

# Novocastra™ Lyophilized Rabbit Polyclonal Antibody Ki67 Antigen

**Product Code: NCL-Ki67p**

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.



# Novocastra™ Lyophilized Rabbit Polyclonal Antibody

## Ki67 Antigen

### Product Code: NCL-Ki67p

#### Intended Use

*For in vitro diagnostic use.*

NCL-Ki67p is intended for the qualitative identification by light microscopy of human ki67 antigen. 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.

#### Immunogen

Prokaryotic recombinant fusion protein corresponding to a 1086bp Ki67 motif-containing cDNA fragment.

#### Specificity

Human Ki67 nuclear antigen expressed in all proliferating cells during late G1, S, M and G2 phases of the cell cycle. Crossreacts with rat and mouse Ki67 nuclear antigen.

#### Reagent Composition

NCL-Ki67p is a lyophilized rabbit serum containing 15 mM sodium azide as a preservative. The user is required to reconstitute the contents of the vial with the correct volume of sterile distilled water as indicated on the vial label.

#### Total Protein Concentration Total Protein

Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

#### Antibody Concentration

Not applicable.

#### Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:1000 for 60 minutes at 25 °C. High temperature antigen retrieval using 0.01M 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 unopened antibody at 2–8 °C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. Do not use after expiration date indicated on the vial label. The reconstituted antibody is stable for at least two months when stored at 2–8 °C. For long term storage, it is recommended that aliquots of the reconstituted antibody are stored frozen at -20 °C (frost-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Prepare working dilutions on the day of use. Return to 2–8 °C immediately after use. 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.† 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 tonsil.

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-Ki67p 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

NCL-Ki67p detects the Ki67 antigen in the nucleus of proliferating cells, including those in the germinal centers and epithelium of tonsil.

### Tumor Tissues

NCL-Ki67p stained proliferating cell nuclei in a variety of human normal (n=16/18) and neoplastic (n=26/56) tissues.

**NCL-Ki67p is recommended for the assessment of cell proliferation in 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 artefacts, 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. Shaaban AM, Sloane JP, West CR et al. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. *American Journal of Pathology*. 2002; 160(2):597-604.
6. van Hogerlinden M, Auer G and Toftgard R. Inhibition of Rel/Nuclear Factor-kappaB signaling in skin results in defective DNA damage-induced cell cycle arrest and Ha-ras- and p53-independent tumor development. *Oncogene*. 2002; 21(32):4969–4977.
7. Iqbal M, Davies MP, Shoker BS et al. Subgroups of non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of oestrogen receptor-positive cells. *Journal of Pathology*. 2001; 193(3):333–338.
8. Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB et al. Abnormal regulation of the oestrogen receptor in benign breast lesions. *Journal of Clinical Pathology* 2000; 53(10):778–783.
9. Torp SH. Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies. *Molecular Pathology*. 1997; 50(4):198–200.

## **Amendments to Previous Issue**

Total Protein Concentration.

## **Date of Issue**

27 April 2015

# 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).

KI67P-CE

Page 5

# Novocastra™ Anticorps polyclonal Lyophilisé de lapin

## Antigène Ki67

### Référence du Produit: NCL-Ki67p

#### Utilisation Prévue

*Diagnostic in vitro.*

Le NCL-Ki67p est destiné à l'identification qualitative par microscopie optique de la molécule de l'antigène Ki67 humain. 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

Polyclonal

#### Immunogène

Protéine procaryote de fusion recombinante correspondant à un fragment d'ADNc contenant un motif de 1086 bp du Ki67.

#### Spécificité

Antigène nucléaire Ki67 humain exprimé dans toutes les cellules en prolifération pendant les phases G1, S, M et G2 du cycle cellulaire. Présence de réactions croisées avec les antigènes nucléaires Ki67 de rat et de souris.

#### Composition du Réactif

Le NCL-Ki67p est un lyophilisé contenant une solution d'azide de sodium 15 mM comme conservateur. L'utilisateur doit reconstituer le contenu du flacon avec un volume correct d'eau distillée stérile comme indiqué sur l'étiquette du flacon.

#### Concentration Totale en Protéines

Total Protein

La concentration totale en protéines, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

#### Concentration en Anticorps

Non applicable.

#### Recommandations d'utilisation

Immunohistochimie (voir **D. Méthodologie**) sur des coupes en paraffine. Dilution préconisée : 1:1000 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

Conservé l'anticorps non ouvert à 2–8 °C. Dans ces conditions il n'y a pas de perte de performance significative du produit jusqu'à la date de péremption qui figure sur l'étiquette du flacon. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du récipient. L'anticorps reconstitué est stable pendant au moins deux mois s'il a été conservé à 2–8 °C. Pour une conservation à long terme, il est recommandé de congeler les aliquotes d'anticorps à -20 °C (l'utilisation de congélateurs à dégivrage automatique n'est pas conseillée). Ne pas congeler et décongeler de façon répétée. Préparer les dilutions de travail le jour même de leur utilisation. Remettre immédiatement à 2–8 °C après utilisation. 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 surnageant 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>

Les amygdales constituent le tissu de contrôle positif recommandé.

