plus grand soin.

Dans ce réactif, la molarité de l'azide de sodium est de 15 mM. Une fiche toxicologique (MSDS) relative à l'azide de sodium est disponible sur demande.

Consulter les réglementations nationales, régionales ou locales en vigueur relatives à l'élimination de tous les éléments potentiellement toxiques.

Les spécimens, avant et après fixation, ainsi que toutes les matières ayant été en contact avec eux, doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et être éliminés en respectant les précautions appropriées<sup>1</sup>. Ne jamais pipeter les réactifs avec la bouche et éviter tout contact des réactifs et des spécimens avec la peau et les membranes muqueuses. Rincer avec de grandes quantités d'eau en cas de contact des réactifs ou des spécimens avec des zones sensibles. Consulter un médecin.

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 doivent être validées par l'utilisateur.

## 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 de conditions d'analyse.

Un tissu présentant un marquage faiblement positif est plus adapté à un contrôle de qualité optimal qu'un tissu présentant un marquage fortement positif et il permet de détecter de moindres niveaux de dégradation du réactif.<sup>2</sup>

Le tissu de contrôle positif recommandé est la peau.

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.

Le cerveau constitue le tissu de contrôle négatif recommandé.

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

S'il est présent, le marquage non spécifique prend habituellement une apparence diffuse. Un marquage sporadique du tissu conjonctif peut également être observé sur des coupes de tissus qui ont été fixées par un excès de formol. Utiliser des cellules intactes pour l'interprétation des résultats du marquage. Les cellules nécrotiques ou dégénérées sont souvent marquées de façon non spécifique.<sup>3</sup> Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique à des protéines ou à des produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être provoqués par des enzymes endogènes comme la pseudoperoxydase (érythrocytes), la peroxydase endogène (cytochrome C), ou la biotine endogène (foie, sein, cerveau, rein, par exemple) selon le type d'immunomarquage utilisé. 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 par des complexes enzymatiques (avidine-biotine, streptavidine, polymère marqué) et le substrat chromogène respectivement. Si un marquage spécifique se produit dans le tissu de contrôle négatif, les résultats des spécimens du patient doivent être considérés comme invalides.

### Réactif de Contrôle Négatif

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

### Tissu du Patient

Examiner les échantillons du patient marqués au NCL-L-EGFR en dernier lieu. 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.

### Résultats Attendus

#### Tissus normaux

Le clone EGFR.113 détecte l'antigène du récepteur du facteur de croissance épidermique à la surface des cellules de divers tissus normaux. Un fort marquage de la membrane est observé dans les cellules basales de l'épiderme cutané ainsi que dans les épithéliums squameux stratifiés de l'endocol et des amygdales. Au niveau de la peau, les glandes eccrines et sébacées ont été également positives. Un immunomarquage a été observé dans l'épithélium prismatique pseudostratifié des bronches et dans l'épithélium transitionnel de l'appareil urinaire. Une forte expression a été observée dans les syncytiotrophoblastes du placenta. Les glandes endométriales ont également été positives de façon variable.

#### Tissus tumoraux

Le clone EGFR.113 a marqué diverses néoplasies (n = 67/132), dont 9 carcinomes de la vessie sur 12, 17 carcinomes des cellules squameuses sur 18, 18 cancers du sein sur 32, 3 tumeurs colorectales sur 3, 2 cancers de la prostate sur 4, 6 adénocarcinomes pulmonaires sur 12, 2 carcinomes endométriaux sur 2, 0 cancers du poumon à petites cellules sur 4 et 0 lymphomes 5. Une positivité cytoplasmique a pu être observée dans certaines tumeurs.

**L'utilisation du NCL-L-EGFR est recommandée dans le cadre de la détermination du statut des tissus normaux et néoplasiques vis-à-vis du récepteur du facteur de croissance épidermique.**

### Limites Générales

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

Le marquage des tissus dépend de leur manipulation et de leur traitement avant le marquage. Une fixation, une congélation, une décongélation, un lavage, un séchage, un chauffage, une coupe, incorrects ou une contamination par d'autres tissus ou d'autres liquides sont susceptibles de conduire à la production d'artefacts, au piégeage de l'anticorps ou à des résultats faussement négatifs. Des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités propres au tissu, peuvent conduire à des résultats incohérents.<sup>4</sup>

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



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

Les anticorps de Leica Biosystems Newcastle Ltd sont destinés, selon les besoins, à être utilisés sur des coupes incluses en paraffine ou des coupes congelées, et conformément à des exigences particulières 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.

### **Bibliographie Générale**

1. 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.
2. 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.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ et al. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *Journal of Clinical Pathology*. 2003; 56(4):300–304.
6. Sriplakich S, Jahnson S and Karlsson MG. Epidermal growth factor receptor expression: predictive value for the outcome after cystectomy for bladder cancer? *BJU Int*. 1999; 83(4):498–503.
7. Inoue K, Chikazawa M, Karashima T et al. Overexpression of c-Met/hepatocyte growth factor receptors in human prostatic adenocarcinoma. *Acta Med Okayama* 1998; 52(6):305–310.
8. Tungekar MF and Linehan J. Patterns of expressions of transforming growth factor and epidermal growth factor receptor in squamous cell lesions of the urinary bladder. *Journal of Clinical Pathology*. 1998; 51:583–587.

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

Non applicable.

### **Date de Publication**

20 juin 2008 (NCL-L-EGFR/CE/UK)

# Méthodologie immunohistochimique d'utilisation des anticorps Novocastra™ sur les tissus inclus en paraffine à l'aide de la technique de restauration des antigènes à haute température.

## A. Réactifs nécessaires mais non fournis

1. Solvants standard utilisés en immunohistochimie.
2. 0.5% v/v Peroxyde d'hydrogène.
3. Tampon Tris (TBS) 50 mM, pH 7,6.
4. Solution(s) de restauration des antigènes - voir Recommandations d'utilisation.
5. Diluant anticorps – sérum normal dilué de façon optimale.
6. Sérums normaux provenant de diverses espèces chez lesquelles l'anticorps secondaire est cultivé.
7. Anticorps secondaire biotinylé - préparer selon les recommandations du fabricant.
8. Complexe Avidine/Biotine – Peroxydase de raifort (ABC-HRP) - préparer selon les recommandations du fabricant.
9. Tétrachlorhydrate de 3,3' diaminobenzidine (DAB) - préparer selon les recommandations du fabricant.
10. Hématoxyline, colorant de contraste - préparer selon les recommandations du fabricant.
11. Milieu de montage - utiliser selon les recommandations du fabricant.

## B. Équipements nécessaires mais non fournis

1. Incubateur réglé à 25 °C.
2. Autocuiseur en acier inoxydable (Novocastra™ recommande de changer les joints à intervalle régulier pour conserver des conditions de démasquage optimales).
3. Équipements généraux d'un laboratoire d'immunohistochimie.

## Remarque relative à la sécurité

Pour garantir une utilisation correcte et sûre de votre autocuiseur, LIRE, S'IL VOUS PLAÎT, LES INSTRUCTIONS FOURNIES PAR LE FABRICANT.

## C. Solutions de restauration des antigènes (voir Recommandations d'utilisation)

### Solution de restauration, citrate 0,01 M (pH 6,0)

Ajouter 3,84 g d'acide citrique (anhydre) à 1,8 l d'eau distillée. Ajuster le pH à 6,0 à l'aide de NaOH 1 M. Compléter à 2,0 l avec de l'eau distillée.

### Solution de restauration, EDTA 1 mM (pH 8,0)

Ajouter 0,37 g d'EDTA (SIGMA, référence du produit E-5134) à 1 l d'eau distillée. Ajuster le pH à 8,0 à l'aide de NaOH 0,1 M

### Solution de restauration, Tris 20 mM/EDTA 0,65 mM/Tween 20 0,0005 % (pH 9,0)

Dissoudre 14,4 g de Tris (BDH, référence du produit 271197K) et 1,44 g d'EDTA (SIGMA, référence du produit E-5134) dans 0,55 l d'eau distillée. Ajuster le pH à 9 avec de l'HCl 1 M et ajouter 0,3 ml de Tween 20 (SIGMA, référence du produit P-1379). Compléter à 0,6 l avec de l'eau distillée. La solution obtenue est une solution concentrée qui devra être diluée, au besoin, avec de l'eau distillée (diluer 0,15 l de la solution avec 1,35 l d'eau distillée, par exemple).

## D. Méthodologie

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

Les utilisateurs doivent déterminer les dilutions optimales des anticorps. 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 approprié aux tissus.
2. Déparaffiner les coupes dans le xylène ou des équivalents de xylène.
3. Réhydrater par l'intermédiaire d'alcools titrés.
4. Neutraliser la peroxydase endogène à l'aide d'une solution peroxyde d'hydrogène/méthanol 0,5% v/v pendant 10 minutes.
5. Laver les lames à l'eau du robinet.

Prétraiter les coupes comme suit :

6. Chauffer 1,5 l de la solution de restauration recommandée (voir Recommandations d'utilisation) jusqu'à ébullition dans un autocuiseur. Couvrir sans verrouiller le couvercle. Placer les lames sur des portoirs de marquage métalliques (ne pas placer les lames trop près les unes des autres afin d'éviter l'apparition d'un marquage irrégulier) et introduire l'ensemble dans l'autocuiseur en s'assurant que les lames soient complètement immergées dans la solution de restauration. Verrouiller le couvercle. Quand l'autocuiseur atteint sa température et sa pression de fonctionnement, compter 1 minute (sauf mention contraire dans Recommandations d'utilisation). Éloigner l'autocuiseur de la source de chaleur et le passer sous l'eau froide, le couvercle restant en place. NE PAS OUVRIR LE COUVERCLE JUSQU'À CE QUE LES INDICATEURS SIGNALENT QUE LA PRESSION A ÉTÉ ÉVACUÉE. Ouvrir le couvercle, retirer les lames et les placer immédiatement dans de l'eau du robinet froide.
7. Laver les coupes dans du tampon TBS pendant 5 minutes sous agitation légère.
8. Couvrir les coupes avec du sérum normal dilué pendant 10 minutes.
9. Incuber les coupes avec l'anticorps primaire dilué de façon optimale (voir Recommandations d'utilisation).
10. Laver dans du tampon TBS pendant 2 fois 5 minutes sous agitation légère.
11. Incuber les coupes dans l'anticorps secondaire biotinylé approprié.
12. Laver dans du tampon TBS pendant 2 fois 5 minutes sous agitation légère.
13. Incuber les lames dans l'ABC-HRP.
14. Laver dans du tampon TBS pendant 2 fois 5 minutes sous agitation légère.
15. Incuber les lames dans le DAB.

16. Rincer les lames à l'eau.
17. Procéder à la coloration de contraste avec l'hématoxyline.
18. Déshydrater, assécher et monter les coupes.

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

Les amendements ont été apportés uniquement à la mise en page. Aucun texte de la version précédente n'a été modifié.

#### **F. Date de publication**

23rd June 2004 (CEprotocol/HTAUT).

# Novocastra™ Anticorpo Monoclonale Murino Liquido

## Epidermal Growth Factor Receptor

### Codice Del Prodotto: NCL-L-EGFR

#### Uso Previsto

Per uso diagnostico in vitro.

NCL-L-EGFR è destinato all'identificazione qualitativa in microscopia ottica della molecola Epidermal Growth Factor Receptor, in sezioni incluse in paraffina. 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

Le tecniche di colorazione immunostochimica (IHC) consentono la visualizzazione degli antigeni mediante l'applicazione sequenziale di un anticorpo specifico per l'antigene (anticorpo primario), di un anticorpo secondario che lega l'anticorpo primario e di un complesso enzimatico con un substrato cromogeno; l'applicazione dei tre reagenti è intervallata da fasi di lavaggio. L'attivazione enzimatica del cromogeno produce una reazione visibile in corrispondenza del sito antigenico. Il campione biologico può, quindi, essere controcolorato e montato. 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 antigene.

#### Clone

EGFR.113

#### Immunogeno

Proteina di fusione ricombinante, corrispondente al dominio esterno della molecola del recettore del fattore di crescita epidermica.

#### Specificità

Dominio esterno del recettore del fattore di crescita epidermica umano.

#### Composizione Del Reagente

NCL-L-EGFR è un supernatante liquido di coltura tissutale, contenente 15 mM di sodio azide come conservante.

#### Classe Ig

IgG2a

#### Concentrazione Proteica Totale

Total Protein

1,0–8,0 g/l. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione proteica totale specifica del lotto.

#### Concentrazione Anticorpale

Superiore o uguale a 93,6 mg/l, come determinato mediante test ELISA. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione di Ig specifica del lotto.

#### Raccomandazioni Per L'uso

Immunostochimica (vedere **D. Metodologia**) sulle sezioni in paraffina. Diluizione raccomandata: 1:10–1:20 per 60 minuti a 25 °C. Si raccomanda smascheramento antigenico ad alta temperatura, in tampono citrato 0,01 M (pH 6,0). Queste raccomandazioni costituiscono delle semplici linee guida; spetta al singolo utente stabilire la diluizione di lavoro ottimale.

#### Conservazione E Stabilità

Conservare a 2–8 °C. Non congelare. Immediatamente dopo l'uso, raffreddare di nuovo a 2–8 °C. Non usare dopo la data di scadenza, indicata sull'etichetta del flacone. Condizioni di conservazione diverse da quelle sopra specificate vanno verificate dall'utente.

#### Preparazione Del Campione Biologico

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

#### Avvertenze E Precauzioni

Questo reagente è stato preparato dal supernatante di coltura cellulare. Trattandosi di un prodotto biologico, va maneggiato con cautela. La molarità della sodio azide nel reagente corrisponde a 15 mM. Su richiesta, è disponibile una scheda dei dati di sicurezza del materiale (MSDS) per la sodio azide.

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

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. 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. Consultare il medico.

