



RE7113, RE7114,
RE7115, RE7116,
RE7117, RE7118,
RE7119, RE7121 &
RE7122

Novocastra Laboratories Ltd., Balliol Business Park West,
Benton Lane, Newcastle Upon Tyne NE12 8EW
United Kingdom
Phone: +44 191 215 0567 Fax: +44 191 215 1152
www.novocastra.co.uk

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.

Brugsanvisning

Læs venligst før produktet tages i brug.

Οδηγίες χρήσης

Παρακαλούμε διαβάστε τις οδηγίες πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν αυτό.

Instructies voor gebruik

Lees deze informatie voordat u dit product gebruikt.

Návod k použití

Před použitím produktu prostudujte tento návod k použití.

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.

Kontroller, at pakken er ubeskadiget før brug.

Ελέγξτε την ακεραιότητα της συσκευασίας πριν από τη χρήση.

Controleer vóór gebruik de integriteit van de verpakking.

Před použitím zkontrolujte neporušenost obalu.

Novocastra™ Laboratories Ltd is a Vision BioSystems™ Company

UK

FR

IT

DE

ES

PT

SV

DA

EL

NL

CS



Epitope Retrieval Solutions

Product Nos: RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121, RE7122

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

The Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 and RE7122 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.¹ Since then numerous studies have been published looking at the effects of epitope retrieval solutions, molarity, pH, and heating methods.² A universal Heat Induced Epitope Retrieval technique suitable for all epitopes does not exist and 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	Citrate-based buffer containing surfactant
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1L	EDTA-based buffer containing surfactant
RE7117 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L	Tris/EDTA-based buffer containing surfactant
RE7121 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1L	

Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

The Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 and RE7121 require dilution with de-ionised water to prepare working solutions (see **Methodology**). Further dilution may result in loss of antigen staining. The user must validate any such change.

The Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 and RE7122 are prediluted. Reconstitution, mixing, dilution, or titration of these reagents is not recommended. 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.



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.

A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from www.novocastra.co.uk

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119), Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7121). A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from www.novocastra.co.uk 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.³

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 unmasking 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, RE7117, RE7119 or RE7121, prepare a working solution by diluting 1 part concentrate with 9 parts de-ionised water. Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 or RE7122 are prediluted and do not require dilution prior to use.

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.⁴ For recommended positive control tissue see primary antibody Instructions for Use. If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target 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.⁵ False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin⁶ (eg. liver, breast, brain, kidney). To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate-chromogen, 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.⁷

Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

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

Novocastra™ 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, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 and RE7122 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. 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.

Amendments to Previous Issue

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

Date of Issue

16 August 2005 (RE7113-K/CE/UK) (Form 711rev- 17/06/04).

Epitope Retrieval Solutions

Références des produits : RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121, RE7122

Utilisation prévue

Diagnostic *in vitro*.

Les Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 et RE7122 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.¹ 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.² 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	Tampon citrate contenant un surfactant
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Ready to Use) 1 l	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	Tampon EDTA contenant un surfactant
RE7117 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Ready to Use) 1 l	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Tampon Tris/EDTA contenant un surfactant
RE7121 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 l	

Reconstitution, Mélange, Dilution, Titrage

Les Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 et RE7121 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.

Les Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 et RE7122 sont pré-dilués. Il n'est pas recommandé de reconstituer, mélanger, diluer, ou titrer ces réactifs. Une dilution supplémentaire est susceptible de se traduire par une perte de marquage des antigènes. Toute modification de ce type doit être validée par l'utilisateur.

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.

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119), Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7121). Une Fiche de données de sécurité est disponible sur demande ou sur le site www.novocastra.co.uk

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.³

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

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, RE7117, RE7119 ou RE7121, préparer une solution de travail en diluant 1 partie de concentré avec 9 parties d'eau désionisée. Les Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 ou RE7122 sont pré-dilués et ne nécessitent pas de dilution avant leur utilisation.

