

Novocastra™ Protein Block

Product Code: RE7102

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™ Protein Block

Product Code: RE7102

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

The Novocastra™ Protein Block RE7102 is intended for use in immunohistochemical (IHC) staining procedure described in the Instructions for Use of the Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K and NovoLink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. 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

In immunohistochemistry diffuse non specific staining (background) can occur as a result of hydrophobic and ionic interactions between antibodies and tissue components. Casein has been shown to decrease non-specific staining in IHC procedures.¹

This product is used in IHC procedures, which allow the qualitative identification by light microscopy of antigens in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, via sequential steps with interposed washing steps (for IHC staining Principle of Procedure see appropriate detection system Instructions for Use). Novocastra™ Protein Block RE7102 is a serum-free, casein-based blocker.

Reagents Provided

Protein Block RE7102 (25 mL). 0.4% Casein in phosphate-buffered saline, with stabilizers, surfactant, and 0.2% Bronidox L as a preservative.

Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

Protein Block RE7102 is a ready to use reagent. Reconstitution, mixing, dilution, or titration of these reagents is not recommended. Further dilution may result in loss of antigen staining and or non-specific staining. The user must validate any such change.

Storage and Stability

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

Specimen Preparation

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

Warnings and Precautions

For professional users.

The concentration of Bronidox L, the preservative used in Protein Block RE7102, is 0.2%. It may cause irritation to the skin, eyes, mucus membranes and upper respiratory tract, and may be harmful if swallowed or absorbed through skin.

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

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

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

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

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

Procedure

A. Reagents required but not supplied

1. Standard solvents used in immunohistochemistry.
2. 50 mM tris-buffered saline (TBS) pH 7.6.
3. Antigen retrieval solution(s) (see Recommendations on Use for primary antibody).
4. Enzyme retrieval solution(s) (see Recommendations on Use for primary antibody).
5. Antibody diluent.
6. Primary antibody.
7. Detection system.
8. Mounting medium

B. Equipment required but not supplied

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

C. Methodology

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

The combination of the primary antibody, its dilution, together with Protein Block RE7102 and the detection system should be validated by the user on a series of known positive and negative controls.

The following steps should be undertaken at the appropriate stage in the IHC protocol (see detection system Instructions for Use).

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

1. Wash in TBS.
2. Incubate sections with Protein Block RE7102 for 5 minutes.
3. Wash in TBS

Quality Control

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

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

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

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

A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.³

For recommended positive control tissue see primary antibody Instructions for Use. If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

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

For recommended negative control tissue see primary antibody Instructions for Use.

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

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.⁴ 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 biotin⁵ (eg. liver, breast, brain, kidney). To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate-chromogen, Streptavidin-HRP or labeled polymer, and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

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

Patient Tissue

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

General Limitations

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

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.⁶

Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

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

Novocastra™ Protein Block RE7102 is for use on paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

Performance Characteristics

Novocastra™ Protein Block RE7102 is a serum-free, casein-based blocker. Casein has been shown to decrease non-specific staining in IHC procedures¹. This product is stable up to the expiry date printed on the product label.

Bibliography - General

1. Tacha DE and McKinney L: Casein reduces nonspecific background staining in immunolabeling techniques. *Journal of Histotechnology* 1992; 15, No2:127–132.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Amendments to Previous Issue

Not applicable.

Date of Issue

17 November 2008 (RE7102/CE/UK).

Novocastra™ Protein Block

Référence du Produit: RE7102

Utilisation Prévue

Diagnostic in vitro.

Le Novocastra™ Protein Block RE7102 est destiné à être utilisé dans le cadre des procédures immunohistochimiques (IHC) de marquage basées sur la peroxydase décrites dans le Mode d'emploi des produits Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/ RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K et NovoLink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/ RE7150-K. 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

En immunohistochimie, un marquage non spécifique diffus (bruit de fond) peut se produire par suite d'interactions hydrophobes et ioniques entre anticorps et éléments tissulaires. Il a été montré que la caséine pouvait réduire le marquage non spécifique lors des procédures IHC.¹

Ce produit est utilisé dans le cadre d'une procédure immunohistochimique (IHC) qui permet une identification qualitative des antigènes par microscopie optique, dans des coupes fixées au formol, incluses en paraffine, par l'intermédiaire d'étapes séquentielles comportant des étapes de lavage (pour le Principe de la procédure de marquage IHC, voir le Mode d'emploi du système de détection approprié). Novocastra™ Protein Block RE7102 est un agent bloquant exempt de sérum, à base de caséine.

Réactifs fournis

Protein Block RE7102 (25 ml). Caséine à 0,4% dans une solution saline tampon phosphate, avec des agents de stabilisation, un surfactant, et un agent de conservation à 0,2%, le Bronidox L.

Reconstitution, Mélange, Dilution, Titrage

Le Protein Block RE7102 est un réactif prêt à l'emploi. Il n'est pas recommandé de reconstituer, mélanger, diluer, ou titrer ces réactifs. Une dilution supplémentaire est susceptible de se traduire par une perte du marquage de l'antigène ou par un marquage non spécifique. Toute modification de ce type doit être validée par l'utilisateur.

Conservation et Stabilité

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

Préparation des Spécimens

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

Mises en Garde et Précautions

Pour utilisateurs professionnels.

La concentration du Bronidox L, l'agent de conservation utilisé dans le Protein Block RE7102, est de 0,2%. Elle est susceptible de provoquer une irritation de la peau, des yeux, des muqueuses et de l'appareil respiratoire supérieur, elle peut être nocive en cas d'ingestion ou d'absorption par voie cutanée.

Une fiche toxicologique (MSDS) est disponible sur demande.

Les spécimens, avant et après fixation, ainsi que tous les matériels ayant été en contact avec eux, doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et éliminés conformément aux précautions appropriées en vigueur.²

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

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

Minimiser la contamination microbienne des réactifs sinon un accroissement du marquage non spécifique est susceptible de se produire. Des durées et des températures d'incubation différentes de celles qui ont été spécifiées sont susceptibles de conduire à des résultats erronés. Toutes les modifications de ce type doivent être validées par l'utilisateur.

Procédure

A. Réactifs nécessaires mais non fournis

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

B. Equipements nécessaires mais non fournis

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

C. Méthodologie

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

L'association de l'anticorps primaire, sa dilution, ainsi que le Protein Block RE7102 et le système de détection doit être validée par l'utilisateur sur une série de contrôles négatifs et positifs connus.

Les étapes suivantes doivent être mises en oeuvre au stade approprié du protocole IHC (le voir Mode d'emploi du système de détection).

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

1. Laver dans du TBS.
2. Incuber les coupes avec le Protein Block RE7102 pendant 5 minutes.
3. Laver dans du TBS.

Contrôle de Qualité

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

Tissu de Contrôle Positif

Il est utilisé pour indiquer que les tissus ont été préparés correctement et que les techniques de marquage étaient appropriées.

Un contrôle tissulaire positif doit être inclus dans toute opération de marquage pour chaque ensemble d'anticorps primaire/de conditions d'analyse.

Un tissu présentant un marquage faiblement positif est plus adapté à un contrôle de qualité optimal qu'un tissu présentant un marquage fortement positif et il permet de détecter de moindres niveaux de dégradation du réactif.³

Pour le tissu de contrôle positif recommandé, voir le Mode d'emploi de l'anticorps primaire.

Si le tissu de contrôle positif ne présente pas de marquage positif, les résultats des spécimens analysés doivent être considérés comme invalides.

Tissu de Contrôle Négatif

Il doit être examiné après le tissu de contrôle positif afin de vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire.

Pour le tissu de contrôle négatif recommandé, voir le Mode d'emploi de l'anticorps primaire.