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 variazioni devono essere convalidate dall'utente.

## Controllo Qualità

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

## Controllo Positivo Del Tessuto

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

Per ogni gruppo di condizioni del test e ogni volta che viene eseguita la 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 anche minimi livelli di degradazione del reagente.<sup>2</sup>

Il tessuto raccomandato per il controllo positivo è la cute.

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 nei confronti dell'antigene bersaglio da parte dell'anticorpo primario.

Il tessuto raccomandato per il controllo negativo è il cervelletto.

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

La colorazione aspecifica, se presente, assume di solito aspetto diffuso. La colorazione sporadica del tessuto connettivo può anche manifestarsi in seguito ad iperfissazione di sezioni di tessuto in formalina. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, usare cellule intatte. Le cellule necrotiche o degenerate si colorano spesso in maniera aspecifica<sup>3</sup>. Si possono osservare risultati falsamente positivi, dovuti a legame non immunologico delle proteine o a prodotti di reazione del substrato. Tali falsi positivi possono essere anche causati da enzimi endogeni quali la pseudoperossidasi (eritrociti), la perossidasi endogena (citocromo C) o la biotina endogena (es. fegato, mammella, cervello, rene), a seconda del tipo di immunocolorazione usato. Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame enzimatico costituito dall'immunoreattività specifica, possono essere colorati ulteriori tessuti del paziente esclusivamente con substrato cromogeno o con complessi enzimatici (avidina-biotina, streptavidina, polimero marcato) e substrato cromogeno. Se nel controllo negativo del tessuto compare una colorazione specifica, i risultati sui campioni biologici ottenuti dal paziente devono essere considerati non validi.

## Controllo Negativo Del Reagente

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

## Tessuto Del Paziente

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

## Risultati Attesi

### Tessuti normali

Il clone EGFR.113 mette in evidenza l'antigene recettoriale del fattore di crescita epidermica sulla superficie delle cellule di diversi tessuti normali. È stata trovata un'intensa colorazione nelle cellule basali dell'epidermide e nell'epitelio squamoso stratificato della cervice uterina e della tonsilla. Nella cute, anche le ghiandole eccrine e quelle sebacee sono state trovate positive. La colorazione immunologica è stata osservata nell'epitelio colonnare pseudostratificato dei bronchi e nell'epitelio di transizione del tratto urinario. Un'intensa espressività è stata osservata nel sinciziotrofoblasto della placenta. Anche le ghiandole endometriali sono state trovate a positività variabile.

### Tessuti tumorali

Il clone EGFR.113 ha colorato una varietà di neoplasie (n=67/132), inclusi 9 di 12 carcinomi vescicali, 17 di 18 carcinomi a cellule squamose, 18 di 32 carcinomi mammari, 3 di 3 neoplasie coloretali, 2 di 4 carcinomi prostatici, 6 di 12 adenocarcinomi bronchiali, 2 di 2 carcinomi endometriali, 0 di 4 carcinomi bronchiali a piccole cellule e 0 di 5 linfomi. In alcune neoplasie si può osservare una positività citoplasmatica.

**Si raccomanda l'uso di NCL-L-EGFR nella determinazione dello stato del recettore del fattore di crescita epidermica nei tessuti normali e in quelli neoplastici.**

## Limitazioni Generali

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

La colorazione del tessuto dipende dalle modalità di manipolazione e di processazione del tessuto stesso, adottate prima della colorazione. La fissazione, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento o la sezione condotti in modo non corretto, o la contaminazione con altri tessuti o liquidi, possono produrre artefatti, intrappolamento (trapping) anticorpale o risultati falsi negativi. Risultati incompatibili possono essere dovuti a modifiche dei metodi di fissazione e di inclusione o ad irregolarità intrinseche al tessuto.<sup>4</sup>

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

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

Gli anticorpi di Leica Biosystems Newcastle Ltd. sono destinati all'uso, quando indicato, su sezioni congelate o incluse in paraffina, con specifici requisiti di fissazione. Un'espressione antigenica inattesa può manifestarsi in particolare nelle neoplasie. L'interpretazione clinica di ogni sezione tissutale colorata deve includere l'analisi morfologica e la valutazione dei controlli appropriati.

### **Riferimenti Bibliografici Di Base**

1. 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.
2. 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.
3. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ et al. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. Journal of Clinical Pathology. 2003; 56(4):300–304.
6. Sriplakich S, Jahnson S and Karlsson MG. Epidermal growth factor receptor expression: predictive value for the outcome after cystectomy for bladder cancer? BJU Int. 1999; 83(4):498–503.
7. Inoue K, Chikazawa M, Karashima T et al. Overexpression of c-Met/hepatocyte growth factor receptors in human prostatic adenocarcinoma. Acta Med Okayama 1998; 52(6):305–310.
8. Tungekar MF and Linehan J. Patterns of expressions of transforming growth factor and epidermal growth factor receptor in squamous cell lesions of the urinary bladder. Journal of Clinical Pathology. 1998; 51:583–587.

### **Modifiche Alla Pubblicazione Precedente**

Non applicabile.

### **Data Di Pubblicazione**

20 giugno 2008 (NCL-L-EGFR/CE/UK)

# Metodologia immunoistochimica per l'uso di anticorpi Novocastra™ su tessuto incluso in paraffina, utilizzando la tecnica di smascheramento antigenico ad alta temperatura.

## A. Reagenti necessari ma non forniti

1. Solventi standard utilizzati in immunoistochimica.
2. 0,5% v/v Perossido di idrogeno.
3. Tampone Tris salino (TBS) 50 mM a pH 7,6.
4. Soluzione(i) per smascheramento antigenico - vedere Raccomandazioni per l'uso.
5. Diluente anticorpale - siero normale diluito in maniera ottimale.
6. Sieri normali delle specie da cui si è ottenuto l'anticorpo secondario.
7. Anticorpo secondario biotinilato - preparare secondo le raccomandazioni del produttore.
8. Complesso avidina/biotina-Perossidasi di rafano (ABC-POD) - preparare secondo le raccomandazioni del produttore.
9. 3,3' diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB) - preparare secondo le raccomandazioni del produttore.
10. Controcolorazione all'ematossilina - preparare secondo le raccomandazioni del produttore.
11. Mezzi di montaggio - usare secondo le raccomandazioni del produttore.

## B. Attrezzature necessarie ma non fornite

1. Set incubatore a 25 °C.
2. Pentola a pressione in acciaio inossidabile (Novocastra™ raccomanda di sostituire le guarnizioni a regolari intervalli di tempo, allo scopo di mantenere condizioni ottimali di smascheramento).
3. Attrezzature di base del laboratorio di immunoistochimica.

## Nota di sicurezza

Per garantire un uso corretto e sicuro della pentola a pressione, SI PREGA DI LEGGERE ATTANTAMENTE LE ISTRUZIONI FORNITE DAL PRODUTTORE.

## C. Soluzioni per smascheramento antigenico (vedere Raccomandazioni per l'uso)

### Soluzione citrata per smascheramento 0,01 M (pH 6,0)

Aggiungere 3,84 grammi di acido citrico (anidro) a 1,8 L di acqua distillata. Aggiustare a pH 6,0 usando NaOH 1M. Aggiustare il volume a 2 L con acqua distillata.

### Soluzione EDTA per smascheramento 1 mM (pH 8,0)

Aggiungere 0,37 g di EDTA (codice prodotto SIGMA E-5134) a 1 L di acqua distillata. Aggiustare a pH 8,0 usando NaOH 0,1 M.

### Soluzione per smascheramento Tris 20 mM/ EDTA 0,65 mM/Tween 20 0,0005% (pH 9,0)

Aggiungere 14,4 g di Tris (codice prodotto BDH 271197K) e 1,44 g di EDTA (codice prodotto SIGMA E-5134) a 0,55 L di acqua distillata. Aggiustare a pH 9 con HCl 1M ed aggiungere 0,3 ml di Tween 20 (codice prodotto SIGMA P-1379). Aggiustare il volume a 0,6 L con acqua distillata. Si ottiene così un concentrato 10x, da diluire con acqua distillata a seconda dei casi (es. 0,15 L diluiti con 1,35 L di acqua distillata).

## D. Metodologia

Prima di intraprendere questa metodologia, l'utente deve acquisire esperienza con le tecniche immunoistochimiche.

Gli utenti devono determinare le diluizioni ottimali degli anticorpi. Se non indicato diversamente, tutte le fasi vanno condotte a temperatura ambiente (25 °C).

1. Tagliare e montare le sezioni sui vetrini ricoperti con un adatto adesivo tissutale.
  2. Deparaffinare le sezioni mediante xilene o liquidi analoghi.
  3. Reidratare mediante passaggi in alcool a differenti gradazioni.
  4. Neutralizzare la perossidasi endogena usando perossido di idrogeno/metanololo 0,5% v/v per 10 minuti.
  5. Lavare i vetrini con acqua corrente.
- Pretrattare le sezioni come segue:
6. Riscaldare 1,5 L della soluzione di smascheramento raccomandata (vedere Raccomandazioni per l'uso) fino alla bollitura, in una pentola a pressione. Coprire senza chiudere ermeticamente il coperchio. Posizionare le sezioni in rastrelli di colorazione metallici (non mettere i vetrini troppo vicini l'uno all'altro, perché ciò potrebbe provocare una colorazione irregolare) e calarle nella pentola a pressione, assicurandosi che i vetrini siano completamente immersi nella soluzione di smascheramento. Chiudere ermeticamente il coperchio. Quando la pentola raggiunge temperatura e pressione di esercizio, calcolare un minuto di tempo (se non diversamente indicato in Raccomandazioni per l'uso). Allontanare la pentola a pressione dal fuoco e metterla sotto l'acqua fredda con il coperchio ancora chiuso. **NON APRIRE IL COPERCHIO FINO A QUANDO L'INDICATORE NON SEGNA LA CADUTA DELLA PRESSIONE.** Aprire il coperchio, estrarre i vetrini e metterli immediatamente sotto l'acqua corrente.
  7. Lavare le sezioni in TBS per 1 x 5 minuti, scuotendole delicatamente.
  8. Ricoprire le sezioni con siero normale diluito, per 10 minuti.
  9. Incubare le sezioni con anticorpo primario diluito in maniera ottimale (vedere Raccomandazioni per l'uso).
  10. Lavare in tampone TBS per 2 x 5 minuti, scuotendo delicatamente.
  11. Incubare le sezioni con l'anticorpo secondario biotinilato appropriato.
  12. Lavare in tampone TBS per 2 x 5 minuti, scuotendo delicatamente.
  13. Incubare i vetrini in ABC-POD.
  14. Lavare in tampone TBS per 2 x 5 minuti, scuotendo delicatamente.
  15. Incubare i vetrini in DAB.

16. Sciacquare i vetrini.
17. Controcolorare con ematosillina.
18. Disidratare, pulire e montare le sezioni.

**E. Modifiche alla pubblicazione precedente**

Sono state apportate correzioni solo al layout. Il testo non ha subito alcuna variazione rispetto alla versione precedente.

**F. Data di pubblicazione**

23rd June 2004 (CEprotocol/HTAUT).



# Novocastra™ Flüssiger Monoklonaler Maus-Antikörper

## Epidermal Growth Factor Receptor

### Produkt-Nr.: NCL-L-EGFR

#### Verwendungszweck

Für *in-vitro*-Diagnostik.

NCL-L-EGFR ist für den qualitativen Nachweis der Epidermal Growth Factor Receptor-Moleküle in Paraffinschnitten mittels Lichtmikroskopie gedacht. 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

Immunhistochemische (IHC) Färbetechniken gestatten die optische Darstellung von Antigenen mittels sequentieller Anwendung eines spezifischen Antikörpers zum Antigen (primärer Antikörper), eines sekundären Antikörpers zum primären Antikörper und eines Enzymkomplexes mit einem chromogenen Substrat, jeweils getrennt durch dazwischen liegende Waschschrte. Die enzymatische Aktivierung des Chromogens führt zu einem sichtbaren Reaktionsprodukt am Ort des Antigens. Die Probe kann dann gegengefärbt und mit einem Deckglas versehen werden. Die Ergebnisse werden mithilfe eines Lichtmikroskops interpretiert und unterstützen die Differentialdiagnose pathophysiologischer Prozesse, die mit einem bestimmten Antigen assoziiert sein könnten.

#### Klon

EGFR.113

#### Immunogen

Prokaryotisches Fusionsprotein, das der externen Domäne des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-Moleküls entspricht.

#### Spezifität

Externe Domäne des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors.

#### Reagenzzusammensetzung

NCL-L-EGFR ist ein flüssiger Gewebekulturüberstand, der 15 mmol/l Natriumazid als Konservierungsmittel enthält.

#### Ig-Klasse

IgG2a

#### Gesamtproteinkonzentration Total Protein

1,0–8,0 g/l. Siehe Angaben auf dem Produktetikett bezüglich der chargenspezifischen Gesamtproteinkonzentration.

#### Antikörperkonzentration

Größer als oder gleich 93,6 mg/l laut ELISA-Bestimmung. Hinsichtlich der chargenspezifischen Ig-Konzentration siehe Angaben auf dem Produktetikett.

#### Gebrauchsempfehlungen

Immunhistochemie (siehe **D. Vorgehensweise**) auf Paraffinschnitten. Empfohlene Verdünnung: 1:10–1:20 über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 25 °C. Es wird empfohlen, das Hochtemperatur-Antigen-Retrieval mit 0,01 mol/l Citrat-Retrieval-Lösung (pH-Wert 6,0) zu verwenden. Dies ist nur eine Empfehlung, und die Benutzer sollten ihre eigenen optimalen Arbeitsverdünnungen bestimmen.