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 œuvre 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 œuvre de contrôles en interne en plus des procédures suivantes. Les contrôles doivent être des spécimens frais provenant d'autopsies, de biopsies ou d'interventions chirurgicales, fixés au formol, traités et inclus en cire de paraffine dès que possible, de la même façon que le(s) échantillon(s) de patient.

Tissu de contrôle positif

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

Tissu de contrôle négatif

Il doit être examiné après le tissu de contrôle positif afin de vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire. Pour le tissu de contrôle négatif recommandé, voir le Mode d'emploi de l'anticorps primaire. Sinon, la diversité des types cellulaires présents dans la plupart des tissus permet de disposer fréquemment de sites de contrôle négatif, mais ils doivent être vérifiés par l'utilisateur. S'il est présent, le marquage non spécifique prend habituellement une apparence diffuse. Un marquage sporadique du tissu conjonctif peut également être observé sur des coupes de tissus qui ont été fixées par un excès de formol. Utiliser des cellules intactes pour l'interprétation des résultats du marquage. Les cellules nécrotiques ou dégénérées sont souvent marquées de façon non spécifique.⁵ Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique à des protéines ou à des produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être provoqués par des enzymes endogènes comme la pseudoperoxydase (érythrocytes), la peroxydase endogène (cytochrome C), ou la biotine endogène⁶ (foie, sein, cerveau, rein, par exemple). Pour différencier l'activité des enzymes endogènes ou la liaison non spécifique d'enzymes de l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être marqués exclusivement avec le substrat chromogène, 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.⁷

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

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

Les Novocastra™ 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 Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 et RE7122 ont été validées à l'aide d'une gamme d'anticorps primaires Novocastra™ de type IgG de souris, IgM de souris et IgG de lapin.

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

Bibliographie

1. 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. 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.

Amendements apportés à la version précédente

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

Date de publication

16 August 2005 (RE7113-K/CE/UK) (Formulaire 711 rév-17/06/04).

Epitope Retrieval Solutions

Cod. prodotti: RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121, RE7122

Uso previsto

Per uso diagnostico in vitro.

Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 e RE7122 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.¹ 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.² 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
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1L	
RE7117 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 500 ml	Tampone EDTA contenente surfattante
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L	
RE7121 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml	Tampone Tris/EDTA contenente surfattante
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1L	

Ricostituzione, miscelazione, diluizione, titolazione

Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 e RE7121 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.

Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 e RE7122 sono prediluite. Non si consiglia la ricostituzione, la miscelazione, la diluizione o la titolazione di questi reagenti. L'ulteriore diluizione potrebbe causare una perdita di colorazione dell'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.novocastra.co.uk

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119), Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7121). Una scheda di sicurezza del prodotto (MSDS) è disponibile su richiesta o dal sito www.novocastra.co.uk

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.³

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

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

1. 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.**

2. Attrezzatura di base del laboratorio di immunostochimica.

C. Metodologia

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

La combinazione dell'anticorpo primario, la sua diluizione 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, RE7117, RE7119 o RE7121, preparare la soluzione di lavoro diluendo 1 parte di concentrato con 9 parti di acqua deionizzata. Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 e RE7122 sono prerediute e non richiedono la diluizione prima dell'uso.

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.⁴ 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.⁵ Si possono osservare risultati falsamente positivi, dovuti a legame non immunologico delle proteine o a prodotti di reazione del substrato. Tali falsi positivi possono essere anche causati da enzimi endogeni quali la pseudoperossidasi (eritrociti), la perossidasi endogena (citocromo C) o la biotina endogena⁶ (es. fegato, mammella, cervello, rene). Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame enzimatico aspecifico dall'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.⁷

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

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

Novocastra™ 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, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 e RE7122 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. Nadj 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

16 August 2005 (RE7113-K/CE/UK) (Form 711rev- 17/06/04).

Epitope Retrieval Solutions

Produkt Nr.: RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121, RE7122

Verwendungszweck

Für in-vitro-Diagnostik.