Si non, 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.⁴

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 endogène⁵ (foie, sein, cerveau, rein, par exemple). Pour différencier l'activité des enzymes endogènes ou la liaison non spécifique d'enzymes de l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être marqués exclusivement avec le substrat chromogène, le Streptavidin-HRP, ou le polymère marqué et le substrat chromogène respectivement. Si un marquage spécifique se produit dans le tissu de contrôle négatif, les résultats des spécimens du patient doivent être considérés comme invalides.

Réactif de Contrôle Négatif

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

Tissu du Patient

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

Limites 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.⁶

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

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

Le Novocastra™ Protein Block RE7102 doit être utilisé sur des coupes incluses en paraffine avec des exigences spécifiques en matière de fixation. Une expression antigénique inattendue est susceptible de se produire, en particulier au niveau des néoplasmes. L'interprétation clinique de toute coupe tissulaire marquée doit comporter une analyse morphologique et l'évaluation des contrôles appropriés.

Caractéristiques de performance

Le Novocastra™ Protein Block RE7102 est un agent bloquant exempt de sérum, à base de caséine. Il a été montré que la caséine pouvait réduire le marquage non spécifique lors des procédures IHC.¹ Ce produit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit.

Bibliographie Générale

1. Tacha DE and McKinney L: Casein reduces nonspecific background staining in immunolabeling techniques. *Journal of Histotechnology* 1992; 15, No2:127–132.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Amendements Apportés à la Version Précédente

Non applicable.

Date de Publication

17 novembre 2008 (RE7102/CE/UK)

Novocastra™ Protein Block

Codice Del Prodotto: RE7102

Uso Previsto

Per uso diagnostico in vitro.

Novocastra™ Protein Block RE7102 è destinato all'uso nelle tecniche di colorazione immunostochimica (IHC), descritte nelle Istruzioni per l'uso dei sistemi di determinazione Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K e NovoLink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. 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

In immunostochimica, una colorazione aspecifica diffusa (di fondo) può manifestarsi in seguito ad interazioni idrofobiche e ioniche fra le componenti anticorpali e tissutali. La caseina ha dimostrato di ridurre la colorazione aspecifica nelle tecniche IHC.¹

Questo prodotto viene impiegato nel corso di tecniche IHC che consentono l'identificazione qualitativa in microscopia ottica degli antigeni in sezioni tissutali fissate in formalina e incluse in paraffina, attraverso fasi sequenziali intervallate da fasi di lavaggio (per il Principio della procedura relativo alla colorazione IHC, vedere le Istruzioni per l'uso del sistema di determinazione corrispondente). Novocastra™ Protein Block RE7102 è un bloccante proteico privo di siero, a base di caseina.

Reagenti forniti

Protein Block RE7102 (25 ml). Caseina 0,4% in tampone fosfato, con stabilizzatori, surfattante e Bronidox L 0,2% come conservante.

Ricostituzione, miscelazione, diluizione, titolazione

Protein Block RE7102 è un reagente pronto all'uso. Non si consiglia la ricostituzione, la miscelazione, la diluizione o la titolazione di questi reagenti.

L'ulteriore diluizione potrebbe causare una perdita di colorazione dell'antigene o una colorazione aspecifica. Tali eventuali variazioni devono essere convalidate dall'utente.

Conservazione E Stabilità

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

Preparazione Del Campione Biologico

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

Avvertenze E Precauzioni

Per uso professionale.

La concentrazione di Bronidox L, il conservante utilizzato in Protein Block RE7102, è 0,2%. Questo prodotto può causare irritazioni della cute, degli occhi, delle mucose e delle vie respiratorie superiori e può essere nocivo se ingerito o se assorbito attraverso la cute.

La scheda di sicurezza del prodotto (MSDS) è disponibile su richiesta.

Prima e dopo la fissazione, i campioni biologici e tutti i materiali ad essi esposti vanno trattati come potenzialmente infettanti e smaltiti con le appropriate precauzioni.²

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

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

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

Procedura

A. Reagenti necessari ma non forniti

1. Solventi standard utilizzati in immunostochimica.
2. Tampone Tris (TBS) 50 mM a pH 7,6.
3. Soluzione/i per lo smascheramento antigenico (vedere Raccomandazioni per l'uso per l'anticorpo primario).
4. Soluzione/i per lo smascheramento con enzimi (vedere Raccomandazioni per l'uso per l'anticorpo primario).
5. Diluente per anticorpi.
6. Anticorpo primario.
7. Sistema di determinazione.
8. Mezzo di montaggio.

B. Attrezzature necessarie ma non fornite

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

C. Metodologia

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

La combinazione dell'anticorpo primario, la sua diluizione, assieme a Protein Block RE7102 e al sistema di determinazione vanno convalidate dall'utente su una serie di controlli positivi e negativi noti.

Effettuare le seguenti operazioni nella fase appropriata del protocollo IHC (vedere le Istruzioni per l'uso relative al sistema di determinazione).

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

1. Lavare in TBS.
2. Incubare le sezioni con Protein Block RE7102 per 5 minuti.
3. Lavare in TBS.

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/anticorpo primario e per ogni ciclo di colorazione, deve essere incluso un controllo positivo del tessuto.

Un tessuto a debole colorazione positiva è più adatto di uno a colorazione positiva intensa per un ottimale controllo qualità e per mettere in evidenza livelli inferiori di degradazione del reagente.³

Per il tessuto raccomandato come controllo positivo, vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario.

Se il controllo positivo del tessuto non dimostra colorazione positiva, i risultati con i campioni biologici del test vanno considerati non alidi.

Controllo Negativo Del Tessuto

Va esaminato dopo il controllo positivo, per verificare la specificità della marcatura dell'antigene bersaglio da parte dell'anticorpo primario.

Per il tessuto raccomandato come controllo negativo, vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario.

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

La colorazione aspecifica, se presente, assume di solito aspetto diffuso. La colorazione sporadica del tessuto connettivo può anche manifestarsi in seguito ad iperfissazione di sezioni di tessuto in formalina. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, usare cellule intatte. Le cellule necrotiche o degenerate si colorano spesso in maniera aspecifica.⁴ 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 endogena⁵ (es. fegato, mammella, cervello, rene). Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame enzimatico specifico dall'immunoreattività specifica, possono essere colorati ulteriori tessuti del paziente esclusivamente e rispettivamente con substrato cromogeno, con Streptavidin-HRP o con polimero marcato e substrato cromogeno. Se nel controllo negativo del tessuto compare una colorazione specifica, i risultati sui campioni biologici ottenuti dal paziente devono essere considerati non validi.

Controllo Negativo Del Reagente

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

Tessuto Del Paziente

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

Limitazioni Generali

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

La colorazione del tessuto dipende dalle modalità di manipolazione e di processazione del tessuto stesso, adottate prima della colorazione. La fissazione, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento o la sezione condotti in modo non corretto, o la contaminazione con altri tessuti o liquidi, può produrre artefatti, intrappolamento (trapping) anticorpale o risultati falsamente negativi. Risultati incompatibili possono essere dovuti a modifiche dei metodi di fissazione e di inclusione o ad irregolarità intrinseche al tessuto.⁶

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

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

Novocastra™ Protein Block RE7102 è destinato all'uso su sezioni tissutali incluse in paraffina con specifici requisiti di fissazione. Un'espressione antigenica inattesa può manifestarsi in particolare nelle neoplasie. L'interpretazione clinica di ogni sezione tissutale colorata deve includere l'analisi morfologica e la valutazione dei controlli appropriati.