#### Lagerung und Stabilität

Bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren. Nach Gebrauch sofort wieder bei 2–8 °C lagern. Nach Ablauf des Verfallsdatums (auf dem Behälteretikett) darf das Produkt nicht mehr verwendet werden. Lagerbedingungen, die von den oben genannten Bedingungen abweichen, müssen vom Benutzer verifiziert werden.

#### Probenvorbereitung

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

#### Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

Dieses Reagenz wurde aus Zellkulturüberstand zubereitet. Das Reagenz ist ein biologisches Produkt und sollte mit entsprechender Vorsicht gehandhabt werden.

Die Molarität des Natriumazids in diesem Reagenz beträgt 15 mmol/l. Ein Sicherheitsdatenblatt (MSDS) für Natriumazid ist auf Anfrage erhältlich.

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

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. 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. Ärztlichen Rat einholen.

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.

## Qualitätskontrolle

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

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

### Positive Gewebekontrolle

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an.

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

Gewebe mit schwach positiver Färbung ist für die optimale Qualitätskontrolle und den Nachweis kleiner Minderungen in der Reagenzleistung besser geeignet als ein Gewebe mit stark positiver Färbung.<sup>2</sup>

Für die positive Gewebekontrolle wird Hautgewebe empfohlen.

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

### Negative Gewebekontrolle

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

Für die negative Gewebekontrolle wird Kleinhirngewebe empfohlen.

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

Liegt eine unspezifische Färbung vor, hat diese gewöhnlich ein diffuses Erscheinungsbild. Eine sporadische Färbung des Bindegewebes kann ebenfalls in Schnitten von übermäßig formalinfixierten Geweben beobachtet werden. Zur Bewertung der Färberegebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.<sup>3</sup> Falsch-positive Ergebnisse können aufgrund einer nichtimmunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten beobachtet werden. In Abhängigkeit von der Art der verwendeten Immunfärbung können solche Ergebnisse auch durch endogene Enzyme wie Pseudoperoxidase (Erythrozyten), endogene Peroxidase (Zytochrom C) oder endogenes Biotin (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. mit Enzymkomplexen (Avidin-Biotin, Streptavidin, markiertes Polymer) plus Substratchromogen gefärbt werden. Falls im negativen Kontrollgewebe eine spezifische Färbung auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

### Negative Reagenzkontrolle

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

### Patientengewebe

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

## Erwartete Ergebnisse

### Normale Gewebe

Klon EGFR.113 weist das epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor-Antigen auf der Zelloberfläche einer Vielzahl normaler Gewebe nach. In den Basalzellen der Hautepidermis und im mehrschichtigen Plattenepithel von Zervix und Tonsillen wurde eine starke Membranfärbung beobachtet. Ekkrine und Talgdrüsen der Haut reagierten ebenfalls positiv. Es wurde eine Immunfärbung wurde im pseudostratifizierten Zylinderepithel der Bronchien und im Übergangsepithel des Harntrakts festgestellt. Eine starke Expression wurde in den Synzytiotrophoblasten der Plazenta beobachtet. Die Endometriumdrüsen reagierten ebenfalls wechselhaft positiv.

### Tumorgewebe

Klon EGFR.113 färbte eine Vielzahl von Neoplasien (n=67/132) einschließlich 9/12 Fällen von Blasenkrebs, 17/18 Plattenzellkarzinomen, 18/32 Fällen von Brustkrebs, 3/3 kolorektalen Tumoren, 2/4 Prostatakzinomen, 6/12 Lungen-Adenokarzinomen, 2/2 Endometriumkarzinomen, 0/4 kleinzelligen Lungenkarzinomen und 0/5 Lymphomen. Bei einigen Tumoren kann eine positive zytoplasmatische Reaktion beobachtet werden.

**NCL-L-EGFR wird zur Bestimmung des Status des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors normaler und neoplastischer Gewebe empfohlen.**

## Allgemeine Beschränkungen

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

Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor dem Färben ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder eine Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper-Trapping oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Abweichende Ergebnisse können aufgrund von Unterschieden bei der Fixierung und Einbettung oder intrinsischen Unregelmäßigkeiten im Gewebe selbst entstehen.<sup>4</sup>

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

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

Antikörper von Leica Biosystems Newcastle Ltd sind wo angezeigt für die Verwendung entweder auf gefrorenen oder in Paraffin eingebetteten Schnitten mit spezifischen Fixierungsanforderungen bestimmt. Es kann insbesondere bei Neoplasmen zu einer unerwarteten Antigenexpression kommen. Die klinische Bewertung eines gefärbten Gewebeschnitts muss eine morphologische Analyse und die Auswertung der entsprechenden Kontrollen einschließen.

### **Literatur - Allgemein**

1. 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.
2. 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.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ et al. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. Journal of Clinical Pathology. 2003; 56(4):300–304.
6. Sriplakich S, Jahnson S and Karlsson MG. Epidermal growth factor receptor expression: predictive value for the outcome after cystectomy for bladder cancer? BJU Int. 1999; 83(4):498–503.
7. Inoue K, Chikazawa M, Karashima T et al. Overexpression of c-Met/hepatocyte growth factor receptors in human prostatic adenocarcinoma. Acta Med Okayama 1998; 52(6):305–310.
8. Tungekar MF and Linehan J. Patterns of expressions of transforming growth factor and epidermal growth factor receptor in squamous cell lesions of the urinary bladder. Journal of Clinical Pathology. 1998; 51:583–587.

### **Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe**

Keine.

### **Ausgabedatum**

20 Juni 2008 (NCL-L-EGFR/CE/UK)

# Immunhistochemisches Vorgehen beim Einsatz von Novocastra™ Antikörpern für Paraffinschnitte in der Hochtemperatur-Antigen- Retrieval-Technik.

## A. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Reagenzien

1. In der Immunhistochemie übliche Standardlösungsmittel.
2. 0,5% v/v Wasserstoffperoxid.
3. 50 mmol/l Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (Tris-Buffered Saline, TBS) pH7,6.
4. Antigen-Retrieval-Lösung(en) - siehe Gebrauchsempfehlungen.
5. Antikörper-Verdünnungsmittel – optimal verdünntes Normalserum.
6. Normalseren der Spezies, in denen der sekundäre Antikörper gezüchtet wird.
7. Sekundärer biotinylierter Antikörper – gemäß den Empfehlungen des Herstellers ansetzen.
8. Avidin-/Biotin-Komplex-Meerrettich-Peroxidase (Avidin/Biotin Complex-Horseradish Peroxidase, ABC-HRP) – gemäß den Empfehlungen des Herstellers ansetzen.
9. 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) - gemäß den Empfehlungen des Herstellers ansetzen.
10. Hämatoxylin-Gegenfärbung - gemäß den Empfehlungen des Herstellers ansetzen.
11. Aufbringungsmedium - gemäß den Empfehlungen des Herstellers zu verwenden.

## B. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Ausrüstung

1. Inkubator, auf 25 °C eingestellt.
2. Druckkochtopf aus rostfreiem Stahl (für optimale Demaskierungsbedingungen empfiehlt Novocastra™ den regelmäßigen Dichtungswechsel).
3. Übliche immunhistochemische Laborausstattung.

## Sicherheitshinweis

Für den sicheren und korrekten Betrieb Ihres Druckkochtopfs BITTE DIE ANWEISUNGEN DES HERSTELLERS BEACHTEN.

## C. Antigen-Retrieval-Lösungen (siehe Gebrauchsempfehlungen)

### 0,01 mol/l Citrat-Retrieval-Lösung (pH 6,0)

3,84 Gramm Zitronensäure (wasserfrei) zu 1,8 l destilliertem Wasser geben. Mit 1 mol/l NaOH auf pH 6,0 titrieren und mit destilliertem Wasser auf 2 l auffüllen.

### 1 mmol/l EDTA Retrieval-Lösung (pH 8,0)

0,37 g EDTA (SIGMA Produkt-Nr. E-5134) zu 1 l destilliertem Wasser geben. Mit 0,1 mol/l NaOH auf pH 8,0 titrieren.

### 20 mmol/l Tris/0,65 mmol/l EDTA/0,0005% Tween 20 Retrieval-Lösung (pH 9,0)

14,4 g Tris (BDH Produkt-Nr. 271197K) und 1,44 g EDTA (SIGMA Produkt-Nr. E-5134) zu 0,55 l destilliertem Wasser geben. Den pH mit 1 mol/l HCL auf 9 titrieren und 0,3 ml Tween 20 (SIGMA Produkt-Nr. P-1379) hinzugeben. Mit destilliertem Wasser auf 0,6 l auffüllen. Dies ist ein 10x Konzentrat, das mit destilliertem Wasser nach Bedarf verdünnt werden sollte (z.B. 0,15 l mit 1,35 l destilliertem Wasser verdünnt).

## D. Vorgehensweise

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

Kunden sollten die optimale Verdünnung für die Antikörper bestimmen. 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 endogene Peroxidase mit 0,5% (volumetrisch) Wasserstoffperoxid/Methanol 10 Minuten lang neutralisieren.
5. Die Objektträger unter laufendem Leitungswasser abspülen.

Die Schnitte wie folgt vorbehandeln:

6. 1,5 l der empfohlenen Retrieval-Lösung (siehe Gebrauchsempfehlungen) in einem Druckkochtopf zum Kochen bringen. Deckel auflegen aber nicht verriegeln. Die Objektträger in Färberrahmen aus Metall einbringen (Objektträger nicht zu dicht aneinander legen, da eine ungleichmäßige Färbung auftreten könnte) und in den Druckkochtopf legen. Dabei muss sichergestellt werden, dass die Objektträger vollständig in die Retrieval-Lösung eintauchen. Deckel verriegeln. Nachdem der Druckkochtopf die Betriebstemperatur und den Betriebsdruck erreicht hat, 1 Minute lang warten (sofern nicht in den Gebrauchsempfehlungen anderweitig vermerkt). Druckkochtopf von der Platte entfernen und bei verriegeltem Deckel unter laufendem Kaltwasser abkühlen. DER DECKEL DARF ERST DANN GEÖFFNET WERDEN, WENN LAUT ANZEIGE DER INNENDRUCK ABGEBAUT WORDEN IST. Den Deckel öffnen, die Objektträger entnehmen und unverzüglich in kaltes Leitungswasser legen.
7. Schnitte in TBS 1 x 5 Minuten lang mit sanfter Kippbewegung spülen.
8. Die Schnitte 10 Minuten lang mit verdünntem Normalserum bedecken.
9. Die Schnitte mit optimal verdünntem primären Antikörper inkubieren (siehe Gebrauchsempfehlungen).
10. Die Schnitte in TBS-Puffer 2 x 5 Minuten lang mit sanfter Kippbewegung spülen.
11. Die Schnitte mit einem entsprechend biotinylierten sekundären Antikörper inkubieren.
12. Die Schnitte in TBS-Puffer 2 x 5 Minuten lang mit sanfter Kippbewegung spülen.
13. Die Objektträger in ABC-HRP inkubieren.
14. Die Schnitte in TBS-Puffer 2 x 5 Minuten lang mit sanfter Kippbewegung spülen.
15. Die Objektträger in DAB inkubieren.

16. Die Objektträger mit Wasser abspülen.
17. Mit Hämatoxylin gegenfärben.
18. Die Schnitte dehydrieren, säubern und aufbringen.

#### **E. Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe**

Änderungen wurden nur am Layout vorgenommen. Der Text der vorherigen Ausgabe wurde nicht geändert.

#### **F. Ausgabedatum**

23rd June 2004 (CEprotocol/HTAUT).

# Novocastra™ Anticuerpos Monoclonal líquidos de Ratón

## Epidermal Growth Factor Receptor

### Código De Producto: NCL-L-EGFR

#### Indicaciones De Uso

*Para uso diagnóstico in vitro.*

NCL-L-EGFR está indicado para la identificación cualitativa en secciones de parafina, mediante microscopía óptica, de Epidermal Growth Factor Receptor. La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia debe complementarse con estudios morfológicos, con el uso de los controles adecuados, y un anatomopatólogo cualificado debe evaluarla en el contexto del historial clínico del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

#### Principio Del Procedimiento

Las técnicas de tinción inmunohistoquímica (IHQ) permiten la visualización de antígenos mediante la aplicación secuencial de un anticuerpo específico dirigido contra el antígeno (anticuerpo primario), un anticuerpo secundario dirigido contra el anticuerpo primario y un complejo enzimático con un sustrato cromogénico, con pasos de lavado intercalados. La activación enzimática del cromógeno produce una reacción visible en el lugar en que se encuentra el antígeno. Luego se puede contrateñir la muestra y cubrirla con un cubreobjeto. 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.

#### Clon

EGFR.113

#### Inmunógeno

Proteína de fusión procarcinógena correspondiente al dominio externo de la molécula de receptor del factor de crecimiento epidérmico.

#### Especificidad

Dominio externo del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano.

#### Composición Del Reactivo

NCL-L-EGFR es un sobrenadante de cultivo tisular líquido que contiene azida sódica 15 mM como conservante.

#### Clase de Ig

IgG2a

#### Concentración Total De Proteína Total Protein

1,0–8,0 g/L. Consulte la etiqueta del vial para ver la concentración total de proteína específica del lote.

#### Concentración De Anticuerpo

Igual o superior a 93,6 mg/L según se ha determinado mediante ELISA. Consulte en la etiqueta del vial la concentración de Ig específica del lote.

#### Recomendaciones De Uso

Inmunohistoquímica (ver **D. Metodología**) con secciones de parafina. Dilución sugerida: 1:10–1:20 durante 60 minutos a 25 °C. Se recomienda realizar recuperación de antígeno a alta temperatura utilizando la solución de recuperación citrato 0,01 M (pH 6,0). Ésta es tan solo una pauta y cada usuario debe determinar sus propias diluciones de trabajo óptimas.

#### Almacenamiento Y Estabilidad

Almacénelo a una temperatura de 2–8 °C. No lo congele. Devuélvalo a 2–8 °C inmediatamente después de su uso. No lo utilice después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. Cualesquiera condiciones de almacenamiento que no sean las arriba especificadas deben ser verificadas por el usuario.

