



BIO SYSTEMS

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

**Product Code: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119**

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



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

## Instructions for Use

Please read before using this product.

## Mode d'emploi

À lire avant d'utiliser ce produit.

## Istruzioni per L'uso

Si prega di leggere, prima di usare il prodotto.

## Gebrauchsanweisung

Bitte vor der Verwendung dieses Produkts lesen.

## Instrucciones de Uso

Por favor, leer antes de utilizar este producto.

## Instruções de Utilização

Leia estas instruções antes de utilizar este produto.

## Instruktioner vid Användning

Var god läs innan ni använder produkten.

## Οδηγίες Χρήσης

Παρακαλούμε διαβάστε τις οδηγίες πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν αυτό.

## Brugsanvisning

Læs venligst før produktet tages i brug.

## Gebruiksaanwijzing

Lezen vóór gebruik van dit product.

## Brugsanvisning

Vennligst les denne før du bruker produktet.

## Kullanım Talimatları

Lütfen bu ürünü kullanmadan önce okuyunuz.

## Инструкции за употреба

Моля, прочетете преди употреба на този продукт.

## Használati utasítás

A termék használatba vétele előtt olvassa el.

## Instruçiuni de utilizare

Citiți aceste instrucțiuni înainte de a utiliza produsul.

## Инструкция по применению

Прочтите перед применением этого продукта.

## Instrukcja obsługi

Przed użyciem tego produktu należy przeczytać instrukcję.

## Navodila za uporabo

Preberite pred uporabo tega izdelka.

## Návod k použití

Čtěte před použitím tohoto výrobku.

## Návod na použitie

Prosím, prečítajte si ho pred použitím produktov.

## Check the integrity of the packaging before use.

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

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

Vor dem Gebrauch die Verpackung auf

Unversehrtheit überprüfen.

Comprobar la integridad del envase, antes de usarlo.

Verifique a integridade da embalagem antes de utilizar o produto.

Kontrollera att paketet är obrutet innan användning.

Ελέγξτε την ακεραιότητα της συσκευασίας πριν από τη χρήση.

Kontroller, at pakken er ubeskadiget før brug.

Controleer de verpakking vóór gebruik.

Sjekk at pakningen er intakt før bruk.

Kullanmadan önce ambalajın bozulmamış olmasını kontrol edin.

Проверете целостта на опаковката преди употреба.

Használat előtt ellenőrizze a csomagolás épségét.

Verificați integritatea ambalajului înainte de a utiliza produsul.

Перед применением убедитесь в целостности упаковки.

Przed użyciem należy sprawdzić, czy opakowanie jest szczelne.

Pred uporabo preverite celovitost embalaže.

Před použitím zkontrolujte neporušenost obalu.

Pre použitím skontrolujte, či balenie nie je porušené.



# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Product Nos: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Intended Use

For *in vitro* diagnostic use.

The Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 and RE7119 are intended for Heat Induced Epitope Retrieval on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections as part of an immunohistochemical procedure. 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

Heat Induced Epitope Retrieval of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections using an appropriate pH solution improves the staining of some antibodies by exposing epitopes within tissue that have been masked during fixation. The development of Epitope Retrieval using heat began in 1991 with the report by Shi et al.<sup>1</sup> Since then numerous studies have been published looking at the effects of Epitope Retrieval solutions, molarity, pH, and heating methods.<sup>2</sup> A universal Heat Induced Epitope Retrieval technique suitable for all epitopes does not exist so a number of different heating methods and Epitope Retrieval solutions, including those listed below may be used.

These products are used in an immunohistochemical (IHC) procedure that allows 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). Heat Induced Epitope Retrieval is not recommended for all antibodies (see primary antibody Recommendations on Use). Optimum conditions for Epitope Retrieval should be validated by the user as these are dependant upon tissue, fixation and/or primary antibody.

### Reagents Provided

One of the following:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Citrate-based buffer containing surfactant
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1L	EDTA-based buffer containing surfactant
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L	Tris/EDTA-based buffer containing surfactant

### Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

The Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 and RE7119 require dilution with de-ionized water to prepare working solutions (see Methodology). Further dilution may result in loss of antigen staining. The user must validate any such change.

### Storage and Stability

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

### Specimen Preparation

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

### Warnings and Precautions

One or more components in the product is hazardous.

A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

For professional users. Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.<sup>3</sup>

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

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

See primary antibody Instructions for Use.

### B. Equipment required but not supplied

1. Stainless steel pressure cooker (it is recommended that the gaskets are changed at regular intervals to maintain optimum retrieval conditions). To ensure safe and correct use of the pressure cooker users must read the manufacturer's instructions.
2. General immunohistochemistry laboratory equipment.

### C. Methodology

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

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

1. If using Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 or RE7119 prepare a working solution by diluting 1 part concentrate with 9 parts de-ionized water.
2. Heat 1.5L of the working solution until boiling in a pressure cooker. Cover but do not lock lid. Position slides into metal staining racks (do not place slides close together as uneven staining may occur) and lower into pressure cooker ensuring slides are completely immersed in retrieval solution. Lock lid.
3. When the pressure cooker reaches operating temperature and pressure, time for 1 minute (optimum time should be validated by the user, as this is dependant upon tissue, fixation and/or primary antibody).
4. Remove pressure cooker from heat source and run under cold water with lid on. DO NOT OPEN LID UNTIL THE INDICATORS SHOW THAT PRESSURE HAS BEEN RELEASED. Open lid, remove slides and place immediately in cool tap water.
5. Proceed with IHC protocol according to manufacturers' Instructions for Use for the primary antibody and detection system.

### Quality Control

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

#### Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques. One positive tissue control should be included for each set of test conditions/primary antibody in each staining run. A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.<sup>4</sup> For recommended positive control tissue see primary antibody Instructions for Use. If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

#### Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody. For recommended negative control tissue see primary antibody Instructions for Use. Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user. Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.<sup>5</sup> False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin<sup>6</sup> (eg. liver, breast, brain, kidney). To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate-chromogen, Streptavidin-HRP or labeled polymer and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

#### Negative Reagent Control

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

#### Patient Tissue

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

#### Limitations

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

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

Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

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

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

### **Performance Characteristics**

The performance of Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 and RE7119 have been validated using a range of Novocastra™ mouse IgG, mouse IgM and rabbit IgG primary antibodies.

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

### **Bibliography**

1. Shi S–R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S–R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–67.
7. 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**

New information has been added to the Warnings and Precautions section.

### **Date of Issue**

30 January 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Références des produits : RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Utilisation prévue

Diagnostic *in vitro*.

Les Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 and RE7119 sont destinés à la restauration de l'épitope induite par la chaleur sur des coupes tissulaires fixées au formol, incluses en paraffine, dans le cadre d'une procédure immunohistochimique. L'interprétation clinique de tout marquage, ou absence de marquage, doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée par un pathologiste qualifié à la lumière des antécédents cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques.

### Principe de la procédure

La restauration de l'épitope induite par la chaleur sur des coupes tissulaires fixées au formol, incluses en paraffine, à l'aide d'une solution de pH approprié améliore le marquage de certains anticorps en exposant les épitopes présents dans les tissus qui ont été masqués au cours de la fixation. Le développement de la restauration de l'épitope induite par la chaleur a commencé en 1991 avec la publication de Shi et al.<sup>1</sup> Depuis lors, de nombreuses études ont été publiées qui ont étudié les effets des solutions de restauration de l'épitope, de la molarité, du pH et des méthodes chauffage.<sup>2</sup> Il n'existe pas de technique de restauration de l'épitope universelle, adaptée à tous les épitopes, il est donc possible d'utiliser de nombreuses méthodes de chauffage et solutions de restauration de l'épitope différentes, y compris celles qui figurent dans la liste ci-dessous.

Ces produits sont utilisés dans le cadre d'une procédure immunohistochimique (IHC) qui permet une identification qualitative des antigènes par microscopie optique, dans des coupes fixées au formol, incluses en paraffine, par l'intermédiaire d'étapes séquentielles comportant des étapes de lavage (pour le Principe de la procédure de marquage IHC, voir le Mode d'emploi du système de détection approprié). La restauration de l'épitope à l'aide d'une technique de restauration de l'épitope induite par la chaleur n'est pas recommandée pour tous les anticorps (voir les Recommandations d'utilisation de l'anticorps primaire). Les conditions optimales de restauration de l'épitope doivent être validées par l'utilisateur car elles sont dépendantes des tissus, de la fixation et/ou de l'anticorps primaire.

### Réactifs fournis

L'un des suivants:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Tampon citrate contenant un surfactant
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	Tampon EDTA contenant un surfactant
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Tampon Tris/EDTA contenant un surfactant

### Reconstitution, Mélange, Dilution, Titrage

Les Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 et RE7119 nécessitent une dilution avec de l'eau désionisée pour préparer les solutions de travail (voir Méthodologie). Une dilution supplémentaire est susceptible de se traduire par une perte de marquage des antigènes. Toute modification de ce type doit être validée par l'utilisateur.

### Conservation et Stabilité

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

### Préparation des spécimens

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

### Mises en garde et Précautions

Un ou plusieurs des composants de ce produit présente un danger.

Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L (RE7113), Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7114).

R36/38 S26 36/37/39 63/64. Une Fiche de données de sécurité est disponible sur demande ou sur le site [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119). Une Fiche de données de sécurité est disponible sur demande ou sur le site [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

### Pour utilisateurs professionnels.

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

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

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

Voir le Mode d'emploi de l'anticorps primaire.

### B. Equipements nécessaires mais non fournis

1. Autocuiseur en acier inoxydable (il est recommandé de changer les joints à intervalle régulier pour conserver des conditions de démasquage optimales). Pour garantir une utilisation sûre et correcte de l'autocuiseur, les utilisateurs doivent lire les Instructions fournies par le fabricant.
2. Équipements généraux d'un laboratoire d'immunohistochimie.

### C. Méthodologie

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

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

1. Lors de l'utilisation de Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 ou RE7119, préparer une solution de travail en diluant 1 partie de concentré avec 9 parties d'eau désionisée.
2. Faire chauffer 1,5 l de solution de travail jusqu'à ébullition dans l'autocuiseur. Couvrir sans verrouiller le couvercle. Placer les lames sur des portoirs de marquage métalliques (ne pas placer les lames trop près les unes des autres afin d'éviter l'apparition d'un marquage irrégulier) et introduire l'ensemble dans l'autocuiseur en s'assurant que les lames soient complètement immergées dans la solution de restauration. Verrouiller le couvercle.
3. Quand l'autocuiseur atteint sa température et sa pression de fonctionnement, compter 1 minute (la durée optimale doit être validée par l'utilisateur car elle est dépendante des tissus, de la fixation et/ou de l'anticorps primaire).
4. Éloigner l'autocuiseur de la source de chaleur et le passer sous l'eau froide, le couvercle restant en place. NE PAS OUVRIR LE COUVERCLE JUSQU'À CE QUE LES INDICATEURS SIGNALENT QUE LA PRESSION A ÉTÉ ÉVACUÉE. Ouvrir le couvercle, retirer les lames et les placer immédiatement dans de l'eau du robinet froide.
5. Mettre en oeuvre le protocole IHC conformément aux Mode d'emploi fourni par le fabricant pour l'anticorps primaire et le système de détection.

### Contrôle de qualité

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

#### Tissu de contrôle positif

Il est utilisé pour indiquer que les tissus ont été préparés correctement et que les techniques de marquage étaient appropriées. Un contrôle tissulaire positif doit être inclus dans toute opération de marquage pour chaque ensemble d'anticorps primaire/de conditions d'analyse. Un tissu présentant un marquage faiblement positif est plus adapté à un contrôle de qualité optimal qu'un tissu présentant un marquage fortement positif et il permet de détecter de moindres niveaux de dégradation du réactif.<sup>4</sup> Pour le tissu de contrôle positif recommandé, voir le Mode d'emploi de l'anticorps primaire. Si le tissu de contrôle positif ne présente pas de marquage positif, les résultats des spécimens analysés doivent être considérés comme invalides.

#### Tissu de contrôle négatif

Il doit être examiné après le tissu de contrôle positif afin de vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire. Pour le tissu de contrôle négatif recommandé, voir le Mode d'emploi de l'anticorps primaire. Sinon, la diversité des types cellulaires présents dans la plupart des tissus permet de disposer fréquemment de sites de contrôle négatif, mais ils doivent être vérifiés par l'utilisateur. S'il est présent, le marquage non spécifique prend habituellement une apparence diffuse. Un marquage sporadique du tissu conjonctif peut également être observé sur des coupes de tissus qui ont été fixées par un excès de formol. Utiliser des cellules intactes pour l'interprétation des résultats du marquage. Les cellules nécrotiques ou dégénérées sont souvent marquées de façon non spécifique.<sup>5</sup> Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique à des protéines ou à des produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être provoqués par des enzymes endogènes comme la pseudoperoxydase (érythrocytes), la peroxydase endogène (cytochrome C), ou la biotine endogène<sup>6</sup> (foie, sein, cerveau, rein, par exemple). Pour différencier l'activité des enzymes endogènes ou la liaison non spécifique d'enzymes de l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être marqués exclusivement avec le substrat chromogène, le Streptavidin-HRP, ou le polymère marqué et le substrat chromogène respectivement. Si un marquage spécifique se produit dans le tissu de contrôle négatif, les résultats des spécimens du patient doivent être considérés comme invalides.

#### Réactif de contrôle négatif

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

#### Tissu du patient

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

## Limites

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

Le marquage des tissus dépend de leur manipulation et de leur traitement avant le marquage. Une fixation, une congélation, une décongélation, un lavage, un séchage, un chauffage, une coupe, incorrects ou une contamination par d'autres tissus ou d'autres liquides sont susceptibles de conduire à la production d'artefacts, au piégeage de l'anticorps ou à des résultats faussement négatifs. Des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités propres au tissu, peuvent conduire à des résultats incohérents.<sup>7</sup>

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

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

Les Novocstra™ Epitope Retrieval Solutions doivent être utilisées sur des coupes incluses en paraffine ayant fait l'objet d'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

Les performances des Novocstra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 et RE7119 ont été validées à l'aide d'une gamme d'anticorps primaires Novocstra™ de type IgG de souris, IgM de souris et IgG de lapin.

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

## Bibliographie

1. Shi S-R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed,paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741-748.
2. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327-343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. 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

De nouvelles informations ont été ajoutées à la section Avertissement et Précautions d'emploi.

## Date de publication

30 janvier 2019



# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Cod. prodotti: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Uso previsto

Per uso diagnostico *in vitro*.

Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116, RE7119 sono destinati allo smascheramento degli epitopi indotto dal calore in sezioni di tessuto fissate in formalina e incluse in paraffina, come parte di una tecnica immunohistochimica. 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

Lo smascheramento degli epitopi indotto dal calore di sezioni tissutali fissate in formalina e incluse in paraffina, usando una soluzione a pH adeguato, migliora la colorazione di alcuni anticorpi, esponendo gli epitopi presenti nel tessuto e mascherati durante la fissazione. Lo sviluppo delle tecniche di smascheramento degli epitopi che utilizzano il calore ha avuto inizio nel 1991 con la pubblicazione di Shi et al.<sup>1</sup> Da allora, sono stati riportati molti studi sugli effetti delle soluzioni per lo smascheramento degli epitopi, della molarità, del pH, e delle tecniche di riscaldamento.<sup>2</sup> Poiché non è ancora disponibile una tecnica universale di smascheramento degli epitopi indotto dal calore, idonea per tutti gli epitopi, bisogna utilizzare metodi diversi di riscaldamento e diverse soluzioni di smascheramento degli epitopi, comprese quelle riportate qui di seguito.

Questi prodotti vengono impiegati nel corso di una tecnica immunohistochimica (IHC), che consente 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). Lo smascheramento degli epitopi indotto dal calore non è consigliato per tutti gli anticorpi (vedere le Raccomandazioni per l'uso per l'anticorpo primario). Le condizioni ottimali per lo smascheramento degli epitopi vanno convalidate dall'utente, poiché dipendono dal tessuto, dalla fissazione e/o dall'anticorpo primario.

### Reagenti forniti

#### Uno dei seguenti:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Tampone citrato contenente surfattante
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1L	Tampone EDTA contenente surfattante
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L	Tampone Tris/EDTA contenente surfattante

### Ricostituzione, miscelazione, diluizione, titolazione

Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 e RE7119 richiedono la diluizione con acqua deionizzata per la preparazione delle soluzioni di lavoro (vedere Metodologia). L'ulteriore diluizione potrebbe causare una perdita di colorazione dell'antigene. Tali eventuali variazioni devono essere convalidate dall'utente.

### Conservazione e stabilità

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

### Preparazione del campione biologico

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

### Avvertenze e precauzioni

Uno o più componenti del prodotto sono pericolosi.

Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L (RE7113), Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7114). R36/38 S26 36/37/39 63/64.

Una scheda di sicurezza del prodotto (MSDS) è disponibile su richiesta o dal sito [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119). Una scheda di sicurezza del prodotto (MSDS) è disponibile su richiesta o dal sito [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

### Per uso professionale.

Prima e dopo la fissazione, i campioni biologici e tutti i materiali ad essi esposti vanno trattati come potenzialmente infettanti e smaltiti con le appropriate precauzioni.<sup>3</sup>

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

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

Vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario.

### B. Attrezzature necessarie ma non fornite

8. Pentola a pressione in acciaio inossidabile (si raccomanda di sostituire periodicamente le guarnizioni, allo scopo di mantenere condizioni ottimali di smascheramento). Per garantire un uso corretto e sicuro della pentola a pressione, l'utente deve leggere le istruzioni fornite dal fabbricante.
9. 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 e le condizioni ottimali per lo smascheramento degli epitopi, assieme al sistema di determinazione vanno convalidate dall'utente su una serie di controlli positivi e negativi noti.

1. Usando Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 o RE7119 preparare la soluzione di lavoro diluendo 1 parte di concentrato con 9 parti di acqua deionizzata.
2. In una pentola a pressione, riscaldare fino all'ebollizione 1,5 L della soluzione di lavoro. Coprire senza chiudere ermeticamente il coperchio. Posizionare le sezioni in rastrelli di colorazione metallici (non mettere i vetrini troppo vicini l'uno all'altro, perché ciò potrebbe provocare una colorazione irregolare) e calarle nella pentola a pressione, assicurandosi che i vetrini siano completamente immersi nella soluzione di smascheramento. Chiudere ermeticamente il coperchio.
3. Quando la pentola a pressione raggiunge la temperatura e la pressione di lavoro, calcolare ancora un minuto di riscaldamento (il tempo ottimale va convalidato dall'utente, poiché dipende dal tessuto, dalla fissazione e/o dall'anticorpo primario).
4. Allontanare la pentola a pressione dalla fonte di calore e metterla sotto l'acqua fredda con il coperchio ancora chiuso. **NON APRIRE IL COPERCHIO PRIMA CHE GLI INDICATORI SEGNALINO CHE LA PRESSIONE SI È ABBASSATA.** Aprire il coperchio, estrarre i vetrini e metterli immediatamente sotto l'acqua corrente.
5. Procedere con il protocollo IHC, seguendo le Istruzioni per l'uso del fabbricante per l'anticorpo primario e per il sistema di determinazione.

### 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.<sup>4</sup> Per il tessuto raccomandato come controllo positivo, vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario. Se il controllo positivo del tessuto non dimostra colorazione positiva, i risultati con i campioni biologici del test vanno considerati non validi.

### Controllo negativo del tessuto

Va esaminato dopo il controllo positivo, per verificare la specificità della marcatura dell'antigene bersaglio da parte dell'anticorpo primario. Per il tessuto raccomandato come controllo negativo, vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario. In alternativa, la varietà dei tipi cellulari presenti nella maggior parte delle sezioni tissutali offre spesso siti di controllo negativo, ma questo va verificato dall'utente. La colorazione aspecifica, se presente, assume di solito aspetto diffuso. La colorazione sporadica del tessuto connettivo può anche manifestarsi in seguito ad iperfissazione di sezioni di tessuto in formalina. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, usare cellule intatte. Le cellule necrotiche o degenerate si colorano spesso in maniera aspecifica.<sup>5</sup> Si possono osservare risultati falsamente positivi, dovuti a legame non immunologico delle proteine o a prodotti di reazione del substrato. Tali falsi positivi possono essere anche causati da enzimi endogeni quali la pseudoperossidasi (eritrociti), la perossidasi endogena (citocromo C) o la biotina endogena<sup>6</sup> (es. fegato, mammella, cervello, rene). Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame enzimatico aspecifico dall'immunoreattività specifica, possono essere colorati ulteriori tessuti del paziente esclusivamente e rispettivamente con substrato cromogeno, con Streptavidin-HRP o con polimero marcato e substrato cromogeno. Se nel controllo negativo del tessuto compare una colorazione specifica, i risultati sui campioni biologici ottenuti dal paziente devono essere considerati non validi.