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 cervelet 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-Ki67p 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 réactif NCL-Ki67p détecte l'antigène Ki67 dans le noyau des cellules en prolifération, parmi lesquelles celles qui se trouvent dans les centre germinatifs et les épithéliums des amygdales.

### Tissus tumoraux

Le réactif NCL-Ki67p a marqué les noyaux des cellules en prolifération de divers tissus humains normaux (n = 16/18) et néoplasiques (n = 26/56).

**L'utilisation du NCL-Ki67p est recommandée dans le cadre de l'évaluation de la prolifération cellulaire dans les tissus normaux et néoplasiques.**



## 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. van Hogerlinden M, Auer G and Toftgard R. Inhibition of Rel/Nuclear Factor-kappaB signaling in skin results in defective DNA damage-induced cell cycle arrest and Ha-ras- and p53-independent tumor development. *Oncogene*. 2002; 21(32):4969–4977.
6. Iqbal M, Davies MP, Shoker BS et al. Subgroups of non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of oestrogen receptor-positive cells. *Journal of Pathology*. 2001; 193(3):333–338.
7. Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB et al. Abnormal regulation of the oestrogen receptor in benign breast lesions. *Journal of Clinical Pathology*. 2000; 53(10):778–783.
8. Torp SH. Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies. *Molecular Pathology*. 1997; 50(4):198–200.

## Amendements Apportés à la Version Précédente

Concentration Totale en Protéines.

## Date de Publication

27 avril 2015

# 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 –Péroxydase 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. Autocuisseur 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 autocuisseur, 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 autocuisseur. 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'autocuisseur en s'assurant que les lames soient complètement immergées dans la solution de restauration. Verrouiller le couvercle. Quand l'autocuisseur atteint sa température et sa pression de fonctionnement, compter 1 minute (sauf mention contraire dans Recommandations d'utilisation). Éloigner l'autocuisseur 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 policlonale Liofilizzato

## Antigene Ki67

### Codice Del Prodotto: NCL-Ki67p

#### Uso Previsto

Per uso diagnostico in vitro.

NCL-Ki67p è destinato all'identificazione qualitativa in microscopia ottica dell'antigene Ki67 umano, 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.

#### Immunogeno

Proteina di fusione ricombinante procariotica, corrispondente a un frammento di cDNA di 1086bp contenente la sottosequenza di Ki67.

#### Specificità

L'antigene nucleare Ki67 umano è espresso in tutte le cellule proliferanti alla fine della fase G1, nella fase S, M e G2 del ciclo cellulare. Crossreagisce con l'antigene nucleare Ki67 di ratto e di topo.

#### Composizione Del Reagente

NCL-Ki67p è un liofilizzato, contenente 15 mM di sodio azide come conservante. L'utente deve ricostituire il contenuto del flacone con il volume appropriato di acqua distillata sterile, come indicato sull'etichetta del flacone stesso.

#### Concentrazione Proteica Totale

Total Protein

Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione proteica totale specifica del lotto.

#### Concentrazione Anticorpale

Non applicabile.

#### Raccomandazioni Per L'uso

Immunostochimica (vedere **D. Metodologia**) sulle sezioni in paraffina. Diluizione raccomandata: 1:1000 per 60 minuti a 25 °C. Si raccomanda smascheramento antigenico ad alta temperatura, in tampone 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 l'anticorpo, nella confezione ancora integra, a 2–8 °C. In queste condizioni, il prodotto non subisce perdite significative di prestazione fino alla data di scadenza, indicata sull'etichetta del flacone. Non usare dopo la data di scadenza, indicata sull'etichetta del flacone. L'anticorpo ricostituito rimane stabile per almeno due mesi, se conservato a 2–8 °C. Per la conservazione a lungo termine, si raccomanda di congelare aliquote dell'anticorpo a -20 °C (non si raccomanda l'uso di congelatori frost-free, cioè senza brina). Evitare di congelare e scongelare ripetutamente. Preparare le diluizioni di lavoro il giorno stesso dell'utilizzazione. Immediatamente dopo l'uso, raffreddare di nuovo a 2–8 °C. 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.<sup>1</sup> Non pipettare i reagenti con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni biologici con la pelle e con le mucose. Se i reagenti o i campioni biologici vengono a contatto con zone sensibili, sciacquare abbondantemente le parti interessate. 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 tonsilla.

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 aspecifico 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-Ki67p. 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 immunistochimici, 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 NCL-Ki67p mette in evidenza l'antigene Ki67 nel nucleo delle cellule proliferanti, incluse quelle dei centri germinativi e quelle dell'epitelio tonsillare.

### Tessuti tumorali

Text Il clone NCL-Ki67p ha colorato il nucleo delle cellule proliferanti in una varietà di tessuti umani normali (n=16/18) e neoplastici (n=26/56).