#### Preparación De Las Muestras

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

#### Advertencias Y Precauciones

Este reactivo se ha preparado a partir del sobrenadante de un cultivo celular. Como se trata de un producto de origen biológico, debe manipularse con precaución.

La molaridad de la azida sódica en este reactivo es 15 mM. Si la solicita, existe una hoja de información sobre la seguridad del material (MSDS) azida sódica a su disposición.

Consulte las normativas nacionales, estatales, provinciales o municipales acerca de cómo desechar cualquier componente potencialmente tóxico.

Las muestras, antes y después de ser fijadas, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como susceptibles de transmitir una infección, y se deben desechar tomando las precauciones adecuadas.<sup>1</sup> No pipetee nunca los reactivos con la boca, y evite el contacto de la piel y de las membranas mucosas con los reactivos y las muestras. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas delicadas, lave éstas con abundante agua. Acuda inmediatamente al médico.

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.

## Control De Calidad

Las diferencias en el procesamiento 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 los controles de su propio laboratorio, 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 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 lograr un control de calidad óptimo y para detectar niveles bajos de degradación del reactivo.<sup>2</sup>

El tejido de control positivo recomendado es piel.

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.

El tejido de control negativo recomendado es cerebelo.

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

Si aparece una tinción no específica, ésta tiene generalmente aspecto difuso. En cortes de tejido fijados excesivamente con formol puede observarse también una tinción esporádica del tejido conectivo. Utilice células intactas para la interpretación de los resultados de la tinción. A menudo, las células necróticas o degeneradas quedan teñidas de forma no específica.<sup>3</sup> También pueden observarse falsos positivos causados por la unión no inmunológica a proteínas o a productos de reacción del sustrato. Estos falsos positivos pueden estar causados también por enzimas endógenas tales como la pseudoperoxidasa (eritrocitos), la peroxidasa endógena (citocromo C), o la biotina endógena (por ejemplo, de hígado, mama, cerebro, riñón), en función del tipo de inmunotinción utilizada. Para diferenciar la actividad de las enzimas endógenas o los enlaces no específicos de las enzimas de la inmunorreactividad específica, pueden teñirse otros tejidos del paciente exclusivamente con cromógeno sustrato o con complejos enzimáticos (avidina-biotina, estreptavidina, polímeros marcados) y cromógeno sustrato respectivamente. Si se produce una 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 un corte 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 las muestras del paciente o pacientes teñidas con NCL-L-EGFR al final. 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.

## Resultados esperados

### Tejidos normales

El clon EGFR.113 detecta el antígeno receptor del factor de crecimiento epidérmico en la superficie de las células de una variedad de tejidos normales. Se observó una intensa tinción de la membrana en las células basales de la epidermis de la piel y en el epitelio escamoso estratificado del cérvix y de la amígdala palatina. En la piel, las glándulas ecrinas y sebáceas también dieron positivo. Se observó inmunotinción en el epitelio columnar pseudoestratificado de los bronquios y en el epitelio de transición del tracto urinario. Asimismo, se observó una expresión intensa en los sincitiotroblastos placentarios. Las glándulas endometriales dieron también positivo, en grado variable.

### Tejidos tumorales

El clon EGFR.113 tiñó una variedad de neoplasias (n=67/132), incluidos 9 de 12 carcinomas de vejiga, 17 de 18 carcinomas de células escamosas, 18 de 32 carcinomas de mama, 3 de 3 tumores colorrectales, 2 de 4 carcinomas prostáticos, 6 de 12 adenocarcinomas pulmonares, 2 de 2 carcinomas endometriales, 0 de 4 carcinomas de células pequeñas pulmonares y 0 de 5 linfomas. En algunos tumores puede observarse positividad citoplasmática.

**NCL-L-EGFR está recomendado para determinar el estado en cuanto al receptor del factor de crecimiento epidérmico en tejidos normales y neoplásicos.**

## Limitaciones Generales

La inmunohistoquímica es un proceso de diagnóstico en varias fases que abarca: la formación especializada en la selección de los reactivos apropiados, la selección, fijación y procesamiento de tejidos, la preparación del portaobjeto para IHQ, y la 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 pueden generar artefactos, atrapamiento del anticuerpo o falsos negativos. La aparición de resultados incoherentes puede deberse a variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, o a irregularidades inherentes al tejido.<sup>4</sup>

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

La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia debe complementarse con estudios morfológicos, con el uso de los controles adecuados, y un anatomopatólogo cualificado debe evaluarla en el contexto del historial clínico del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Los anticuerpos de Leica Biosystems Newcastle Ltd son para utilizarlos, según se indique, con secciones congeladas o 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.

### **Bibliografía - General**

1. 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.
2. 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.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ et al. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *Journal of Clinical Pathology*. 2003; 56(4):300–304.
6. Sriplach S, Jahnsen S and Karlsson MG. Epidermal growth factor receptor expression: predictive value for the outcome after cystectomy for bladder cancer? *BJU Int*. 1999; 83(4):498–503.
7. Inoue K, Chikazawa M, Karashima T et al. Overexpression of c-Met/hepatocyte growth factor receptors in human prostatic adenocarcinoma. *Acta Med Okayama* 1998; 52(6):305–310.
8. Tungekar MF and Linehan J. Patterns of expressions of transforming growth factor and epidermal growth factor receptor in squamous cell lesions of the urinary bladder. *Journal of Clinical Pathology*. 1998; 51:583–587.

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

No aplicable.

### **Fecha De Publicación**

20 de junio de 2008 (NCL-L-EGFR/CE/UK)



# Metodología inmunohistoquímica para utilizar anticuerpos Novocastra™ sobre tejido incluido en parafina, mediante la técnica de recuperación de antígeno por alta temperatura.

## A. Reactivos necesarios que no se incluyen

1. Disolventes estándar utilizados en inmunohistoquímica.
2. 0.5% v/v Peróxido de hidrógeno.
3. Solución salina tamponada Tris (TBS) 50 mM pH7,6.
4. Solución(es) recuperadora(s) de antígeno - ver Recomendaciones de Uso.
5. Disolvente de anticuerpo - suero normal en dilución óptima.
6. Suero normal de las especies en las que se ha criado el anticuerpo secundario.
7. Anticuerpo secundario biotinilado - preparar según la recomendación del fabricante.
8. Complejo Avidina/Biotina-peroxidasa de rábano (ABC-HRP) - preparar según la recomendación del fabricante.
9. 3,3' Tetraclorhidrato de diaminobenzidina (DAB) - preparar según la recomendación del fabricante.
10. Contrateñido de hematoxilina - preparar según la recomendación del fabricante.
11. Medio de montaje - utilizar según la recomendación del fabricante.

## B. Equipo necesario, pero no incluido

1. Incubadora graduada a 25 °C.
2. Olla a Presión de Acero Inoxidable (Novocastra™ recomienda que las juntas se cambien periódicamente, para mantener las óptimas condiciones de desmascarado).
3. Equipo general para laboratorio de inmunohistoquímica.

## Nota de seguridad

Para garantizar la utilización correcta y segura de la olla a presión, POR FAVOR, LEER LAS INSTRUCCIONES DEL FABRICANTE.

## C. Soluciones para la recuperación de antígeno (ver Recomendaciones de Uso)

### Solución recuperadora de citrato 0,01 M (pH 6,0)

Añadir 3,84 gramos de ácido cítrico (anhidro) a 1,8 L de agua destilada. Ajustar el pH a 6,0 utilizando NaOH 1 M. Completar hasta 2 L con agua destilada.

### Solución recuperadora EDTA 1 mM (pH 8,0)

Añadir 0,37 g de EDTA (código SIGMA de producto E-5134) a 1 L de agua destilada. Ajustar el pH a 8,0 utilizando NaOH 0,1M .

### Tris 20mM/EDTA 0,65 mM/Solución recuperadora Tween 20 al 0,0005% (pH 9,0)

Disolver 14,4 g de Tris (código BDH de producto 271197K) y 1,44 g de EDTA (código SIGMA de producto E-5134) en 0,55 L de agua destilada. Ajustar el pH a 9 con HCl 1 M y añadir 0,3 ml de Tween 20 (código SIGMA de producto P-1379). Completar hasta 0,6 L con agua destilada. Se trata de un concentrado 10x que debe diluirse con agua destilada, según necesidad (por ejemplo, 0,15 L diluido con 1,35 L de agua destilada).

## D. Metodología

Antes de utilizar esta metodología, los usuarios deben seguir una formación en técnicas de inmunohistoquímica.

Los clientes deben determinar las diluciones óptimas para los anticuerpos. Salvo si se indica especialmente, todos los pasos se efectúan bajo temperatura ambiente (25 °C).

1. Cortar y montar las secciones sobre portaobjetos tratados con un adhesivo adecuado para tejidos.
2. Eliminar la parafina de las secciones con xileno o con sustitutos del xileno.
3. Rehidratar mediante alcoholes graduados.
4. Neutralizar la peroxidasa endógena utilizando peróxido de hidrógeno/metanol al 0,5% en v/v durante 10 minutos.
5. Lavar los portaobjetos con agua corriente del grifo.

Pretratar las secciones como se describe a continuación:

6. Calentar en una olla a presión, 1,5 L de la solución recuperadora recomendada (ver Recomendaciones de Uso) hasta la ebullición. Cubrir, pero no sujetar la tapa. Colocar los portaobjetos en bastidores metálicos de tinción (no colocar los portaobjetos muy juntos, para evitar la tinción desigual) e introducirlos en la olla a presión, asegurándose de que los portaobjetos quedan completamente sumergidos en la solución recuperadora. Cerrar bien la tapa. Cuando la olla a presión alcanza la temperatura y presión de funcionamiento, cronometrar 1 minuto (a menos que se indique diferente en Recomendaciones de Uso). Sacar la olla a presión de la fuente de calor y enfriarla bajo agua corriente, con la tapa cerrada. NO ABRIR LA TAPA HASTA QUE LOS INDICADORES MUESTREN QUE LA PRESIÓN YA SE HA LIBERADO. Abrir la tapa, extraer los portaobjetos y colocarlos inmediatamente en agua fresca del grifo.
7. Lavar las secciones en TBS durante 1 x 5 minutos, balanceando suavemente.
8. Cubrir las secciones con suero normal diluido, durante 10 minutos.
9. Incubar las secciones con anticuerpo primario en dilución óptima (ver Recomendaciones de Uso).
10. Lavar en tampón TBS durante 2 x 5 minutos, balanceando suavemente.
11. Incubar las secciones en el anticuerpo secundario biotinilado apropiado.
12. Lavar en tampón TBS durante 2 x 5 minutos, balanceando suavemente.
13. Incubar los portaobjetos en ABC-HRP.
14. Lavar en tampón TBS durante 2 x 5 minutos, balanceando suavemente.
15. Incubar los portaobjetos en DAB.
16. Enjuagar los portaobjetos con agua.

17. Contrateñir con hematoxilina.
18. Deshidratar, aclarar y montar las secciones.

#### **E. Correcciones a la Publicación Anterior**

Sólo se han realizado cambios en la presentación. No se ha modificado el texto con respecto a la publicación anterior.

#### **F. Fecha de publicación**

23rd June 2004 (CEprotocol/HTAUT).

# Novocastra™ Anticorpo Monoclonal líquido de Ratinho

## Epidermal Growth Factor Receptor

### Código Do Produto: NCL-L-EGFR

#### Utilização prevista

*Para utilização em diagnósticos in vitro.*

NCL-L-EGFR foi concebido para efectuar a identificação qualitativa do Epidermal Growth Factor Receptor por microscopia óptica, em secções parafinizadas. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos empregando os devidos controlos e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico.

#### Princípio Do Procedimento

As técnicas de coloração imunohistoquímica (IHC) permitem que se faça a visualização de antígenos por meio da aplicação sequencial de um anticorpo específico do antígeno (o anticorpo primário), de um anticorpo secundário ao anticorpo primário, e de um complexo enzimático com um substrato cromogénico e etapas de lavagem de permeio. A activação enzimática do cromogénio resulta num produto de reacção visível no local do antígeno. A amostra pode então ser contrastada e coberta 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.

#### Clone

EGFR.113

#### Imunogénio

Proteína de fusão procariótica correspondendo ao domínio externo da molécula do receptor do factor de crescimento epidérmico.

#### Especificidade

Domínio externo do receptor do factor de crescimento epidérmico humano.

#### Composição Do Reagente

NCL-L-EGFR é o sobrenadante líquido da cultura de um tecido contendo 15 mM de azida de sódio como produto conservante.

#### Classe De Ig

IgG2a

#### Concentração Total De Proteína Total Protein

1,0–8,0 g/L. Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração total de proteína do lote específico.

#### Concentração De Anticorpo

Maior que ou igual a 93,6 mg/L, conforme determinado por ELISA. Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração de Ig do lote específico.

#### Recomendações Sobre A Utilização

Imunohistoquímica (ver **D. Metodologia**) em secções de parafina. Diluição sugerida: 1:10–1:20 durante 60 minutos a 25 °C. Recomenda-se a recuperação de antígenos a alta temperatura utilizando 0,01 M de solução de citrato de recuperação (pH 6,0). Esta recomendação é apenas uma directriz e o utilizador deve determinar qual a diluição ideal para o trabalho específico.

#### 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 recipiente. As condições de armazenamento que diferirem das que se encontram especificadas acima devem ser verificadas pelo utilizador.

#### Preparação Das Amostras

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

#### Avisos E Precauções

Este reagente foi preparado a partir do sobrenadante de cultura celular. Visto ser um produto biológico, deve ser manuseado com o devido cuidado.

A molaridade da azida de sódio neste reagente é de 15 mM. Encontra-se disponível, mediante pedido, uma folha de dados de segurança de materiais (MSDS) sobre a azida de sódio.