### Controllo negativo del reagente

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

### Tessuto del paziente

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

## Limitazioni

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

La colorazione del tessuto dipende dalle modalità di manipolazione e di processazione del tessuto stesso, adottate prima della colorazione. La fissazione, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento o la sezione condotti in modo non corretto, o la contaminazione con altri tessuti o liquidi, può produrre artefatti, intrappolamento (trapping) anticorpale o risultati falsamente negativi. Risultati incompatibili possono essere dovuti a modifiche dei metodi di fissazione e di inclusione o ad irregolarità intrinseche al tessuto.<sup>7</sup>

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

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

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

## Caratteristiche di rendimento

Il rendimento di Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 e RE7119 è stato convalidato utilizzando una gamma di anticorpi primari Novocastra™ IgG di topo, IgM di topo e IgG di coniglio.

Questi prodotti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

## Riferimenti bibliografici

1. Shi S-R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741-748.
2. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327-343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. 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

Sono state aggiunte nuove informazioni alla sezione Avvertenze e precauzioni.

## Data di pubblicazione

30 gennaio 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Produkt Nr.: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Verwendungszweck

Für *in-vitro*-Diagnostik.

Die Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 und RE7119 sind zur hitzeinduzierten Epitopdemaskierung auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten als Teil eines immunhistochemischen Verfahrens bestimmt. Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

### Verfahrensgrundlage

Die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten mithilfe einer geeigneten pH-Lösung verbessert die Färbung einiger Antikörper durch die Freilegung von Epitopen in Geweben, die während der Fixierung maskiert wurden. Die Entwicklung der Epitopdemaskierung durch Erhitzen begann 1991 mit dem Bericht von Shi et al.<sup>1</sup> Seitdem sind zahlreiche Studien über die Auswirkungen von Epitopdemaskierungslösungen, Molarität, pH-Wert und Erhitzungsmethoden veröffentlicht worden.<sup>2</sup> Es gibt keine universelle Technik zur hitzeinduzierten Epitopdemaskierung, die für alle Epitope geeignet ist. Aus diesem Grund können eine Reihe unterschiedlicher Erhitzungsmethoden und Epitopdemaskierungslösungen, einschließlich der im Folgenden aufgeführten, verwendet werden.

Diese Produkte werden in einem immunhistochemischen (IHC-) Verfahren verwendet, das den qualitativen Nachweis von Antigenen in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebeschnitten in mehreren aufeinander folgenden Schritten mit dazwischen liegenden Waschschritten mittels Lichtmikroskopie gestattet (die Verfahrensgrundlage der IHC-Färbung ist in den Gebrauchsanweisungen des entsprechenden Nachweissystems beschrieben). Die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung wird nicht für alle Antikörper empfohlen (siehe Gebrauchsempfehlungen für den primären Antikörper). Da die optimalen Bedingungen für die Epitopdemaskierung vom Gewebe, von der Fixierung und/oder vom primären Antikörper abhängen, sind sie vom Benutzer zu validieren.

### Gelieferte Reagenzien

Eine der folgenden Reagenzien verwenden:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Puffer auf Citratbasis mit oberflächenaktiver Substanz
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Puffer auf EDTA-Basis mit oberflächenaktiver Substanz
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Puffer auf Tris/EDTA-Basis mit oberflächenaktiver Substanz

### Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration

Die Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 und RE7119 müssen zur Vorbereitung von Arbeitslösungen mit entionisiertem Wasser verdünnt werden (siehe Vorgehensweise). Eine weitere Verdünnung könnte zum Verlust der Antigenfärbung führen. Der Benutzer muss solche Änderungen zuvor validieren.

### Lagerung und Stabilität

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

#### Probenvorbereitung

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

### Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

Eine Komponente oder mehrere Komponenten dieses Produkts sind gefährlich.

Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L (RE7113), Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7114). R36/38 S26 36/37/39 63/64.

Ein Material Sicherheits-Datenblatt ist auf Anfrage von [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com) erhältlich.

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119). Ein Material Sicherheits-Datenblatt ist auf Anfrage von [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com) erhältlich.

### Für geschultes Fachpersonal.

Vor und nach der Fixierung sind die Proben sowie alle Materialien, die mit ihnen in Kontakt gekommen sind, als potentiell infektiös zu behandeln und daher mit entsprechender Vorsicht zu entsorgen.<sup>3</sup>

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

Die 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

Siehe Gebrauchsanweisungen des primären Antikörpers.

## B. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Ausrüstung

1. Druckkochtopf aus rostfreiem Stahl (für optimale Demaskierungsbedingungen wird der regelmäßige Dichtungswechsel empfohlen). Zur Sicherstellung des sicheren und korrekten Betriebs des Druckkochtopfs müssen Benutzer zuerst die Herstelleranweisungen gelesen haben.
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 und optimalen Bedingungen für die Epitopdemaskierung zusammen mit dem Nachweissystem ist vom Benutzer auf einer Reihe bekannter positiver und negativer Kontrollen zu validieren.

1. Bei Verwendung der Novocastro™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 oder RE7119 eine Arbeitslösung durch Verdünnung von 1 Teil Konzentrat mit 9 Teilen entionisiertem Wasser ansetzen. 1,5 Liter der Arbeitslösung in einem Druckkochtopf bis zum Kochen erhitzen. Deckel auflegen aber nicht verriegeln. Die Objektträger in Färberahmen aus Metall einbringen (Objektträger nicht zu dicht aneinander legen, da eine ungleichmäßige Färbung auftreten könnte) und in den Druckkochtopf legen. Dabei muss sichergestellt werden, dass die Objektträger vollständig in die Demaskierungslösung eintauchen. Deckel verriegeln.
2. Nachdem der Druckkochtopf seine Betriebstemperatur und seinen Betriebsdruck erreicht hat, Zeitschalter auf 1 Minute stellen (die optimale Zeitdauer ist vom Benutzer zu validieren, da sie von Gewebe, Fixierung und/oder primärem Antikörper abhängt).
3. Druckkochtopf von der Platte entfernen und bei verriegeltem Deckel unter laufendem Kaltwasser abkühlen. DER DECKEL DARF ERST DANN GEÖFFNET WERDEN, WENN LAUT ANZEIGE DER INNENDRUCK ABGEBAUT WORDEN IST. Den Deckel öffnen, die Objektträger entnehmen und unverzüglich in kaltes Leitungswasser legen.
4. Anschließend mit dem IHC-Protokoll gemäß den Gebrauchsanweisungen des Herstellers für den primären Antikörper und das Nachweissystem fortfahren.

## Qualitätskontrolle

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

## Positive Gewebekontrolle

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an. In jedem Färbelauf sollte für jeden Satz Testbedingungen/primärer Antikörper eine positive Gewebekontrolle durchgeführt werden. Gewebe mit schwach positiver Färbung ist für die optimale Qualitätskontrolle und den Nachweis kleiner Minderungen in der Reagenzleistung besser geeignet, als ein Gewebe mit stark positiver Färbung.<sup>4</sup> Informationen über das positive Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden. Falls das positive Kontrollgewebe keine positive Färbung nachweisen kann, sollten die mit den Testproben erzielten Ergebnisse als ungültig betrachtet werden.

## Negative Gewebekontrolle

Die negative Gewebekontrolle sollte nach der positiven Gewebekontrolle erfolgen, um die Spezifität der Zielantigenmarkierung durch den primären Antikörper zu verifizieren. Informationen über das empfohlene negative Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden. Alternativ bietet die Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen, die in den meisten Gewebeschnitten vorliegen, häufig Stellen für eine negative Kontrolle. Jedoch sollte dies vom Benutzer verifiziert werden. Liegt eine unspezifische Färbung vor, hat diese gewöhnlich ein diffuses Erscheinungsbild. Eine sporadische Färbung des Bindegewebes kann ebenfalls in Schnitten von übermäßig formalinfixierten Geweben beobachtet werden. Zur Bewertung der Färbegergebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.<sup>5</sup> Falsch-positive Ergebnisse können aufgrund einer nichtimmunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten beobachtet werden. Solche Ergebnisse können auch durch endogene Enzyme wie Pseudoperoxidase (Erythrozyten), endogene Peroxidase (Zytochrom C) oder endogenes Biotin<sup>6</sup> (beispielsweise Leber, Mamma, Gehirn, Niere) hervorgerufen werden. Um eine endogene Enzymaktivität bzw. eine unspezifische Enzymbindung von einer spezifischen Immunreaktivität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substratchromogen, Streptavidin-HRP bzw. markiertem Polymer plus Substratchromogen gefärbt werden. Falls im negativen Kontrollgewebe eine spezifische Färbung auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

## Negative Reagenzkontrolle

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

## Patientengewebe

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

## Beschränkungen

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

Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor dem Färben ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder eine Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper–Trapping oder falsch–negativen Ergebnissen führen. Abweichende Ergebnisse können aufgrund von Unterschieden bei der Fixierung und Einbettung oder intrinsischen Unregelmäßigkeiten im Gewebe selbst entstehen.<sup>7</sup>

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

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

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

## Leistungsmerkmale

Die Leistung der Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 und RE7119 wurden mithilfe einer Reihe von primären Novocastra™ Maus–IgG–, Maus–IgM– und Kaninchen–IgG–Antikörpern validiert.

Diese Produkte bleiben bis zum auf dem Behälteretikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

## Literatur

1. Shi S–R, Key RE and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin–fixed, paraffin–embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S–R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc. Philadelphia.
5. P5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. 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

Neue Informationen wurden im Abschnitt Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen hinzugefügt.

## Ausgabedatum

30 Januar 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Referencia: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Indicaciones de uso

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Los productos Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 y RE7119 están indicados para la recuperación de epítomos inducida mediante calentamiento, a temperatura elevada, sobre secciones de tejido fijadas con formol e incluidas en parafina, como parte de un procedimiento inmunohistoquímico. La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia se debe complementar con estudios morfológicos utilizando los controles adecuados, y un patólogo cualificado debe evaluarla en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

### Principio del procedimiento

La recuperación de epítomos inducida mediante calentamiento, de secciones de tejido fijados en formol e incluidos en parafina, usando una solución de pH apropiado, mejora la tinción de algunos anticuerpos, al exponer los epítomos presentes en el tejido que se han enmascarado durante la fijación. El desarrollo de la recuperación de epítomos mediante el calentamiento comenzó en 1991, con el informe de Shi et al.<sup>1</sup> Desde entonces, se han publicado numerosos estudios donde se examinan los efectos de las soluciones de recuperación del epítomo, de la molaridad, el pH y los métodos de calentamiento.<sup>2</sup> No existe ninguna técnica universal de recuperación de epítomos adecuada para todos los epítomos y por eso se pueden usar muchos métodos distintos de calentamiento y distintas soluciones de recuperación de los epítomos, incluidos los enumerados más abajo.

Estos productos se usan en el procedimiento inmunohistoquímico, lo que permite la identificación cualitativa, mediante microscopía óptica, de antígenos en secciones fijadas con formol e incluidas en parafina, mediante pasos secuenciales y con pasos intermedios de lavado (vea el Principio del procedimiento de la tinción inmunohistoquímica en las Instrucciones de uso del sistema de detección adecuado). La recuperación de los epítomos mediante el calentamiento no se recomienda con todos los anticuerpos (véanse las Recomendaciones de uso del anticuerpo primario). Las condiciones óptimas para la recuperación de los epítomos deben ser validadas el usuario, ya que dependen del tejido, fijación y/o del anticuerpo primario.

### Reactivos suministrados

#### Uno de las siguientes:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Tampón basado en citrato, que contiene agente tensioactivo
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	Tampón basado en EDTA, que contiene agente tensioactivo
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Tampón basado en Tris/EDTA, que contiene agente tensioactivo

### Reconstitución, mezcla, dilución y titulación

Los productos Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 y RE7119 necesitan disolverse en agua designada para preparar soluciones de trabajo (consulte la sección Metodología). Una mayor dilución puede provocar la pérdida de la tinción del antígeno. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo.

### Almacenamiento y estabilidad

Almacénelo a una temperatura de 2–8 °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, deben realizarse simultáneamente controles positivos y negativos con muestras de pacientes.

### Preparación de las muestras

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

### Advertencias y precauciones

Al menos uno de los componentes del producto es peligroso.

Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L (RE7113), Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7114). R36/38 S26 36/37/39 63/64.

Está disponible una Hoja de información sobre la seguridad del material, previa petición, o en [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119). Está disponible una Hoja de información sobre la seguridad del material, previa petición, o en [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

### Para usuarios profesionales.

Las muestras, antes y después de ser fijadas, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como capaces de transmitir una infección, y se deben desechar tomando las precauciones adecuadas.<sup>3</sup>

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

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

Vea las Instrucciones de uso del anticuerpo primario.

### B. Equipo necesario que no se suministra

1. Olla de presión de acero inoxidable (se recomienda cambiar las juntas periódicamente para mantener las condiciones óptimas de desmenzamiento). Para garantizar un uso correcto y seguro de la olla de presión los usuarios deben leer las instrucciones del fabricante.
2. Equipo de laboratorio utilizado generalmente para inmunohistoquímica.

### C. Metodología

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

La combinación del anticuerpo primario, su dilución y las condiciones óptimas para la recuperación de los epítomos, junto con el sistema de detección, deberá ser validada por el usuario sobre una serie de controles positivos y negativos conocidos.

1. En caso de usar los productos Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 o RE7119 o, prepare una solución de trabajo, mediante la dilución de una parte de concentrado en nueve partes de agua desionizada.
2. Caliente 1,5 l de solución de trabajo hasta que alcance la ebullición en la olla de presión. Cubra, pero sin cerrar la tapa con seguro. Coloque los portaobjetos en gradillas metálicas de tinción (no coloque los portaobjetos juntos, ya que puede producirse una tinción desigual) y bájelas en la olla de presión, asegurando que los portaobjetos están completamente sumergidos en la solución de recuperación. Cierre la tapa con seguro.
3. Cuando la olla de presión alcance la temperatura y presión operativas, ajuste el tiempo a un minuto (el tiempo óptimo lo debe validar el usuario ya que depende del tejido, la fijación y/o del anticuerpo primario).
4. Retire la olla de presión del fuego o fuente de calor y derrame agua fría sobre ella, manteniéndola tapada. **NO ABRA LA TAPA HASTA QUE SE HAYAN LIBERADO LOS INDICADORES DE PRESIÓN.** Abra la tapa, retire los portaobjetos y colóquelos inmediatamente en agua del grifo fría.
5. Proceda con el protocolo de inmunohistoquímica conforme a las Instrucciones de uso del fabricante para el anticuerpo primario y del sistema de detección.

### Control de calidad

Las diferencias en el procesamiento de los tejidos y en los procedimientos técnicos del laboratorio del usuario pueden producir una variabilidad significativa en los resultados; por ello, es necesario que éste lleve a cabo regularmente 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 realizadas. Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado que un tejido con una tinción positiva intensa para un control de calidad óptimo y para detectar niveles bajos de degradación del reactivo.<sup>4</sup> En cuanto al control de tejido positivo recomendado, vea las Instrucciones de uso del anticuerpo primario. Si el tejido de control positivo no muestra tinción positiva, los resultados de las muestras analizadas deben considerarse no válidos.

### Control tisular negativo

Debe examinarse después del control de tejido positivo, a fin de verificar la especificidad del marcado del antígeno diana por el anticuerpo primario. En cuanto al tejido de control negativo recomendado, vea las Instrucciones de uso del anticuerpo primario. Como alternativa, la variedad de diferentes tipos de células presentes en la mayoría de las secciones de tejido ofrece con frecuencia lugares de control negativo, pero esto debe ser verificado por el usuario. Si aparece tinción no específica, tiene generalmente aspecto difuso. En secciones de tejido fijado excesivamente en formol puede observarse también tinción esporádica del tejido conectivo. Utilice células intactas para la interpretación de los resultados de la tinción. A menudo, las células necróticas o degeneradas quedan teñidas de forma no específica.<sup>5</sup> También pueden observarse falsos positivos causados por la unión no inmunológica de proteínas o de productos de reacción del sustrato. Estos falsos positivos pueden estar causados también por enzimas endógenas tales como la pseudoperoxidasa (eritrocitos), la peroxidasa endógena (citocromo C), o la biotina endógena<sup>6</sup> (por ejemplo, de hígado, mama, cerebro o riñón). Para diferenciar la actividad de las enzimas endógenas o la unión inespecífica de las enzimas de la inmunorreactividad específica, pueden teñirse otros tejidos del paciente exclusivamente con cromógeno-sustrato, Streptavidin-HRP o polímeros marcados, y con cromógeno-sustrato, respectivamente. Si se produce tinción específica del control tisular negativo, los resultados de las muestras de los pacientes deben considerarse no válidos.

### Control de reactivo negativo

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

### Tejido del paciente

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



## Limitaciones

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

La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento del tejido previos a la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o seccionamiento incorrectos, o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede generar artefactos, atrapamiento del anticuerpo o falsos negativos. La aparición de resultados incoherentes puede deberse a variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, o a irregularidades inherentes al tejido.<sup>7</sup>

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

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

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

## Características del rendimiento

La eficacia de los productos Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 y RE7119 se ha validado con la ayuda de una gama de anticuerpos primarios IgG e IgM murinas, e IgG de conejo, de marca Novocastra™.

Estos productos son estables hasta las fechas de caducidad impresas en las etiquetas del producto.

## Bibliografía

1. Shi S-R, Key RE and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741-748.
2. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327-343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc. Philadelphia.
5. P5. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## Correcciones a la publicación anterior

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

## Fecha de publicación

30 de enero de 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## N.ºs dos produtos: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos *in vitro*.

As soluções Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 e RE7119 foram concebidas para efectuar a recuperação de epitopos induzida pelo calor em secções de tecido fixadas em formol e envolvidas em parafina, como parte de um procedimento imunohistoquímico. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos que empreguem os devidos controlos, e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto dos antecedentes clínicos do doente e de outros testes de diagnóstico.

### Princípio do procedimento

A recuperação de epitopos induzida pelo calor em secções de tecido fixadas em formol e envolvidas em parafina, empregando uma solução com o pH apropriado, melhora o nível de coloração de alguns anticorpos, através da exposição de epitopos contidos no tecido que tinham permanecido dissimulados durante a fixação. O desenvolvimento da recuperação de epitopos por meio de calor teve início em 1991, com o relatório feito por Shi e outros<sup>1</sup>. Desde essa altura que se têm publicado muitos estudos que consideraram os efeitos das soluções de recuperação de epitopos, a molaridade, o pH, e os métodos de aquecimento<sup>2</sup>. Não existe uma técnica universal de recuperação de epitopos induzida pelo calor que seja apropriada para todos os epitopos, portanto podem empregar-se inúmeros métodos diferentes de aquecimento e de soluções de recuperação de epitopos, incluindo os que se apresentam a seguir.

Estes produtos são empregados num procedimento imunohistoquímico (IHQ), o qual permite a identificação qualitativa de antígenos, por microscopia óptica, em secções de tecido fixadas com formol e envolvidas 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). A recuperação de epitopos induzida pelo calor não é recomendada para todos os anticorpos (consultar as Recomendações sobre a utilização do anticorpo primário). As condições ideais para a recuperação de epitopos devem ser validadas pelo utilizador, pois que tais condições variam com os tecidos, fixação e/ou anticorpo primário.

### Reagentes fornecidos

#### Um dos seguintes reagentes:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1l RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Tampão à base de citrato contendo um tenso-activo
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1l	Tampão à base de EDTA contendo um tenso-activo
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1l	Tampão à base de Tris/EDTA contendo um tenso-activo

### Reconstituição, mistura, diluição, titulação

As Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 e RE7119 têm de ser diluídas com água desionizada para se prepararem soluções de trabalho (consultar a secção de Metodologia). Qualquer diluição adicional poderá resultar na perda de coloração do antígeno. O utilizador deve validar quaisquer alterações dessa natureza.

### Armazenamento e estabilidade

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

### Preparação das amostras

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

Avisos e precauções

Um ou mais dos componentes do produto é/são perigoso/s.

Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L (RE7113), Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7114).

R36/38 S26 36/37/39 63/64.

Encontra-se disponível uma Ficha de Dados de Segurança do Material, mediante pedido ou através do site [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119). Encontra-se disponível uma Ficha de Dados de Segurança do Material, mediante pedido ou através do site [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com).