**Si raccomanda l'uso di NCL-Ki67p nella determinazione della proliferazione cellulare nei tessuti normali e neoplastici.**

## Limitazioni Generali

L'immunistochimica 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. 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. Shaaban AM, Sloane JP, West CR et al. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. American Journal of Pathology. 2002; 160(2):597–604.
6. van Hogerlinden M, Auer G and Toftgard R. Inhibition of Rel/Nuclear Factor-kappaB signaling in skin results in defective DNA damage-induced cell cycle arrest and Ha-ras- and p53-independent tumor development. Oncogene. 2002; 21(32):4969–4977.
7. Iqbal M, Davies MP, Shoker BS et al. Subgroups of non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of oestrogen receptor-positive cells. Journal of Pathology. 2001; 193(3):333–338.
8. Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB et al. Abnormal regulation of the oestrogen receptor in benign breast lesions. Journal of Clinical Pathology. 2000; 53(10):778–783.
9. Torp SH. Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies. Molecular Pathology. 1997; 50(4):198–200.

### **Modifiche Alla Pubblicazione Precedente**

Concentrazione Proteica Totale.

### **Data Di Pubblicazione**

27 aprile 2015

# Metodologia immunostochimica 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 immunostochimica.
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 immunostochimica.

## 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 immunostochimiche.

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 ematossilina.
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™ Lyophilisierter polyklonaler Kaninchen-Antikörper

## Ki67-Antigen

### Produkt-Nr.: NCL-Ki67p

#### Verwendungszweck

Für *in-vitro*-Diagnostik.

NCL-Ki67p ist für den qualitativen Nachweis der humanen Ki67-Antigens 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 Waschschritte. 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.

#### Immungen

Prokaryotisches rekombinantes Fusionsprotein, das einem cDNA-Fragment mit einem 1086bp-Ki67-Muster entspricht.

#### Spezifität

Humanes Ki67-Kernantigen, das in allen proliferierenden Zellen während der späten G1-, S-, M- und G2-Phasen des Zellzyklus exprimiert wird. Es besteht eine Kreuzreaktivität mit dem Ki67-Kernantigen von Ratte und Maus.

#### Reagenzusammensetzung

NCL-Ki67p ist ein lyophilisierter Gewebekulturrückstand, der 15 mmol/l Natriumazid als Konservierungsmittel enthält. Der Benutzer muss den Inhalt des Fläschchens mit dem korrekten Volumen sterilen, destillierten Wassers entsprechend den Angaben auf dem Produktetikett rekonstituieren.

#### Gesamtproteinkonzentration Total Protein

Siehe Angaben auf dem Produktetikett bezüglich der chargenspezifischen Gesamtproteinkonzentration.

#### Antikörperkonzentration

Nicht zutreffend.

#### Gebrauchsempfehlungen

Immunhistochemie (siehe **D. Vorgehensweise**) auf Paraffinschnitten. Empfohlene Verdünnung: 1:1000 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

Ungeöffneten Antikörper bei 2–8 °C lagern. Unter diesen Bedingungen kommt es bis zum Ablauf des auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatums zu keiner bedeutenden Verschlechterung der Produktleistung. Nach Ablauf des Verfallsdatums (auf dem Behälteretikett) darf das Produkt nicht mehr verwendet werden. Der rekonstituierte Antikörper bleibt bei einer Lagertemperatur von 2–8 °C mindestens zwei Monate lang stabil. Für eine langfristige Lagerung wird empfohlen, Aliquoten des rekonstituierten Antikörpers bei -20 °C einzufrieren (rostfreie Gefrierschränke werden nicht empfohlen). Wiederholtes Einfrieren und Auftauen muss vermieden werden. Die Arbeitsverdünnungen müssen am Tag ihrer Verwendung angesetzt werden. Nach Gebrauch sofort wieder bei 2–8 °C lagern. 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.<sup>1</sup> Reagenzien dürfen niemals mit dem Mund pipettiert werden, und jeglicher Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden. Falls Reagenzien oder Proben mit empfindlichen Bereichen in Kontakt gekommen sind, müssen diese mit reichlich Wasser gespült werden. 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 Tonsillengewebe 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-Ki67p 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

NCL-Ki67p weist das Ki67-Antigen im Kern proliferierender Zellen nach, einschließlich solcher, die in den Keimzentren und im Epithel der Tonsillen gefunden werden.

#### Tumorgewebe

NCL-Ki67p färbt proliferierende Zellkerne in einer Vielzahl humaner normaler (n=16/18) und neoplastischer (n=26/56) Gewebe.