Consultar a legislação aplicável em relação ao descarte de quaisquer componentes potencialmente tóxicos.

As amostras, antes e depois da sua fixação, bem como todos os materiais expostos às mesmas, devem ser manipulados como se tivessem a capacidade de transmitir infecções e devem ser descartados com as devidas precauções.<sup>1</sup> Não pipetar nunca os reagentes com a boca e evitar o contacto entre a pele e membranas mucosas e os reagentes e amostras. Caso os reagentes ou amostras entrem em contacto com áreas sensíveis, lavar com grandes quantidades de água. Consultar um médico.

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.

## 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.

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

Os tecidos com uma coloração positiva fraca são mais indicados do que os têm uma coloração positiva forte para proporcionarem um controlo de qualidade óptimo, bem como para detectar níveis reduzidos de degradação dos reagentes.<sup>2</sup>

O tecido de controlo positivo recomendado é a pele.

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.

O controlo de tecido negativo recomendado é o cerebelo.

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

A coloração não específica, caso ocorra, tem geralmente um aspecto difuso. A coloração esporádica do tecido conjuntivo pode também ter lugar em secções de tecido excessivamente fixado em formol. Devem utilizar-se células intactas para a interpretação dos resultados da coloração. As células necróticas ou degeneradas causam muitas vezes uma coloração não específica.<sup>3</sup> Podem verificar-se resultados positivos falsos devido à ligação não imunológica de proteínas ou de produtos da reacção do substrato. Esses resultados podem também ser causados por enzimas endógenas tais como a pseudoperoxidase (eritrócitos), a peroxidase endógena (citocromo C), ou a biotina endógena (ex. no fígado, mama, cérebro ou rim) dependendo do tipo de imunocoloração utilizado. Para diferenciar entre a actividade das enzimas endógenas e as ligações não específicas de enzimas de imunoreactividade específica, podem colorir-se tecidos adicionais dos doentes exclusivamente com substrato cromogénio ou com complexos de enzimas (avidina-biotina, estreptavidina, polímero marcado) 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 do doente coloridas com NCL-L-EGFR 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.

## Resultados Previstos

### Tecidos normais

O clone EGFR 113 detecta o antígeno do receptor do factor de crescimento epidérmico na superfície celular de uma variedade de tecidos normais. Registou-se uma forte coloração da membrana nas células basais da epiderme da pele e no epitélio escamoso estratificado do colo do útero e amígdala. Na pele, as glândulas ecrinas e sebáceas também deram resultados positivos. Observou-se a imunocoloração no epitélio colunar pseudo-estratificado dos brônquios e no epitélio transicional do tracto urinário. Observou-se uma expressão forte em sincitiotrofoblastos da placenta. As glândulas endometriais também deram resultados positivos variáveis.

### Tecidos tumorais

O clone EGFR 113 coloriu uma variedade de neoplasias (n=67/132), incluindo 9/12 carcinomas da bexiga, 17/18 carcinomas de célula escamosa, 18/32 carcinomas da mama, 3/3 tumores colorectais, 2/4 carcinomas da próstata, 6/12 adenocarcinomas do pulmão, 2/2 carcinomas endometriais, 0/4 carcinomas pulmonares de célula pequena e 0/5 linfomas. Pode observar-se a positividade citoplasmática em alguns tumores.

### **NCL-L-EGFR é recomendado para determinar a condição do receptor do factor de crescimento epidérmico dos tecidos normais e neoplásticos.**

## Limitações Gerais

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

A coloração de tecidos depende do seu manuseamento e processamento antes da sua coloração. A fixação, congelação, descongelação, lavagem, secagem, aquecimento ou corte incorrectos das amostras, ou a sua contaminação com outros tecidos ou fluidos, podem produzir artefactos, retenção de anticorpos, ou resultados falso-negativos. Os resultados inconsistentes podem dever-se a variações nos métodos de fixação e envolvimento ou a irregularidades inerentes ao tecido.<sup>4</sup>

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

A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos empregando os devidos controlos e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico.

Os anticorpos da Leica Biosystems Newcastle Ltd destinam-se a serem utilizados, conforme indicado, em secções de tecido ou congeladas ou 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.

### **Bibliografia - Geral**

1. 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.
2. 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.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ et al. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *Journal of Clinical Pathology*. 2003; 56(4):300–304.
6. Sriplakich S, Jahnsen S and Karlsson MG. Epidermal growth factor receptor expression: predictive value for the outcome after cystectomy for bladder cancer? *BJU Int*. 1999; 83(4):498–503.
7. Inoue K, Chikazawa M, Karashima T et al. Overexpression of c-Met/hepatocyte growth factor receptors in human prostatic adenocarcinoma. *Acta Med Okayama* 1998; 52(6):305–310.
8. Tungekar MF and Linehan J. Patterns of expressions of transforming growth factor and epidermal growth factor receptor in squamous cell lesions of the urinary bladder. *Journal of Clinical Pathology*. 1998; 51:583–587.

### **Emendas Da Edição Anterior**

Não é aplicável.

### **Data De Emissão**

20 de Junho de 2008 (NCL-L-EGFR/CE/UK)

# Metodologia de imunohistoquímica para utilização de anticorpos Novocastra™ em tecido envolvido em parafina, por meio da técnica de recuperação de antígenos a alta temperatura

## A. Reagentes necessários mas não fornecidos

1. Solventes comuns utilizados em imunohistoquímica.
2. 0,5% v/v Peróxido de hidrogénio.
3. Solução salina tampão Tris (TBS), 50 mM, pH 7,6.
4. Solução/soluções para a recuperação de antígeno – ver Recomendações sobre a Utilização.
5. Diluente do anticorpo – soro normal diluído a um nível óptimo.
6. Soros normais da espécie em que o anticorpo secundário tenha sido desenvolvido.
7. Anticorpo secundário biotilado – preparar conforme recomendado pelo fabricante.
8. Complexo de Avidina/Biotina-Peroxidase de rábano silvestre (ABC-HRP) – preparar conforme recomendado pelo fabricante.
9. 3,3' Tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB) – preparar conforme recomendado pelo fabricante.
10. Contraste de hematoxilina – preparar conforme recomendado pelo fabricante.
11. Meio de montagem – usar conforme recomendado pelo fabricante.

## B. Equipamento necessário mas não fornecido

1. Incubador regulado para 25 °C.
2. Painel de Pressão de Aço Inoxidável (a Novocastra™ recomenda a mudança dos vedantes a intervalos regulares, a fim de manter níveis óptimos de recuperação).
3. Equipamento geral de laboratório de imunohistoquímica.

## Nota de segurança

LEIAS AS INSTRUÇÕES DO FABRICANTE DA PAINEL DE PRESSÃO para utilizar a mesma de forma correcta e segura.

## C. Soluções de recuperação de antígeno (ver as Recomendações sobre a Utilização)

### Solução de recuperação citrato a 0,01 M (pH 6,0)

Adicionar 3,84 gramas de ácido cítrico (anidro) a 1,8 l de água destilada. Ajustar até um pH de 6,0 usando 1 M NaOH. Juntar água destilada até obter um volume de 2l.

### Solução de recuperação EDTA a 1 mM (pH 8,0)

Adicionar 0,37 g de EDTA (código de produto SIGMA E-5134) a 1 l de água destilada. Ajustar até um pH de 8,0 usando 1 M NaOH.

### Solução de recuperação Tris/0,65 mM EDTA/0,0005% Tween 20, 20 mM (pH 9,0)

Dissolver 14,4 g de Tris (código de produto BDH 271197K) e 1,44g de EDTA (código de produto SIGMA E-5134) em 0,55l de água destilada. Ajustar até um pH de 9, usando 1 M HCl, e adicionar 0,3 ml de Tween 20 (código de produto SIGMA P-1379). Juntar água destilada até obter 0,6 l. Este produto é concentrado 10x e deve ser diluído com água destilada conforme necessário (p. ex. 0,15 diluído com 1,35 l de água destilada).

## D. Metodologia

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

O cliente deve determinar quais as fórmulas de diluição óptimas para os anticorpos. 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. Desparafinar as secções em xileno ou substitutos de xileno.
3. Reidratar através de álcoois graduados.
4. Neutralizar a peroxidase endógena por meio de peróxido de hidrogénio/metanol a 0,5% v/v durante 10 minutos.
5. Lavar as lâminas em água corrente de torneira.

Pré-tratar as secções da seguinte maneira:

6. Aquecer 1,5 l da solução de recuperação recomendada (ver Recomendações sobre a Utilização) numa panela de pressão até ao ponto de ebulição. Cobrir com a tampa, mas não engatar. Posicionar as lâminas nos suportes de metal para coloração (não colocar as lâminas próximas umas das outras, para evitar uma coloração desigual) e mergulhar na panela de pressão, certificando-se de que as lâminas ficam completamente submersas na solução de recuperação. Engatar a tampa. Uma vez que a panela de pressão tenha alcançado a temperatura e pressão operacional, marcar 1 minuto (a não ser que verifique recomendação em contrário nas Recomendações sobre a Utilização). Retirar a panela de pressão da fonte de calor, e colocar sob a corrente de água fria de uma torneira, com a tampa em posição. NÃO ABRIR A TAMPATÉ QUE OS INDICADORES MOSTREM QUE A PRESSÃO BAIXOU. Abrir a tampa, retirar as lâminas e colocá-las imediatamente sob a corrente de água fria de uma torneira.
7. Lavar as secções em TBS durante 1 x 5 minutos, agitando-as levemente.
8. Cobrir as secções com soro normal diluído durante 10 minutos.
9. Incubar as secções com anticorpo primário optimamente diluído (ver Recomendações sobre a Utilização).
10. Lavar em tampão TBS durante 2 x 5 minutos, agitando levemente.
11. Incubar as secções num anticorpo secundário biotilado apropriado.
12. Lavar em tampão TBS durante 2 x 5 minutos, agitando levemente.
13. Incubar as lâminas em ABC-HRP.
14. Lavar em tampão TBS durante 2 x 5 minutos, agitando levemente.
15. Incubar as lâminas em DAB.
16. Enxaguar as lâminas em água.

18. Contrastar com hematoxilina.
18. Desidratar, soltar e montar as secções.

#### **E. Emendas da Edição Anterior**

Apenas a disposição sofreu alterações. O texto da edição anterior não foi emendado de forma nenhuma.

#### **F. Data de Emissão**

23rd June 2004 (CEprotocol/HTAUT).

# Novocastra™ Væskeformigt Monoklonalt Museantistof

## Epidermal Growth Factor Receptor

### Produktkod: NCL-L-EGFR

#### Avsedd Användning

*För in vitro diagnostisk användning.*

NCL-L-EGFR är avsedd för kvalitativ identifiering med ljusmikroskopi av Epidermal Growth Factor Receptor-molekyler i paraffinsnitt. 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

Immunhistokemiska (IHC) färgningstekniker tillåter visualisering av antigener genom sekvenstillämpning av en specifik antikropp till antigenet (primär antikropp), en sekundär antikropp till den primära antikroppen och ett enzymkomplex med ett kromogent substrat med inlagda tvättsteg. Den enzymatiska aktiveringen av kromogenet resulterar i en synlig reaktionsprodukt på antigenområdet. Proverna kan då kontrastfärgas och förses med täckglas. Resultaten tolkas med ljusmikroskop och bidrar till differentialdiagnosen av patofysiologiska processer som eventuellt kan associeras till ett särskilt antigen.

#### Klon

EGFR.113

#### Immunogen

Prokaryotiskt fusionsprotein som motsvarar den externa domänen av den epidermala tillväxtfaktor receptor molekylen.

#### Specifitet

Extern domän av den humana epidermala tillväxtfaktor receptorn.

#### Reagensinnehåll

NCL-L-EGFR är en flytande supernatant från vävnadsodling som innehåller 15 mM natriumazid som konserveringsmedel.

#### Ig-klass

IgG2a

#### Total Proteinkoncentration Total Protein

1,0–8,0 g/l. Se flaskans etikett för total specifik proteinkoncentration för satsen.

#### Antikropps-koncentration

Större än eller lika med 93,6 mg/l fastställt genom ELISA. Se flaskans etikett för specifik Ig-koncentration för satsen.

#### Rekommendationer Vid Användning

Immunhistokemi (se **D. Metodologi**) på paraffinsnitt. Föreslagen spädning: 1:10–1:20 i 60 minuter vid 25 °C. Hög temperatur antigenåtervinning med 0,01 M citratåtervinningslösning (pH 6,0) rekommenderas. Detta är endast en riktlinje och användare bör själva fastställa den optimala bruksspädningen.

#### Förvaring Och Stabilitet

Förvara vid 2–8 °C. Frys ej. Återgå till 2–8 °C direkt efter användning. Använd ej efter det utgångsdatum som anges på flaskans etikett. Förvaringsförhållanden som skiljer sig från de ovannämnda måste kontrolleras av användaren.

#### Preparation Av Prov

Rekommenderat fixeringsmedel för paraffinbäddade vävnadsnitt är 10% neutralbuffrat formalin.

#### Varningar Och Försiktighetsåtgärder

Reagenset har förberetts från supernatanten av vävnadsodlingar. Eftersom det är en biologisk produkt bör skälig försiktighet iakttas vid hantering.

Natriumazidens molaritet i reagenset är 15 mM. Varuinformationsblad (MSDS) för natriumazid finns att få på begäran.

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

Före och efter fixering bör prover och alla material som har varit utsatta för dem hanteras som om det finns risk för att de kan överföra infektioner och kasseras med iakttagande av försiktighet.<sup>1</sup> Pipettera aldrig reagenser med munnen och se till att huden och slemhinnorna inte kommer i kontakt med reagens och prover. Om reagens eller prover kommer i kontakt med känsliga områden, tvätta med rikliga mängder vatten. Rådgör med läkare.

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.