### Apenas para utilizadores profissionais.

As amostras, antes e depois da sua fixação, bem como todos os materiais expostos às mesmas, devem ser processados tal como se tivessem a capacidade de transmitir infecções e devem ser descartados com as devidas precauções<sup>3</sup>.

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

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

## Procedimento

### A. Reagentes necessários mas não fornecidos

Consultar as Instruções de utilização relativas ao anticorpo primário.

### B. Equipamento necessário não fornecido

1. Painela de pressão de aço inoxidável (recomendamos que se faça a mudança dos vedantes a intervalos regulares, a fim de se manterem níveis ótimos de recuperação). Para se assegurar a utilização correcta e segura da painela de pressão, o utilizador deve ler as instruções do fabricante.
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, e de condições óptimas para a recuperação de epitopos, juntamente com o sistema de detecção, deve ser validada pelo utilizador numa série de controlos positivos e negativos conhecidos.

1. Caso se utilizem as soluções Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 ou RE7119, preparar uma solução de trabalho, diluindo para tal 1 parte do produto concentrado para 9 partes de água desionizada.
2. Aquecer 1,5l da solução de trabalho numa painela de pressão, até levantar fervura. Cobrir com a tampa mas não engatar. Posicionar as lâminas nos suportes de coloração de metal (não colocar as lâminas próximas umas das outras, para evitar uma coloração desigual) e mergulhar na painela de pressão, certificando-se de que as lâminas ficam completamente submersas na solução de recuperação. Engatar a tampa.
3. Quando a painela de pressão alcançar a temperatura e pressão operacionais, deixar passar 1 minuto (o período de tempo ideal deve ser validado pelo utilizador, pois a extensão do período depende do tecido, fixação e/ou anticorpo primário).
4. Retirar a painela de pressão da fonte de calor, e colocar sob a corrente de água fria de uma torneira, com a tampa em posição. **NÃO ABRIR A TAMPA ATÉ QUE OS INDICADORES MOSTREM QUE A PRESSÃO ESCAPOU.** Abrir a tampa, retirar as lâminas e colocá-las imediatamente em água fria de torneira.
5. Continuar a efectuar o protocolo IHQ em conformidade com as Instruções de utilização emitidas pelo fabricante para o anticorpo primário e para o sistema de detecção.

### Controlo da qualidade

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

### Controlo de tecido positivo

Usado para assinalar os tecidos correctamente preparados e as técnicas de coloração indicadas. Por cada conjunto de condições de testes, em cada processo de coloração, deve incluir-se um controlo de tecido positivo. Os tecidos com uma coloração positiva fraca são mais indicados do que os têm uma coloração positiva forte para proporcionar um controlo de qualidade óptimo, bem como para detectar níveis reduzidos de degradação dos reagentes<sup>4</sup>. Consultar as Instruções de utilização do anticorpo primário para obter informações sobre o tecido de controlo positivo recomendado. Se o controlo de tecido positivo não demonstrar uma coloração positiva, os resultados obtidos com as amostras de testes devem ser considerados inválidos.

### Controlo de tecido negativo

Este deve ser examinado depois do controlo de tecido positivo, para verificar a especificidade da marcação do antígeno objectivado pelo anticorpo primário. Consultar as Instruções de utilização do anticorpo primário para obter informações sobre o tecido de controlo negativo recomendado. Alternativamente, a variedade de diferentes tipos de células presentes na maioria das secções de tecidos oferece muitas vezes locais de controlo negativo, mas isto deve ser verificado pelo utilizador. A coloração não específica, caso ocorra, tem geralmente um aspecto difuso. A coloração esporádica do tecido conjuntivo pode também ter lugar em secções de tecido excessivamente fixado em formol. Devem utilizar-se células intactas para a interpretação dos resultados da coloração. As células necróticas ou degeneradas causam muitas vezes uma coloração não específica<sup>5</sup>. Podem verificar-se resultados falso-positivos devido à ligação não imunológica de proteínas ou de produtos da reacção do substrato. Esses resultados podem também ser causados por enzimas endógenas tais como a pseudoperoxidase (eritrócitos), a peroxidase endógena (citocromo C), ou a biotina endógena<sup>6</sup> (ex. no fígado, mama, cérebro ou rim). Para diferenciar entre a actividade das enzimas endógenas ou as ligações não específicas de enzimas e as imunoreactividades específicas, podem colorir-se tecidos adicionais dos doentes exclusivamente com substrato cromogénio, Streptavidin-HRP ou com polímero etiquetado e substrato-cromogénio, respectivamente. Se ocorrer a coloração específica no controlo de tecido negativo, os resultados dos testes feitos com as amostras do doente devem ser considerados inválidos.

### Controlo de reagente negativo

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

### Tecido do doente

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

## Limites

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

A coloração de tecidos depende do seu manuseamento e processamento antes da sua coloração. A fixação, congelação, descongelação, lavagem, secagem, aquecimento ou corte incorrectos das amostras, ou a sua contaminação com outros tecidos ou fluidos, pode produzir artefactos, retenção de anticorpos, ou resultados falso-negativos. Os resultados inconsistentes podem dever-se a variações nos métodos de fixação e envolvimento, ou a irregularidades inerentes ao tecido<sup>7</sup>.

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

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

Os produtos Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions servem para ser utilizados em secções envolvidas em parafina com requisitos especiais de fixação. Pode ocorrer uma expressão inesperada de antígeno, especialmente em neoplasmas. A interpretação clínica de qualquer secção de tecido colorido deverá incluir a análise morfológica e a avaliação de controlos apropriados.

Características de desempenho

O desempenho das Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 e RE7119 foi validado através da utilização de uma série de anticorpos primários Novocastra™ de IgG de ratinho, de IgM de ratinho e de IgG de coelho.

Estes produtos permanecem estáveis até ao(s) prazo(s) de validade indicado(s) no(s) rótulo(s) do produto.

## Bibliografia

1. Shi S-R, Key RE and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741-748.
2. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327-343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. 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

Adicionámos mais informações à secção de Advertências e Precauções.

## Data de emissão

30 de Janeiro de 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Produktnummer: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Avsedd användning

För *in vitro* diagnostisk användning.

Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 och RE7119 är avsedda för värmeframkallad epitopåtervinning på formalinfixerade, paraffinbäddade vävnadssnitt som en del av en immunhistokemisk procedur. Den kliniska tolkningen av all färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar som använder korrekta kontroller och utvärderas av kvalificerad patolog inom ramen för patientens kliniska anamnes och andra diagnostiska tester.

### Metodens princip

Värmeframkallad epitopåtervinning av formalinfixerade paraffinbäddade vävnadssnitt med hjälp av en lämplig pH lösning förbättrar färgningen av vissa antikroppar genom att exponera epitoperna inom vävnaden som har maskerats vid fixering. Utvecklingen av epitopåtervinning med hjälp av värme började 1991 med en rapport av Shi et al.<sup>1</sup> Sedan dess har ett stort antal studier publicerats som tittar på effekterna av epitopåtervinningslösningar, molaritet, pH och uppvärmningsmetoder.<sup>2</sup> En universell värmeframkallad epitopåtervinningssteknik som passar alla epitoper existerar inte, därför kan ett antal olika uppvärmningsmetoder och epitopåtervinningslösningar, inklusive de som uppräknas nedan, användas.

Dessa produkter används i immunhistokemiska (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). Värmeframkallad epitopåtervinning rekommenderas inte för alla antikroppar (se primär antikropp Rekommendationer vid användning). Optimala förhållanden för epitopåtervinning bör kontrolleras av användaren eftersom dessa beror på vävnad, fixering och/eller primär antikropp.

### Tillhandahållna reagens

#### Ett av följande:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Citratbaserad buffert innehållande ytaktivt medel
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1L	EDTA baserad buffert innehållande ytaktivt medel
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L	Tris/EDTA baserad buffert innehållande ytaktivt medel

### Rekonstitution, blandning, spädning, titrering

Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 and RE7119 kräver spädning med avjoniserat vatten för att förbereda brukslösningar (se Metod). Fortsatt spädning kan resultera i förlust av antigenfärgning. Användaren måste kontrollera sådana förändringar.

### Förvaring och stabilitet

Förvara vid 2–8 °C. Frys inte. Återgå till 2–8 °C direkt efter användning. Använd inte efter det utgångsdatum som anges på produktens etikett. Förvaringsförhållanden som skiljer sig från de 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

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

Varningar och försiktighetsåtgärder

En eller flera komponenter i produkten är farliga.

Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L (RE7113), Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7114).

R36/38 S26 36/37/39 63/64.

Materialsäkerhetsdatablad finns att få på begäran eller från [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119), Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7121).

Materialsäkerhetsdatablad finns att få på begäran eller från [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

### För professionella användare.

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

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

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

Se primär antikropp Instruktioner vid användning.

### B. Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

1. Tryckkokare av rostfritt stål (det rekommenderas att packningen byts ut regelbundet för att upprätthålla optimala avmaskningsförhållanden). För att försäkra sig om säker och korrekt användning av tryckkokare bör användare läsa tillverkarens instruktioner.
2. Allmän immunhistokemisk laboratorieutrustning.

### C. Metod

Innan metoden tillämpas måste användarna vara utbildade i immunhistokemiska tekniker.

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

1. Vid användning av Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 or RE7119 förbered en brukslösning genom att späda 1 del koncentrat med 9 delar avjoniserat vatten.
2. Värm 1,5L brukslösning till kokpunkt i en tryckkokare. Täck med lås in locket. Placera objektglaset på metalhyllorna (placera in te objektglaset nära varandra eftersom ojämna färgning kan förekomma), sänk ned i tryckkokaren och se till att objektglaset är helt nedsänkta i återvinningslösning. Lås locket.
3. När tryckkokaren uppnår operativ temperatur och tryck, ta tid under en minut (optimal tid bör kontrolleras av användaren eftersom den kan bero på vävnad, fixering och/eller primär antikropp).
4. Ta bort tryckkokare från värmekälla och ställ under kallt vatten med locket på. ÖPPNA INTE LOCKET FÖRRÄN ALLA VISARE INDIKERAR ATT TRYCKET HAR SLÄPPTS. Öppna locket, ta ut objektglaset och placera omedelbart i svalt kränvatten.
5. Fortsätt med IHC protokoll enligt tillverkarens Instruktioner för användning av primär antikropp och detektionssystem.

### Kvalitetskontroll

Skilnader i vävnadsbehandling och tekniska metoder i användarens laboratorium kan ge stor variation i resultaten vilket kan göra det nödvändigt att genomföra regelbundna interna kontroller utöver följande metoder. Kontroller bör vara färskas obduktions-/biopsi-/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.<sup>4</sup> För rekommenderad positiv kontrollvävnad se primär antikropp Instruktioner vid användning. Om den positiva vävnadskontrollen misslyckas med att uppvisa positiv färgning bör resultat med testproverna anses vara ogiltiga.

### Negativ vävnadskontroll

Bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen för att fastställa specificiteten för märkningen av målantigenet med den primära antikroppen. För rekommenderad negativ kontrollvävnad se primär antikropp Instruktioner vid användning. Alternativt ger ofta en mängd olika celltyper som finns i de flesta vävnadssnitt negativa kontrollområden men detta bör kontrolleras av användaren. Ospecifik färgning, om det förekommer, har ofta ett diffust utseende. Sporadisk färgning av bindväv kan också observeras i snitt från överflödigt formalinfixerade vävnader. Använd intakta celler för tolkning av färgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler färgar ofta ospecifikt.<sup>5</sup> Falskt positiva resultat kan ses p.g.a. icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erythrocyter), endogent peroxididas (cytokrom C), eller endogent biotin<sup>6</sup> (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure). För att skilja endogen enzymaktivitet eller ospecifik enzymbindning från specifik immunreaktivitet kan ytterligare patientvävnader färgas exklusivt med respektive substratkromogen eller Streptavidin-HRP eller märkt polymer och substratkromogen. Om specifik färgning sker i den negativa vävnadskontrollen bör resultat med patientprover anses vara ogiltiga.

### Negativ reagenskontroll

Använd en 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.

### Begränsningar

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

Vävnadsfärgning är beroende av hantering och bearbetning av vävnaden före färgningen. Felaktig fixering, nedfrysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering med andra vävnader eller vätskor kan framställa artefakter, infångande av antikroppar eller falskt negativa resultat. Motsägelsefulla resultat kan bero på variationer av fixerings- och inbäddningsmetoder eller på naturliga oregelbundenheter inom vävnaden.<sup>7</sup>

Överflödiga 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™ Epitope Retrieval Solutions är avsedda för användning på paraffinbäddade sektioner med specifika fixeringskrav. Övåntat antigenuttryck kan ske, speciellt i neoplasmer. Morfologisk analys och utvärdering av lämpliga kontroller måste ingå i den kliniska tolkningen av alla färgade vävnadssnitt.

### **Prestanda**

Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 och RE7119 prestanda har kontrollerats med en rad Novocastra™ mus IgG, mus IgM och kanin IgG primära antikroppar.

Dessa produkter håller sig stabila fram till utgångsdatumet som är tryckt på produktens etikett.

### **Bibliografi**

1. Shi S–R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed,paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S–R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. 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**

Ny information har lagts till avsnittet Varningar och försiktighetsåtgärder.

### **Utgivningsdatum**

30 januari 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Κωδικοί είδους: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Χρήση για την οποία προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Τα Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 και RE7119 προορίζονται για θερμικά επαγόμενη ανάκτηση επιτόπου από τομές ιστού μονιμοποιημένες με φορμόλη και εγκλεισμένες σε παραφίνη, ως μέρος μιας ανοσοϊστοχημικής διαδικασίας. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν σωστούς μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογοανατόμο.

### Αρχή της διαδικασίας

Η θερμικά επαγόμενη ανάκτηση επιτόπου από τομές ιστού μονιμοποιημένες με φορμόλη και εγκλεισμένες σε παραφίνη με χρήση διαλύματος κατάλληλου pH βελτιώνει τη χρώση μερικών αντισωμάτων με έκθεση επιτόπων εντός του ιστού, οι οποίοι έχουν συγκαλυφθεί κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης. Η ανάπτυξη της ανάκτησης επιτόπου με χρήση θερμότητας άρχισε το 1991 με την αναφορά από τους Shi et al.<sup>1</sup> Έκτοτε, έχουν δημοσιευτεί πολυάριθμες μελέτες που εξετάζουν τις επιδράσεις των διαλυμάτων ανάκτησης επιτόπου, της μοριακότητας, του pH και των μεθόδων θέρμανσης.<sup>2</sup> Δεν υπάρχει μια γενική τεχνικά θερμικά επαγόμενη ανάκτησης επιτόπου κατάλληλη για όλους τους επιτόπους και συνεπώς, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν αρκετές διαφορετικές μέθοδοι θέρμανσης και διαλύματα ανάκτησης επιτόπου, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που παρατίθενται παρακάτω.

Τα προϊόντα αυτά χρησιμοποιούνται σε μια ανοσοϊστοχημική (IHC) διαδικασία, η οποία επιτρέπει την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός των αντιγόνων σε τομές ιστού μονιμοποιημένου με φορμόλη και εγκλεισμένου σε παραφίνη, μέσω διαδοχικών βημάτων με παρεμβαλλόμενα βήματα πλύσης (για την Αρχή της διαδικασίας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, δείτε τις οδηγίες χρήσης του κατάλληλου συστήματος ανίχνευσης). Δε συνιστάται θερμικά επαγόμενη ανάκτηση επιτόπου για όλα τα αντισώματα (δείτε την ενότητα Συστάσεις για τη χρήση του πρωτοταγούς αντισώματος). Οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάκτηση επιτόπου πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη, καθώς αυτές εξαρτώνται από τον ιστό, τη μονιμοποίηση ή/και το πρωτοταγές αντίσωμα.

### Παρεχόμενα αντιδραστήρια

#### Ένα από τα ακόλουθα:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση κιτρικά που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση το EDTA που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση το Tris/EDTA που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα

### Ανασύσταση, ανάμειξη, αραιώση, τιτλοδότηση

Τα Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 και RE7119 απαιτούν αραιώση με απονισμένο νερό για την παρασκευή διαλυμάτων εργασίας (δείτε την ενότητα Μεθοδολογία). Περαιτέρω αραιώση ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα απώλεια χρώσης του αντιγόνου. Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει τυχόν τέτοια αλλαγή.

### Φύλαξη και σταθερότητα

Φυλάσσετε στους 2–8 °C. Μην καταψύχετε. Επαναφέρετε στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Μη χρησιμοποιείτε μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην 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, εμπομένως 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

Ένα ή περισσότερα συστατικά στο προϊόν είναι επικίνδυνα.

Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L (RE7113), Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7114). R36/38 S26 36/37/39 63/64.

Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού διατίθεται κατόπιν αιτήματος ή από τη διεύθυνση [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119). Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού διατίθεται κατόπιν αιτήματος ή από τη διεύθυνση [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com).

### Για επαγγελματίες χρήστες.

Τα δείγματα, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, καθώς και όλα τα υλικά που εκτίθενται σε αυτά, πρέπει να υποβάλλονται σε χειρισμό ως δυνητικά μετάδοσης λοίμωξης και να απορρίπτονται με κατάλληλες προφυλάξεις.<sup>3</sup>



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

Ελαχιστοποιήστε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διότι ενδέχεται να συμβεί αύξηση της μη ειδικής χρώσης. Χρόνοι ή θερμοκρασίες επώασης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται ενδέχεται να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τυχόν τέτοια μεταβολή πρέπει να επικυρώνεται από το χρήστη.

## Διαδικασία

### A. Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Δείτε τις οδηγίες χρήσης του πρωτοταγούς αντισώματος.

### B. Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

- Ατμοκλιβανός πίεσης από ανοξείδωτο χάλυβα (συνιστάται η αλλαγή των παρεμβυσμάτων σε τακτικά διαστήματα για τη διατήρηση των βέλτιστων συνθηκών αποκάλυψης). Για να διασφαλιστεί η ασφάλης και η σωστή χρήση του ατμοκλιβανού πίεσης, οι χρήστες πρέπει να διαβάσουν τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός ανοσοϊστοχημείας.

### Γ. Μεθοδολογία

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

Ο συνδυασμός του πρωτοταγούς αντισώματος, της αραίωσής του και των βέλτιστων συνθηκών για ανάκτηση επιτόπου, σε συνδυασμό με το σύστημα ανίχνευσης πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη σε σειρά γνωστών θετικών και αρνητικών μαρτύρων.

- Εάν χρησιμοποιείτε τα Novocastra™ Eptore Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 ή RE7119, παρασκευάστε ένα διάλυμα εργασίας με αραίωση 1 μέρους συμπυκνώματος με 9 μέρη αποιονισμένου νερού.
- Θερμάνετε μέχρι βρασμού 1,5 L του διαλύματος εργασίας σε ατμοκλιβανό πίεσης. Καλύψτε τη συσκευή, αλλά μην ασφαλίσετε το καπάκι. Τοποθετήστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε μεταλλικές βάσεις χρώσης (μην τοποθετείτε τις αντικειμενοφόρους πλάκες κοντά μεταξύ τους διότι ενδέχεται να συμβεί ανομοιομορφη χρώση) και χαμηλώστε μέσα στον ατμοκλιβανό πίεσης, διασφαλίζοντας ότι οι αντικειμενοφόροι πλάκες είναι εντελώς εμβαπτισμένες σε διάλυμα ανάκτησης. Ασφαλίστε το καπάκι.
- Όταν ο ατμοκλιβανός πίεσης φθάσει σε θερμοκρασία και πίεση λειτουργίας, χρονομετρήστε επί 1 λεπτό (ο βέλτιστος χρόνος πρέπει να επικυρώνεται από το χρήστη, επειδή αυτός εξαρτάται από τον ιστό, τη μονιμοποίηση ή/και το πρωτοταγές αντίσωμα).
- Αφαιρέστε τον ατμοκλιβανό πίεσης από την πηγή θερμότητας και αφήστε να τρέξει πάνω του κρύο νερό χωρίς να αφαιρέσετε το καπάκι. ΜΗΝ ΑΝΟΙΓΕΤΕ ΤΟ ΚΑΠΑΚΙ ΠΡΟΤΟΥ ΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΔΕΙΞΟΥΝ ΟΤΙ ΕΧΕΙ ΑΠΛΕΥΘΕΡΘΕΙ Η ΠΙΕΣΗ. Ανοίξτε το καπάκι, αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες και τοποθετήστε τις αμέσως σε κρύο νερό βρύσης.
- Προχωρήστε με το πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας (IHC) σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης των κατασκευαστών για το πρωτοταγές αντίσωμα και το σύστημα ανίχνευσης.