**NCL-Ki67p wird zur Bewertung der Zellproliferation in normalen und neoplastischen Geweben 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. 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. Shaaban AM, Sloane JP, West CR et al. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. American Journal of Pathology. 2002; 160(2):597–604.
6. van Hogerlinden M, Auer G and Toftgard R. Inhibition of Rel/Nuclear Factor-kappaB signaling in skin results in defective DNA damage-induced cell cycle arrest and Ha-ras- and p53-independent tumor development. Oncogene. 2002; 21(32):4969–4977.
7. Iqbal M, Davies MP, Shoker BS et al. Subgroups of non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of oestrogen receptor-positive cells. Journal of Pathology. 2001; 193(3):333–338.
8. Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB et al. Abnormal regulation of the oestrogen receptor in benign breast lesions. Journal of Clinical Pathology 2000; 53(10):778–783.
9. Torp SH. Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies. Molecular Pathology. 1997; 50(4):198–200.

## Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Gesamtproteinkonzentration.

## Ausgabedatum

27 April 2015

# 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. Normalsereen 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 Policlonal Liofilizado

## Ki67 Antigen

### Código De Producto: NCL-Ki67p

#### Indicaciones De Uso

*Para uso diagnóstico in vitro.*

NCL-Ki67p está indicado para la identificación cualitativa en secciones de parafina, mediante microscopía óptica, de moléculas del antígeno Ki67 humano. 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 cubreobjetos. Los resultados se interpretan utilizando un microscopio óptico y son de ayuda en el diagnóstico diferencial de los procesos fisiopatológicos, que pueden estar o no vinculados a un determinado antígeno.

#### Inmunógeno

Proteína de fusión recombinante procarriótica correspondiente a un fragmento de cADN de 1086 pb que contiene el motivo Ki67.

#### Especificidad

Antígeno nuclear Ki67 humano que se expresa en todas las células proliferativas durante las fases G1 tardía, S, M y G2 del ciclo celular. Reacciona de forma cruzada con el antígeno nuclear Ki67 de rata y ratón.

#### Composición Del Reactivo

NCL-Ki67p es un liofilizado que contiene azida sódica 15 mM como conservante. El usuario debe reconstituir el contenido del vial con el volumen correcto de agua destilada estéril que se indica en la etiqueta del vial.

#### Concentración Total De Proteína

Total Protein

Consulte la etiqueta del vial para ver la concentración total de proteína específica del lote.

#### Concentración De Anticuerpo

No aplicable.

#### Recomendaciones De Uso

Inmunohistoquímica (ver **D. Metodología**) con secciones de parafina. Dilución sugerida: 1:1000 durante 60 minutos a 25 °C. Se recomienda realizar recuperación de antígeno a alta temperatura utilizando la solución de recuperación citrato 0,01M (pH 6,0). Ésta es tan solo una pauta y cada usuario debe determinar sus propias diluciones de trabajo óptimas.

#### Almacenamiento Y Estabilidad

Almacene el anticuerpo sin abrir a una temperatura de 2–8 °C. Bajo estas condiciones, no hay pérdida significativa de la eficacia del producto hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. No lo utilice después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. El anticuerpo reconstituido es estable durante al menos dos meses si se almacena a una temperatura de 2–8 °C. Para el almacenamiento de larga duración, se recomienda almacenar alícuotas del anticuerpo reconstituido congeladas a -20 °C (no se recomiendan los congeladores libres de escarcha ("frost free")). Debe evitar congelar y descongelar repetidamente el producto. Prepare las diluciones de trabajo el día en que las vaya a utilizar. Devuélvalo a 2–8 °C inmediatamente después de su uso. 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 pipeteo nunca los reactivos con la boca, y evite el contacto de la piel y de las membranas mucosas con los reactivos y las muestras. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas 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 control tisular positivo recomendado es amígdala palatina.

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 control tisular 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 inmunoreactividad 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-Ki67p 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 NCL-Ki67p detecta al antígeno Ki67 en el núcleo de las células proliferativas, incluidas las que se encuentran en los centros germinativos y el epitelio de la amígdala palatina.

### Tejidos tumorales

El clon NCL-Ki67p tiñó los núcleos de las células proliferativas en una variedad de tejidos normales (n=16/18) y neoplásicos (n=26/56) humanos.

**NCL-Ki67p está recomendado para evaluar la proliferación celular 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. Shaaban AM, Sloane JP, West CR et al. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. American Journal of Pathology. 2002; 160(2):597–604.
6. van Hogerlinden M, Auer G and Toftgard R. Inhibition of Rel/Nuclear Factor-kappaB signaling in skin results in defective DNA damage-induced cell cycle arrest and Ha-ras- and p53-independent tumor development. Oncogene. 2002; 21(32):4969–4977.
7. Iqbal M, Davies MP, Shoker BS et al. Subgroups of non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of oestrogen receptor-positive cells. Journal of Pathology. 2001; 193(3):333–338.
8. Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB et al. Abnormal regulation of the oestrogen receptor in benign breast lesions. Journal of Clinical Pathology. 2000; 53(10):778–783.
9. Torp SH. Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies. Molecular Pathology. 1997; 50(4):198–200.

## Correcciones A La Publicación Anterior

Concentración Total De Proteína.