#### 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 färsk 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 vid varje färgningskörning.

En vävnad med svag positiv färgning är mer lämplig för optimal kvalitetskontroll och för att upptäcka låga nivåer av reagensdegradering än en vävnad med stark positiv färgning.<sup>2</sup>

Hud rekommenderas som positiv kontrollvävnad.

Om den positiva vävnadskontrollen inte uppvisar positiv färgning bör resultat med testproverna anses vara ogiltiga.

## Negativ Vävnadskontroll

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

Lillhjärnan rekommenderades som negativ kontrollvävnad.

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

Ospecifik färgning, om det förekommer, har ofta ett diffust utseende. Sporadisk färgning av bindväv kan också observeras i snitt från överflödigt formalinfixerade vävnader. Använd intakta celler för tolkning av färgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler färgar ofta ospecifikt.<sup>3</sup> Falskt positiva resultat kan uppstå p.g.a. icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erythrocyter), endogent peroxid (cytokrom C) eller endogent biotin (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure) beroende på typ av immunfärgning som används. För att skilja endogen enzymaktivitet eller ospecifik enzymbindning från specifik immunreaktivitet kan ytterligare patientvävnader färgas exklusivt med respektive substratkromogen eller enzymkomplex (avidin-biotin, streptavidin, märkt polymer) och substrat-kromogen. Om specifik färgning sker i den negativa vävnadskontrollen bör resultat med patientprover anses vara ogiltiga.

## Negativ Reagenskontroll

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

## Patientvävnad

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

## Förväntade Resultat

### Normal vävnad

Klon EGFR.113 upptäcker den epidermala tillväxtfaktor receptor antigenen på cellytan i en mängd normala vävnader. Stark membranfärgning påträffades i de basala cellerna av hudepidermis och i flerskiktat skvamöst epitel av cervix och tonsill. I huden var ekkrina och talgkörtlarna också positiva. Immunfärgning observerades i bronkernas pseudoskiktade kolumnepitel och urinvägarnas övergångsepitel. Starkt uttryck observerades i placentans syncytiotrofoblaster. De endometriala körtlarna var också omväxlande positiva.

### Tumörvävnader

Klon EGFR.113 färgade en mängd neoplasier (n=67/132), inklusive 9/12 urinbläsecarcinom, 17/18 skvamösa cellcarcinom, 18/32 bröstcarcinom, 3/3 kolorektala tumörer, 2/4 prostatacarcinom, 6/12 lungadenocarcinom, 2/2 endometrial carcinoma, 0/4 småcelliga lungcancer och 0/5 lymfom. Cytoplasmatisk positivitet kan observeras hos vissa tumörer.

### NCL-L-EGFR rekommenderas för bestämning av den epidermala tillväxtfaktor receptorns status av normala och neoplastiska vävnader.

## Allmänna Begränsningar

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

Vävnadsfärgning påverkas av hantering och bearbetning av vävnaden före färgningen. Felaktig fixering, nedfrysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering av 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 i vävnaden.<sup>4</sup>

Överflödigt eller ofullständig kontrastfärgning kan försvåra en korrekt tolkning av resultatet.

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.

Antikroppar från Leica Biosystems Newcastle Ltd är till för användning så som anges på antingen frysta eller paraffinbäddade snitt med specifika fixeringskrav. Öväntat antigenuttryck kan ske, speciellt i neoplasmer. Morfologisk analys och utvärdering av lämpliga kontroller måste ingå i den kliniska tolkningen av alla färgade vävnadssnitt.

## Bibliografi - Allmän

1. 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.
2. 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.
3. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.

4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ et al. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *Journal of Clinical Pathology*. 2003; 56(4):300–304.
6. Sriplakich S, Jahnsen S and Karlsson MG. Epidermal growth factor receptor expression: predictive value for the outcome after cystectomy for bladder cancer? *BJU Int*. 1999; 83(4):498–503.
7. Inoue K, Chikazawa M, Karashima T et al. Overexpression of c-Met/hepatocyte growth factor receptors in human prostatic adenocarcinoma. *Acta Med Okayama* 1998; 52(6):305–310.
8. Tungekar MF and Linehan J. Patterns of expressions of transforming growth factor and epidermal growth factor receptor in squamous cell lesions of the urinary bladder. *Journal of Clinical Pathology*. 1998; 51:583–587.

### **Rättelser Av Tidigare Utgivning**

Galler inte.

### **Utgivningsdatum**

20 juni 2008 (NCL-L-EGFR/CE/UK).

# Immunhistokemisk metodologi för användning av Novocastra™ antikroppar på paraffinbäddad vävnad med hög temperatur antigenåtervinningsstekniken.

## A. Reagens som krävs men ej tillhandahålls

1. Standard lösningar som används inom immunhistokemi.
2. 0,5% v/v Väteperoxid.
3. 50 mM Trisbuffrad salt (TBS) pH 7,6.
4. Antigenåtervinningslösning(ar) – se Rekommendationer vid användning.
5. Antikroppsutspädningsmedel – optimalt spätt normalt serum.
6. Normal sera från arterna i vilka den sekundära antikroppen odlas.
7. Sekundär biotinylerad antikropp – bered enligt tillverkarens rekommendationer.
8. Avidin/Biotin komplex - pepparrotsperoxid (ABC-HRP) – bered enligt tillverkarens rekommendationer.
9. 3,3' Diaminobenzidin tetrahydroklorid (DAB) – bered enligt tillverkarens rekommendationer.
10. Hematxylin kontrastfärgning – bered enligt tillverkarens rekommendationer.
11. Monteringsmedel – bered enligt tillverkarens rekommendationer.

## B. Utrustning som krävs men ej tillhandahålls

1. Inkubator inställd på 25 °C.
2. Tryckkokare av rostfritt stål (Novocastra™ rekommenderar att packningen byts ut med regelbundna intervaller för att upprätthålla optimala förhållande för demaskering).
3. Allmän immunhistokemisk laboratorieutrustning.

## Notering om säkerhet

För att försäkra er om korrekt och riskfri användning av er tryckkokare, VAR GOD LÄS TILLVERKARENS INSTRUKTIONER.

## C. Antigenåtervinningslösningar (se Rekommendationer vid användning)

### 0,01 M citratåtervinningslösning (pH 6,0)

Tillsätt 3,84 gram citronsyra (vattenfri) till 1,8L destillerat vatten. Justera till pH 6,0 med 1 M NaOH. Blanda ihop till 2 L med destillerat vatten.

### 1mM EDTA återvinningslösning (pH 8,0)

Tillsätt 0,37 g EDTA (SIGMA produktkod E-5134) till 1 L destillerat vatten. Justera pH till 8,0 med 0,1 M NaOH.

### 20mM Tris/0,65mM EDTA/0,0005% Tween 20 återvinningslösning (pH 9,0)

Lös upp 14,4 g Tris (BDH produktkod 271197K) och 1,44 g EDTA (SIGMA produktkod E-5134) till 0,55 L destillerat vatten. Justera pH till 9 med 1 M HCL och tillsätt 0,3 ml Tween 20 (SIGMA produktkod P-1379). Blanda ihop till 0,6 L med destillerat vatten. Detta är ett 10 x koncentrat som bör spädas med destillerat vatten enligt behov (t.ex. 0,15 L spätt med 1,35 L destillerat vatten).

## D. Metodologi

Innan denna metodologi tillämpas måste användare utbildas i immunhistokemiska tekniker.

Kunder bör fastställa optimal spädning för antikroppar. Alla steg utförs vid rumstemperatur (25 °C) om inget annat anges.

1. Skär och montera snitten på objektglas klädda med lämpligt vävnadskliester.
2. Avparaffinera snitten i xylol eller xylol ersättningspreparat.
3. Återhydratisera genom olika grader av sprit.
4. Neutralisera endogent peroxid (med 0,5%v/v väteperoxid/metanol i 10 minuter).
5. Tvätta objektglasen under rinnande kranvatten.

Förbehandla snitten enligt följande:

6. Värm 1,5 L av den rekommenderade återvinningslösningen (se Rekommendationer vid användning) i en tryckkokare tills den kokar. Täck men läs ej locket. Sätt objektglasen i färgningshyllorna av metall (sätt ej objektglasen tätt ihop eftersom det kan leda till ojämn färgning) och sänk ned i tryckkokaren, se till att objektglasen är helt nedsänkta i återvinningslösning. Lås locket. När tryckkokaren uppnår driftstemperatur och tryck ta tiden under en minut (om ej annat anges i Rekommendationer vid användning) Ta bort tryckkokaren från värmekällan och låt rinna under kallt vatten med locket på. ÖPPNA EJ LOCKET FÖRRÄN INDIKATORERNA VISAR ATT TRYCKET HAR SLÄPPT. Öppna locket, ta bort objektglasen och placera omedelbart i svalt kranvatten.
7. Tvätta snitten i TBS i 1 x 5 minuter och gunga försiktigt.
8. Täck snitten med normalt spätt serum i 10 minuter.
9. Inkubera snitten med optimalt spädd primär antikropp (se Rekommendationer vid användning).
10. Tvätta snitten i TBS buffert i 2 x 5 minuter och gunga försiktigt.
11. Inkubera snitten i lämplig biotinylerad sekundär antikropp.
12. Tvätta snitten i TBS buffert i 2 x 5 minuter och gunga försiktigt.
13. Inkubera objektglasen i ABC-HRP.
14. Tvätta snitten i TBS buffert i 2 x 5 minuter och gunga försiktigt.
15. Inkubera objektglasen i DAB.
16. Skölj objektglasen i vatten.
17. Kontrastfärga med hematxylin.
18. Dehydratisera, röj och montera snitten.

**Rättelser av tidigare utgivning**

Ändringar har gjorts endast i layout. Texten har inte förändrats sedan förra utgåvan.

**Utgivningsdatum**

23rd June 2004 (CEprotokoll/HTAUT).

# Novocastra™ Υγρό μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού Epidermal Growth Factor Receptor Κωδικός είδους: NCL-L-EGFR

## Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Το NCL-L-EGFR προορίζεται για την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός της ανθρώπινης Μόρια Epidermal Growth Factor Receptor σε τομές παραφίνης. 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

Οι τεχνικές ανοσοϊστοχημικής (IHC) χρώσης επιτρέπουν την οπτικοποίηση των αντιγόνων μέσω της διαδοχικής εφαρμογής ενός ειδικού αντισώματος στο αντιγόνο (πρωτοταγές αντίσωμα), ενός δευτεροταγούς αντισώματος στο πρωτοταγές αντίσωμα και ενός ενζυμικού συμπλόκου με χρωμογόνο υποστρώμα με παρεμβαλλόμενα βήματα πλύσης. Η ενζυμική ενεργοποίηση του χρωμογόνου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ορατού προϊόντος αντίδρασης στη θέση του αντιγόνου. Το δείγμα μπορεί κατόπιν να υποβληθεί σε αντίχρωση και να καλυφθεί με καλυπτρίδα. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με χρήση μικροσκοπίου φωτός και βοηθούν στη διαφορική διάγνωση παθοφυσιολογικών εξεργασιών, οι οποίες ενδέχεται ή όχι να σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

## Κλώνος

EGFR.113

## Ανοσογόνο

Προκαρμωπική πρωτεΐνη σύντηξης που αντιστοιχεί στην εξωτερική περιοχή του μορίου του υποδοχέα παράγοντα ανάπτυξης επιδερμίδας.

## Ειδικότητα

Εξωτερική περιοχή του ανθρώπινου υποδοχέα παράγοντα ανάπτυξης επιδερμίδας.

## Σύνθεση Αντιδραστήριου

Το NCL-L-EGFR είναι ένα υγρό υπερκείμενο ιστοκαλλιέργειας που περιέχει 15 mM αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.

## Τάξη Ig

IgG2a

## Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης

Total Protein

1,0–8,0 g/L. Για την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

## Συγκέντρωση Αντισώματος

Μεγαλύτερη ή ίση με 93,6 mg/L, όπως προσδιορίζεται με ELISA. Για τη συγκέντρωση Ig που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

## Συστάσεις Για Τη Χρήση

Ανοσοϊστοχημεία (δείτε την ενότητα “Δ. Μεθοδολογία”) σε τομές παραφίνης. Προτεινόμενη αραίωση: 1:10–1:20 επί 60 λεπτά στους 25 °C. Συνιστάται ανάκτηση αντιγόνου σε υψηλή θερμοκρασία με χρήση διαλύματος ανάκτησης κπικίων 0,01 M (pH 6,0). Αυτό παρέχεται ως οδηγός και οι χρήστες θα πρέπει να προσδιορίζουν τις δικές τους βέλτεστες αραιώσεις εργασίας.

## Φύλαξη Και Σταθερότητα

Φυλάσσετε στους 2–8 °C. Μην καταψύχετε. Επαναφέρετε στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Μην χρησιμοποιείτε μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Τυχόν συνθήκες φύλαξης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται παραπάνω πρέπει να επαληθεύονται από το χρήστη.

## Παρασκευή Δείγματος

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

## Προειδοποιήσεις Και Προφυλάξεις

Το αντιδραστήριο αυτό έχει παρασκευαστεί από το υπερκείμενο κυτταροκαλλιέργειας. Επειδή είναι βιολογικό προϊόν, θα πρέπει να γίνεται ως δίνεται εύλογη προσοχή κατά το χειρισμό του.

Η μοριακότητα του αζιδίου του νατρίου στο αντιδραστήριο αυτό είναι 15 mM. Κατόπιν αιτήματος, διατίθεται ένα δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού (MSDS) για το αζίδιο του νατρίου.

Συμβουλευτείτε τους ομοσπονδιακούς, πολιτειακούς ή τοπικούς κανονισμούς για απόρριψη τυχόν δυνητικών τοξικών συστατικών.