Caratteristiche di rendimento

Novocastra™ Protein Block RE7102 è un bloccante proteico privo di siero, a base di caseina. La caseina ha dimostrato di ridurre la colorazione aspecifica nelle tecniche IHC.¹ Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Riferimenti Bibliografici Di Base

1. Tacha DE and McKinney L: Casein reduces nonspecific background staining in immunolabeling techniques. *Journal of Histotechnology* 1992; 15, No2:127–132.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Modifiche Alla Pubblicazione Precedente

Non applicabile.

Data Di Pubblicazione

17 novembre 2008 (RE7102/CE/UK)

Novocastra™ Protein Block

Produkt-Nr.: RE7102

Verwendungszweck

Für in-vitro-Diagnostik.

Der Novocastra™ Protein Block RE7102 dient der Verwendung bei immunhistochemischen (IHC-) Färbeverfahren, die in den Gebrauchsanweisungen von Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, NovoLink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K Detection Systems beschrieben sind. Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Verfahrensgrundlage

In der Immunhistochemie kann eine diffuse unspezifische Färbung (Hintergrund) als Ergebnis hydrophobischer und ionischer Interaktionen zwischen Antikörpern und Gewebekomponenten auftreten. Casein verringert nachweislich die unspezifische Färbung bei IHC-Verfahren.¹

Dieses Produkt wird in immunhistochemischen (IHC-) Verfahren verwendet, die den qualitativen Nachweis von Antigenen in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebeschnitten in mehreren aufeinander folgenden Schritten mit dazwischen liegenden Waschschritten mittels Lichtmikroskopie gestatten (die Verfahrensgrundlage der IHC-Färbung ist in den Gebrauchsanweisungen des entsprechenden Nachweissystems beschrieben). Novocastra™ Protein Block RE7102 ist ein serumfreier Blocker auf Caseinbasis.

Gelieferte Reagenzien

Protein Block RE7102 (25 ml), 0,4% Casein in einer phosphatgepufferten physiologischen Kochsalzlösung mit Stabilisatoren, oberflächenaktiver Substanz und 0,2% Bronidox L als Konservierungsmittel.

Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration

Protein Block RE7102 ist ein gebrauchsfertiges Reagenz. Rekonstitution, Mischen, Verdünnung oder Titration dieser Reagenzien wird nicht empfohlen.

Eine weitere Verdünnung könnte zum Verlust der Antigenfärbung und/oder zu einer unspezifischen Färbung führen. Der Benutzer muss solche Änderungen zuvor validieren.

Lagerung und Stabilität

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

Probenvorbereitung

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

Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

Für geschultes Fachpersonal.

Die Konzentration von Bronidox L, dem im Protein Block RE7102 verwendeten Konservierungsmittel, beträgt 0,2%. Es kann Reizungen von Haut, Augen, Schleimhäuten und oberen Atemwegen hervorrufen und bei Verschlucken oder A sorption b durch die Haut gesundheitsschädlich sein.

Ein Sicherheitsdatenblatt (Material Safety Data Sheet (MSDS)) ist auf Anfrage erhältlich.

Vor und nach der Fixierung sind die Proben sowie alle Materialien, die mit ihnen in Kontakt gekommen sind, als potentiell infektiös zu behandeln und daher mit entsprechender Vorsicht zu entsorgen.²

Reagenzien dürfen niemals mit dem Mund pipettiert werden, und jeglicher Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden. Falls Reagenzien oder Proben mit empfindlichen Bereichen in Kontakt gekommen sind, müssen diese mit reichlich Wasser gespült werden.

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

Die mikrobielle Verunreinigung von Reagenzien ist zu minimieren, da ansonsten eine erhöhte unspezifische Färbung auftreten kann. Falls die spezifizierten Inkubationszeiten oder –temperaturen nicht eingehalten werden, kann es zu fehlerhaften Ergebnissen kommen. Jegliche Abweichungen von den angegebenen Werten müssen vom Benutzer verifiziert werden

Verfahren

A. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Reagenzien

1. In der Immunhistochemie übliche Standardlösungsmittel.
2. 50 mmol/l Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (Tris-Buffered Saline, TBS) pH 7,6.
3. Antigendemaskierungslösung(en) (siehe Gebrauchsempfehlungen für den primären Antikörper).
4. Enzymdemaskierungslösung(en) (siehe Gebrauchsempfehlungen für den primären Antikörper).
5. Antikörperverdünnung.
6. Primärer Antikörper.
7. Nachweissystem.
8. Aufbringungsmedium.

B. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Ausrüstung

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

C. Vorgehensweise

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

Die Kombination aus dem primären Antikörper, seiner Verdünnung zusammen mit dem Protein Block RE7102 und dem Nachweissystem ist vom Benutzer auf einer Reihe bekannter positiver und negativer Kontrollen zu validieren.

Die folgenden Schritte sind im entsprechenden Stadium des IHC-Protokolls durchzuführen (siehe Gebrauchsanweisungen des Nachweissystems).

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

1. In TBS waschen.
2. Schnitte 5 Minuten lang mit Protein Block RE7102 inkubieren.
3. In TBS waschen.

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

Positive Gewebekontrolle

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an.

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

Gewebe mit schwach positiver Färbung ist für die optimale Qualitätskontrolle und den Nachweis kleiner Minderungen in der Reagenzleistung besser geeignet, als ein Gewebe mit stark positiver Färbung.³

Informationen über das positive Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden.

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

Negative Gewebekontrolle

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

Informationen über das empfohlene negative Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden.

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

Liegt eine unspezifische Färbung vor, hat diese gewöhnlich ein diffuses Erscheinungsbild. Eine sporadische Färbung des Bindegewebes kann ebenfalls in Schnitten von übermäßig formalinfixierten Geweben beobachtet werden. Zur Bewertung der Färbegergebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.⁴ Falsch-positive Ergebnisse können aufgrund einer nichtimmunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten beobachtet werden. Solche Ergebnisse können auch durch endogene Enzyme wie Pseudoperoxidase (Erythrozyten), endogene Peroxidase (Zytochrom C) oder endogenes Biotin⁵ (beispielsweise Leber, Mamma, Gehirn, Niere) hervorgerufen werden. Um eine endogene Enzymaktivität bzw. eine unspezifische Enzymbindung von einer spezifischen Immunreaktivität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substratchromogen, Streptavidin-HRP bzw. markiertem Polymer plus Substratchromogen gefärbt werden. Falls im negativen Kontrollgewebe eine spezifische Färbung auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

Negative Reagenzkontrolle

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

Patientengewebe

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

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 Färbegergebnisse.

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.⁶

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

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

Novocastra™ Protein Block RE7102 ist zur Verwendung auf paraffineingebetteten Schnitten mit spezifischen Fixierungsanforderungen bestimmt. Es kann insbesondere bei Neoplasmen zu einer unerwarteten Antigenexpression kommen. Die klinische Bewertung eines gefärbten Gewebeschnitts muss eine morphologische Analyse und die Auswertung der entsprechenden Kontrollen einschließen.

Leistungsmerkmale

Novocastra™ Protein Block RE7102 ist ein serumfreier Blocker auf Caseinbasis. Casein verringert nachweislich die unspezifische Färbung bei IHC-Verfahren.¹ Dieses Produkt bleibt bis zum auf dem Behälteretikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Literatur - Allgemein

1. Tacha DE and McKinney L: Casein reduces nonspecific background staining in immunolabeling techniques. *Journal of Histotechnology* 1992; 15, No2:127–132.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Keine.

Ausgabedatum

17 November 2008 (RE7102/CE/UK)

Novocastra™ Protein Block

Código De Producto: RE7102

Indicaciones De Uso

Para uso diagnóstico in vitro.