## Fecha De Publicación

27 de abril de 2015



# 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 Policlonal Lofilizado de Coelho

## Ki67 Antigen

### Código Do Produto: NCL-Ki67p

#### Utilização prevista

*Para utilização em diagnósticos in vitro.*

NCL-Ki67p foi concebido para efectuar a identificação qualitativa do antígeno Ki67 humano por microscopia de luz. 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.

#### Imunogénio

Proteína de fusão recombinante procariótica correspondendo a um fragmento de cADN de 1086bp contendo um motivo de Ki67.

#### Especificidade

Format specific text Antígeno nuclear Ki67 humano expressado em todas as células de proliferação durante as fases G1, S, M e G2, próximas do fim do ciclo celular. Tem uma reacção cruzada com o antígeno nuclear Ki67 do rato e ratinho.

#### Composição Do Reagente

NCL-Ki67p é um sobrenadante liofilizado de contendo 15 mM de azida de sódio como produto conservante.

O utilizador deve reconstituir o conteúdo da ampola com o volume correcto de água destilada esterilizada, conforme indicado no rótulo da ampola.

#### Concentração Total De Proteína Total Protein

Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração total de proteína do lote específico.

#### Concentração De Anticorpo

Não é aplicável

#### Recomendações Sobre A Utilização

Imunohistoquímica (ver **D. Metodologia**) em secções de parafina. Diluição sugerida: 1:1000 durante 60 minutos a 25 °C.

Recomenda-se a recuperação de antígenos a alta temperatura utilizando 0,01M 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 o anticorpo em embalagem não aberta a 2–8 °C. Nessas condições, não se regista uma redução significativa no desempenho do produto até ao prazo de validade indicado no rótulo da ampola. Não utilizar após o prazo de validade indicado no rótulo do recipiente. O anticorpo reconstituído permanece estável durante pelo menos dois meses, desde que seja armazenado a uma temperatura entre 2–8 °C. Em caso de armazenamento a longo prazo, recomenda-se que as alíquotas do anticorpo reconstituído sejam armazenadas congeladas a -20 °C (não se recomenda a utilização de congeladores do tipo auto-descongelador). Deve evitar-se congelar e descongelar repetidamente o produto. Preparar as diluições de trabalho no próprio dia do seu emprego. Retornar à temperatura de 2–8 °C imediatamente após a utilização. 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 amígdala.

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-Ki67p 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 NCL-Ki67p detecta o antígeno Ki67 no núcleo de células em proliferação, incluindo as que se encontram nos centros germinais e no epitélio da amígdala.

### Tecidos tumorais

O NCL-Ki67p marcou os núcleos de células em proliferação numa variedade de tecidos humanos normais (n=16/18) e neoplásticos (n=26/56).

**NCL-Ki67p é recomendado para a avaliação da proliferação celular em 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. 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. Shaaban AM, Sloane JP, West CR et al. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. American Journal of Pathology. 2002; 160(2):597–604.
6. van Hogerlinden M, Auer G and Toftgard R. Inhibition of Rel/Nuclear Factor-kappaB signaling in skin results in defective DNA damage-induced cell cycle arrest and Ha-ras- and p53-independent tumor development. Oncogene. 2002; 21(32):4969–4977.
7. Iqbal M, Davies MP, Shoker BS et al. Subgroups of non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of oestrogen receptor-positive cells. Journal of Pathology. 2001; 193(3):333–338.
8. Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB et al. Abnormal regulation of the oestrogen receptor in benign breast lesions. Journal of Clinical Pathology. 2000; 53(10):778–783.
9. Torp SH. Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies. Molecular Pathology. 1997; 50(4):198–200.

## Emendas Da Edição Anterior

Concentração Total De Proteína.

## Data De Emissão

27 de Abril de 2015

# 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. Desparafinizar 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™ Frystorkad polyklonal kaninantikropp

## Ki67 Antigen

### Produktkod: NCL-Ki67p

#### Avsedd Användning

*För in vitro diagnostisk användning.*

NCL-Ki67p är avsedd för kvalitativ identifiering med ljusmikroskopi av humant Ki67-antigen med ljusmikroskopi. 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.

#### Immunogen

Prokaryotiskt rekombinant fusionsprotein motsvarande ett 1086bp Ki67 motiv innehållande cDNA-fragment.

#### Specificitet

Humant Ki67 nukleärt antigen uttryckt i alla prolifererande celler under sena G1, S, M och G2 faser av cellcykeln. Korsreagerar med råttas och mus Ki67 nukleärt antigen.

#### Reagensinnehåll

NCL-Ki67p är en frystorkad polyklonal från vävnadsodling som innehåller 15 mM natriumazid som konserveringsmedel. Användaren måste späda flaskans innehåll med den korrekta volymen sterilt destillerat vatten enligt anvisningarna på flaskans etikett.

#### Total Proteinkoncentration Total Protein

Se flaskans etikett för total specifik proteinkoncentration för satsen.