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

### Θετικός μάρτυρας ιστού

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

### Αρνητικός μάρτυρας ιστού

Θα πρέπει να εξετάζεται μετά τον θετικό μάρτυρα ιστού για την επαλήθευση της ειδικότητας της επισήμανσης του αντιγόνου-στόχου από το πρωτοταγές αντίσωμα. Για τον συνιστώμενο ιστό αρνητικού μάρτυρα, δείτε τις οδηγίες χρήσης του πρωτοταγούς αντισώματος. Εναλλακτικά, η ποικιλία διαφόρων κυτταρικών τύπων που υπάρχουν στις περισσότερες τομές ιστών παρέχει συχνά θέσεις αρνητικού μάρτυρα, αλλά αυτό πρέπει να επαληθεύεται από το χρήστη. Μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, έχει συνήθως διάχυτη εμφάνιση. Ενδέχεται επίσης να παρατηρηθεί σποραδική χρώση του συνδετικού ιστού σε τομές από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με υπερβολική ποσότητα φορμόλης. Χρησιμοποιείτε άθικτα κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης. Νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα παρουσιάζουν συχνά μη ειδική χρώση.5 Ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ανοσολογικής δέσμωσης των πρωτεϊνών ή των προϊόντων αντίδρασης του υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδοϊπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός). Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμωσης των ενζύμων από ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπέδων ιστού ασθενούς με υπόστρωμα-χρωμογόνο, στρεπταβιδίνη-HRP ή ομοιογενές 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 αντιδραστήριου. Όπως συμβαίνει με οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική εξέταση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα

σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύτηκε, όχι ότι το αντιγόνο δεν υπήρχε στα κύτταρα/στον ιστό που εξετάστηκε. Εάν είναι απαραίτητο, χρησιμοποιήστε μια σειρά αντισωμάτων για την αναγνώριση ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων.

## Περιορισμοί

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

Η χρώση του ιστού εξαρτάται από το χειρισμό και την επεξεργασία του ιστού πριν από τη χρώση. Τυχόν εσφαλμένη μονιμοποίηση, κατάψυξη, απόψυξη, πλύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να παράγει μορφώματα, παγίδευση αντισώματος ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τυχόν ασυνεπή αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται σε παραλλαγές των μεθόδων μονιμοποίησης και εγκλεισμού ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.<sup>7</sup>

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

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

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

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Η απόδοση των Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 και RE7119 έχει επικυρωθεί με χρήση μιας σειράς πρωτοτύπων αντισωμάτων IgG ποντικού, IgM ποντικού και IgG κουνελίου Novocastra™.

Τα προϊόντα αυτά είναι σταθερά έως την(ις) ημερομηνία(ες) λήξης που αναγράφεται(ονται) στις ετικέτες του προϊόντος.

## Βιβλιογραφία

1. Shi S–R, Key RE and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin–fixed,paraffin–embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S–R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. 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

Νέες πληροφορίες έχουν προστεθεί στην ενότητα Προειδοποίηση και προφυλάξεις.

## Ημερομηνία έκδοσης

30 Ιανουαρίου 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Produkt nr.: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Tilsigtet anvendelse

Til *in vitro* diagnostisk anvendelse.

Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 og RE7119 er beregnet til varmeinduceret epitopgenfinding af formalinfikserede, paraffinindstøbte vævssnit som en del af en immunhistokemisk procedure. Klinisk fortolkning af farvning eller mangel derpå skal suppleres med morfologiske undersøgelser under anvendelse af passende kontroller og bør evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests af en kvalificeret patolog.

### Procedureprincip

Varmeinduceret epitopgenfinding af formalinfikserede, paraffinindstøbte vævssnit ved anvendelse af en passende pH-opløsning forbedrer farvningen af nogle antistoffer ved eksponering af epitoper i vævet, der er blevet maskeret under fiksering. Udviklingen af epitopgenfinding ved anvendelse af varme begyndte i 1991 med rapporten af Shi et al.<sup>1</sup> Siden da er der publiceret talrige studier, der har beskæftiget sig med virkningen af epitopgenfindingsopløsninger, molaritet, pH og opvarmningsmetoder.<sup>2</sup> En universel varmeinduceret epitopgenfindingsmetode egnet for alle epitoper findes ikke, så der skal derfor anvendes en række forskellige opvarmningsmetoder og epitopgenfindingsopløsninger inklusive de nedenfor angivne.

Disse produkter anvendes i en immunhistokemisk (IHC) procedure, 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). Varmeinduceret epitopgenfinding anbefales ikke for alle antistoffer (se Anbefalinger vedrørende anvendelse for det primære antistof). De optimale betingelser for epitopgenfinding skal valideres af brugeren, da disse afhænger af væv, fiksering og/eller primært antistof.

### Leverede reagenser

#### Et af følgende:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Citratbaseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	EDTA-baseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Tris/EDTA-baseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel

### Rekonstituering, blanding, fortynding, titrering

Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 og RE7119 kræver fortynding med deioniseret vand for at klargøre opløsningerne (se Metodologi). Yderligere fortynding kan resultere i tab af antigenfarvning. Brugeren skal kontrollere alle sådanne ændringer.

### Opbevaring og holdbarhed

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

### Prøveklargøring

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

### Advarsler og forholdsregler

En eller flere af komponenterne i produktet er skadelige.

Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L (RE7113), Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7114). R36/38 S26 36/37/39 63/64.

Et datablad for materialesikkerhed kan fås efter anmodning eller er tilgængeligt på [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119). Et datablad for materialesikkerhed kan fås efter anmodning eller er tilgængeligt på [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

### Må kun anvendes af uddannet fagpersonale.

Prøver skal før og efter fiksering, lige som alle materialer eksponeret mod prøverne, håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler<sup>3</sup>.

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

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

Se brugsvejledningen for det primære antistof.

### B. Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

1. Trykkoger af rustfrit stål (det anbefales, at pakningerne udskiftes jævnligt for at sikre optimale demaskeringsbetingelser). Læs fabrikantens brugsanvisning for at sikre sikker og korrekt anvendelse af trykkogeren.
2. Almindeligt laboratorieudstyr til immunhistokemi.

### C. Metodologi

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

Kombinationen af primært antistof, dets fortynding og de optimale betingelser for epitopgenfindning skal sammen med detektionssystemet valideres af brugeren på en serie kendte positive og negative kontroller.

1. Ved anvendelse af Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 eller RE7119 fremstilles en brugsopløsning ved fortynding af 1 del koncentrat med 9 dele deioniseret vand.
2. Opvarm 1,5 l af brugsopløsningen til kogepunktet i en trykkoger. Læg låget på uden at låse det. Placer objektglassene i metallafvarningsstativerne (objektglassene må ikke stå for tæt, da der i så fald kan forekomme ujævn farvning), og sænk dem ned i trykkogeren idet det sikres, at objektglassene er fuldstændig nedsænket i genfindingsopløsningen. Lås låget.
3. Når trykkogeren når driftstemperatur og –tryk tages der tid i 1 minut (den optimale tid skal valideres af brugeren, da denne afhænger af væv, fiksering og/eller primært antistof).
4. Trykkogeren tages af varmen og holdes under koldt, rindende vand med låget på. LÅGET MÅ IKKE ÅBNES, FØR INDIKATORERNE VISER, AT TRYKKET ER UDLØST. Åbn låget, tag objektglassene ud, og placer dem straks i koldt vand fra hanen.
5. Fortsæt med IHC–protokollen ifølge producentens vejledning for det primære antistof og detektionssystemet.

### 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 reagensnedbrydning<sup>4</sup>. Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede positive kontrolvæv. Hvis den positive vævskontrol ikke udviser positiv farvning, skal resultater af testprøverne kasseres.

### Negativ vævskontrol

Skal undersøges efter den positive vævskontrol for at sikre, at det primære antistof mærker målantigenet specifikt. Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede negative kontrolvæv. Alternativt frembyder de mange forskellige celletyper, der er til stede i de fleste vævssnit, ofte negative kontrolsteder, men dette skal verificeres af brugeren. Uspecifik farvning har, hvis til stede, ofte et diffus udseende. Sporadisk farvning af bindevæv kan ligeledes observeres i vævssnit af væv, der er fikseret for kraftigt i formalin. Anvend intakte celler til fortolkning af farvningsresultaterne. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte mere uspecifikt.<sup>5</sup> Der kan eventuelt ses falske positive resultater, der skyldes non–immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. Dette kan ligeledes skyldes endogene enzymer, såsom pseudoperoxidase (erythrocytter), endogen peroxidase (cytochrom C) eller endogent biotin<sup>6</sup> (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre). For at differentiere mellem endogen enzymaktivitet eller uspecifik enzymbinding og specifik immunoreaktivitet kan yderligere patientvæv eventuelt farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen, Streptavidin–HRP eller mærket polymer og substratkromogen. Hvis der optræder specifik farvning i den negative vævskontrol, skal resultaterne af patientprøverne kasseres.

### Negativ reagenskontrol

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

### Patientvæv

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

### Begrænsninger

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

Vævsfarvning er afhængig af håndteringen og behandlingen af vævet inden farvning. Forkert fiksering, frysning, optøning, vask, tørring, opvarmning, sektionering eller kontaminering med andet væv eller andre væsker kan frembringe artefakter, indfangning af antistof eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variationer i fikserings– og indstøbningsmetoder eller irregulåriteter indeholdt i vævet.<sup>7</sup>

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

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

Ydelsen af Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 og RE7119 er blevet valideret ved anvendelse af en række primære Novocastra™ muse-IgG-, muse-IgM- og kanin-IgG-antistoffer.

Produkterne er stabile indtil udløbsdatoen trykt på produkternes etiketter.

### **Bibliografi**

1. Shi S-R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741-748.
2. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327-343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. 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**

Der er tilføjet ny information i afsnittet Advarsler og forholdsregler.

### **Udgivelsesdato**

30 januar 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Productnr's.: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Beoogd gebruik

Voor diagnostisch gebruik *in-vitro*.

De Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 en RE7119 zijn bedoeld voor het in immunohistochemische procedures uitvoeren van een door warmte geïnduceerde epitooptretrieval op in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde weefselcoupes. De klinische interpretatie van elke kleuring of het ontbreken ervan moet worden aangevuld door morfologische onderzoeken met correcte controles en moet binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests worden geëvalueerd door een deskundig patholoog.

### Principe van de procedure

Een door warmtebehandeling geïnduceerde epitooptretrieval bij in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde weefselcoupes verbetert de kleuring van sommige antilichamen doordat hiermee epitopen in het weefsel worden blootgelegd die tijdens de fixatie gemaskeerd waren. Met het ontwikkelen van de door warmte geïnduceerde epitooptretrieval is in 1991 een begin gemaakt met de beschrijving door Shi et al1. Daarna is er een groot aantal onderzoeken gepubliceerd over de effecten van epitooptretrievaloplossingen, molariteit, pH en methodes van verwarming<sup>2</sup>. Er is geen universele door warmte geïnduceerde epitooptretrievaltechniek die geschikt is voor alle epitopen; daarom kunnen verschillende verwarmingsmethodes en epitooptretrievaloplossingen worden gebruikt, waaronder de onderstaand beschreven methodes.

Deze producten worden gebruikt in een immunohistochemische (IHC) procedure waarmee via een lichtmicroscop een kwalitatieve identificatie kan worden uitgevoerd van antigenen in coupes van in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel, via opeenvolgende stappen, met tussendoor spoelen. (Zie voor het Principe van de procedure bij IHC-kleuring de gebruiksaanwijzing van het betreffende detectiesysteem). De door warmtebehandeling geïnduceerde epitooptretrieval wordt niet aanbevolen voor alle antilichamen (zie Aanbevelingen voor gebruik voor primair antilichaam). Omdat de optimale condities voor epitooptretrieval afhankelijk zijn van weefsel, fixatie en/of primair antilichaam moeten deze door de gebruiker worden gevalideerd.

### Geleverde reagentia

Eén van de volgende:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Op citraat gebaseerde buffer met daarin surfactans
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	Op EDTA gebaseerde buffer met daarin surfactans
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Op tris/EDTA gebaseerde buffer met daarin surfactans

### Reconstitutie, mengen, verdunnen, titreren

De Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 en RE7119 moeten worden verdund met gedemineraleerd water om werkoplossingen te maken (zie Methodologie). Verder verdunnen leidt mogelijk tot verlies aan antigeenkleuring. De gebruiker moet eventuele wijzigingen valideren.

### Bewaren en stabiliteit

Bewaren bij 2-8 °C. Niet invriezen. Onmiddellijk na gebruik weer bewaren bij 2-8 °C. Niet gebruiken na de op het etiket van het product vermelde houdbaarheidsdatum. Andere dan de aangegeven bewaarcondities moeten door de gebruiker worden geverifieerd. Er zijn geen duidelijke tekenen waaraan de instabiliteit van dit product is te herkennen; daarom moeten naast de monsters van de patiënt ook steeds positieve en negatieve controles worden getest.

### Specimenbereiding

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

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Het product bevat een of meer schadelijke bestanddelen.

Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L (RE7113), Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7114). R36/38 S26 36/37/39 63/64.

Op verzoek is een veiligheidsinformatieblad leverbaar dat ook kan worden gedownload van [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119).

Op verzoek is een veiligheidsinformatieblad leverbaar dat ook kan worden gedownload van [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

### Beroepsmatig gebruik.

Voor en na fixatie moeten specimens en alle eraan blootgestelde materialen worden behandeld alsof ze infectieus zijn; daarom moeten ze ook met de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd<sup>3</sup>.

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

Beprek de microbiële verontreiniging van reagentia tot een minimum zodat niet-specifieke kleuring wordt voorkomen. Het afwijken van de aangegeven incubatietijden of temperaturen kan leiden tot foutieve resultaten. Eventuele wijzigingen moeten door de gebruiker worden gevalideerd.

## Procedure

### A. Benodigde maar niet geleverde reagentia

Zie de Gebruiksaanwijzing voor primair antilichaam.

### B. Benodigde maar niet geleverde apparatuur

1. Roesvrijstalen hogedrukpan (aanbevolen wordt de afdichtingen regelmatig te vervangen om te zorgen voor optimale condities voor het blootleggen). Lees de aanwijzingen van de fabrikant zodat correct en veilig met de hogedrukpan kan worden gewerkt.
2. Algemene laboratoriumapparatuur voor immunohistochemie.

### C. Methodologie

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

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

1. Bij gebruik van de Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (X10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 of RE7119 moet een werkoplossing worden bereid door verdunning van 1 deel concentraat met 9 delen gedemineraliseerd water.
2. Verwarm 1,5 l van de werkoplossing in de hogedrukpan totdat de oplossing kookt. Sluit de pan maar vergrendel het deksel niet. Plaats de glaasjes in metalen kleurrekjes (zet de glaasjes niet vlak bij elkaar omdat daardoor een ongelijkmatige kleuring kan optreden), laat ze in de pan zakken en zorg ervoor dat de glaasjes volledig in de retrievaloplossing zijn ondergedompeld. Vergrendel het deksel.
3. Stel een tijd van 1 minuut in als de hogedrukpan op de juiste temperatuur en druk is gekomen (de optimale tijd moet worden gevalideerd door de gebruiker want dit is afhankelijk van het weefsel, de fixatie en/of primair antilichaam).
4. Neem de hogedrukpan van de warmtebron en laat hem onder koud water afkoelen met het deksel op de pan. OPEN HET DEKSEL NIET VOORDAT DE INDICATOR AANGEEFT DAT DE DRUK ERAF IS. Open het deksel, neem de glaasjes uit de pan en zet ze onmiddellijk in koud kraanwater.
5. Ga verder met het IHC–protocol volgens de Gebruiksaanwijzing van de fabrikant voor het primaire antilichaam en detectiesysteem.

### Kwaliteitscontrole

Door verschillen in het bewerken van weefsel en technische procedures in het laboratorium van de gebruiker kunnen de resultaten sterk verschillen; daarom is het noodzakelijk om, naast de volgende procedures, regelmatig intern controles uit te voeren. Controles moeten bestaan uit verse autopsie–/biopsie–/chirurgiespecimens die zo spoedig mogelijk op dezelfde wijze in formaline zijn gefixeerd, bewerkt en in paraffine ingebed als het/de patiëntmonster(s).

### Positief controleweefsel

Dit wordt gebruikt ter controle van correct bereide weefsels en juist uitgevoerde kleuringstechnieken. Bij elke kleuringstest behoort een positief controleweefsel deel uit te maken van elke set testcondities/primair antilichaam. Weefsel met een zwakke positieve kleuring is beter geschikt voor een goede kwaliteitscontrole en voor het detecteren van lage niveaus van reagensafbraak dan weefsel met een sterke positieve kleuring<sup>4</sup>. Zie voor aanbevolen positief controleweefsel de Gebruiksaanwijzing voor primair antilichaam. Als het positieve controleweefsel geen positieve kleuring vertoont moeten de resultaten van de testspecimens als ongeldig beschouwd worden.

### Negatief controleweefsel

Dit moet na het positieve controleweefsel worden onderzocht zodat de specificiteit van de labeling van het targetantigeen door het primaire antilichaam kan worden geverifieerd. Zie voor aanbevolen negatief controleweefsel de Gebruiksaanwijzing voor primair antilichaam. Door de variëteit van verschillende celtypes in de meeste weefselcoupes komen er vaak negatieve controleplaatsen voor; dit moet door de gebruiker worden geverifieerd. Eventuele niet–specifieke kleuring ziet er vaak diffuus uit. Ook in weefselcoupes die zeer sterk in formaline gefixeerd zijn kan sporadisch kleuring van bindweefsel worden waargenomen. Gebruik intacte cellen voor de interpretatie van de kleuringresultaten. Necrotische of gedegenereerde cellen kleuren vaak niet–specifiek<sup>5</sup>. Niet–immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten kan leiden tot vals–positieve resultaten. Zulke resultaten kunnen ook worden veroorzaakt door endogene enzymen als pseudoperoxidase (erythrocyten), endogeen peroxidase (cytochrom C) of endogeen biotine<sup>6</sup> (bv. lever, borst, hersenen en nier). Om te kunnen differentiëren tussen enerzijds endogene enzymactiviteit of niet–specifieke binding van enzymen en anderzijds specifieke immunoreactiviteit kan extra patiëntweefsel worden gekleurd met respectievelijk uitsluitend substraatchromogeen, Streptavidin–HRP of gelabelde polymeer en substraatchromogeen. Als bij het negatieve controleweefsel specifieke kleuring optreedt moeten de resultaten van het patiëntspecimen als ongeldig worden beschouwd.

### Negatief controle reagens

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

### Patiëntweefsel

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

### Beperkingen

Immunohistochemie is een diagnostisch proces van meerdere stappen; hiervoor is een gespecialiseerde opleiding vereist in het kiezen van de juiste reagentia; de keuze, fixatie en bewerking van weefsel; de voorbehandeling van IHC–glaasjes en de interpretatie van de kleuringresultaten.

De kleuring van het weefsel is afhankelijk van de manier waarop het weefsel vóór de kleuring is behandeld en bewerkt. Het onjuist fixeren, invriezen, ontdoien, spoelen, drogen, verwarmen, snijden en besmetting met andere weefsels of vloeistoffen kan leiden

tot artefacten, antilichaam–trapping of vals–negatieve resultaten. Inconsistente resultaten zijn mogelijk te wijten aan variaties in de methodes van fixeren en inbedden of aan weefselgeigen afwijkingen<sup>7</sup>.

Een te sterke of onvolledige achtergrondkleuring kan de juiste interpretatie van de resultaten in gevaar brengen.

De klinische interpretatie van elke kleuring of het ontbreken ervan moet worden aangevuld door morfologische onderzoeken met correcte controles en moet binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests worden geëvalueerd door een deskundig patholoog.

Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions zijn bedoeld voor gebruik op in paraffine ingebedde coupes die een specifieke fixatie vereisen. Er kan onverwachte antigeenexpressie optreden, met name bij neoplasmata. Tot het totaal van de klinische interpretatie van elke gekleurde weefselcoupe behoort ook de morfologische analyse en evaluatie van de overeenkomstige controles.

### **Eigenschappen**

De prestaties van Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 en RE7119 zijn gevalideerd met een reeks Novocastra™ muis IgG, muis IgM en konijn IgG primaire antilichamen.

Deze producten zijn stabiel tot de uiterste gebruiksdatum die op het etiket van de producten vermeld staat.

### **Literatuurlijst**

1. Shi S–R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin–fixed,paraffin–embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S–R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

### **Wijzigingen ten opzichte van de voorgaande uitgave**

Aan de paragraaf Waarschuwingen en Voorzorgsmaatregelen zijn nieuwe gegevens toegevoegd.