El producto Novocastra™ Protein Block RE7102 está indicado en el procedimiento de tinción inmunohistoquímica descrito en las Instrucciones de uso de Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, NovoLink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia se debe complementar con estudios morfológicos utilizando los controles adecuados, y un patólogo cualificado debe evaluarla en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Principio Del Procedimiento

En inmunohistoquímica se puede producir una tinción inespecífica (de fondo) como resultado de interacciones hidrófobas e iónicas entre los anticuerpos y los componentes tisulares. Se ha visto que la caseína disminuye la tinción no específica en procedimientos de inmunohistoquímica.¹

Este producto se usa en procedimientos de inmunohistoquímica, lo que permite la identificación cualitativa mediante microscopía óptica de antígenos en secciones de tejidos fijados con formol e incluidos en parafina, mediante pasos secuenciales con pasos intermedios de lavado (el Principio del procedimiento de la tinción inmunohistoquímica se puede consultar en las Instrucciones de uso del sistema correspondiente). Novocastra™ Protein Block RE7102 es un bloqueante sin suero, basado en caseína.

Reactivos suministrados

Protein Block RE7102 (25 mL). Caseína al 0,4% en solución salina tamponada con fosfatos, provista de estabilizantes, agente tensioactivo y Bronidox L al 0,2% como conservante.

Reconstitución, mezclado, dilución y titulación

Protein Block RE7102 es un reactivo listo para su uso. No se recomienda reconstituir, mezclar, diluir ni titular estos reactivos.

Una dilución mayor puede provocar que ya no se tiña el antígeno, o una tinción inespecífica. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo.

Almacenamiento Y Estabilidad

Almacénalo a una temperatura de 2–8 °C. No lo congele. Devuélvalo a 2–8 °C inmediatamente después de su uso. No lo utilice después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto. Cualesquiera condiciones de almacenamiento que no sean las especificadas deben ser verificadas por el usuario. No existe ningún signo evidente que indique la inestabilidad de este producto; por lo tanto, deberán realizarse simultáneamente controles positivos y negativos con muestras de paciente.

Preparación De Las Muestras

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

Advertencias Y Precauciones

Para usuarios profesionales.

La concentración de Bronidox L, que es el conservante usado en Protein Block RE7102, es del 0,2%. Puede causar irritación en la piel, ojos, membranas mucosas y vías respiratorias altas, y puede ser dañino si se ingiere o se absorbe por la piel.

Si la solicita, existe una hoja de información sobre la seguridad del material (MSDS) a su disposición.

Las muestras, antes y después de la fijación, y todos los materiales expuestos a ellas, se deben manipular como si fueran materiales infecciosos en potencia y se deben desechar aplicando las precauciones adecuadas.²

No pipeteo nunca los reactivos con la boca, y evite el contacto de la piel y de las membranas mucosas con los reactivos y las muestras. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas sensibles, lave éstas con abundante agua.

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

Reduzca al mínimo la contaminación microbiana de los reactivos; de lo contrario, podría producirse un aumento de la tinción no específica. Cualquier tiempo o temperatura de incubación que no sean los aquí especificados pueden conducir a resultados erróneos. Cualquier cambio de tal naturaleza debe ser validado por el usuario.

Procedimiento

A. Reactivos necesarios que no se suministran

1. Disolventes estándar utilizados en inmunohistoquímica.
2. Solución salina tamponada con Tris 50 mM (TBS), pH 7,6.
3. Soluciones de recuperación de antígenos (vea en Recomendaciones de uso del anticuerpo primario).
4. Soluciones de recuperación de enzimas (vea en Recomendaciones de uso del anticuerpo primario).
5. Diluyente de anticuerpos.
6. Anticuerpo primario.
7. Sistema de detección.
8. Medio de montaje.

B. Equipo necesario que no se suministra

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

C. Metodología

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

La combinación del anticuerpo primario, su dilución, junto con Protein Block RE7102 y el sistema de detección los debe validar el usuario sobre una serie de controles positivos y negativos conocidos.

Los pasos siguientes se deben ejecutar en la fase apropiada del protocolo de inmunohistoquímica (vea las Instrucción de uso del sistema de detección).

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

1. Lave con TBS.
2. Incube secciones en Protein Block RE7102 durante 5 minutos.
3. Lave con TBS.

Control De Calidad

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

Control Tisular Positivo

Se utiliza para indicar la preparación correcta de los tejidos y las técnicas de tinción adecuadas.

Debe incluirse un control tisular positivo por cada conjunto de condiciones de ensayo y anticuerpo primario en cada tinción o serie de tinciones realizada.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado que un tejido con una tinción positiva intensa para un control de calidad óptimo y para detectar niveles bajos de degradación del reactivo.³

En cuanto al control de tejido positivo recomendado, vea las Instrucciones de uso del anticuerpo primario.

Si el control de tejido positivo no muestra tinción positiva, los resultados de las muestras analizadas deben considerarse no válidos.

Control Tisular Negativo

Deberá examinarse después del control de tejido positivo, a fin de verificar la especificidad del marcado del antígeno diana por el anticuerpo primario.

En cuanto al control negativo recomendado, vea las Instrucciones de uso del anticuerpo primario.

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

Si aparece tinción no específica, tiene generalmente aspecto difuso. En secciones de tejido fijado excesivamente en formol puede observarse también tinción esporádica del tejido conectivo. Utilice células intactas para la interpretación de los resultados de la tinción. A menudo, las células necróticas o degeneradas quedan teñidas de forma no específica.⁴ También pueden observarse falsos positivos causados por la unión no inmunológica de proteínas o de productos de reacción del sustrato. Estos falsos positivos pueden estar causados también por enzimas endógenas tales como la pseudoperoxidasa (eritrocitos), la peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena⁵ (por ejemplo, de hígado, mama, cerebro o riñón). Para diferenciar la actividad de las enzimas endógenas o la unión inespecífica de las enzimas de la inmunoreactividad específica, pueden teñirse otros tejidos del paciente exclusivamente con cromógeno-sustrato, Streptavidin-HRP o polímeros marcados, y con cromógeno-sustrato, respectivamente. Si se produce tinción específica del control tisular negativo, los resultados de las muestras de los pacientes deben considerarse no válidos.

Control De Reactivo Negativo

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

Tejido Del Paciente

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

Limitaciones Generales

La inmunohistoquímica es un proceso de diagnóstico en varias fases que abarca: formación especializada en la selección de los reactivos apropiados; selección, fijación y procesamiento de tejidos; preparación del portaobjeto para IHQ; e interpretación de los resultados de la tinción.

La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento del tejido previos a la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o seccionamiento incorrectos, o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede generar artefactos, atrapamiento del anticuerpo o falsos negativos. La aparición de resultados incoherentes puede deberse a variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, o a irregularidades inherentes al tejido.⁶

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

La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia se debe complementar con estudios morfológicos utilizando los controles adecuados, y un patólogo cualificado debe evaluarla en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Novocastra™ Protein Block RE7102 está indicado en secciones incluidas en parafina, con requisitos de fijación específicos. Puede producirse una expresión inesperada del antígeno, especialmente en las neoplasias. La interpretación clínica de cualquier sección de tejido teñida debe incluir un análisis morfológico y la evaluación de los controles apropiados.

Características del rendimiento

Novocastra™ Protein Block RE7102 es un bloqueante sin suero, basado en caseína. Se ha mostrado que la caseína disminuye las tinciones no específicas de procedimientos inmunohistoquímicos¹. Este producto es estable hasta la fecha de caducidad impresa en su etiqueta.

Bibliografía - General

1. Tacha DE and McKinney L: Casein reduces nonspecific background staining in immunolabeling techniques. *Journal of Histotechnology* 1992; 15, No2:127–132.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Correcciones A La Publicación Anterior

No aplicable.