#### Antikropps-koncentration

Gäller ej

#### Rekommendationer Vid Användning

Immunhistokemi (se **D. Metodologi**) på paraffinsnitt. Föreslagen spädning: 1:1000 i 60 minuter vid 25 °C. Hög temperatur antigenåtervinning med 0,01M citratåtervinningslösning (pH 6,0) rekommenderas. Detta är endast en riktlinje och användare bör själva fastställa den optimala bruksspädningen.

#### Förvaring Och Stabilitet

Förvara öppnad antikropp vid 2–8 °C. Vid dessa förhållanden sker ingen betydelsefull nedgång i produktens utförande fram till utgångsdatumet på flaskans etikett. Använd ej efter det utgångsdatum som anges på flaskans etikett. Den spädda antikroppen håller sig stabil i minst två månader om den förvaras vid 2–8 °C. Vid långvarig förvaring rekommenderas det att alikvoter av den spädda antikroppen förvaras frysta vid -20 °C (frostfria frys rekommenderas ej). Upprepad nedfrysning och upptinande bör undvikas. Förbered brukslösningar samma dag som de skall användas. Återgå till 2–8 °C direkt efter användning. Förvaringsförhållanden som skiljer sig från de ovan nämnda 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 iaktas 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 resultatet vilket kan göra det nödvändigt att genomföra regelbundna interna kontroller utöver följande metoder.

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

## Positiv Vävnadskontroll

Används för att ange korrekt förberedda vävnader och rätt färgningstekniker.

En positiv vävnadskontroll bör ingå i varje uppsättning av testförhållanden 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>

Tonsill är den rekommenderade positiva kontrollvävnaden.

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 är den rekommenderade negativa kontrollvävnaden.

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 (erytrocyter), 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-Ki67p sist. Positiv färgningsintensitet bör utvärderas inom ramen för all ospecifik bakgrunds-färgning av den negativa reagenskontrollen. Som vid alla immunhistokemiska tester betyder ett negativt resultat att antigenet inte upptäcktes 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

NCL-Ki67p upptäcker Ki67-antigenet i cellkärnan hos prolifererande celler, inklusive de i germinalcenter och epitel hos tonsill.

### Tumörvävnader

NCL-Ki67p färgade prolifererande cellkärnor i en mängd normala (n=16/18) och neoplastiska (n=26/56) humana vävnader.

**NCL-Ki67p rekommenderas för utvärderingen av cellproliferering i 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. Övåntat 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. Nadji 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. Shaaban AM, Sloane JP, West CR et al. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. *American Journal of Pathology*. 2002; 160(2):597–604.
6. van Hogerliinden M, Auer G and Toftgard R. Inhibition of Rel/Nuclear Factor-kappaB signaling in skin results in defective DNA damage-induced cell cycle arrest and Ha-ras- and p53-independent tumor development. *Oncogene*. 2002; 21(32):4969–4977.
7. Iqbal M, Davies MP, Shoker BS et al. Subgroups of non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of oestrogen receptor-positive cells. *Journal of Pathology*. 2001; 193(3):333–338.
8. Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB et al. Abnormal regulation of the oestrogen receptor in benign breast lesions. *Journal of Clinical Pathology*. 2000; 53(10):778–783.
9. Torp SH. Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies. *Molecular Pathology*. 1997; 50(4):198–200.

## **Rättelser Av Tidigare Utgivning**

Total Proteinkoncentration.

## **Utgivningsdatum**

27 april 2015

# 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 - pepparrotsperoxidas (ABC-HRP) – bered enligt tillverkarens rekommendationer.
9. 3,3' Diaminobenzidin tetrahydroklorid (DAB) – bered enligt tillverkarens rekommendationer.
10. Hematoxilin 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 peroxidas 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 hematoxilin.
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™ Λυοφιλοποιημένο πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού Αντιγόνο Ki67 Κωδικός είδους: NCL-Ki67p

## Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

*Gia in vitro διαγνωστική χρήση.*

Το NCL-Ki67p προορίζεται για την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός της ανθρωπίνης Μόρια αντιγόνου Ki67 σε τομές παραφίνης. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν αριστούς 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 υπόστρωμα 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 καλυπτήρια. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με χρήση μικροσκοπίου φωτός και βοηθούν στη διαφορική διάγνωση παθολογικών εξεργασιών, οι οποίες ενδέχεται ή όχι να σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

## Ανοσογόνο

Προκαρμυπική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σύντηξης που αντιστοιχεί σε ένα θραύσμα του cDNA που περιέχει το μοτίβο Ki67 1086 bp.

## Ειδιότητα

Ανθρώπινο πυρηνικό αντιγόνο Ki67 που εκφράζεται σε όλα τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα κατά τη διάρκεια των όψιμων φάσεων G1, S, M και G2 του κυτταρικού κύκλου. Παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με το πυρηνικό αντιγόνο Ki67 αρουραίου και ποπτικού.