### **Datum van uitgave**

30 januari 2019



# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Produktnr.: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Tiltenkt bruk

Til *in vitro*-diagnostisk bruk.

Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 og RE7119 er tenkt brukt for varmeindusert epitop demaskering på formalifisert, parafinnstøpt vevsnitt som en del av en immunhistokjemisk prosedyre. Den kliniske tolkningen av en farging eller uteblitt farging skal suppleres av morfologiske studier ved bruk av riktige kontroller og skal evalueres av en kvalifisert patolog innenfor sammenhengen av pasientens sykehistorie og andre diagnostiske tester.

### Prinsipp for prosedyren

Varmeindusert epitop demaskering av formalifiserte, parafinnstøpte vevsnitt ved hjelp av en passende pH-løsning forbedrer fargingen av noen antistoffer ved å eksponere epitoper i vevet som har blitt maskert under fikseringen. Utviklingen av epitop demaskering ved hjelp av varme begynte i 1991 med en rapport av Shi et al.<sup>1</sup> Siden da har mange studier blitt publisert som har sett på effekten av demaskeringsoppløsninger, molaritet, pH og oppvarmingsmetoder.<sup>2</sup> En universell teknikk for varmeindusert epitop demaskering av alle epitoper finnes ikke, så mange forskjellige oppvarmingsmetoder og epitop demaskeringsoppløsninger kan brukes, inkludert de som er oppgitt nedenfor.

Disse produktene brukes i en immunhistokjemisk (IHC) prosedyre, som gjør det mulig med kvalitativ identifisering med lysmikroskopering av antigener i snitt av formalifisert, parafinnstøpt vev, via sekvensielle trinn med mellomliggende vasketrinn (for IHC-fargingens prinsipp for prosedyren, se bruksanvisningen for det aktuelle deteksjonssystemet). Varmeindusert epitop demaskering anbefales ikke for alle antistoffer (se primære antistoffers anbefalinger for bruk). Optimale betingelser for epitop demaskering må valideres av brukeren, siden disse avhenger av vev, fiksering og/eller primært antistoff.

### Medfølgende reagenser

Én av følgende:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Sitratbasert buffer som inneholder et overflateaktivt stoff
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	EDTA-basert buffer som inneholder et overflateaktivt stoff
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Tris/EDTA-basert buffer som inneholder et overflateaktivt stoff

### Rekonstitusjon, blanding, fortynning, titrering

Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 and RE7119 krever fortynning med avionisert vann for å forberede arbeidsløsninger (se Metodikk). Ytterligere fortynning kan forårsake tap av antigenfarging. Brukeren må validere enhver slik endring.

### Oppbevaring og stabilitet

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

### Prøveklargjøring

Anbefalt fiksativ er 10 % nøytralbufret formalin for parafinnstøpte vevsnitt.

### Advarsler og forholdsregler

Én eller flere bestanddeler i produktet er farlige.

Materialsikkerhetsdatablad er tilgjengelig på forespørsel eller tilgjengelig fra [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com).

For helsepersonell. Prøver, før og etter fiksering, og alle materialer som er utsatt for dem, skal behandles som om de kan overføre smitte og kasseres med riktige forholdsregler.<sup>3</sup>

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

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

## Prosedyre

### A. Nødvendige reagenser som ikke følger med

Se bruksanvisningen for primært antistoff.

### B. Nødvendig utstyr som ikke følger med

1. Trykkoker av rustfritt stål (Det anbefales at pakingene skiftes ut regelmessig for å opprettholde optimale demaskeringsforhold). For å sikre trygg og riktig bruk av trykkokeren, må brukere lese produsentens instruksjoner.
2. Generelt immunhistokjemisk laboratoriestyr.

### C. Metodikk

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

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

1. Hvis Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 eller RE7119 brukes, lag en arbeidsløsning ved å fortygne 1 del konsentrat med 9 deler avionisert vann.
2. Varm opp 1,5 l med arbeidsløsningen til den koker, i en trykkoker. Sett på lokk, men ikke lås lokket. Plasser objektglassene i fargingsstativer av metall (ikke plasser objektglassene nærme hverandre, da det kan føre til ujevn farging), senk ned i trykkoker og sørg for at objektglassene er helt neddykket i demaskeringsoppløsningen. Lås lokket.
3. Når trykkokeren når driftstemperatur og -trykk, ta tiden i 1 minutt (Optimal tid må valideres av brukeren, siden dette avhenger av vev, fiksering og/eller primært antistoff).
4. Fjern trykkokeren fra varmekilden og hold under rennende, kaldt vann med lokket på. IKKE ÅPNE LOKKET FØR INDIKATORENE VISER AT TRYKKET ER FRIGITT. Åpne lokket, ta ut objektglassene og plasser umiddelbart i kaldt vann fra springen.
5. Fortsett med IHC-protokollen i henhold til produsentens bruksanvisning for det primære antistoffet og deteksjonssystemet.

### Kvalitetskontroll

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

#### Positivt kontrollvev

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

#### Negativt kontrollvev

Skal undersøkes etter det positive kontrollvevet for å verifisere spesifisiteten i merkingen av målantigenet med det primære antistoffet. For anbefalt negativt kontrollvev, se bruksanvisningen for primært antistoff. Alternativt gir variasjonen av forskjellige celletyper som kan finnes i de fleste vevsnett ofte rom for negativ kontroll, men dette må verifiseres av brukeren. Uspesifikk farging, hvis dette forekommer, har vanligvis et diffus utseende. Sporadisk farging av bindevev vil også kunne observeres i vevsnett som er fiksert i for mye formalin. Bruk intakte celler til tolkning av fargingsresultater. Nekrotiske eller degenererte celler farger ofte uspesifikt.<sup>5</sup> Falske positive resultater kan sees på grunn av ikke-immunologisk binding av proteiner eller substratreagensprodukter. De kan også være forårsaket av endogene enzymer slik som pseudoperoksidase (erytrocytter), endogen peroksidase (cytokrom C) eller endogent biotin<sup>6</sup> (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre). For å differensiere endogen enzymaktivitet eller uspesifikk binding av enzymer fra spesifikk immunreaktivitet kan ekstra pasientvev farges eksklusivt med henholdsvis substratkromogen, Streptavidin-HRP eller merket polymer og substratkromogen. Hvis det forekommer spesifikk farging i det negative kontrollvevet, skal resultater med pasientprøvene betraktes som ugyldige.

#### Negativ reagenskontroll

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

#### Pasientvev

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

#### Begrensninger

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

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

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

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

## Ytelseegenskaper

Ytelsen til Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 og RE7119 har blitt validert ved bruk av en rekke Novocastra™ primære antistoffer for mus-IgG, mus-IgM og kanin-IgG.

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

## Bibliografi

1. Shi S–R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S–R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–67.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## Endringer på tidligere utgave

Ny informasjon er lagt til i avsnittet Advarsler og forsiktighetsregler.

## Utstedelsesdato

30 januar 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Ürün No: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Kullanım Amacı

*In vitro* diagnostik kullanım içindir.

Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 ve RE7119, immünohistokimyasal prosedürün bir parçası olarak formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş doku kesitlerinde Isı İndüklü Epitop Alımı içindir. Herhangi bir boyamanın veya boyama yokluğunun klinik yorumu, morfolojik çalışmalar ve uygun kontrollerle tamamlanmalıdır ve nitelikli bir patolog tarafından hastanın klinik öyküsü ve diğer tanı testleri bağlamında değerlendirilmelidir.

### Prosedür İlkesi

Uygun pH çözeltisi kullanılarak formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş doku kesitlerinin Isı İndüklü Epitop Alımı, fiksasyon boyunca maskelenmiş doku içindeki epitoplara maruz kalarak bazı antikörlerin boyanmasını iyileştirir. Isı kullanılarak Epitop Geri Kazanımının gelişimi, 1991 yılında Shi ve arkadaşları tarafından yayımlanan bir raporla başlamıştır.<sup>1</sup> O zamandan beri Epitop Geri Kazanım çözümlerinin etkisinin ele alındığı birçok çalışma yayımlanmıştır.<sup>2</sup> Tüm epitoplar için uygulanabilir evrensel bir Isı İndüklü Epitop Alımı tekniği yoktur, bu nedenle aşağıda belirtilenler dahil birçok farklı ısıtma yöntemi ve Epitop Geri Kazanım çözeltisi kullanılabilir.

Bu ürünler, bir araya getirilmiş yıkama adımları ile sıralı basamaklar yoluyla formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş dokunun bölümlerindeki antijenlerin ışık mikroskopisi ile kalitatif tanımlamaya izin veren bir immünohistokimyasal (IHC) prosedürde kullanılır (IHC boyaması Prosedür İlkesi için bkz. uygun saptama sistemi Kullanım Talimatları). Isı İndüklü Epitop Alımı, tüm antikörler için önerilmemektedir. (bkz. primer antikör Kullanım Önerileri). Epitop geri kazanımı için optimal koşullar kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır; çünkü bu koşullar dokuya, fiksasyona ve/veya primer antikora bağlıdır.

### Sağlanan Reaktifler

#### Aşağıdakilerden biri:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Sürfaktan içeren sitrat bazlı tampon
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1L	Sürfaktan içerek EDTA bazlı tampon
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L	Sürfaktan içerek Tirs/EDTA bazlı tampon

### Sulandırma, Karıştırma, Seyreltme, Titrasyon

Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 ve RE7119, çalışma çözümlerinin hazırlanması için deiyonize suyla seyreltmeyi gerektirir. Fazla seyreltme antijen boyanması kaybına yol açabilir. Bu tür herhangi bir değişiklik kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

### Saklama ve Stabilite

2-8°C'de saklayın. Dondurmayın. Kullanımdan hemen sonra 2-8°C'ye geri alın. Ürün etiketinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın. Yukarıda belirtilenler dışında saklama koşulları kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Ürünün instabilitesini gösteren belirgin bulgular yoktur, bu nedenle pozitif ve negatif kontroller hasta numuneleriyle eş zamanlı olarak çalışılmalıdır.

### Örnek Hazırlama

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

### Uyarılar ve Önlemler

Bu ürünlerdeki bir veya daha fazla bileşen tehlikelidir.

Malzeme Güvenlik Bilgileri Formu talep üzerine sağlanmaktadır ve [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com) sitesinde mevcuttur.

Profesyonel kullanıcılar içindir. Fiksasyondan önce ve sonra örnekler ve bunlara maruz kalmış bütün materyaller, enfeksiyon yayabilecekmiş gibi işlem görmelidir ve gerekli önlemler alınarak atılmalıdır.<sup>3</sup>

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

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

## Prosedür

### A. Gereken ancak sağlanmayan reaktifler

Primer antikor Kullanım Talimatlarına bakın.

### B. Gereken ancak sağlanmayan ekipman

1. Paslanmaz çelik basınçlı pişirici (optimum geri kazanım koşullarının sağlanması için contaların düzenli aralıklarla değiştirilmesini önerilmektedir). Basınçlı pişiricinin güvenli ve doğru kullanımı için kullanıcılar, üretici talimatlarını okumalıdır.
2. Genel immünohistokimya laboratuvar ekipmanı.

### C. Metodoloji

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

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

1. Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 veya RE7119 kullanıyorsanız 1 parça konsantrasyonu 9 parça deiyonize suda seyrelterek çalışma çözeltisini hazırlayın.
2. 1,5 l çalışma çözeltisini basınçlı pişiricide kaynaya kadar ısıtın. Kapağı kapatın, ancak kilitlemeyin. Lamları metal boyama raklarına yerleştirin (lamları eşitsiz boyama olacak şekilde birbirlerine yakın yerleştirmeyin) ve basınçlı pişiriciye indirerek lamların geri kazanım çözeltisine tümüyle daldıklarından emin olun. Kapağı kilitleyin.
3. Basınçlı pişirici çalışma sıcaklığına ve basıncına geldiğinde 1 dakika tutun (optimum süre dokuya, fiksasyona ve/veya primer antikora bağlı olduğu için kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır).
4. Basınçlı pişiriciyi ısı kaynağından uzaklaştırın ve kapağı kapalı halde soğuk suyun altında tutun. GÖSTERGELER BASINCI BOŞALDIĞINI BELİRTENE KADAR KAPAĞI AÇMAYIN. Kapağı açın, lamları çıkarın ve hemen soğuk musluk suyuna yerleştirin.
5. Primer antikor ve saptama sistemini üreticinin Kullanım Talimatlarına göre IHC protokolüyle işleme alın.

### Kalite Kontrol

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

### Pozitif Doku Kontrolü

Doğru hazırlanmış dokuları ve uygun boyama tekniklerini belirtmek için kullanılır. Her boyama çalışmasında her test koşulu/primer antikor seti için bir pozitif doku kontrolü dahil edilmelidir. Zayıf pozitif boyama yapılmış doku, optimal kalite kontrolü ve minör reaktif bozunma düzeylerini saptamak için güçlü pozitif boyama yapılmış dokudan daha uygundur.<sup>4</sup> Önerilen pozitif kontrol dokuları için primer antikor Kullanım Talimatlarına bakın. Pozitif doku kontrolü pozitif boyama göstermezse test örneklerinin sonuçları geçersiz kabul edilmelidir.

### Negatif Doku Kontrolü

Primer antikor tarafından hedef antijenin etiketlenmesinin spesifikliğini doğrulamak için, pozitif doku kontrolünden sonra incelenmelidir. Önerilen negatif kontrol doku için primer antikor Kullanım Talimatlarına bakın. Alternatif olarak, doku kesitlerinin çoğunda bulunan farklı hücre tipi çeşitleri sıklıkla negatif kontrol bölgeleri sunar ancak bu kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Olduğu durumda, spesifik olmayan boyamanın görünümünü genelde diffüzdür. Aşırı formalin fiksasyonlu dokulardan kesitlerde bağ dokusunun sporadik boyanması da görülebilir. Boyama sonuçlarının yorumlanması için intakt hücreler kullanın. Nekrotik ve dejenerer hücreler genellikle spesifik olmayan şekilde boyanır.<sup>5</sup> Proteinlerin veya substrat reaksiyon ürünlerinin immünoolojik olmayan bağlanması nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar görülebilir. Bunlar ayrıca psödoperoksidaz (eritrositler), endojen peroksidaz (sitokrom C) veya endojen biotin<sup>6</sup> (ör. karaciğer, meme, beyin, böbrek) gibi endojen enzimler nedeniyle oluşabilir. Endojen enzim aktivitesini veya enzimlerin spesifik olmayan bağlanmasını spesifik immünoreaktiviteden ayırmak için ek hasta dokuları sırasıyla sadece substrat kromojenle, Streptavidin-HRP'yle ya da etiketlenmiş polimer ve substrat kromojenle boyanabilir. Negatif doku kontrolünde spesifik boyanma oluştursa hasta örneklerinin sonuçları geçersiz kabul edilmelidir.

### Negatif Reaktif Kontrolü

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

### Hasta Dokusu

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

### Sınırlamalar

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

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

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

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

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

### **Performans Özellikleri**

Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 ve RE7119'un performansı, bir dizi Novocastra™ fare IgG, fare IgM ve tavşan IgG primer antikorları kullanılarak doğrulanmıştır.

Bu ürünler, ürün etiketinde belirtilen son geçerlilik tarihi/tarihlerine kadar stabildir.

### **Kaynakça**

1. Shi S–R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S–R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–67.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

### **Önceki Sayıya Göre Değişiklikler**

Uyarılar ve Önlemler bölümüne yeni bilgiler eklenmiştir.

### **Düzenlenme Tarihi**

30 Ocak 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Продуктови №: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Предназначение

За употреба при *in vitro* диагностика.

Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 и RE7119 са предназначени за термично индуцирано извличане на епитоп на фиксирани във формалин и вградени в парафин тъкани срези като част от имунохистохимична процедура. Клиничната интерпретация на всяко оцветяване или неговата липса следва да бъде допълнена от морфологични проучвания с помощта на подходящи контроли и трябва да се оценява в контекста на клиничната история на пациента и други диагностични изследвания от квалифициран патолог.

### Принцип на процедурата

Термично индуцирано извличане на епитоп на фиксирани във формалин и вградени в парафин тъкани срези, използващо разтвор с подходящо pH, подобрява оцветяването на някои епитопите, като излага епитопите на тъкан, която е била маскирана по време на фиксация. Разработването на използващо топлина извличане на епитоп започва през 1991 г. с доклад на Ши и др.<sup>1</sup> Оттогава насам са публикувани безброй проучвания, обръщайки внимание на ефектите на разтворите за извличане на епитоп, моларността, pH и методите на загряване.<sup>2</sup> Не съществува една универсална техника за термично индуцирано извличане на епитоп, подходяща за всички епитопи, затова могат да бъдат използвани известен брой други методи на затопляне и разтвори за извличане на епитоп, включително тези, изброени по-долу.

Тези продукти се използват при имунохистохимична (ИНС) процедура, която позволява качествена идентификация с оптична микроскопия на антигени в срези на фиксирана във формалин и вградена в парафин тъкан, чрез последователни междинни стъпки на промиване (за принципа на процедурата на имунохистохимично оцветяване вижте инструкциите за употреба на съответната система за откриване). Термично индуцираното извличане на епитоп не се препоръчва за всички антители (вж. „Препоръки за употреба за първично анти тяло“). Оптималните условия за извличане на епитоп трябва да бъдат валидирани от потребителя, тъй като зависят от тъканта, фиксацията и/или първичното анти тяло.

### Предоставени реактиви

#### Един от следните:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL	Базиран на цитрат буфер, съдържащ повърхностно активно вещество
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1L	Базиран на етилендиаминтетраоцетна киселина буфер, съдържащ повърхностно активно вещество
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L	Базиран на трометамин-буферинан физиологичен разтвор/ етилендиаминтетраоцетна киселина буфер, съдържащ повърхностно активно вещество

### Възстановяване, смесване, разреждане, титриране

Разтворите за извличане на епитоп (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 и RE7119 трябва да бъдат разредени с дейонизирана вода, за да се приготвят работни разтвори (вж. „Методология“). По-нататъшното разреждане може да доведе до загуба на оцветяване на антигена. Всички подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя.

### Съхранение и стабилност

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

### Подготовка на спесимени

Препоръчителният фиксиращ разтвор е неутрален буферизиран формалин 10% за тъкани срези, вградени в парафин.

### Предупреждения и предпазни мерки

Един или повече от компонентите на продукта са опасни.

Информационният лист за безопасност на материалите може да се получи при поискване или е на разположение от [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

За професионална употреба. Спесимените преди и след фиксация, както и всички материали, изложени на тяхното влияние, трябва да бъдат третирани като способни да предадат инфекция и да бъдат изхвърлени, прилагайки съответните предпазни мерки.<sup>3</sup>

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

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

## Процедура

### А. Необходими, но непредоставени реактиви

Вижте инструкциите за употреба за първично анти тяло.

### В. Необходимо, но непредоставено оборудване

1. Съд за загреване под налягане от неръждаема стомана (препоръчва се уплътненията да се подменят на регулярни интервали, за да се поддържат оптимални условия на извличане). За да се гарантира безопасно и правилно използване на съда за загреване под налягане, потребителите трябва да прочетат инструкциите на производителя.
2. Общо имунохистохимично лабораторно оборудване.

### С. Методология

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

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

1. Ако използвате Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 или RE7119, пригответе работен разтвор, като разредите 1 част концентрат към 9 части дейонизирани вода.
2. Загрейте 1,5 L от работния разтвор до кипване в съд за загреване под налягане. Покрийте, но не заключвайте капака. Позиционирайте предметните стъкла на метални поставки за оцветяване (не поставяйте предметните стъкла близо едно до друго, тъй като това може да доведе до неравномерно оцветяване) и ги поставете в съда за загреване под налягане, уверявайки се, че предметните стъкла са изцяло потопени в разтвора за извличане. Заключете капака.
3. Когато съдът за загреване под налягане достигне работна температура и налягане, отмерете 1 минута (оптималното време трябва да се потвърди от потребителя, тъй като то зависи от тъканта, фиксацията и/или първичното анти тяло).
4. Отстранете съда за загреване под налягане от източника на загреване и го поставете под течаща студена вода, без да сваляте капака. НЕ ОТВАРЯЙТЕ КАПАКА, ДОКАТО ИНДИКАТОРИТЕ НЕ ПОКАЖАТ, ЧЕ НАЛЯГАНЕТО Е ОСВОБОДЕНО. Отворете капака, извадете предметните стъкла и ги поставете незабавно в хладка вода.
5. Продължете с имунохистохимичния протокол според инструкциите за употреба на производителя за първичното анти тяло и системата за откриване.