Fecha De Publicación

17 de noviembre de 2008 (RE7102/CE/UK)

Novocastra™ Protein Block

Código Do Produto: RE7102

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos in vitro.

O produto Novocastra™ Protein Block RE7102 foi concebido para ser utilizado no procedimento de coloração imunohistoquímica (IHQ) descrito nas instruções de utilização dos sistemas de detecção Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/ RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K e NovoLink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/ RE7150-K Detection Systems. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos que empreguem os devidos controlos, e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto dos antecedentes clínicos do doente e de outros testes de diagnóstico.

Princípio Do Procedimento

Em imunohistoquímica, pode ocorrer a coloração difusa não específica (de fundo) como resultado de interações hidrofóbicas e iónicas entre os anticorpos e os componentes dos tecidos. A caseína demonstrou diminuir a coloração não específica em procedimentos de IHQ¹.

Este produto é utilizado em procedimentos de IHQ, os quais permitem a identificação qualitativa de antígenos, por microscopia óptica, em secções de tecido fixado com formol e envolvido em parafina, através de etapas sequenciais intercaladas com etapas de lavagem (consultar as Instruções de utilização do sistema de detecção apropriado para obter informações sobre o Princípio do procedimento da coloração IHQ). O produto Novocastra™ Protein Block RE7102 é um bloqueador à base de caseína, livre de soro.

Reagentes fornecidos

Protein Block RE7102 (25 mL). Caseína a 0,4% em soro com tampão fosfato e produtos estabilizadores e tenso-activos, bem como Bronidox L a 0,2% como produto conservante.

Reconstituição, mistura, diluição, titulação

O Peroxidase Block RE7102 é um reagente pronto para ser utilizado. Não se recomenda a reconstituição, mistura, diluição ou titulação destes reagentes.

Qualquer diluição adicional pode resultar na perda de coloração do antígeno e/ou numa coloração não específica. O utilizador deve validar quaisquer alterações dessa natureza.

Armazenamento E Estabilidade

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

Preparação Das Amostras

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

Avisos E Precauções

Apenas para utilizadores profissionais.

A concentração de Bronidox L, o conservante utilizado no produto Protein Block RE7102, é de 0,2%. Este pode causar irritação à pele, olhos, membranas mucosas e tracto respiratório superior, e pode ser nocivo caso seja ingerido ou absorvido através da pele.

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

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

Nunca pipetar os reagentes com a boca e evitar o contacto da pele e membranas mucosas com os reagentes e amostras. Se os reagentes ou amostras entrarem em contacto com zonas sensíveis, lavar com grandes quantidades de água.

Consultar a legislação nacional ou europeia em relação ao descarte de quaisquer componentes potencialmente tóxicos.

Minimizar a contaminação microbiana dos reagentes, para evitar a possibilidade do aumento da coloração não específica. Os períodos de incubação ou temperaturas diferentes dos que foram especificados poderão dar azo a resultados errados. Todas as alterações desse tipo devem ser validadas pelo utilizador

Procedimento

A. Reagentes necessários não fornecidos

1. Solventes comuns utilizados em imunohistoquímica.
2. 50 mM de tris-buffered saline (TBS) pH 7,6.
3. Solução ou soluções de recuperação do antígeno (consultar a secção Recomendações sobre a utilização para obter informações sobre o anticorpo primário).
4. Solução ou soluções de recuperação das enzimas (consultar a secção Recomendações sobre a utilização para obter informações sobre o anticorpo primário).
5. Diluente de anticorpo.
6. Anticorpo primário.
7. Sistema de detecção.
8. Meio de montagem.

B. Equipamento necessário não fornecido

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

C. Metodologia

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

A combinação do anticorpo primário, da sua diluição, juntamente com o produto Protein Block RE7102 e do sistema de detecção deve ser validada pelo utilizador numa série de controlos positivos e negativos conhecidos.

As etapas que se seguem devem ser efectuadas no estágio apropriado do protocolo IHQ (consultar as Instruções de utilização do sistema de detecção).

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

1. Lavar em TBS.
2. Incubar as secções com Protein Block RE7102 durante 5 minutos.
3. Lavar em TBS.

Controlo Da Qualidade

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

Controlo De Tecido Positivo

Usado para assinalar os tecidos correctamente preparados e as técnicas de coloração indicadas.

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

Os tecidos com uma coloração positiva fraca são mais apropriados do que os têm uma coloração positiva forte para proporcionarem um controlo de qualidade óptimo, bem como para detectar níveis reduzidos de degradação dos reagentes⁴.

Consultar as Instruções de utilização do anticorpo primário para obter informações sobre o tecido de controlo positivo recomendado.

Se o controlo de tecido positivo não demonstrar uma coloração positiva, os resultados obtidos com as amostras de testes devem ser considerados inválidos.

Controlo De Tecido Negativo

Este deve ser examinado depois do controlo de tecido positivo, para verificar a especificidade da marcação do antígeno objectivado pelo anticorpo primário.

Consultar as Instruções de utilização do anticorpo primário para obter informações sobre o tecido de controlo negativo recomendado.

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

A coloração não específica, caso ocorra, tem geralmente um aspecto difuso. A coloração esporádica do tecido conjuntivo pode também ter lugar em secções de tecido excessivamente fixado em formol. Devem utilizar-se células intactas para a interpretação dos resultados da coloração. As células necróticas ou degeneradas causam muitas vezes uma coloração não específica⁵. Podem verificar-se resultados falso-positivos devido à ligação não imunológica de proteínas ou de produtos da reacção do substrato. Esses resultados podem também ser causados por enzimas endógenas tais como a pseudoperoxidase (eritrócitos), a peroxidase endógena (citocromo C), ou a biotina endógena⁶ (ex. no fígado, mama, cérebro ou rim). Para se diferenciar entre a actividade das enzimas endógenas ou as ligações não específicas de enzimas e as imunoreactividades específicas, podem colorir-se tecidos adicionais dos doentes exclusivamente com substrato cromogénio, Streptavidin-HRP ou com polímero etiquetado e substrato-cromogénio, respectivamente. Se ocorrer a coloração específica no controlo de tecido negativo, os resultados dos testes feitos com as amostras do doente devem ser considerados inválidos.

Controlo De Reagente Negativo

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

Tecido Do Doente

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

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, pode produzir artefactos, retenção de anticorpos, ou resultados falso-negativos. Os resultados inconsistentes podem dever-se a variações nos métodos de fixação e envolvimento, ou a irregularidades inerentes ao tecido⁶.

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

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

Novocastra™ Protein Block RE7102 serve para ser utilizado em secções envolvidas em parafina com requisitos especiais de fixação. Pode ocorrer uma expressão inesperada de antígeno, especialmente em neoplasmas. A interpretação clínica de qualquer secção de tecido colorido deverá incluir a análise morfológica e a avaliação de controlos apropriados.

Características de desempenho

O produto Novocastra™ Protein Block RE7102 é um bloqueador à base de caseína, livre de soro. A caseína demonstrou diminuir a coloração não específica em procedimentos de IHQ1. Este produto é estável até ao prazo de validade indicado no seu rótulo.

Bibliografia - Geral

1. Tacha DE and McKinney L: Casein reduces nonspecific background staining in immunolabeling techniques. *Journal of Histotechnology* 1992; 15, No2:127–132.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F, Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Emendas Da Edição Anterior

Não é aplicável.

Data De Emissão

17 de novembro de 2008 (RE7102/CE/UK)

Novocastra™ Protein Block

Produktkod: RE7102

Avsedd Användning

För in vitro diagnostisk användning.

Novocastra™ Protein Block RE7102 är avsedd för användning i immunhistokemiska (IHC) färgningsprocedurer beskrivna i Instruktioner vid användning av Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K och NovoLink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Den kliniska tolkningen av färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar med lämpliga kontroller och bör utvärderas av en kvalificerad patolog inom ramen för patientens anamnes och andra diagnostiska tester.