## Σύνθεση Αντιδραστήριου

Το NCL-Ki67p είναι ένας λυοφιλοποιημένος πολυκλωνικός αντιορός κουνελιού, που διατίθεται σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7,6) με 1% πρωτεΐνης φορέα αλβουμίνης βοείου ορού και το οποίο περιέχει 15 mM αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό. Ο χρήστης χρειάζεται να ανασυστήσει το περιεχόμενο του φιαλιδίου με τον σωστό όγκο αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού, όπως υποδεικνύεται στην ετικέτα του φιαλιδίου.

## Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης

Total Protein

Για την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

## Συγκέντρωση Αντισώματος

Δεν έχει εφαρμογή.

## Συστάσεις Για Τη Χρήση

Ανοσοϊστοχημεία (δείτε την ενότητα **“Δ. Μεθοδολογία”**) σε τομές παραφίνης. Προτεινόμενη αραίωση: 1:1000 επί 60 λεπτά στους 25 °C. Συνιστάται ανάκτηση αντιγόνου σε υψηλή θερμοκρασία με χρήση διαλύματος ανάκτησης κηρίων 0,01 M (pH 6,0). Αυτό παρέχεται ως οδηγός και οι χρήστες θα πρέπει να προσδιορίζουν τις δικές τους βέλτιστες αραιώσεις εργασίας.

## Φύλαξη Και Σταθερότητα

Φυλάσσετε το μη ανοιγμένο αντίσωμα στους 2–8 °C. Υπό τις συνθήκες αυτές, δεν υπάρχει σημαντική απώλεια στην απόδοση του προϊόντος έως την ημερομηνία λήξης που υποδεικνύεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Μη χρησιμοποιείτε μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Το ανασυσταθέν αντίσωμα είναι σταθερό επί δύο μήνες τουλάχιστον, εφόσον φυλάσσεται στους 2–8 °C. Για μακροχρόνια φύλαξη, συνιστάται τα κλάσματα του ανασυσταθέντος αντισώματος να φυλάσσονται κατεψυγμένα στους -20 °C (δεν συνιστάται η χρήση καταψυκτών χωρίς πάγο). Θα πρέπει να αποφεύγονται οι επαναληπμένοι κύκλοι κατάψυξης και απόψυξης. Παρασκευάστε αραιώσεις εργασίας την ημέρα της χρήσης. Επαναφέρετε στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση. 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 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 μεταδόσης 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 άφθονες ποσότητες νερού. Ζητήστε τη συμβουλή του γιατρού.

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 θετική χρώση για βέλτιστο έλεγχο ποιότητας και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόμησης των αντιδραστηρίων.<sup>2</sup>

Συνιστώμενος ιστός θετικού μάρτυρα είναι η αμυγδαλή.

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 συνδεδετικού 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 ενζύμια, 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 ασθενούς 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 Αντιδραστηρίου

Χρησιμοποιείτε έναν μη ειδικό αρνητικό μάρτυρα αντιδραστηρίου 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-Ki67p. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκτιμάται στα πλαίσια τυχόν μη ειδικής χρώσης υποβάθρου του αρνητικού μάρτυρα αντιδραστηρίου. Όπως συμβαίνει με οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική εξέταση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύτηκε, όχι ότι το αντιγόνο δεν υπήρχε στα κύτταρα/στον ιστό που εξετάστηκε. Εάν είναι απαραίτητο, χρησιμοποιήστε μια σειρά αντισωμάτων για την αναγνώριση ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων.

## Αναμενόμενα Αποτελέσματα

### Φυσιολογικοί ιστοί

Με το NCL-Ki67p ανιχνεύεται το αντιγόνο Ki67 στον πυρήνα πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων στα βλαστικά κέντρα και το επιθήλιο της αμυγδαλής.

### Καρκινικοί ιστοί

Με το NCL-Ki67p χρωματίστηκαν πυρήνες πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων σε ποικιλία ανθρώπινων φυσιολογικών (n=16/18) και νεοπλασματικών (n=26/56) ιστών.

**Το NCL-Ki67p συνιστάται για την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς ιστούς.**

## Γενικοί Περιρισμοί

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, απόψυξη, πλύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να παράγει μορφώματα, παγίδευση αντισώματος ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τυχόν ασυνεπή αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται σε παραλλαγές των μεθόδων μονιμοποίησης και εγκλεισμού ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.<sup>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 αντι σώματα που παρέχονται από την Leica Biosystems Newcastle Ltd προορίζονται για χρήση, όπως υποδεικνύεται, είτε σε κατεψυγμένους είτε σε εγκλεισμένους 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. Shaaban AM, Sloane JP, West CR et al. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. *American Journal of Pathology*. 2002; 160(2):597–604.
6. van Hogerlinden M, Auer G and Toftgard R. Inhibition of Rel/Nuclear Factor-kappaB signaling in skin results in defective DNA damage-induced cell cycle arrest and Ha-ras- and p53-independent tumor development. *Oncogene*. 2002; 21(32):4969–4977.
7. Iqbal M, Davies MP, Shoker BS et al. Subgroups of non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of oestrogen receptor-positive cells. *Journal of Pathology*. 2001; 193(3):333–338.
8. Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB et al. Abnormal regulation of the oestrogen receptor in benign breast lesions. *Journal of Clinical Pathology*. 2000; 53(10):778–783.
9. Torp SH. Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies. *Molecular Pathology*. 1997; 50(4):198–200.