### Качествен контрол

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

### Позитивна тъканна контрола

Използва се, за да се покажат правилно пригответени тъкани и правилни техники на оцветяване. Една позитивна тъканна контрола трябва да бъде включена за всеки сет с тест условия/първично анти тяло при всяка серия проби за оцветяване. Тъкан със слабо позитивно оцветяване е по-подходяща от тъкан със силно позитивно оцветяване за оптимален качествен контрол и за откриване на по-малки нива на деградация на реактива.<sup>4</sup> За препоръчителна позитивна контролна тъкан вижте инструкциите за употреба за първично анти тяло. Ако позитивната тъканна контрола не показва позитивно оцветяване, резултатите от спесимените, включени в теста, трябва да се считат за невалидни.

### Негативна тъканна контрола

Трябва да се изследва след позитивната тъканна контрола, за да се провери специфичността на белязването на таргетния антиген от първичното анти тяло. За препоръчителна негативна контролна тъкан вижте инструкциите за употреба за първично анти тяло. Алтернативно, разнообразието от различни видове клетки, присъстващи в повечето тъкани срези, често предлага места за негативна контрола, но това трябва да се провери от потребителя. Неспецифичното оцветяване, ако присъства, обикновено е дифузно на вид. Спорадично оцветяване на съединителна тъкан може да се наблюдава и в части от прекомерно фиксирани във формалин тъкани. Използвайте интактни клетки за интерпретация на резултатите от оцветяването. Некротичните или дегенерираните клетки често се оцветяват неспецифично.<sup>5</sup> Може да се видят неверни позитивни резултати поради неимунологично свързване на протеини или реакционни продукти на субстрата. Те може да са причинени и от ендогенни ензими като псевдопероксидаза (еритроцити), ендогенна пероксидаза (цитохром С) или ендогенен биотин<sup>6</sup> (напр. черен дроб, гърда, мозък, бъбрек). За диференциране на ендогенна ензимна активност или неспецифично ензимно свързване от специфична имунна реактивност ексклузивно може да се оцветят допълнителни тъкани от пациента, съответно със субстрат-хромоген, Streptavidin-HRP или маркерен полимер и субстрат-хромоген. Ако се появи специфично оцветяване в негативната тъканна контрола, резултатите от спесимените на пациентите трябва да се считат за невалидни.

### Негативна контрола на реактива

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

### Тъкан от пациента

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



## Ограничения

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

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

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

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

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

## Работни характеристики

Действието на Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 и RE7119 е валидирано чрез използването на поредица от Novocastra™ миши IgG, миши IgM и заешки IgG първични антитела.

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

## Библиография

1. Shi S-R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–67.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## Изменения на предишно издание

Към раздела „Предупреждения и предпазни мерки“ е добавена нова информация.

## Дата на издаване

30 Януари 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Termékszámok: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Alkalmazási terület

*In vitro* diagnosztikai használatra.

A Novocastra™ Epitope Retrieval Solution RE7113, RE7114, RE7116 és RE7119 készítmények formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmetszetek hőindukált epitópfeltáráására szolgálnak az immunhisztokémiai eljárás részeként. Minden festődés meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollokkal kell kiegészíteni, valamint az értékelést a beteg klinikai kórtörténete és egyéb diagnosztikai vizsgálatok figyelembevételével, képzett patológusnak kell elvégeznie.

### Az eljárás elve

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmetszetek megfelelő pH-jú oldattal végzett hőindukált epitópfeltárása a fixálás során rejtetté vált szöveti epitópok feltáráásával javítja egyes antitestek festési teljesítményét. A hő alkalmazásával végzett epitópfeltáráás fejlődése 1991-ben Shi és mtsai. beszámolójával kezdődött.<sup>1</sup> Azóta számos vizsgálatra került sor, amelyek az epitópfeltáráás, a molaritás, a pH és a hevítő módszerek hatásait vizsgálták.<sup>2</sup> Nem létezik minden epitópra alkalmazható univerzális hőindukált epitópfeltárási eljárás, így számos különböző hevítési módszer és epitópfeltáráó oldat alkalmazható, köztük az alább felsoroltak is.

E termékek olyan immunhisztokémiai (IHC) eljárás során használandók, amely formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmetszetekben lévő antigének fénymikroszkópos vizsgálattal végzett kvalitatív azonosítására szolgál meghatározott sorrendben végrehajtott lépések során, közébeiktott mosási lépésekkel (az IHC-festés eljárási elvének leírását lásd az adott detektáló rendszerek használati útmutatójában). A hőindukált epitópfeltáráás nem minden antitest esetén ajánlott (lásd az elsődleges antitestnél a Felhasználási javaslatokat). Az epitópfeltáráás optimális körülményeit a felhasználónak kell validálnia, mivel ezek függnek a szövettől, a fixálástól és/vagy az elsődleges antitesttől.

### Biztosított reagensek

#### Az alábbiak közül egy:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Felületaktív anyagot tartalmazó, citrátalapú puffer
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1L	Felületaktív anyagot tartalmazó, EDTA-alapú puffer
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L	Felületaktív anyagot tartalmazó, tris/EDTA-alapú puffer

### Feloldás, elegyítés, hígítás és titrálás

Az Epitope Retrieval Solution (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 és RE7119 oldatokat ionmentes vízzel végzett hígítást igényelnek a munkaoldat elkészítéséhez (lásd a Módszer című fejezetet). A további hígítás az antigénfestődés elvesztését okozhatja. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatás validálnia kell.

### Tárolás és stabilitás

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

### A minták előkészítése

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

### Figyelmeztetések és óvintézkedések

A termék egy vagy több összetevője veszélyes.

Az anyagbiztonsági adatlapot igény esetén rendelkezésre bocsátjuk, illetve elérhető a [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com) weboldalon is.

Szakemberek általi használatra. A mintákat fixálás előtt és után, valamint a velük érintkező összes anyagot fertőzések terjesztésére képes anyagként kell kezelni, és megfelelő körülményekkel kell ártalmatlanítani.<sup>3</sup>

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

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

## Eljárás

### A. Szükséges, de nem szállított reagensek

Lásd az elsődleges antitest használati útmutatóját.

### B. Szükséges, de nem szállított felszerelés

1. Rozsdamentes acél nyomástartó edény (kukta) (az optimális feltárási feltételek fenntartása érdekében a tömítések rendszeres időközönként végzett cseréje javasolt). A kukta biztonságos és helyes használatához olvassa el a gyártó útmutatóját.
2. Általános immunhisztokémiai laboratóriumi felszerelés.

### C. Módszer

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

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

1. Novocastra™ Epitope Retrieval Solution (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, illetve RE7119 alkalmazása esetén készítsen munkaoldatot 1 rész koncentrátum és 9 rész ionmentes víz alkalmazásával.
2. Hévítsen 1,5 l munkaoldatot kuktában forrásgig. Fedje, de ne zárja le a fedelet. Helyezze a tárgylemezeket fém festőrácsokra (ne tegye egymáshoz közel a tárgylemezeket, mivel az egyenletlen festődést eredményezhet), majd erressze le őket a kuktába oly módon, hogy a tárgylemezek teljesen belemerüljenek a feltárási oldatba. Zárja le a fedelet.
3. Amikor a kukta eléri az üzemi hőmérsékletet és nyomást, állítsa be az időzítést 1 percre (az optimális időtartamot a felhasználónak kell validálnia, mivel az függ a szövetről, a fixálástól és/vagy az elsődleges antitesttől).
4. Vegye le a kuktát a hőforrásról, majd tartsa hideg folyóvíz alá lezárt fedéllel. NE NYISSA FEL A FEDELET ADDIG, AMÍG A MŰSZER AZT NEM JELZIK, HOGY A TÚLNYOMÁS MEGSZÜNT. Nyissa fel a fedelet, és vegye ki, majd tegye azonnal hideg csapvízbe a tárgylemezeket.
5. Az elsődleges antitest és a detektáló rendszer gyártói használati útmutatójának megfelelően végezze el az IHC-protokollt.

### Minőség-ellenőrzés

A felhasználó laboratóriumában alkalmazott szövetfeldolgozási és technikai eljárások eltérései jelentős különbséget okozhatnak az eredményekben, ami az alábbi eljárásokon túl belső kontrollok rendszeres futtatását teszi szükségessé. Kontrollként friss boncolási/biopsziás/sebészeti mintákat kell használni, amelyekre a lehető leghamarabb a meggyezző módon kell formailban fixálni, feldolgozni és paraffinviaszba ágyazni.

### Posztív szövetkontroll

A megfelelő szövet-előkészítés és festési technikák ellenőrzésére használatos. Minden tesztelési körülményegyes/elsődleges antitest esetében és minden megfestési sorozatban kell alkalmazni egy pozitív szövetkontrollt. A gyengén pozitív festődésű szövet alkalmasabb az erősebben pozitív festődésű szövetnél az optimális minőség-ellenőrzéshez, valamint a kismértékű reagensbomlás észleléséhez.<sup>4</sup> A javasolt pozitív kontrollszövetrel kapcsolatban lásd az elsődleges antitest használati útmutatóját. Ha a pozitív szövetkontroll nem mutat pozitív festődést, a vizsgált minták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

### Negatív szövetkontroll

A pozitív szövetkontroll után azért kell megvizsgálni, hogy a vizsgált antigén elsődleges antitest segítségével történő jelölésének specificitását ellenőrizni lehessen. A javasolt negatív kontrollszövetrel kapcsolatban lásd az elsődleges antitest használati útmutatóját. Ezenkívül a legtöbb szövetmetszetben jelen lévő különböző sejttípusok gyakran használhatók negatív kontrollként, de ezeket a felhasználónak kell ellenőriznie. Ha van nem specifikus festődés, az rendszerint diffúz megjelenésű. A formailban túlfixált szövetekből származó metszeteknél a kötőszövet szórányos festődése is megfigyelhető. A festési eredmények értelmezésére ép sejteket használjon. A nekrotizált vagy degenerálódtott sejtek gyakran nem specifikusan festődnek meg.<sup>5</sup> A fehérvér vagy a szubsztát reakciótermékeinek nem immunológiai kötődése miatt álpozitív eredmények jelentkezhetnek. Álpozitív eredményeket okozhatnak olyan endogén enzimek is, mint a pszeudoperoxidáz (vörösvérsejtek), endogén peroxidáz (citokróm C), illetve endogén biotin<sup>6</sup> (pl. máj, emlő, agy, vese). Az endogén enzim aktivitásának vagy az enzimek nem specifikus kötődésének a specifikus immunreakciótól való megkülönböztetésére további betegszövetek festhetők kizárólag szubsztát–kromogén oldattal, Streptavidin-HRP-vel vagy jelölt polimerrel és szubsztát–kromogénnel. Ha a negatív szövetkontroll specifikus festődést mutat, a betegminták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

### Negatív reagenskontroll

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

### Betegszövet

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

### Korlátozások

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

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

A túlzott vagy hiányos kontrasztfestés ronthatja az eredmények megfelelő értelmezését.

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

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

### **Teljesítményjellemzők**

A Novocastra™ Epitope Retrieval Solution RE7113, RE7114, RE7116 és RE7119 teljesítményét különböző Novocastra™ egér IgG, egér IgM és nyúl IgG elsődleges antitestek alkalmazásával validálták.

Ezek a termékek a termékcímkén feltüntetett lejárati dátumig stabilak.

### **Szakirodalom**

1. Shi S–R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S–R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–67.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

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

Új információ került a Figyelmeztetések és óvintézkedések című részbe.

### **Kiadás dátuma**

30 január 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Nr. produs: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Utilizare prevăzută

Pentru diagnosticare *in vitro*.

Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 și RE7119 sunt destinate Recuperării induse de căldură a epitopilor pe secțiuni de țesut fixate cu formalină, încorporate în parafină, în cadrul unei proceduri imunohistochimice. Interpretarea clinică a oricărei colorări sau a absenței acesteia trebuie completată cu studii morfologice utilizând controale adecvate și trebuie evaluată în contextul antecedentelor clinice ale pacientului, precum și al altor teste de diagnosticare efectuate de către un patolog calificat.

### Principiul procedurii

Recuperarea indusă de căldură a epitopilor la secțiunile de țesut fixate cu formalină, încorporate în parafină îmbunătățește colorația anumitor anticorpi prin expunerea epitopilor din țesut care au fost mascați la fixare. Dezvoltarea recuperării epitopilor cu utilizarea căldurii a început în anul 1991 cu raportul Shi et al.<sup>1</sup> De atunci au fost publicate numeroase studii care examinează efectele soluțiilor de recuperare a epitopilor, molarității, pH-ului și metodelor de încălzire.<sup>2</sup> O tehnică universală de recuperare indusă de căldură a epitopilor adecvată pentru toți epitopii nu există, astfel încât pot fi utilizate diferite metode de încălzire și soluții de recuperare a epitopilor, inclusiv cele enumerate mai jos.

Aceste produse sunt utilizate într-o procedură imunohistochimică (IHC), care permite identificarea calitativă prin microscopie optică a antigenilor în secțiuni de țesut fixat cu formalină, încorporat în parafină, prin etape secvențiale cu etape de spălare intercalate (pentru Principiul Procedurii de colorație IHC a se vedea Instrucțiunile de Utilizare ale sistemului de detecție corespunzător). Recuperarea indusă de căldură a epitopilor nu este recomandată pentru toți anticorpii (a se vedea Recomandările de utilizare pentru anticorpii primari). Condițiile optime pentru recuperarea epitopilor trebuie validate de utilizator, întrucât acestea depind de țesut, fixare și/sau anticorpii primari.

### Reactivi furnizați

#### Una din următoarele:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1l RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Soluție tampon bazată pe citrat conținând surfactant
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1l	Soluție tampon bazată pe EDTA conținând surfactant
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1l	Soluție tampon bazată pe Tris/EDTA conținând surfactant

### Reconstituire, amestecare, diluare, titrare

Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 și RE7119 necesită diluare cu apă deionizată pentru a pregăti soluții de lucru (a se vedea Metodologia). Diluarea poate duce la pierderea colorării antigenilor. Utilizatorul trebuie să valideze orice astfel de schimbare.

### Depozitare și stabilitate

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

### Pregătirea specimenului

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

### Avertismente și precauții

Una sau mai multe componente din produs este periculoasă.

O Fișă tehnică de securitate a materialului este disponibilă la cerere sau poate fi obținută de pe site-ul [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Pentru utilizatori profesioniști. Specimenele, înainte și după fixare, precum și toate materialele expuse la acestea, trebuie manipulate ca și când ar avea potențialul de a transmite infecții și trebuie eliminate luând măsurile de precauție adecvate.<sup>3</sup>

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

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

## Procedură

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

A se vedea Instrucțiunile de Utilizare pentru anticorpii primari

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

1. Vas sub presiune din inox (se recomandă ca garniturile să fie înlocuite la intervale regulate pentru a menține condițiile optime de recuperare). Pentru a asigura utilizarea în siguranță și corectă a vasului sub presiune, utilizatorii trebuie să citească instrucțiunile producătorului.
2. Echipament de laborator general pentru imunohistochimie.

### C. Metodologie

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

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

1. Dacă se utilizează Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 sau RE7119 preparați o soluție de lucru diluând 1 parte de concentrat cu 9 părți apă ionizată.
2. Încălziți 1,5l din soluția de lucru până la fierbere într-un vas sub presiune. Acoperiți, dar nu blocați capacul. Amplasați lamele în suporturile metalice de colorație (nu puneți lamele aproape una de cealaltă căci se poate produce colorația neuniformă) și coborâți-le în vasul sub presiune, asigurându-vă că lamele sunt complet scufundate în soluția de recuperare. Blocați capacul.
3. Când vasul sub presiune ajunge la temperatura și presiunea de operare, cronometriți 1 minut (timpul optim trebuie validat de utilizator, întrucât depinde de țesut, fixare și/sau anticorpii primari).
4. Îndepărtați vasul sub presiune de pe sursa de căldură și puneți-o sub jet de apă rece acoperită cu capac. **NU DESCHIDEȚI CAPACUL PÂNĂ CÂND INDICATOARELE NU INDICĂ FAPTUL CĂ PRESIUNEA A FOST ELIBERATĂ.** Deschideți capacul, scoateți lamele și puneți-le imediat în apă rece de la robinet.
5. Procedați cu protocolul IHC conform Instrucțiunilor de utilizare ale producătorului pentru anticorpii primari și sistemul de detecție.

### Controlul calității

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

### Țesutul de control pozitiv

Folosit pentru a indica țesuturile pregătite corect și tehnicile de colorație adecvate. O probă de țesut de control pozitiv trebuie să fie inclusă pentru fiecare set de condiții de testare/anticorpii primari în fiecare etapă de colorație. Un țesut cu colorație pozitivă slabă este mai adecvat decât un țesut cu colorație pozitivă puternică pentru controlul optim al calității și pentru a detecta nivelele minore de degradare a reactivilor.<sup>4</sup> Pentru țesutul de control pozitiv recomandat a se vedea Instrucțiunile de utilizare ale reactivului primar. Dacă țesutul de control pozitiv nu demonstrează colorația pozitivă, rezultatele obținute cu acele probe de testare trebuie considerate nevalide.

### Țesutul de control negativ

Trebuie examinat după țesutul de control pozitiv pentru a verifica specificitatea informațiilor de etichetare ale antigenului țintă în funcție de anticorpii primari. Pentru țesutul de control negativ recomandat, a se vedea Instrucțiunile de utilizare pentru anticorpii primari. Ca alternativă, varietatea de tipuri diferite de celule prezente în majoritatea secțiunilor tisulare oferă frecvent locuri de control negativ, dar acest lucru trebuie verificat de către utilizator. Colorația nespecifică, dacă este prezentă, are, de obicei, un aspect difuz. Colorația sporadică a țesutului conjunctiv poate fi observată, de asemenea, în secțiuni de țesuturi fixate în mod excesiv în formalină. Folosiți celule intacte pentru interpretarea rezultatelor de colorație. Celulele necrotice sau degenerare se colorează deseori într-un mod nespecific.<sup>5</sup> Se pot observa rezultate fals pozitive ca urmare a legării non-immunologice a proteinelor sau produșilor de reacție ai substratului. Acestea pot fi cauzate, de asemenea, de enzimele endogene precum pseudoperoxidaza (eritrocite), peroxidaza endogenă (citocromul C) sau biotina endogenă<sup>6</sup> (de exemplu, ficat, sân, creier, rinichi). Pentru a diferenția activitatea enzimelor endogene sau legarea nespecifică a enzimelor de imunoreactivitatea specifică, pot fi colorate țesuturile suplimentare de la pacient numai cu substrat cromogen, Streptavidin-HRP sau polimer etichetat și substrat cromogen. În cazul în care colorația specifică are loc în țesutul de control negativ, rezultatele obținute pe eșantioanele pacientului trebuie să fie considerate nevalide.

### Reactivul de control negativ

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

### Țesutul pacientului

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

### Limitări

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

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

Contracolorația excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea adecvată a rezultatelor.

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

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

### **Caracteristici de performanță**

Performanța Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 și RE7119 a fost validată utilizând o gamă de anticorpi primari Novocastra™ IgG șoarece, IgM șoarece și IgG iepure.

Aceste produse sunt stabile până la data expirării indicată pe etichetele produselor.

### **Bibliografie**

1. Shi S–R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S–R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–67.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

### **Amendamente la ediția anterioară**

Au fost adăugate noi informații la secțiunea Avertismente și măsuri de precauție.

### **Data publicării**

30 ianuarie 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## № продуктов: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Назначение

Для диагностики *in vitro*.

Растворы для демаскировки эпитопов The Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 и RE7119 предназначены для тепловой демаскировки в зафиксированных в формалине и залитых в парафин срезах тканей в рамках процедуры иммуногистохимического исследования. Клиническая интерпретация любого окрашивания или его отсутствия должна быть дополнена морфологическими исследованиями с надлежащими контролями и должна быть оценена квалифицированным патологом с учетом анамнеза пациента и других диагностических тестов.

### Принцип процедуры

Тепловая демаскировка эпитопов в зафиксированных в формалине и залитых в парафин срезах тканей при использовании раствора соответствующего pH улучшает окрашивание некоторых антител за счет выявления в ткани эпитопов, которые были замаскированы во время фиксации. Развитие процесса демаскировки эпитопов при использовании высокой температуры началось в 1991 году с отчета, написанного Ши (Shi) и соавт.<sup>1</sup> С этого момента было опубликовано множество статей, которые рассматривали последствия растворов для демаскировки эпитопов, а именно, молярность, pH и методы нагревания.<sup>2</sup> Универсальной высокотемпературной техники демаскирования эпитопов, которая бы подходила для всех эпитопов, не существует, поэтому могут использоваться различные методы нагревания и растворы демаскирования эпитопов, включая те, которые указаны далее.