Metodens Princip

Inom immunhistokemi kan diffus ospecifik färgning (bakgrund) förekomma som ett resultat av hydrofoba och jon interaktioner mellan antikroppar och vävnadskomponenter. Kasein har visat sig minska ospecifik färgning i IHC procedurer.¹

Denna produkt används i IHC procedurer som tillåter kvalitativ identifikation med ljusmikroskopi av antigener i sektioner av formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad via sekvenssteg med inlagda tvättsteg (för IHC färgning Metodens princip se Instruktioner vid användning för lämpligt detektionssystem) Novocastra™ Protein Block RE7102 är en serumfri, kaseinbaserad blockerare.

Tillhandahållna reagens

Protein Block RE7102 (25 ml), 0,4% kasein i fosfatbuffrad koksaltlösning med stabiliseringsmedel, ytaktivt medel och 0,2% Bronidox L som konserveringsmedel.

Rekonstitution, blandning, spädning, titrering

Protein Block RE7102 är ett bruksfärdigt reagens. Rekonstitution, blandning, spädning eller titrering av dessa reagens rekommenderas inte.

Fortsatt spädning kan resultera i förlust av antigenfärgning och ospecifik färgning. Användaren måste kontrollera sådana förändringar.

Förvaring Och Stabilitet

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

Preparation Av Prov

Rekommenderat fixeringsmedel för paraffinbäddade vävnadssnitt är 10% neutralbuffrat formalin.

Varningar Och Försiktighetsåtgärder

För professionella användare.

Koncentrationen av Bronidox L, konserveringsmedlet som används i Protein Block RE7102, är 0,2%. Det kan orsaka irritation i hud, ögon, slemhinnor och övre luftvägar och kan vara skadligt vid sväljning eller om det absorberas genom huden.

Varuinformationsblad (MSDS) finns att få på begäran.

Prover, innan och efter fixering samt all material som utsätts för dem bör hanteras som om de överför infektioner och kastas enligt gällande försiktighetsåtgärder.²

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

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

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

Procedur

A. Reagens som krävs men inte tillhandahålls

1. Standardlösningar som används inom immunhistokemi.
2. 50 mM tris-buffrad koksaltlösning (TBS) pH 7,6.
3. Antigenåtervinningslösningar (se Rekommendationer vid användning för primära antikroppar).
4. Enzymåtervinningslösningar (se Rekommendationer vid användning för primära antikroppar).
5. Antikroppslösning.
6. Primär antikropp.
7. Detektionssystem.
8. Monteringsmedium.

B. Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

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

C. Metod

Innan metoden tillämpas måste användarna vara utbildade i immunhistokemiska tekniker.

Kombinationen av primär antikropp, dess spädning, tillsammans med Protein Block RE7102 och detektionssystemet bör kontrolleras av användare genom en serie kända positiva och negativa kontroller.

Följande steg bör tas på rätt plats enligt IHC protokollet (se detektionssystem Instruktioner vid användning)

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

1. Tvätta i TBS.
2. Inkubera sektioner med Protein Block RE7102 i 5 minuter.
3. Tvätta i TBS.

Kvalitetskontroll

Skilnader i vävnadsbehandling och tekniska metoder i användarens laboratorium kan ge stor variation i resultaten vilket kan göra det nödvändigt att genomföra regelbundna interna kontroller utöver följande metoder.

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

Positiv Vävnadskontroll

Används för att ange korrekt förberedda vävnader och rätt färgningstekniker.

En positiv vävnadskontroll bör ingå i varje uppsättning av testförhållanden/primär antikropp vid varje färgningskörning.

En vävnad med svag positiv färgning är mer passande för optimal kvalitetskontroll och för att upptäcka låga nivåer av reagensdegradering än en vävnad med stark positiv färgning.⁶

För rekommenderad positiv kontrollvävnad se primär antikropp Instruktioner vid användning.

Om den positiva vävnadskontrollen misslyckas med att uppvisa positiv färgning bör resultat med testproverna anses vara ogiltiga.

Negativ Vävnadskontroll

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

För rekommenderad negativ kontrollvävnad se primär antikropp Instruktioner vid användning.

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

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 färgas ofta ospecifikt.⁴ Falskt positiva resultat kan ses p.g.a. ickeimmunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erythrocyter), endogen peroxid (cytokrom C), eller endogen biotin⁵ (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure). För att skilja endogen enzymaktivitet eller ospecifik enzymbindning från specifik immunreaktivitet kan ytterligare patientvävnader färgas exklusivt med respektive substratromogen, Streptavidin-HRP eller märkt polymer, och substratromogen. 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 färgade patientprover 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, inte att det inte förekom i de analyserade cellerna/vävnaderna. Använd vid behov en antikroppspanel för att identifiera falskt negativa reaktioner.

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-objektglas samt tolkning av färgningsresultaten.

Vävnadsfärgning är beroende av hantering och bearbetning av vävnaden före färgningen. Felaktig fixering, nedfrysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering med andra vävnader eller vätskor kan framställa artefakter, infångande av antikroppar eller falskt negativa resultat. Motsägelsefulla resultat kan bero på variationer av fixerings- och inbäddningsmetoder eller på naturliga oregelbundenheter inom vävnaden.⁶

Överflödigt eller ofullständig kontrastfärgning kan äventyra korrekt tolkning av resultat.

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

Novocastra™ Protein Block RE7102 är till för användning på paraffinbäddade sektioner med specifika fixeringskrav. Övrigt antigenuttryck kan ske, speciellt i neoplasmer. Morfologisk analys och utvärdering av lämpliga kontroller måste ingå i den kliniska tolkningen av alla färgade vävnadssnitt.

Prestanda

Novocastra™ Protein Block RE7102 är en serumfri, kaseinbaserad blockerare. Kasein har visat sig minska ospecifik färgning i IHC procedurer. Denna produkt håller sig stabil fram till utgångsdatumet på produktens etikett.

Bibliografi - Allmän

1. Tacha DE and McKinney L: Casein reduces nonspecific background staining in immunolabeling techniques. *Journal of Histotechnology* 1992; 15, No2:127–132.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Rättelser Av Tidigare Utgivning

Galler inte.

Utgivningsdatum

17 november 2008 (RE7102/CE/UK).

Novocastra™ Protein Block

Κωδικός είδους: RE7102

Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

Για in vitro διαγνωστική χρήση.

Το Novocastra™ Protein Block RE7102 προορίζεται για χρήση στη διαδικασία ανοσοϊστοχημικής (IHC) χρώσης που περιγράφεται στις οδηγίες χρήσης των συστημάτων ανίχνευσης Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K, NovoLink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν σωστούς μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογοανατόμο.

Αρχή Της Διαδικασίας

Στην ανοσοϊστοχημεία είναι δυνατό να συμβεί διάχυτη μη ειδική χρώση (υπόβαθρο) ως αποτέλεσμα υδρόφοβων και ιοντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αντισωμάτων και συστατικών του ιστού. Η καζείνη έχει δείξει ότι μειώνει τη μη ειδική χρώση σε ανοσοϊστοχημικές (IHC) διαδικασίες.¹

Το προϊόν αυτό χρησιμοποιείται σε ανοσοϊστοχημικές (IHC) διαδικασίες, οι οποίες επιτρέπουν την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός των ανιχνώντων σε τομές ιστού μονιμοποιημένου με φορμόλη και εγκλεισμένου σε παραφίνη, μέσω διαδοχικών βημάτων με παρεμβλλόμενα βήματα πλύσης (για την Αρχή της διαδικασίας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, δείτε τις οδηγίες χρήσης του κατάλληλου συστήματος ανίχνευσης). Το Novocastra™ Protein Block RE7102 είναι ένας παράγοντας αποκλεισμού με βάση την καζείνη χωρίς ορό.