## **Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση**

Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης.

## **Ημερομηνία Έκδοσης**

27 Απριλίου 2015

# 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 αβιδίνη/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. Αντιχρώση αιματοξιλίνης - 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 πύση 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™ Lyophilized Rabbit Polyclonal Antibody

## Ki67 Antigen

### Produktkode: NCL-Ki67p

#### Tilsigtet Anvendelse

*Til in vitro diagnostisk anvendelse.*

NCL-Ki67p er beregnet til kvalitativ identifikation af humant Ki67-antigen 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.

#### Procedereprincip

Immunhistokemi (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.

#### Immunogen

Prokaryot rekombinant fusionsprotein svarende til et 1086 bp stort Ki67-motiv indeholdt i et cDNA-fragment.

#### Specificitet

Humant Ki67-kerneantigen udtrykt i alle prolifererende celler i celleyklusens sene G1-, S-, M- og G2-fase. Krydsreagerer med Ki67-kerneantigen fra rotte og mus.

#### Reagenssammensætning

NCL-Ki67p er et lyophiliseret polyklonalt kaninantiserum præsenteret i fosfatbufferjusteret saltvandsopløsning (pH 7,6) med 1% okseserumalbuminbæreprøtein og indeholdende 15 mM natriumazid som konserveringsmiddel. Brugeren skal rekonstituere indholdet i hætteflasken med det korrekte volumen sterile destillerede vand som angivet på hætteflaskens etikette.

#### Totalproteinkoncentration

Total Protein

Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik totalproteinkoncentration.

#### Antistofkoncentration

Ingen rettelser.

#### Anbefalinger Vedrørende Anvendelse

Immunhistokemi (se **D. Metodologi**) på paraffinsnit. Foreslået fortynding: 1:1000 ved 60 minutter ved 25 °C. Antigengendinding ved høj temperatur ved anvendelse af 0,01 M citratgenfindingsopløsning (pH 6,0) anbefales. Antigengendinding 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

Opbevar det uåbnede antistof ved 2–8 °C. Under disse betingelser er der ingen betydende tab af produktets ydeevne indtil udløbsdatoen angivet på hætteflaskens etikette. Må ikke anvendes efter udløbsdatoen angivet på hætteflaskens etikette. Det rekonstituerede antistof er stabilt i mindst to måneder når opbevaret ved 2–8 °C. Ved langtidsoptbevaring anbefales det at udportionere det rekonstituerede antistof og opbevare portionerne nedfrosset ved -20 °C (frostfri fryser anbefales ikke). Gentagen optøning og frysning skal undgås. Fremstil brugsopløsninger på dagen for anvendelsen. Sættes tilbage til 2–8 °C umiddelbart efter brug. 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.

Konsulter 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 smittefarligt 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 brugerens laboratorium kan frembringe betydeligt varierende resultater og nødvendiggøre regelmæssig udførelse af kontroller på stedet ud over nedenstående procedurer.

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

## Positiv Vævskontrol

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

Der bør inkluderes en positiv vævskontrol for hvert sæt testbetingelser 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 tonsil.

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 cerebellum.

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-Ki67p 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

NCL-Ki67p påviser Ki67-antigenet i kerner i prolifererende celler indbefattende celler i germinalcentre og epitel i tonsil.

### Tumørvæv

Klon NCL-Ki67p farvede prolifererende cellekerner i en række forskellige humane normale (n=16/18) og neoplastiske (n=26/56) væv.

**NCL-Ki67p anbefales anvendt til vurdering af celleproliferation 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 antigenekspression, 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. Shaaban AM, Sloane JP, West CR et al. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. *American Journal of Pathology*. 2002; 160(2):597–604.
6. van Hogerlinden M, Auer G and Toftgard R. Inhibition of Rel/Nuclear Factor-kappaB signaling in skin results in defective DNA damage-induced cell cycle arrest and Ha-ras- and p53-independent tumor development. *Oncogene*. 2002; 21(32):4969–4977.
7. Iqbal M, Davies MP, Shoker BS et al. Subgroups of non-atypical hyperplasia of breast defined by proliferation of oestrogen receptor-positive cells. *Journal of Pathology*. 2001; 193(3):333–338.
8. Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB et al. Abnormal regulation of the oestrogen receptor in benign breast lesions. *Journal of Clinical Pathology*. 2000; 53(10):778–783.
9. Torp SH. Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies. *Molecular Pathology*. 1997; 50(4):198-200.

## **Rettelser Til Tidligere Udgave**

Totalproteinkoncentration.

## **Udgivelsesdato**

27 april 2015

# 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 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