Ο χειρισμός δειγμάτων, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, καθώς και όλων των υλικών που έχουν εκτεθεί σε αυτά, θα πρέπει να γίνεται ως εάν ήταν δυνητικά μετάδοσης λοίμωξης και η απόρριψή τους να πραγματοποιείται λαμβάνοντας τις σωστές προφυλάξεις.<sup>1</sup> Μην αναρροφάτε ποτέ με πιπέτα αντιδραστήρια με το στόμα και αποφύγετε 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 αφθονες ποσότητες νερού. Ζητήστε τη συμβουλή ιατρού.

Ελαχιστοποιήστε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διότι ενδέχεται να συμβεί αύξηση μη ειδικής χρώσης.

Χρόνοι ή θερμοκρασίες επώασης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται ενδέχεται να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τυχόν τέτοιες μεταβολές πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη.

## 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 νεκροψιας/βιοψίας/χειρουργικά δείγματα, τα οποία είναι μονιμοποιημένα σε φορμόλη, επεξεργασμένα και εγκλεισμένα σε κηρό παραφίνης, το συντομότερο δυνατό με τον ίδιο τρόπο με το(α) δείγμα(τα) του ασθενούς.

## Θετικός Μάρτυρας Ιστού

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

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

Ένας ιστός με ασθενή θετική χρώση είναι πιο κατάλληλος από έναν ιστό με ισχυρή εξωτερική χρώση για βέλτιστο έλεγχο ποιότητας και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόμησης των αντιδραστηρίων.<sup>2</sup>

Συνιστώμενος ιστός θετικού μάρτυρα είναι το δέρμα.

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 αντισώμα.

Συνιστώμενος ιστός αρνητικού μάρτυρα είναι η παρεγκεφαλίδα.

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

Μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, έχει συνήθως διάχυτη εμφάνιση. Ενδέχεται επίσης να παρατηρηθεί σποραδική χρώση του συνδεδεμένου ιστού σε τομές από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με υπερβολική ποσότητα φορμόλης. Χρησιμοποιείτε άθικτα κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης. Νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα παρουσιάζουν συχνά μη ειδική χρώση.<sup>3</sup> Ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ανοσολογικής δέσμευσης των πρωτεϊνών ή των προϊόντων αντίδρασης του υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδουπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός) ανάλογα με τον τύπο ανοσοχρώσης που χρησιμοποιείται. Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμευσης των ενζύμων από ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπλέον ιστούς με χρωμογόνο υποστρώματος ή ενζυμικά σύμπλοκα (αβιδίνη-βιοτίνη, στρεπταβιδίνη, σημασμένο πολυμερές) και υπόστρωμα-χρωμογόνο, αντίστοιχα. Εάν παρουσιαστεί ειδική χρώση στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενούς θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

## Αρνητικός Μάρτυρας Αντιδραστήριου

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

## Ιστός Ασθενούς

Εξετάστε τελευταία τα δείγματα ασθενούς που έχουν χρωματιστεί με το NCL-L-EGFR. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκτιμάται στα πλαίσια της 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.

## Αναμενόμενα Αποτελέσματα

### Φυσιολογικοί ιστοί

Με τον κλώνο EGFR.113 ανιχνεύεται το αντιγόνο του υποδοχέα παράγοντα ανάπτυξης επιδερμίδας στην κυτταρική επιφάνεια σε μια ποικιλία φυσιολογικών ιστών. Ισχυρή χρώση μεμβράνης διαπιστώθηκε στα βασικά κύτταρα της επιδερμίδας του δέρματος και σε πολλοί/στοιβακώδεις επιθήλιο του τραχήλου και της αμυγδαλής. Στο δέρμα, οι απεκκριτικοί και οι σηματοδοτικοί αδένες ήταν επίσης θετικοί. Παρατηρήθηκε ανοσοχρώση στο ψευδοπλοστίβο κυλινδρικό επιθήλιο των βρόγχων και στο μεταβατικό επιθήλιο της ουροφόρας οδού. Ισχυρή έκφραση παρατηρήθηκε σε συγκυτιοτροφοβλάστες του πλακούντα. Οι αδένες του ενδομητρίου ήταν επίσης μεταβλητά θετικοί.

### Καρκινικοί ιστοί

Με τον κλώνο EGFR.113 χρωματίστηκε μια ποικιλία νεοπλασιών (n=67/132), συμπεριλαμβανομένων 9/12 καρκινωμάτων της ουροδόχου κύστης, 17/18 ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων, 18/32 καρκινωμάτων του μαστού, 3/3 ορθοκολικών όγκων, 2/4 καρκινωμάτων του προστάτη, 6/12 αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα, 2/2 καρκινωμάτων του ενδομητρίου, 0/4 μικροκυτταρικών καρκινωμάτων του πνεύμονα και 0/5 λεμφωμάτων. Σε μερικούς όγκους είναι δυνατό να παρατηρηθεί κυτταροπλασματική θετικότητα.

**Το NCL-L-EGFR συνιστάται για προσδιορισμό της κατάστασης του υποδοχέα παράγοντα ανάπτυξης επιδερμίδας των φυσιολογικών και των νεοπλασματικών ιστών.**

## Γενικοί Περιορισμοί

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια διαγνωστική διεργασία πολλαπλών βημάτων, η οποία αποτελείται από ειδικευμένη εκπαίδευση στην επιλογή των κατάλληλων αντιδραστηρίων, επιλογή ιστού, μονιμοποίηση και επεξεργασία, προετοιμασία 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, αποψίξη, πλύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να παράγει μορφώματα, παγίδευση αντισώματος ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τυχόν ασυνεπή αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται σε παραλλαγές των μεθόδων μονιμοποίησης και εγκλεισμού ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.<sup>4</sup>

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

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

Τα αντισώματα που παρέχονται από την Leica Biosystems Newcastle Ltd προορίζονται για χρήση, όπως υποδεικνύεται, είτε σε κατεψυγμένες είτε σε εγκλεισμένες σε παραφίνη τομές, με ειδικές απαιτήσεις μονιμοποίησης. Ενδέχεται να παρουσιαστεί μη αναμενόμενη έκφραση αντιγόνου, ειδικά σε νεοπλασμάτα. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρωματισμένης τομής ιστού πρέπει να περιλαμβάνει μορφολογική ανάλυση και την αξιολόγηση των κατάλληλων μαρτύρων.

## **Βιβλιογραφία - Γενική**

1. 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.
2. 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.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ et al. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. Journal of Clinical Pathology. 2003; 56(4):300–304.
6. Sriplakich S, Jahnsen S and Karlsson MG. Epidermal growth factor receptor expression: predictive value for the outcome after cystectomy for bladder cancer? BJU Int. 1999; 83(4):498–503.
7. Inoue K, Chikazawa M, Karashima T et al. Overexpression of c-Met/hepatocyte growth factor receptors in human prostatic adenocarcinoma. Acta Med Okayama 1998; 52(6):305–310.
8. Tungekar MF and Linehan J. Patterns of expressions of transforming growth factor and epidermal growth factor receptor in squamous cell lesions of the urinary bladder. Journal of Clinical Pathology. 1998; 51:583–587.

## **Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση**

Δεν έχει εφαρμογή.

## **Ημερομηνία Έκδοσης**

20 Ιουνίου 2008 (NCL-L-EGFR/CE/UK)

# Μεθοδολογία ανοσοϊστοχημείας για χρήση αντισωμάτων Novocastra™ σε ιστό εγκλεισμένο σε παραφίνη με χρήση της τεχνικής ανάκτησης αντιγόνου σε υψηλή θερμοκρασία.

## A. Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Πρότυποι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημεία.
2. 0.5% v/v Υπεροξειδίου του υδρογόνου.
3. 50 mM αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος Tris (TBS) pH 7.6.
4. Διάλυμα(τα) ανάκτησης αντιγόνου – δείτε την ενότητα “Συστάσεις για τη χρήση”.
5. Αραιωτικό αντισώματος – βέλτιστα αραιωμένος φυσιολογικός ορός.
6. Φυσιολογικοί οροί από το είδος στο οποίο αναπτύσσεται το δευτεροταγές αντίσωμα.
7. Δευτεροταγές βιοτινυλιωμένο αντίσωμα – παρασκευάζετε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
8. Σύμπλοκο αβιδίνης/βιοτίνης-Υπεροξειδάση χρένου (ABC-HRP) - παρασκευάζετε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
9. Τετραϋδροχλωρική 3,3' διαμοιβενζιδίνη (DAB) - παρασκευάζετε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
10. Αντιχρωση αιματοξυλίνης - παρασκευάζετε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
11. Μέσο στερέωσης – χρησιμοποιείτε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

## B. Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

1. Θάλαμος επώασης ρυθμισμένος στους 25 °C.
2. Ατμοκλιβανός από ανοξείδωτο χάλυβα (H Novocastra™ συνιστά την αλλαγή των παρεμβυσμάτων σε τακτικά διαστήματα για τη διατήρηση των βέλτιστων συνθηκών αποκάλυψης).
3. Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός ανοσοϊστοχημείας.

## Σημείωση ασφαλείας

Για να διασφαλιστεί η σωστή και ασφαλής χρήση του ατμοκλιβανού σας, ΠΑΡΑΚΑΛΟΥΜΕ ΔΙΑΒΑΣΤΕ ΤΙΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΤΟΥ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗ.

## Γ. Διαλύματα ανάκτησης αντιγόνου (δείτε την ενότητα “Συστάσεις για τη χρήση”)

### Διάλυμα ανάκτησης κιτρικών 0,01 M (pH 6,0)

Προσθέστε 3,84 g κιτρικού οξέος (άνυδρου) σε 1,8 L απεσταγμένου νερού. Ρυθμίστε σε pH 6,0 με χρήση 1 M NaOH. Αυξήστε τον όγκο έως τα 2 L με απεσταγμένο νερό.

### Διάλυμα ανάκτησης EDTA 1 mM (pH 8,0)

Προσθέστε 0,37 g EDTA (κωδικός είδους E-5134 της SIGMA) σε 1 L απεσταγμένου νερού. Ρυθμίστε σε pH 8,0 με χρήση 0,1 M NaOH.

### Διάλυμα ανάκτησης 20 mM Tris/0,65 mM EDTA/0,0005% Tween 20 (pH 9,0)

Διαλύστε 14,4 g Tris (κωδικός είδους 271197K της BDH) και 1,44 g EDTA (κωδικός είδους E-5134 της SIGMA) σε 0,55 L απεσταγμένου νερού. Ρυθμίστε το pH στο 9 με 1 M HCl και προσθέστε 0,3 ml Tween 20 (κωδικός είδους P-1379 της SIGMA). Αυξήστε τον όγκο έως τα 0,6 L με απεσταγμένο νερό. Αυτό είναι ένα συμπύκνωμα 10x, το οποίο πρέπει να αραιώνεται με απεσταγμένο νερό, όπως απαιτείται (π.χ. 0,15 L αραιωμένα με 1,35 L απεσταγμένου νερού).

## Δ. Μεθοδολογία

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

Οι πελάτες θα πρέπει να προσδιορίσουν τις βέλτιστες αραιώσεις για αντι σώματα. 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 ξυλένιου.
  3. Επανυδατώστε μέσω διαβαθμισμένων αλκοολών.
  4. Εξουδετερώστε την ενδογενή υπεροξειδάση με χρήση 0,5% v/v υπεροξειδίου του υδρογόνου/μεθανόλης επί 10 λεπτά.
  5. Πλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε τρεχούμενο νερό βρύσης.
- Υποβάλλετε σε προεπεξεργασία τις τομές ως εξής:
6. Θερμάνετε 1,5 L του συνιστώμενου διαλύματος ανάκτησης (δείτε την ενότητα “Συστάσεις για τη χρήση”) μέχρι βρασμού σε ατμοκλιβανό. Καλύψτε τη συσκευή, αλλά μην ασφαλίσετε το καπάκι. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε μεταλλικές βάσεις χρώσης (μην τοποθετείτε τις αντικειμενοφόρους πλάκες κοντά μεταξύ τους διότι ενδέχεται να συμβεί ανομοιόμορφη χρώση) και χαμηλώστε μέσα στον ατμοκλιβανό, διασφαλίζοντας ότι οι αντικειμενοφόροι πλάκες είναι εντελώς εμβυθισμένες σε διάλυμα ανάκτησης. Ασφαλίστε το καπάκι. Όταν ο ατμοκλιβανός φθάσει σε θερμοκρασία και πίεση λειτουργίας, χρονομερήστε επί 1 λεπτό (εκτός εάν υποδεικνύεται διαφορετικά στην ενότητα “Συστάσεις για τη χρήση”). Αφαιρέστε τον ατμοκλιβανό από την πηγή θερμότητας και αφήστε να τρέξει πάνω της κρύο νερό χωρίς να αφαιρέσετε το καπάκι. ΜΗΝ ΑΝΟΙΓΕΤΕ ΤΟ ΚΑΠΑΚΙ ΠΡΟΤΟΥ ΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΔΕΙΞΟΥΝ ΟΤΙ ΕΧΕΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΘΕΙ Η ΠΙΕΣΗ. Ανοίξτε το καπάκι, αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες και τοποθετήστε τις αμέσως σε κρύο νερό βρύσης.
  7. Πλύνετε τις τομές σε TBS επί 1 x 5 λεπτά με απαλή ανακίνηση.
  8. Καλύψτε τις τομές με αραιωμένο φυσιολογικό ορό επί 10 λεπτά.
  9. Επωάστε τις τομές με βέλτιστα αραιωμένο πρωτοταγές αντίσωμα (δείτε την ενότητα “Συστάσεις για τη χρήση”).
  10. Πλύνετε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS επί 2 x 5 λεπτά με απαλή ανακίνηση.
  11. Επωάστε τις τομές σε κατάλληλο βιοτινυλιωμένο δευτεροταγές αντίσωμα.
  12. Πλύνετε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS επί 2 x 5 λεπτά με απαλή ανακίνηση.
  13. Επωάστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε ABC-HRP.
  14. Πλύνετε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS επί 2 x 5 λεπτά με απαλή ανακίνηση.



15. Επλώστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε DAB.
16. Εκπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με νερό.
17. Αντιχρωματίστε με αιματοξυλίνη.
18. Αφυδατώστε, καθαρίστε και στερεώστε τις τομές.

#### **Ε. Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση**

Έχουν γίνει τροποποιήσεις στη διάταξη μόνο. Δεν έχει τροποποιηθεί κείμενο από την προηγούμενη έκδοση.

#### **Στ. Ημερομηνία έκδοσης**

23rd June 2004 (CEprotocol/HTAUT).

# Novocastra™ Flydende Muse Monoklonalt Antistof

## Epidermal Growth Factor Receptor

### Produktkode: NCL-L-EGFR

#### Tilsigtet Anvendelse

*Til in vitro diagnostisk anvendelse.*

NCL-L-EGFR er beregnet til kvalitativ identifikation af Epidermal Growth Factor Receptor-molekyler i paraffinsnit ved lysmikroskopi.

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

Immunhistokemiske (IHC) farvningsteknikker muliggør visualisering af antigener via sekventiel tilsætning af et specifikt antistof mod antigenet (primært antistof), et sekundært antistof mod det primære antistof og et enzym kompleksbundet til et kromogent substrat med indskudte vasketrin. Den enzymatiske aktivering af kromogenet resulterer i et synligt reaktionsprodukt på antigenstedet. Prøven kan derefter kontrastfarves 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 antigen.

#### Klon

EGFR.113

#### Immunogen

Prokaryot rekombinant fusionsprotein svarende til det eksterne domæne af det epidermale vækstfaktorreceptormolekyle.

#### Specifitet

Eksternt domæne af den humane epidermale vækstfaktorreceptor.

#### Reagenssammensætning

NCL-L-EGFR er en flydende vævskultursupernatant indeholdende 15 mM natriumazid som konserveringsmiddel.

#### Ig-klasse

IgG2a

#### Totalproteinkoncentration

Total Protein

1,0–8,0 g/l. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik totalproteinkoncentration.

#### Antistofkoncentration

Større end eller lig med 93,6 mg/l som bestemt ved ELISA. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik Ig-koncentration.

#### Anbefalinger Vedrørende Anvendelse

Immunhistokemi (se **D. Metodologi**) på paraffinsnit. Foreslået fortynding: 1:10–1:20 ved 60 minutter ved 25 °C. Antigengenhedning ved høj temperatur ved anvendelse af 0,01 M citratgenfindingsopløsning (pH 6,0) anbefales. Disse retningslinier er vejledende, og brugeren bør selv bestemme egne optimale brugsopløsninger.

#### 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 hætteflaskens etikette. Andre opbevaringsbetingelser end de ovenfor angivne skal verificeres af brugeren.

#### Prøveklargøring

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

#### Advarsler Og Forholdsregler

Dette reagens er fremstillet ud fra supernatanten af en cellekultur. Da det er et biologisk produkt, skal der tages fornuftige sikkerhedsforanstaltninger ved dets håndtering.

Molariteten af natriumazid i dette reagens er 15 mM. Der kan efter anmodning leveres et datablad for materialesikkerhed (MSDS) for natriumazid.

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

Prøver skal før og efter fiksering, lige som alle materialer eksponeret mod prøverne, håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler<sup>1</sup>. Pipetter aldrig reagenser med munden og undgå, at reagenser og prøver kommer i kontakt med huden eller slimhinder. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skal der skylles efter med rigelige mængder vand. Søg læge.

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.

#### Kvalitetskontrol

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

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

### Positiv Vævskontrol

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

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

Svagt positivt farvet væv er mere egnet end kraftigt positivt farvet væv til optimal kvalitetskontrol og påvisning af små niveauer af reagensnedbrydning.<sup>2</sup>

Anbefalet positivt kontrolvæv er hud.

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

### Negativ Vævskontrol

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

Det anbefalede negative kontrolvæv er lillehjerne.

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

Uspecifik farvning har, hvis til stede, ofte et diffust udseende. Sporadisk farvning af bindevæv kan ligeledes observeres i vævssnit af væv, der er fikseret for kraftigt i formalin. Anvend intakte celler til fortolkning af farvningsresultaterne. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte mere uspecifikt.<sup>3</sup> Der kan eventuelt ses falske positive resultater, der skyldes non-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. Dette kan ligeledes skyldes endogene enzymer, såsom pseudoperoxidase (erythrocytter), endogen peroxidase (cytochrom C) eller endogent biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre) afhængigt af den anvendte type immunfarve. For at differentiere mellem endogen enzymaktivitet eller uspecifik enzymbinding og specifik immunreaktivitet kan yderligere patientvæv eventuelt farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen eller enzymkomplekser (avidin-biotin, streptavidin, mærket polymer) og substratkromogen. Hvis der optræder specifik farvning i den negative vævskontrol, skal resultaterne af patientprøverne kasseres.

### Negativ Reagenskontrol

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

### Patientvæv

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

### Forventede Resultater

#### Normalt væv

Klon EGFR-113 påviser det epidermale vækstfaktorreceptorantigen på celleoverfladen i en række forskellige normale væv. Der blev fundet kraftig farvning af membranen af basalceller i hudepidermis og i lagdelt pladeepitel fra cervix og tonsil. I hud var ekkrine og sebaceous kirtler ligeledes positive. Immunofarvning blev observeret i det pseudolagdelte søllepitel i bronkier og i transitionseptet i urinvejen. Der observeredes kraftig ekspresion i placentale syncytiotrophoblaster. Endometrikirtler var ligeledes positive i varierende grad.

#### Tumorer

Klon EGFR-113 farvede en række forskellige neoplasier (n=67/132) indbefattende 9/12 blåreccarcinomer, 17/18 pladecellecarcinomer, 18/32 brystcarcinomer, 3/3 colorektale tumorer, 2/4 prostatacarcinomer, 6/12 lungeadenocarcinomer, 2/2 endometriecarcinomer, 0/4 småcellede lungecarcinomer og 0/5 lymfomer. Positivt cytoplasma kan observeres i nogle tumorer.

**NCL-L-EGFR anbefales anvendt til bestemmelse af statusen af epidermal vækstfaktorreceptor i normalt og neoplastisk væv.**

### Generelle Begrænsninger

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

Vævsfarvning er afhængig af håndteringen og behandlingen af vævet inden farvning. Forkert fiksering, frysning, optøning, vask, tørring, opvarmning, sektionering eller kontaminering med andet væv eller andre væsker kan frembringe artefakter, indfangning af antistof eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variationer i fikserings- og indstøbningsmetoder eller irregulariteter indeholdt i vævet.<sup>4</sup>

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

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

Antistoffer fra Leica Biosystems Newcastle Ltd er som angivet beregnet til anvendelse på enten frosne eller paraffinindstøbte vævssnit med specifikke krav til fiksering. Der kan forekomme uventet antigenekspresion, navnlig i neoplasmer. Den kliniske fortolkning af alle farvede vævssnit skal indbefatte morfologisk analyse og evaluering af passende kontroller.

### Bibliografi - Generelt

1. 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.
2. 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.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.

4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ et al. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *Journal of Clinical Pathology*. 2003; 56(4):300–304.
6. Sriplakich S, Jahnsen S and Karlsson MG. Epidermal growth factor receptor expression: predictive value for the outcome after cystectomy for bladder cancer? *BJU Int*. 1999; 83(4):498–503.
7. Inoue K, Chikazawa M, Karashima T et al. Overexpression of c-Met/hepatocyte growth factor receptors in human prostatic adenocarcinoma. *Acta Med Okayama* 1998; 52(6):305–310.
8. Tungekar MF and Linehan J. Patterns of expressions of transforming growth factor and epidermal growth factor receptor in squamous cell lesions of the urinary bladder. *Journal of Clinical Pathology*. 1998; 51:583–587.

### **Rettelser Til Tidligere Udgave**

Ingen rettelser.

### **Udgivelsesdato**

20 Juni 2008 (NCL-L-EGFR/CE/UK)

# Metodik for immunohistokemi ved anvendelse af Novocastra™ antistoffer på paraffinindstøbte væv vha. antigen-genvindingsteknik ved høj temperatur.

## A. Nødvendige reagenser, som ikke er inkluderet

1. Standard opløsningsmidler, der anvendes i immunohistokemi.
2. 0,5% v/v Brintoverilte.
3. 50 mm Tris-bufferet saltvand (TBS) pH 7,6.
4. Antigen-genvindingsopløsning(er) - se Anbefalinger vedr. anvendelse.
5. Antistofsolvens- optimal opløsning af normalt serum.
6. Normale sera fra de arter, i hvilke det sekundære antistof dyrkes.
7. Sekundært biotinyleret antistof - forberedes ifølge producentens anbefalinger.
8. Avidin/biotin kompleks-peberrodsoxidase (ABC-HRP) - forberedes ifølge producentens anbefalinger.
9. 3,3' diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB) - forberedes ifølge producentens anbefalinger.
10. Hematoxilin kontrastfarve - forberedes ifølge producentens anbefalinger.
11. Monteringsmedium - anvendes ifølge producentens anbefalinger.

## B. Nødvendigt udstyr, som ikke er inkluderet

1. Inkubator sat til 25 °C.
2. Trykkoger af rustfrit stål (Novocastra™ anbefaler, at pakningerne udskiftes jævnlige for at sikre optimal rensningsprocedure).
3. Almindeligt laboratorieudstyr til immunohistokemi.

## Sikkerhedsbemærkning

For at sikre korrekt og sikker anvendelse af jeres trykkoger LÆS VENLIGST FABRIKANTENS BRUGSANVISNING.

## C. Antigen-genvindingsopløsninger (se Anbefalinger vedr. anvendelse)

### 0,01 m citrat genvindingsopløsning (pH 6,0)

3,84 gram citronsyre (vandfri) tilsættes til 1,8 l destilleret vand. pH justeres til 6,0 vha. 1 m NaOH. Der laves op til 2 l med destilleret vand.

### 1 mm EDTA-genvindingsopløsning (pH 8,0).

0,37 g EDTA (SIGMA produktkode E-5134) tilsættes til 1 l destilleret vand. pH justeres til 8,0 vha. 0,1 m NaOH.

### 20 mm Tris/0,65 mm EDTA/0,0005% Tween 20 genvindingsopløsning (pH 9,0)

14,4 g Tris (BDH produktkode 271197K) og 1,44 g EDTA (SIGMA produktkode E-5134) opløses i 0,55 l destilleret vand. pH justeres til 9 med 1 m HCl og tilsættes 0,3 ml Tween 20 (SIGMA produktkode P-1379). Der laves op til 0,6 l med destilleret vand. Dette er et 10x koncentrat, som skal fortyndes med destilleret vand efter behov (f.eks. 0,15 l fortyndet med 1,35 l destilleret vand).

## D. Metodik

Før denne metodik tages i brug, skal brugere være oplært i immunohistokemiteknikker.

Kunder skal fastlægge optimale fortyndinger for antistoffer. Med mindre andet er anført, skal alle trin udføres ved stuetemperatur (25 °C).

1. Snittene skæres og monteres på objektglas coated med en passende vævsadhæsiv.
  2. Snittene deparaffineres i xylen og xylensurrogater.
  3. Rehydreres gennem klassificeret alkohol.
  4. Endogenperoxidase neutraliseres vha. 0,5 % v/v brintoverilte/metanol i 10 minutter.
  5. Objektglassene vaskes under rindende vand fra hanen.
- Snittene forbehandles på følgende måde:
6. 1,5 l af den anbefalede genvindingsopløsning (se Anbefalinger vedr. anvendelse) sættes i kog i en trykkoger. Låget lægges på, men låses ikke fast. Objektglassene placeres i farvningsstativerne af metal (objektglassene må naturligvis ikke stå for tæt, da farvningen så påvirkes), de sænkes ned i trykkogeren, og det kontrolleres, at objektglassene er fuldstændig nedsænket i genvindingsopløsningen. Låget låses. Når trykkogeren når driftstemperatur og tryk, tages der tid i et minut (medmindre andet er anført i Anbefalinger vedr. anvendelse). Trykkogeren tages af varmen og holdes under koldt, rindende vand, med låget på. LÅGET MÅ IKKE ÅBNES, FØR INDIKATORERNE VISER, AT TRYKKET ER UDLØST. Låget åbnes, objektglassene tages ud og placeres straks i koldt vand fra hanen.
  7. Snittene vaskes i TBS i 1 x 5 minutter, imens de vugges stille og roligt frem og tilbage.
  8. Snittene dækkes med fortyndet normalt serum i 10 minutter.
  9. Snittene inkuberes med optimalt fortyndet primært antistof (se Anbefalinger vedr. anvendelse).
  10. Vaskes i TBS-buffer i 2 x 5 minutter, idet de vugges stille og roligt frem og tilbage.
  11. Snittene inkuberes i passende biotinyleret sekundært antistof.
  12. Vaskes i TBS-buffer i 2 x 5 minutter, idet de vugges stille og roligt frem og tilbage.
  13. Objektglassene inkuberes i ABC-HRP.
  14. Vaskes i TBS-buffer i 2 x 5 minutter, idet de vugges stille og roligt frem og tilbage.
  15. Objektglassene inkuberes i DAB.

16. Objektglassene skylles i vand.
17. Kontrastfarves med hæmatoxylin.
18. Snittene dehydreres, renses og monteres.

#### **E. Rettelser til tidligere udgave**

Der er kun lavet ændringer i layouten. Der er ingen ændringer i teksten i forhold til den tidligere udgave.

#### **F. Udgivelsesdato**

23rd June 2004 (CEprotocol/HTAUT).



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