Эти продукты используются в рамках иммуногистохимической процедуры, которая обеспечивает количественное определение методом световой микроскопии антигенов на срезах зафиксированных в формалине и залитых в парафин тканей последовательными этапами с промежуточными процедурами промывки (Принцип процедуры иммуногистохимического окрашивания представлен в соответствующих инструкциях по использованию систем обнаружения). Тепловая демаскировка эпитопов не рекомендуется для всех антител (см. «Рекомендации по использованию первичного антитела»). Оптимальные условия демаскировки эпитопов должны быть валидированы пользователем, поскольку они зависят от типа тканей, фиксации и/или первичных антител.

### Реактивы, входящие в комплект поставки

#### Выполните одно из следующих действий:

Раствор для демаскировки эпитопов RE7113, pH 6, (10-кратный концентрат), 1 л (RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L) Раствор для демаскировки эпитопов RE7114, pH 6, (10-кратный концентрат), 500 мл (RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml)	Буфер на основе лимонной кислоты, содержащий сурфактант
Раствор для демаскировки эпитопов RE7116, pH 8, (10-кратный концентрат), 1 л (RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1L)	Буфер на основе EDTA, содержащий сурфактант
Раствор для демаскировки эпитопов RE7119, pH 9, (10-кратный концентрат), 1 л (RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L)	Буфер на основе EDTA/Tris, содержащий сурфактант

### Восстановление, смешивание, разведение, титрование

Растворы для демаскировки эпитопов Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 и RE7119 должны быть разведены деионизированной водой для подготовки рабочих растворов (см. Методику). Дальнейшее разведение может привести к потере окрашивания антигена. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.

### Хранение и стабильность

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

### Подготовка образцов

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

### Предупреждения и меры предосторожности

Один или несколько компонентов данной продукции представляют опасность для здоровья.

Паспорт безопасности химической продукции предоставляется по запросу или доступен на сайте: [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)  
Только для профессионального использования. С образцами (до и после фиксации) и всеми материалами, на которые они воздействуют, следует обращаться как с потенциально способными к передаче инфекции и утилизировать, соблюдая соответствующие меры предосторожности.<sup>3</sup>

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

Сведите к минимуму микробное загрязнение реактивов во избежание усиления неспецифического окрашивания. Инкубация при температуре или продолжительностью, которые отличаются от указанных в инструкции, может дать ошибочные результаты.

Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.



## Процедура

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

См. Инструкции по использованию первичного антитела.

### B. Необходимое оборудование, не входящее в комплект поставки

1. Скороварка из нержавеющей стали (Stainless Steel Pressure cooker) (рекомендуется регулярно производить замену прокладок (через определенные промежутки времени) для поддержания оптимальных условий демаскировки). Для обеспечения безопасного и эффективного использования скороварки пользователям следует ознакомиться с руководствами производителя.
2. Стандартное лабораторное оборудование для иммуногистохимических исследований.

### C. Методика

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

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

1. При использовании растворов для демаскировки эпитопов Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 и RE7119 готовят рабочий раствор, разводя 1 часть концентрата в 9 частях деионизированной воды.
2. Нагревают 1,5 мл рабочего раствора до тех пор, пока в скороварке не начнется кипение. Прикройте, но не закрывайте крышку. Поместите препараты в металлические штативы для окрашивания (но не слишком близко друг к другу во избежание неравномерного окрашивания) и опустите их внутрь скороварки таким образом, чтобы препараты оказались полностью покрыты восстанавливающим раствором. Закройте крышку.
3. При достижении рабочей температуры и давления в скороварке установите время на 1 минуту (оптимальное время следует валидировать пользователем, поскольку оно зависит от ткани, фиксации и/или первичного антитела).
4. Снимите скороварку с источника тепла и с открытой крышкой поместите под холодную воду. НЕ ОТКРЫВАЙТЕ КРЫШКУ ДО ТЕХ ПОР, ПОКА ИНДИКАТОРЫ НЕ ПОКАЖУТ, ЧТО ДАВЛЕНИЕ СБРОШЕНО. Откройте крышку, извлеките препараты и незамедлительно поместите их под проточную холодную воду.
5. Следуйте ИГХ протоколу в соответствии с «Инструкциями по использованию первичных антител и системы обнаружения», подготовленными их производителями.

### Контроль качества

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

### Положительный контроль ткани

Применяется для проверки правильности подготовки тканей и методов окрашивания. Один образец ткани, использующийся в качестве положительного контроля, должен быть включен в каждый процесс окрашивания для каждого комплекса «Условия проведения исследования» / «Первичные антитела». Для оптимального контроля качества и обнаружения незначительных уровней деградации реактива более подходит ткань со слабым положительным окрашиванием, чем ткань с сильным положительным окрашиванием.<sup>4</sup> Для определения тканей, которые рекомендуется использовать в качестве положительного контроля, смотрите Инструкции по использованию первичных антител. При отсутствии положительного окрашивания положительного контроля ткани результаты, полученные с исследуемыми образцами, считаются недействительными.

### Отрицательный контроль ткани

Этот тест необходимо выполнять после положительного контроля ткани для проверки специфичности мечения целевого антигена первичным антителом. Для определения тканей, которые рекомендуется использовать в качестве отрицательного контроля, смотрите «Инструкции по использованию первичных антител». Кроме того, разнообразие типов клеток для отрицательного контроля можно часто найти в большинстве срезов тканей, однако такие препараты должны быть проверены пользователем. Неспецифическое окрашивание, если оно присутствует, обычно выглядит диффузным. В срезах тканей, избыточно фиксированных формалином, можно также иногда увидеть окрашивание соединительной ткани. Для интерпретации результатов окрашивания используйте интактные клетки. Что касается некротизированных или разрушенных клеток, часто можно наблюдать неспецифическое окрашивание.<sup>5</sup> Связывание белков или продуктов реакции субстрата, происходящее неиммунологическим способом, может привести к ложноположительным результатам. Они могут быть обусловлены активностью эндогенных ферментов, таких как псевдопероксидаза (эритроцитов), эндогенная пероксидаза (цитохром С) или эндогенный биотин<sup>6</sup> (например, в печени, молочной железе, головном мозге, почках). Чтобы отличить активность эндогенных ферментов или неспецифическое связывание ферментов от специфической иммуореактивности, можно выполнить окрашивание дополнительных тканей, взятых у пациента, с использованием исключительно хромогенного субстрата или с применением Стрептавидина, ковалентно конъюгированного с пероксидазой хрена (Streptavidin-HRP), или меченого полимера и хромогенного субстрата соответственно. При наличии специфического окрашивания в отрицательном контроле ткани результаты исследования полученных у пациентов образцов считаются недействительными.

### Отрицательный контроль реактива

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

## Ткань, полученная у пациента

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

## Ограничения

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

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

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

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

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

## Эксплуатационные характеристики

Эффективность растворов для демаскировки эпитопов Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 and RE7119 была валидирована при использовании первичных антител Novocastra™ к иммуноглобулину G мышей, иммуноглобулину M мышей и иммуноглобулину G кроликов.

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

## Список литературы

1. Shi S-R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–67.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## Дополнения к предыдущему выпуску

В раздел «Предупреждения и меры предосторожности» была добавлена новая информация.

## Дата выпуска

30 Январь 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Numery produktów: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Przeznaczenie

Do diagnostyki *in vitro*.

Preparaty Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 i RE7119 są przeznaczone do ciepłego odmaskowywania epitopu w utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie skrawków tkanek w ramach procedury immunohistochemicznej. Kliniczną interpretację barwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. Ocena powinna być przeprowadzona przez wykwalifikowanego patologa w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych.

### Zasady postępowania

Ciepłe odmaskowywanie epitopu w utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie skrawkach tkanek przy użyciu odpowiedniego roztworu pH poprawia barwienie niektórych przeciwciał w wyniku ekspozycji na tkance epitopów, które zostały zamaskowane podczas utrwalania. Ciepłe odmaskowywanie epitopu rozpoczęło się w 1991 r. od raportu Shi i wsp.<sup>1</sup> Od tego czasu opublikowano wiele badań dotyczących wpływu roztworów do odmaskowywania epitopu, molarności, pH i metod ogrzewania.<sup>2</sup> Nie istnieje uniwersalna technika ciepłego odmaskowywania epitopu, dlatego można zastosować wiele różnych metod ogrzewania i roztworów do odmaskowywania epitopu, w tym te wymienione poniżej.

Produktu te są stosowane w procedurze immunohistochemicznej (IHC), która pozwala na jakościową identyfikację za pomocą mikroskopii świetlnej antygenów w skrawkach utrwalonej w formalinie i zatopionej w parafinie tkanki, w kolejnych etapach przedzielonych przemywaniem (Zasady Postępowania podczas barwienia IHC są opisane w Instrukcji stosowania odpowiedniego systemu detekcji). Ciepłe odmaskowywanie epitopu nie jest zalecane w przypadku wszystkich przeciwciał (zob. Zalecenia dotyczące użycia przeciwciała pierwszorzędowego). Optymalne warunki odmaskowywania epitopu powinny zostać zweryfikowane przez użytkownika, ponieważ są one zależne od tkanki, utrwalania i/lub przeciwciała pierwszorzędowego.

### Odczynniki znajdujące się w zestawie

#### Jeden z następujących:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 koncentrat) 1l RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 koncentrat) 500 ml	Bufor na bazie cytrynianu zawierający środek powierzchniowo czynny
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 koncentrat) 1l	Bufor na bazie EDTA zawierający środek powierzchniowo czynny
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 koncentrat) 1l	Bufor na bazie Tris/EDTA zawierający środek powierzchniowo czynny

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

Preparaty Epitope Retrieval Solutions (x10 koncentrat) RE7113, RE7114, RE7116 i RE7119 wymagają rozcieńczenia wodą dejonizowaną w celu przygotowania roztworów roboczych (zob. Metodologia). Dalsze rozcieńczanie może prowadzić do niemożliwości przeprowadzenia barwienia antygeny. Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

### Przechowywanie i trwałość

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

### Przygotowanie próbek

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

### Ostrzeżenia i środki ostrożności

Co najmniej jeden składnik produktu jest niebezpieczny.

Karta charakterystyki jest udostępniana na żądanie lub można ją pobrać ze strony [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Dla profesjonalnych użytkowników. Próbki przed i po utrwaleniu oraz wszelkie materiały narażone na kontakt z nimi należy traktować jak materiały potencjalnie zakaźne i należy je użytkować z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności.<sup>3</sup>

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

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

## Procedura

### A. Odczynniki wymagane, lecz niedostarczane

Zob. Instrukcja stosowania przeciwciała pierwszorzędowego

### B. Sprzęt wymagany, lecz niedostarczany

1. Szybkowar ze stali nierdzewnej (zaleca się regularną wymianę uszczelkek, aby zachować optymalne warunki odmaskowywania). Aby zapewnić bezpieczne i prawidłowe użytkowanie szybkowaru, należy zapoznać się z instrukcjami producenta.
2. Ogólne wyposażenie laboratorium immunohistochemicznego.

### C. Metodologia

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

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

1. W przypadku stosowania Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 koncentrat) RE7113, RE7114, RE7116 lub RE7119 przygotować roztwór roboczy, rozcieńczając 1 część koncentratu 9 częściami wody dejonizowanej.
2. Zagotować 1,5 l roztworu roboczego w szybkowarze. Przykryć, ale nie blokować pokrywki. Umieścić preparaty w metalowych stojakach do barwienia (nie umieszczają preparatów blisko siebie, ponieważ może wystąpić nierównomierne barwienie) i zanurzyć w szybkowarze tak, aby preparaty były całkowicie zanurzone w roztworze do odmaskowywania. Zablokować pokrywkę.
3. Gdy szybkowar osiągnie temperaturę roboczą i ciśnienie, odczekać 1 minutę (optymalny czas powinien zostać zweryfikowany przez użytkownika, ponieważ zależy od tkanki, utrwalania i/lub przeciwciała pierwszorzędowego).
4. Zjąć szybkowar ze źródła ciepła i wstawić z pokrywką pod zimną wodę. NIE ZDEJMOWAĆ POKRYWKI DO CHWILI, GDY WSKAŹNIK POKAŻE SPADEK CIŚNIENIA. Otworzyć pokrywkę, wyjąć preparaty i umieścić je natychmiast pod zimną wodą z kranu.
5. Należy postępować zgodnie z protokołem IHC (badania immunohistochemicznego) określonym w Instrukcji dołączonej przez producenta dotyczącej przeciwciała pierwszorzędowego i systemu detekcji.

### Kontrola jakości

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

### Tkankowa kontrola pozytywna

Stosowana w celu wskazania prawidłowo przygotowanych tkanek i prawidłowych technik barwienia. W każdej serii barwienia każdy zestaw warunków testowych/przeciwciał pierwszorzędowych powinien uwzględniać jedną tkankową kontrolę pozytywną. Do optymalnej kontroli jakości i do wykrywania niewielkich poziomów degradacji odczynników bardziej nadaje się tkanka o słabym barwieniu pozytywnym niż tkanka o silnym barwieniu pozytywnym.<sup>4</sup>

Informacje na temat zalecanej pozytywnej kontroli tkankowej zob. Instrukcja stosowania przeciwciała pierwszorzędowego. Jeśli tkankowa kontrola pozytywna nie wykaże odpowiedniego barwienia pozytywnego, wyniki testu przeprowadzonego na próbkach pobranych od pacjenta należy uznać za nieważne.

### Tkankowa kontrola negatywna

Należy ją wykonać po tkankowej kontroli pozytywnej, aby sprawdzić swoistość znakowania docelowego antygenu przez przeciwciało pierwszorzędowe. W przypadku zalecanej negatywnej kontroli tkankowej zob. Instrukcja stosowania przeciwciała pierwszorzędowego. Ewentualnie tkankowa kontrola negatywna może obejmować różne typy komórek obecne w większości skrawków tkankowych, jednak powinno to zostać zweryfikowane przez użytkownika. Barwienie niespecyficzne, jeżeli jest obecne, zwykle ma charakter rozproszony. Na skrawkach wykonanych z materiału tkankowego nadmiernie utrwalonego w formalinie można również zaobserwować sporadyczne barwienie tkanki łącznej. Do interpretacji wyników barwienia należy używać nieuszkodzonych komórek. Komórki martwicze lub zdegenerowane często powodują barwienie niespecyficzne.<sup>5</sup> Wyniki fałszywie pozytywne mogą pojawić się w następstwie nieimmunologicznego wiązania białek lub występowania produktów reakcji substratów. Mogą być również spowodowane przez enzymy endogenne, takie jak pseudoperoxydaza (erytrocyty), peroxydaza endogenna (cytochrom C) lub endogenna biotyna<sup>6</sup> (np. wątroba, sutki, mózg, nerki). Aby odróżnić endogenną aktywność enzymatyczną lub niespecyficzne wiązanie enzymów od swoistej immunoreaktywności, dodatkowe tkanki pacjenta mogą być barwione - odpowiednio - wyłącznie substratem chromogenem, preparatem Streptavidin-HRP lub znakowanym polimerem i substratem chromogenicznym. Jeśli w trakcie tkankowej kontroli negatywnej nastąpi barwienie niespecyficzne, wyniki testu przeprowadzonego na próbkach pobranych od pacjenta należy uznać za nieważne.

### Negatywna kontrola odczynnika

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

### Tkanka pacjenta

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

## Ograniczenia

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

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

Nadmierne lub niepełne barwienie ujemne może pogarszać interpretację wyników.

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

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

## Charakterystyka działania

Skuteczność Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 i RE7119 została zweryfikowana przy użyciu szeregu przeciwciał mysich IgG, mysich IgM i króliczych IgG Novocastra™.

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

## Bibliografia

1. Shi S–R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S–R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–67.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

## Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Do rozdziału „Ostrzeżenia i środki ostrożności” zostały dodane nowe informacje.

## Data publikacji

30 stycznia 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Kataloške številke: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Predvidena uporaba

#### Za diagnostično uporabo in vitro.

Izdelki Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 in RE7119 so namenjeni uporabi pri toplotnem pridobivanju epitopa pri rezinah tkiva, fiksiranih s formalinom in vstavljenih v parafin, kot del imunohistokemijskega postopka. Klinično razlago obarvanja ali odsotnosti le-tega morajo dopoljevati morfološke študije ustreznih kontrolnih vzorcev, ki jih v okviru klinične anamneze bolnika in drugih diagnostičnih testov oceni usposobljen patolog.

#### Načelo postopka

Toplotno pridobivanje epitopa v rezinah tkiva, fiksiranih s formalinom in vstavljenih v parafin, z raztopino z ustrežno vrednostjo pH, izboljša obarvanje nekaterih protiteles, saj izpostavi epitope v tkivu, ki so bili maskirani med fiksacijo. Razvoj toplotnega pridobivanja epitopa se je začel leta 1991, ko so o njem prvič poročali Shi in sodelavci<sup>1</sup>. Od takrat so bile objavljene številne študije o učinkih raztopin za pridobivanje epitopa, molarnosti, vrednosti pH in metodah segrevanja.<sup>2</sup> Univerzalna tehnika toplotnega pridobivanja epitopa, ki bi bila primerna za vse epitope, ne obstaja, zato se uporabljajo številne različne metode segrevanja in raztopine za pridobivanje epitopa, vključno s tistimi, ki so opisane spodaj.

Ti izdelki se uporabljajo pri imunohistokemijskem postopku (IHC), ki omogoča svetlobno-mikroskopsko kvalitativno identifikacijo antigenov v rezinah tkiva, fiksiranih s formalinom in vstavljenih v parafin, z zaporednimi koraki in vmesnimi koraki izpiranja (za načelo postopka IHC glejte navodila za uporabo ustreznega sistema za zaznavanje). Toplotno pridobivanje epitopa ni priporočeno za vsa protitelesa (glejte priporočila za uporabo primarnih protiteles). Optimalne pogoje pridobivanja epitopa mora uporabnik validirati, saj so ti odvisni od tkiva, fiksacije in/ali primarnega protitelesa.

### Priloženi reagenti

#### En izmed naslednjih:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Citratni pufer, ki vsebuje surfaktant
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1L	Pufer z EDTA, ki vsebuje surfaktant
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L	Pufer s tris/EDTA, ki vsebuje surfaktant

### Rekonstitucija, mešanje, redčenje, titracija

Za pripravo delovnih raztopin je treba izdelke Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 in RE7119 razredčiti z deionizirano vodo (glejte poglavje Metodologija). Nadaljnje redčenje lahko privede do neobarvanja antigena. Uporabnik mora potrditi vsako takšno spremembo.

### Shranjevanje in stabilnost

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

### Priprava vzorcev

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

### Opozorila in previdnostni ukrepi

En ali več sestavnih delov v izdelku je nevarnih.

Varnostni list je na voljo na zahtevo ali na spletnem mestu [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com).

Za poklicne uporabnike. Z vzorci, pred fiksiranjem in po njem, in vsemi materiali, s katerimi so prišli v stik, morate rokovati, kot da bi lahko prenašali okužbe, in pri njihovem odstranjevanju upoštevati ustrezne previdnostne ukrepe.<sup>3</sup>

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

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

## Postopek

### A. Potrebni reagenti, ki niso priloženi

Glejte navodila za uporabo primarnih protiteles.

### B. Potrebna oprema, ki ni priložena

1. Tlačni lonec iz nerjavnega jekla (priporoča se zamenjevanje tesnil v rednih presledkih, da ohranite optimalne pogoje za pridobivanje). Uporabniki morajo prebrati izdelovalčeva navodila, da zagotovijo varno in pravilno uporabo tlačnega lonca.
2. Splošna oprema za imunohistokemijski laboratorij.

### C. Metodologija

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

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

1. Če uporabljate izdelke Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 ali RE7119, pripravite delovno raztopino tako, da razredčite 1 del koncentrata z 9 deli deionizirane vode.
2. Segrejte 1,5 l delovne raztopine do vrelišča v tlačnem loncu. Pokrov zaprite, vendar ga ne zaklenite. Postavite preparate v kovinska stojala za barvanje (preparatov ne postavite preblizu skupaj, saj je barvanje lahko neenakomerno) in jih spustite v tlačni lonec, tako da so popolnoma potopljeni v raztopino za pridobivanje. Zaklenite pokrov.
3. Ko tlačni lonec doseže delovno temperaturo in tlak, merite čas 1 minuto (optimalni čas mora validirati uporabnik, saj je odvisen od tkiva, fiksacije in/ali primarnega protitelesa).
4. Odstranite tlačni lonec z vira toplote in ga še pokritega polijte z mrzlo vodo. NE ODPRITE POKROVA, DOKLER KAZALNIKI NE POKAŽEJO, DA SE JE TLAK SPROSTITIL. Odprite pokrov, vzemite preparate in jih takoj položite v hladno vodo iz vodovoda.
5. Nadaljujte s protokolom IHC v skladu z navodili izdelovalca primarnega protitelesa in sistema za zaznavanje.