Παρεχόμενη αντιδραστήρια

Protein Block RE7102 (25 mL). Καζείνη 0,4% σε ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα φωσφορικών, με σταθεροποιητές, επιφανειοδραστικό παράγοντα και 0,2% Bronidox L ως συντηρητικό.

Ανασύσταση, ανάμειξη, αραιώση, τιτλοδότηση

Το Protein Block RE7102 είναι ένα έτοιμο προς χρήση αντιδραστήριο. Δε συνιστάται ανασύσταση, ανάμειξη, αραιώση ή τιτλοδότηση των αντιδραστηρίων αυτών.

Περαιτέρω αραιώση ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα απώλεια της χρώσης του ανιχνόου ή/και μη ειδική χρώση. Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει τυχόν τέτοια αλλαγή.

Φύλαξη Και Σταθερότητα

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

Παρασκευή Δείγματος

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

Προειδοποιήσεις Και Προφυλάξεις

Για επαγγελματίες χρήστες.

Η συγκέντρωση του Bronidox L, το συντηρητικό που χρησιμοποιείται στο Protein Block RE7102, είναι 0,2%. Ενδέχεται να προκαλέσει ερεθισμό στο δέρμα, τα μάτια, τους βλεννογόνους και την άνω αναπνευστική οδό και να είναι επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης ή απορρόφησης μέσω του δέρματος.

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

Τα δείγματα, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, καθώς και όλα τα υλικά που εκτίθενται σε αυτά, πρέπει να υποβάλλονται σε χειρισμό ως δυνητικά μετάδοσης λοίμωξης και να απορρίπτονται με κατάλληλες προφυλάξεις².

Μην αναρροφάτε ποτέ με πιπέτα τα αντιδραστήρια με το στόμα και αποφεύγετε την επαφή του δέρματος και των βλεννογόνων με αντιδραστήρια και δείγματα. Εάν τα αντιδραστήρια ή τα δείγματα έλθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, πλύνετε με άφθονες ποσότητες νερού.

Συμβουλευτείτε τους ομοσπονδιακούς, πολιτειακούς ή τοπικούς κανονισμούς για απόρριψη τυχόν δυνητικών τοξικών συστατικών. Ελαχιστοποιήστε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διότι ενδέχεται να συμβεί αύξηση της μη ειδικής χρώσης. Χρόνοι ή θερμοκρασίες επώασης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται ενδέχεται να διορθωθούν αποτελέσματα. Τυχόν τέτοια μεταβολή πρέπει να επικυρώνεται από το χρήστη.

Διαδικασία

A. Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Πρότυποι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημεία.
2. 50 mM αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος Tris (TBS) pH 7,6.
3. Διάλυμα(τα) ανάκτησης ενζυγίων (δείτε την ενότητα Συστάσεις για τη χρήση για το πρωτοταγές αντίσωμα).
4. Διάλυμα(τα) ανάκτησης ενζύμων (δείτε την ενότητα Συστάσεις για τη χρήση για το πρωτοταγές αντίσωμα).
5. Αραιωτικό αντισώματος.
6. Πρωτοταγές αντίσωμα.
7. Σύστημα ανίχνευσης.
8. Υλικό στερέωσης.

B. Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

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

C. Μεθοδολογία

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

Ο συνδυασμός του πρωτοταγούς αντισώματος, της αραίωσής του, σε συνδυασμό με το Protein Block RE7102 και το σύστημα ανίχνευσης πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη σε σειρά γνωστών θετικών και αρνητικών μαρτύρων.

Τα ακόλουθα βήματα πρέπει να εκτελούνται στο κατάλληλο στάδιο του ανοσοϊστοχημικού (IHC) πρωτοκόλλου (δείτε τις οδηγίες χρήσης του συστήματος ανίχνευσης).

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

1. Πλύνετε σε TBS.
2. Επώαστε τις τομές με Protein Block RE7102 επί 5 λεπτά.
3. Πλύνετε σε TBS.

Ποιοτικός Έλεγχος

Τυχόν διαφορές στην επεξεργασία των ιστών και τις τεχνικές διαδικασίες στο εργαστήριο του χρήστη ενδέχεται να προκαλέσουν σημαντική μεταβλητότητα στα αποτελέσματα, καθιστώντας αναγκαία την τακτική εκτέλεση εσωτερικών ελέγχων επιπέδων των ακόλουθων διαδικασιών.

Οι μάρτυρες θα πρέπει να είναι φρέσκα δείγματα νεκροψιάς/βιοψιάς/χειρουργικά δείγματα, τα οποία είναι μονιμοποιημένα με φορμόλη, επεξεργασμένα και εγκλεισμένα σε κηρό παραφίνης, το συντομότερο δυνατό με τον ίδιο τρόπο με το(α) δείγμα(τα) του ασθενούς.

Θετικός Μάρτυρας Ιστού

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

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

Ένας ιστός με ασθενή θετική χρώση είναι πιο κατάλληλος από έναν ιστό με ισχυρή θετική χρώση για βέλτιστο ποιοτικό έλεγχο και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόμησης των αντιδραστηρίων.³

Για το συνιστώμενο ιστό θετικού μάρτυρα, δείτε τις οδηγίες χρήσης του πρωτοταγούς αντισώματος.

Εάν ο θετικός μάρτυρας ιστού δεν παρουσιάζει θετική χρώση, τα αποτελέσματα με τα δείγματα της εξέτασης θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Αρνητικός Μάρτυρας Ιστού

Θα πρέπει να εξετάζεται μετά τον θετικό μάρτυρα ιστού για την επαλήθευση της ειδικότητας της επίσημης της αντιγόνου-στόχου από το πρωτοταγές αντίσωμα.

Για τον συνιστώμενο ιστό αρνητικού μάρτυρα, δείτε τις οδηγίες χρήσης του πρωτοταγούς αντισώματος.

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

Μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, έχει συνήθως διάχυτη εμφάνιση. Ενδέχεται επίσης να παρατηρηθεί αποραδική χρώση του συνδεδεκού 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 u963 συχνά μη ειδική χρώση.⁴ Ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ανοσολογικής δέσμευσης των πρωτεϊνών ή των προϊόντων αντίδρασης του υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδούπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη⁵ (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός). Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμευσης των ενζύμων από ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπέδων ιστού ασθενών με υπόστρωμα-χρωμογόνο, στρεπταβιδίνη-HRP ή σημιασμένο 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 της μη ειδικής χρώσης και για να επιτρέπεται καλύτερη ερμηνεία της ειδικής χρώσης στη θέση του αντιγόνου.

Ιστός Ασθενούς

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

Γενικοί Περιορισμοί

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια διαγνωστική διεργασία πολλαπλών βημάτων, η οποία αποτελείται από ειδικευμένη εκπαίδευση στην επιλογή των κατάλληλων αντιδραστηρίων, επιλογή ιστού, μονιμοποίηση και επεξεργασία, παρασκευή της πλάκας IHC και ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης.

Η χρώση του ιστού εξαρτάται από το χειρισμό και την επεξεργασία του ιστού πριν από τη χρώση. Τυχόν εσφαλμένη μονιμοποίηση, κατάψυξη, απόψυξη, πλύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να παράγει μορφώματα, παγιδευση αντισώματος ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τυχόν ασυνεπή αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται σε παραλλαγές των μεθόδων μονιμοποίησης και εγκλεισμού ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.⁶

Τυχόν υπερβολική ή ατελής αντιχρώση ενδέχεται να διακυβευθεί 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.