### Kontrola kakovosti

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

### Pozitivni kontrolni vzorci tkiva

Uporabite jih za opredelitev pravilno pripravljenih tkiv in ustreznih tehnik barvanja. Pri vsakem postopku barvanja morate vsakemu sklopu preizkusnih pogojev/primarnega protitelesa dodati en pozitiven kontrolni vzorec tkiva. Za kar najboljšo kontrolo kakovosti in boljše zaznavanje manjših stopenj razkroja reagenta je tkivo s šibkim pozitivnim obarvanjem bolj primerno kot tkivo z močnim pozitivnim obarvanjem.<sup>4</sup> Za priporočeno pozitivno kontrolno tkivo glejte navodila za uporabo primarnega protitelesa. Če pozitivni kontrolni vzorci tkiva ne pokažejo pozitivnega obarvanja, morate rezultate preizkusnih vzorcev zavreči kot neveljavne.

### Negativni kontrolni vzorci tkiva

Pregledati jih morate po pregledu pozitivnih kontrolnih vzorcev tkiva, da preverite specifičnost oznake ciljnega antigena glede na primarno protitelo. Za priporočeno negativno kontrolno tkivo glejte navodila za uporabo primarnega protitelesa. Drugače pa se kot negativni kontrolni vzorci pogosto uporablja vrsta različnih celic, ki so prisotne v večini rezin tkiv, vendar pa mora tako uporabo preveriti uporabnik. Nespecifično barvanje, če je prisotno, je običajno razpršeno. Opazite lahko tudi posamično obarvanje vezivnega tkiva v rezinah tkiv, kot posledica premočnega fiksiranja s formalinom. Za razlago rezultatov obarvanja uporabite nespremenjene celice. Obarvanje nekrotičnih ali degeneriranih celic je pogosto nespecifično.<sup>5</sup> Lažno pozitivni rezultati se lahko pojavijo zaradi ne-immunoške vezave proteinov ali produktov reakcije substrata. Povzročijo jih lahko tudi endogeni encimi, kot so psevdoperoksidaza (eritrociti), endogena peroksidaza (citokrom C) ali endogeni biotin<sup>6</sup> (npr. jetra, dojke, možgani, ledvice). Za razlikovanje med endogeno aktivnostjo encimov ali nespecifično vezavo encimov od specifične imunske reaktivnosti, lahko barvate dodatna tkiva bolnikov izključno s kombinacijami substrat-kromogen, streptavidin-HRP ali označeni polimer in substrat-kromogen. Če pride do specifičnega obarvanja negativnih kontrolnih vzorcev tkiva, morate rezultate vzorcev bolnika zavreči kot neveljavne.

### Negativni kontrolni reagent

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

### Bolnikovo tkivo

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

### Omejitev

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

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

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

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

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

### **Značilnosti učinkovitosti**

Učinkovitost raztopin Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 in RE7119 so validirali z nizom primarnih protiteles proti mišjim IgG, mišjim IgM in kunčjim IgG Novocastra™.

Izdelki so stabilni do datuma izteka roka uporabnosti, ki je naveden na oznaki izdelkov.

### **Literatura**

1. Shi S–R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S–R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–67.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

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

Poglavju Opozorila in previdnostni ukrepi so dodane nove informacije.

### **Datum izdaje**

30 januar 2019



# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Číslo výrobků: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Zamýšlené použití

Pro diagnostické použití *in vitro*.

Roztoky k vyvolání epitopu Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 a RE7119 jsou určeny k teplem indukovanému odmaskování epitopu na tkáňových řezech fixovaných formalínem a zalitých do parafínu, které je součástí imunohistochemického postupu. Klinická interpretace zbarvení či nezbarvení by měla být doplněna morfológickými studii s využitím řádných kontrol a vyhodnocení by mělo být provedeno kvalifikovaným patologem v kontextu klinické historie pacienta a dalších diagnostických zkoušek.

### Princip postupu

Teplem indukované odmaskování epitopu na tkáňových řezech fixovaných formalínem a zalitých do parafínu s využitím roztoku o vhodném pH zlepšuje obarvení pomocí některých protilátek tím, že v tkáni dochází k expozici některých epitopů, které byly při fixaci maskovány. Rozvoj metody teplem indukovaného odmaskování epitopu s využitím tepla začal v roce 1991 na základě článku publikovaného autory Shi a kol.1 Od té doby byly publikovány četné studie, které se zabývají vlivy roztoků, molarity, pH, a metod zahřívání na odmaskování epitopu.2 Neexistuje univerzální metoda teplem indukovaného odmaskování epitopu, která by byla vhodná pro všechny epitopy, a proto je možné použít řadu různých metod zahřívání a roztoků k odmaskování epitopu, včetně metod uvedených dále.

Tyto výrobky se používají v imunohistochemickém (IHC) postupu, který umožňuje kvalitativní identifikaci antigenů optickým mikroskopem, prováděnou na tkáňových řezech fixovaných formalínem a zalitých v parafínu, prostřednictvím postupných kroků s vloženými kroky promývání (Princip postupu IHC barvení –viz Návod k použití příslušného detekčního systému). Tepelně indukované odmaskování epitopu se nedoporučuje pro všechny protilátky (viz Doporučení k použití pro primární protilátku). Optimální podmínky pro odmaskování epitopu by měly být uživatelem validovány, protože jsou závislé na tkáni, fixaci a/nebo primární protilátce.

### Dodávaná činidla

#### Jedno z následujících.

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Pufr na bázi citrátu s obsahem povrchové aktivního činidla
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	Pufr na bázi EDTA s obsahem povrchové aktivního činidla
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Pufr na bázi Tris/ EDTA s obsahem povrchové aktivního činidla

### Rekonstituce, míchání, ředění, titrace

Epitope Retrieval Solutions (10x Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 a RE7121 vyžadují k přípravě pracovního roztoku ředění deionizovanou vodou (viz Metodologie). Další ředění může mít za následek ztrátu zbarvení antigenu. Každou takovou změnu musí uživatel validovat.

### Skladování a stabilita

Skladujte při 2-8 °C. Nezmrazujte. Po použití okamžitě uložte na místo s teplotou 2-8 °C. Nepoužívejte po datu použitelnosti, které je uvedeno na štítku výrobku. Jiné než specifikované skladovací podmínky musí být uživatelem ověřeny. Neexistují zjevné známky naznačující nestabilitu tohoto výrobku, a proto je třeba společně s vzorky pacientů zpracovávat pozitivní i negativní kontrolní vzorky.

### Příprava vzorku

Doporučený fixační prostředek je 10% neutrálně pufovaný formalín pro tkáňové řezy zalité do parafínu.

### Varování a upozornění

Tento výrobek obsahuje jednu nebo více nebezpečných složek..

Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L (RE7113), Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7114), R36/38 S26 36/37/39 63/64.

Bezpečnostní listy jsou k dispozici na požádání nebo na adrese [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119), Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7121).

Bezpečnostní listy jsou k dispozici na požádání nebo na adrese [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

Určeno pouze pro použití odbornými pracovníky.

Se vzorky před a po fixaci a se všemi materiály, které s nimi přišly do styku, by mělo být zacházeno jako s potenciálně infekčními a měly by být likvidovány za řádných bezpečnostních opatření.3

Nikdy nepipetujte činidla ústy a zabraňte kontaktu pokožky a sliznic s činidly a vzorky. Pokud dojde ke kontaktu činidel nebo vzorků s citlivými plochami, omyjte postižené místo velkým množstvím vody.

Minimalizujte mikrobiální kontaminaci činidel, protože může dojít ke zvýšení nespecifického zbarvení. Jiné než specifikované inkubační časy nebo teploty mohou mít za následek chybné výsledky. Každou takovou změnu musí uživatel validovat.

## Postup

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

Viz Návod k použití pro primární protilátky.

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

1. Tlakový hrnc z nerezové oceli (doporučuje se pravidelná výměna těsnění, aby byly zachovány optimální podmínky pro odmaskování). K zajištění bezpečného a správného použití tlakového hrnce je uživatel povinen seznámit se s návodem od výrobce.
2. Obecné zařízení pro imunohistochemickou laboratoř.

### C. Metodologie

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

Kombinace primární protilátky, jejího zředění a optimálních podmínek pro odmaskování epitopu společně s detekčním systémem by měly být validovány uživatelem na řadě známých pozitivních a negativních kontrolních vzorků.

1. Při použití Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116 nebo RE7119 připravte pracovní roztok zředěním 1 dílu koncentrátu s 9 díly deionizované vody.
2. Zahřívte 1.5L pracovního roztoku až k bodu varu v tlakovém hrnci. Přikryjte víkem, ale víko neuzamykejte. Umístěte sklíčka do kovových stojanů (nedávajte sklíčka blízko vedle sebe, protože může dojít k nepravdělnému zabarvení) a ponořte je do tlakového hrnce tak, aby byly v odmaskovacím roztoku zcela ponořeny. Uzamkněte víko.
3. Jakmile tlakový hrnc dosáhne provozní teploty a tlaku, odměřte 1 minutu (optimální dobu by měl uživatel validovat, protože je závislá na tkáni, fixaci a/nebo primární protilátce).
4. Sejměte tlakový hrnc ze zdroje tepla a s víkem jej ochlaďte proudem studené vody. NEOTVÍREJTE VÍKO, DOKUD INDIKÁTORY NEUKÁŽÍ VYROVNÁNÍ TLAKU. Otevřete víko, vyjměte sklíčka a okamžitě je ponořte do studené vody z kohoutku.
5. Pokračujte podle IHC protokolu v souladu s Návodem k použití pro primární protilátku a detekční systém od výrobce.

### Řízení jakosti

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

### Positivní tkáňová kontrola

Používá se ke zjištění správnosti zpracování tkání a řádných metod barvení. Pro každou skupinu zkušebních podmínek/ primární protilátku v každé dávce barvení by měla být provedena jedna kontrola pozitivní tkání. Tkáň se slabým pozitivním zabarvením je vhodnější než tkáň se silným pozitivním zabarvením, protože umožňuje optimální kontrolu jakosti a zjištění nízkých hodnot degradace činidel.<sup>4</sup> Doporučené tkáně pro pozitivní kontrolu jsou uvedeny v Pokynech k použití pro primární protilátky. Jestliže kontrola pozitivní tkáně neprokáže pozitivní zabarvení, je nutné považovat výsledky získané na testovaných vzorcích za neplatné.

### Negativní tkáňová kontrola

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

### Negativní kontrola činidlem

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

### Tkáň pacienta

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

### Omezení

Imunohistochemie je víceokrový diagnostický proces, který vyžaduje specializované školení ve volbě vhodných činidel; volba tkání, fixace a zpracování; příprava IHC sklíčka a interpretace výsledků barvení.

Zabarvení tkání závisí na manipulaci a zpracování tkáně před jejím obarvením. Nevhodná fixace, zmrazení, rozmrazení, praní, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi nebo tekutinami mohou mít za následek vznik artefaktů, zachytávání protilátek nebo falešně negativní výsledky. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem odchylek v metodách fixace a zalévání vzorků nebo důsledkem přirozených nepravidel tkáně.<sup>7</sup>

Řádnou interpretaci výsledků může ohrozit i nadměrné nebo neúplné kontrastní zabarvení.

Klinická interpretace jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti by měla být doplněna morfologickými studii s využitím řádných kontrola výsledky by měly být vyhodnoceny kvalifikovaným patologem v kontextu klinické historie pacienta a dalších diagnostických zkoušek. Roztoky k vyvolání epitopu se používají na řezech zalitých do parafínu se specifickými požadavky na fixaci. Může dojít k neočekávané expresi antigenu, zvláště u novotvarů. Klinická interpretace jakýchkoli zbarvených tkáňových řezů musí zahrnovat morfologickou analýzu a vyhodnocení odpovídajících kontrol.

### **Pracovní charakteristiky**

Pracovní charakteristiky Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 a RE7119 byly validovány pomocí řady primárních protilátek Novocastra™, a to myších IgG, myších IgM a králíčích IgG.

Tyto výrobky jsou stabilní až do data použitelnosti uvedeného na štítku.

### **Literatura**

1. Shi S–R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed,paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S–R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

### **Změny oproti předchozímu vydání**

Nepoužity.

### **Datum vydání**

30 leden 2019

# Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions

## Č. produktu: RE7113, RE7114, RE7116, RE7119

### Zamýšľané použitie

Na diagnostické použitie *in vitro*.

Prípravky Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 a RE7119 sú určené na záchyt epitopov s tepelnou indukciou rezov tkaniva zaliatých do parafínu a fixovaných formalínom ako súčasť imunohistochemického postupu. Klinická interpretácia akéhokoľvek farbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými vyšetreniami za použitia zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a iných diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.

### Princíp postupu

Záchyt epitopov s tepelnou indukciou rezov tkaniva zaliateho do parafínu a fixovaného formalínom použitím roztoku s vhodnou hodnotou pH zlepšuje farbenie niektorých protilátok prostredníctvom odhalenia epitopov v tkanive, ktoré boli počas fixácie zakryté. Záchyt epitopov s tepelnou indukciou sa začal používať v roku 1991 na základe správy Shi a kol.<sup>1</sup> Odvtedy bolo publikovaných množstvo štúdií, ktoré sa zaoberali účinkami záchytných roztokov, molaritou, pH a metódami zahrievania.<sup>2</sup> Univerzálna technika záchytu epitopov s tepelnou indukciou vhodná pre všetky epitopy však neexistuje, preto je možné použiť rôzne metódy zahrievania a záchytných roztokov vrátane tých, ktoré sú uvedené nižšie.

Tieto produkty sa používajú pri imunohistochemických postupoch (IHC) a umožňujú kvalitatívnu identifikáciu prostredníctvom svetelnej mikroskopie antigénov v rezoch tkaniva zaliateho do parafínu a fixovaného formalínom postupnými krokmi a medzíkrokmi umývania (informácie týkajúce sa princípov postupu farbenia IHC nájdete v návode na použitie k príslušnému detekčnému systému). Záchyt epitopov s tepelnou indukciou sa neodporúča pre všetky protilátky (pozrite si odporúčania na používanie primárnych protilátok). Používateľ musí validovať optimálne podmienky záchytu epitopu, pretože závisia od tkaniva, fixácie alebo primárnej protilátky.

### Dodané činidlá

#### Jedno z nasledujúcich:

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1L RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	Pufor na báze citranu obsahujúci surfaktant
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1L	Pufor na báze EDTA obsahujúci surfaktant
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L	Pufor na báze tris/EDTA obsahujúci surfaktant

### Rekonštitúcia, miešanie, riedenie, titrácia

Záchytné roztoky epitopu (x10 koncentrát) RE7113, RE7114, RE7116 a RE7119 vyžadujú zriadenie deionizovanou vodou na prípravu pracovného roztoku (pozrite si časť Metodológia). Ďalšie zriadenie môže viesť k strate antigénového zafarbenia. Každú takúto zmenu musí validovať používateľ.

### Ukladanie a stabilita

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

### Príprava vzorky

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

### Varovania a bezpečnostné opatrenia

Minimálne jeden komponent produktu je nebezpečný.

Materiálový bezpečnostný list je k dispozícii na požiadanie alebo na stránkach [www.LeicaBiosystems.com](http://www.LeicaBiosystems.com)

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

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

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

## Postup

### A. Požadované, ale nedodávané činidlá

Pozrite si návod na použitie pre primárnu protilátku.

### B. Požadované, ale nedodávané vybavenie

1. Antikorový tlakový hrniec (odporúča sa pravidelne meniť tesnenia, aby sa zachovali optimálne podmienky záchytu). Na zaistenie bezpečného a správneho použitia tlakového hrnca si používateľa musia prečítať pokyny od výrobcu.
2. Všeobecné vybavenie imunohistochemického laboratória

### C. Metóda

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

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

1. Pri použití pripravkov Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 koncentrát) RE7113, RE7114, RE7116 alebo RE7119 si pripravte pracovný roztok zriedením 1 dielu koncentrátu s 9 dielmi deionizovanej vody.
2. Uveďte 1,5 l pracovného roztoku do varu v tlakovom hrnci. Veko zatvorte, ale nezaistujte. Sklíčka umiestnite na kovové farbiace stojany (sklíčka neumiestňujte blízko pri sebe, pretože môže dôjsť k nerovnomernému zafarbeniu) a spustite do tlakového hrnca, pričom dbajte, aby boli úplne ponorené do záchytného roztoku. Zaisťte veko.
3. Keď sa v tlakovom hrnci dosiahne prevádzková teplota a tlak, odmerajte čas v trvaní 1 minúty (používajte by si mal overiť optimálny čas, pretože závisí od tkaniva, fixácie alebo primárnej protilátky).
4. Tlakový hrniec presuňte z tepelného zdroja a vložte ho pod studenú vodu, pričom veko nechajte na mieste. VEKO NEOTVÁRAJTE, KÝM INDIKÁTORY NESIGNALIZUJÚ UVOLNENIE TLAKU. Otvorte veko, vyberte sklíčka a okamžite ich umiestnite pod studenú vodu z vodovodu.
5. Postupujte podľa protokolu IHC v súlade s návodom na použitie od výrobcu primárnej protilátky a detekčného systému.

### Kontrola kvality

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

### Pozitívna kontrola tkanívom

Identifikuje správne pripravené tkanivá a správne techniky zafarbenia. Každá súprava testových podmienok/primárnej protilátky v každom cykle zafarbenia musí obsahovať jednu pozitívnu kontrolu tkanívom. Tkanivo so slabým pozitívnym farbením je pre optimálnu kontrolu kvality a na detekciu slabšej degradácie činidla vhodnejšie než tkanivo so silným pozitívnym farbením.<sup>4</sup> Odporúčané pozitívne kontrolné tkanivo si pozrite v návode na použitie primárnej protilátky. Ak pozitívna kontrola tkanívom nebude vykazovať pozitívne zafarbenie, výsledky testovaných vzoriek je nutné považovať za neplatné.

### Negatívna kontrola tkanívom

Nútné vyšetrenie po pozitívnej kontrole tkanívom s cieľom overiť špecifickosť značenia cieľového antigénu primárnou protilátkou. Odporúčanú negatívnu kontrolu tkanívom si pozrite v návode na použitie primárnej protilátky. Ako negatívnu kontrolu je možné použiť aj rôzne typy buniek prítomné vo väčšine tkanivových rezov, takýto postup si však vyžaduje validáciu používateľom. Prípadné nešpecifické farbenie má obvykle difúzný vzhľad. V rezoch tkanív silne fixovaných formalínom môže byť pozorované sporadické farbenie spojiva. Na interpretáciu výsledkov farbenia používajte intaktné bunky. Nekrotické alebo degenerované bunky sa často farbja nešpecificky.<sup>5</sup> Falošne pozitívne výsledky môžu byť pozorované v dôsledku neimunologickej väzby proteínov alebo produktov reakcie substrátu. Môžu byť spôsobené aj endogénnymi enzýmami, ako napr. pseudoperoxidázou (erythrocyty), endogénnou peroxidázou (cytochróm C) alebo endogénnym biotínom<sup>6</sup> (napr. pečeň, prsník, mozog, oblička). S cieľom diferencovať endogénnu enzymatickú aktivitu alebo nešpecifickú väzbu enzýmov od špecifickej imunoreaktivity môžete nafarbiť ďalšie vzorky tkanív pacienta výhradne substrátovým chromogénom, prípravkom Streptavidin-HRP, resp. značeným polymérom alebo substrátovým chromogénom. V prípade špecifického farbenia v negatívnej kontrole tkanívom je nutné výsledky vzoriek pacienta považovať za neplatné.

### Negatívna kontrola činidlom

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

### Tkanivo pacienta

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

### Obmedzenia

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

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

Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže narušiť správnosť interpretácie výsledkov.

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

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

### **Parametre výkonu**

Výkonnosť prípravkov Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7116 a RE7119 bola overená použitím série primárnych protilátok Novocastra™ myšacích IgG, myšacích IgM a králičích IgG.

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

### **Literatúra**

1. Shi S–R, Key ME and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based upon microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1991; 39:741–748.
2. Shi S–R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(3):327–343.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false–positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–67.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

### **Úpravy predchádzajúceho vydania**

V časti Varovania a Bezpečnostné opatrenia boli pridané nové informácie.

### **Dátum vydania**

30 január 2019

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



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

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

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