Το Novocastra™ Protein Block RE7102 προορίζεται για χρήση σε τομές εγκλεισμένες σε παραφίνη με ειδικές απαιτήσεις μονιμοποίησης. Ενδέχεται να παρουσιαστεί μη αναμενόμενη έκφραση αντιγόνου, ειδικά σε νεοπλασμάτα. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε κεχρωσμένης τομής ιστού πρέπει να περιλαμβάνει μορφολογική ανάλυση και την αξιολόγηση των κατάλληλων μαρτύρων.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Το Novocastra™ Protein Block RE7102 είναι ένας παράγοντας αποκλεισμού με βάση την καζεΐνη χωρίς ορό. Η καζεΐνη έχει δείξει ότι μειώνει τη μη ειδική χρώση σε ανοσοϊστοχημικές (IHC) διαδικασίες¹. Το προϊόν αυτό είναι σταθερό έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος.

Βιβλιογραφία - Γενική

1. Tacha DE and McKinney L: Casein reduces nonspecific background staining in immunolabeling techniques. *Journal of Histochemistry* 1992; 15, No2:127–132.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

Ημερομηνία Έκδοσης

17 Νοέμβριος 2008 (RE7102/CE/UK)

Novocastra™ Protein Block

Produktkode: RE7102

Tilsigtet Anvendelse

Til in vitro diagnostisk anvendelse.

Novocastra™ Protein Block RE7102 er beregnet til anvendelse i de immunhistokemiske (IHC) farvningsprocedurer beskrevet i brugsvejledningen for Novocastra™ Peroxidase Detection Systems RE7110-K/RE7120-K, Novocastra™ Concentrated Peroxidase Detection System RE7130-K og NovoLink™ Polymer Detection Systems RE7140-K/RE7150-K. Den kliniske fortolkning af al farvning eller fravær af farvning skal suppleres med morfologiske studier ved anvendelse af passende kontroller og skal evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests af en kvalificeret patolog.

Procedureprincip

I immunhistokemi kan der opstå diffus uspecifik farvning (baggrund) som resultat af hydrofobe interaktioner og ioninteraktioner mellem antistoffer og vævskomponenter. Casein er vist at nedsætte uspecifik farvning i IHC-procedurer.¹

Dette produkt anvendes i en IHC-procedurer, der muliggør kvalitativ identifikation af antigener ved lysmikroskopi i vævssnit af formalinfikseret, paraffinindstøbt væv via sekventielle trin med indskudte vasketrin (vedrørende Procedureprincip for IHC-farvning, se brugsvejledningen for det passende detektionssystem). Novocastra™ Protein Block RE7102 er et serumfrit, caseinbaseret blokeringsmiddel.

Leverede reagenser

Protein Block RE7102 (25 ml), 0,4% Casein i fosfatbufferjusteret saltvandsopløsning med stabilisatorer, overfladeaktivt middel og 0,2% Bronidox L som konserveringsmiddel.

Rekonstituering, blanding, fortynding, titrering

Protein Block RE7102 er et brusklart reagens. Rekonstituering, blanding, fortynding eller titrering af disse reagenser anbefales ikke.

Yderligere fortynding kan resultere i tab af antigenfarvning og/eller uspecifik farvning. Brugeren skal kontrollere alle sådanne ændringer.

Opbevaring Og Holdbarhed

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

Prøveklargøring

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

Advarsler Og Forholdsregler

Må kun anvendes af uddannet fagpersonale.

Koncentrationen af Bronidox L, det anvendte konserveringsmiddel i Protein Block RE7102, er 0,2%. Det kan forårsage irritation af hud, øjne, slimhinder og de øvre luftveje og kan være skadeligt, hvis det sluges eller absorberes gennem huden.

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

Prøver skal før og efter fiksering, lige som alle materialer eksponeret mod prøverne, håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler.²

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

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

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

Procedure

A. Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

1. Standardopløsningsmidler anvendt i immunhistokemi.
2. 50 mM trisbufferjusteret saltvandsopløsning (TBS) pH 7,6.
3. Antigengenhfindingsopløsning(er) (se Anbefalinger vedrørende anvendelse for primært antistof).
4. Enzymgenfindingsopløsning(er) (se Anbefalinger vedrørende anvendelse for primært antistof).
5. Antistofdiluent.
6. Primært antistof.
7. Detektionssystem
8. Monteringsmedium.

B. Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

1. Udstyr nødvendigt til antigenfindning hvis anbefalet for det primære antistof.
2. Almindeligt laboratoriestyr til immunhistokemi.

C. Metodologi

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

Kombinationen af primært antistof og dets fortynding sammen med Protein Block RE7102 og detektionssystemet skal valideres af brugeren på en serie kendte positive og negative kontroller.

Følgende trin skal udføres på det passende trin i IHC-protokollen (se brugsvejledningen for detektionssystemet).

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

1. Vask i TBS.
2. Inkuber vævssnittene med Protein Block RE7102 i 5 minutter.
3. Vask i TBS.

Kvalitetskontrol

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

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

Positiv Vævskontrol

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

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

Svagt positivt farvet væv er mere egnet end kraftigt positivt farvet væv til optimal kvalitetskontrol og påvisning af små niveauer af reagensnedbrydning³.

Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede positive kontrolvæv.

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

Negativ Vævskontrol

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

Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede negative kontrolvæv.

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

Uspecifik farvning har, hvis til stede, ofte et diffust udseende. Sporadisk farvning af bindevæv kan ligeledes observeres i vævssnit af væv, der er fikseret for kraftigt i formalin. Anvend intakte celler til fortolkning af farvningsresultaterne. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte mere uspecifikt.⁴ 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 biotin⁵ (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre). For at differentiere mellem endogen enzymaktivitet eller uspecifik enzymbinding og specifik immunreaktivitet kan yderligere patientvæv eventuelt farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen, Streptavidin-HRP eller mærket polymer og substratkromogen. Hvis der optræder specifik farvning i den negative vævskontrol, skal resultaterne af patientprøverne kasseres.

Negativ Reagenskontrol

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

Patientvæv

Anvendes til påvisning af, at vævet er fremstillet korrekt, og at der er anvendt korrekte farvningsteknikker. Der bør inkluderes en positiv vævskontrol for hvert sæt testbetingelser/primært antistof i hver farvekørsel. Svagt positivt farvet væv er mere egnet end kraftigt positivt farvet væv til optimal kvalitetskontrol og påvisning af små niveauer af reagensnedbrydning. Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede positive kontrolvæv. Hvis den positive vævskontrol ikke udviser positiv farvning, skal resultater af testprøverne kasseres.

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 irregularetter indeholdt i vævet.⁶

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 fortolkning af kvalificeret patolog.

Novocastra™ Protein Block RE7102 er beregnet til anvendelse på paraffinindstøbte vævssnit med specifikke krav til fiksering. Der kan forekomme uventet antigenekspresion, navnlig i neoplasmer. Den kliniske fortolkning af alle farvede vævssnit skal indbefatte morfologisk analyse og evaluering af passende kontroller

Ydeevne

Novocastra™ Protein Block RE7102 er et serumfrit, caseinbaseret blokeringsmiddel. Casein er vist at nedsætte uspecifik farvning i IHC procedurer¹. Produktet er stabilt til udløbsdatoen trykt på produktets etikette.

Bibliografi - Generelt

1. Tacha DE and McKinney L: Casein reduces nonspecific background staining in immunolabeling techniques. *Journal of Histotechnology* 1992; 15, No2:127–132.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
3. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
4. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
5. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Rettelser Til Tidligere Udgave

Ingen rettelser

Udgivelsesdato

17 November 2008 (RE7102/CE/UK)

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