Die Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 und RE7122 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.¹ Seitdem sind zahlreiche Studien über die Auswirkungen von Epitopdemaskierungslösungen, Molarität, pH-Wert und Erhaltungsmethoden veröffentlicht worden.² Es gibt keine universelle Technik zur hitzeinduzierten Epitopdemaskierung, die für alle Epitope geeignet ist. Aus diesem Grund können eine Reihe unterschiedlicher Erhaltungsmethoden 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 Waschschrritten 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 primärem Antikörper abhängen, sind sie vom Benutzer zu validieren.

Delieferte Reagenzien

Eine der folgenden Reagenzien verwenden.

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L	Puffer auf Citratbasis mit oberflächenaktiver Substanz
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Puffer auf EDTA-Basis mit oberflächenaktiver Substanz
RE7117 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Puffer auf Tris/EDTA-Basis mit oberflächenaktiver Substanz
RE7121 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration

Die Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 und RE7121 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.

Die Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 und RE7122 sind bereits vorverdünnt. Rekonstitution, Mischen, Verdünnung oder Titration dieser Reagenzien wird nicht empfohlen. 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.novocastra.co.uk erhältlich.

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119), Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7121). Ein Material Sicherheits-Datenblatt ist auf Anfrage von www.novocastra.co.uk 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.³

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

Die 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 Nachweisystem ist vom Benutzer auf einer Reihe bekannter positiver und negativer Kontrollen zu validieren.

1. Bei Verwendung der Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 oder RE7121 eine Arbeitslösung durch Verdünnung von 1 Teil Konzentrat mit 9 Teilen entionisiertem Wasser ansetzen. Die Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 und RE7122 sind bereits vorverdünnt und brauchen vor dem Gebrauch nicht verdünnt zu werden.

2. 1,5 Liter der Arbeitslösung in einem Druckkochtopf bis zum Kochen erhitzen. Deckel auflegen aber nicht verriegeln. Die Objektträger in Färbeframes 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 Demaskierlösung eintauchen. Deckel verriegeln.

3. 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).

4. 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.

5. Anschließend mit dem IHC-Protokoll gemäß den Gebrauchsanweisungen des Herstellers für den primären Antikörper und das Nachweisystem 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.⁴ Informationen über das positive Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden. Falls das positive Kontrollgewebe keine positive Färbung nachweisen kann, sollten die mit den Testproben erzielten Ergebnisse als ungünstig 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 Färberegebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.⁵ Falsch-positive Ergebnisse können aufgrund einer nichtimmunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten beobachtet werden. Solche Ergebnisse können auch durch endogene Enzyme wie Pseudoperoxidasen (Erythrozyten), endogene Peroxidase (Zytochrom C) oder endogenes Biotin⁵ (beispielsweise Leber, Mamma, Gehirn, Niere) hervorgerufen werden. Um eine endogene Enzymaktivität bzw. eine unspezifische Enzymbindung von einer spezifischen Immunreaktivität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substratchromogen, Streptavidin-HRP bzw. markiertem Polymer plus Substratchromogen gefärbt werden. Falls im negativen Kontrollgewebe eine spezifische Färbung auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungünstig 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 Färbeintensität ist im Kontext einer unspezifischen Hintergrundfärbung der negativen Reagenzkontrolle zu bewerten. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis, dass das Antigen nicht nachgewiesen wurde. Ein negatives Ergebnis bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, dass das Antigen in den getesteten Zellen / im getesteten Gewebe nicht vorlag. Bei Bedarf sollte zur Identifizierung falsch-negativer Reaktionen eine Gruppe von Antikörpern verwendet werden.

Beschränkungen

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

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

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, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 und RE7122 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. 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.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Neue Informationen wurden im Abschnitt **Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen** hinzugefügt.

Ausgabedatum

16 August 2005 (RE7113-K/CE/UK) (Formular 711 überarbeitet 17.06.04).

Epitope Retrieval Solutions

Referencia: RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121, RE7122

Indicaciones de uso

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Los productos Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 y RE7122 están indicados para la recuperación de epitopos 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 epitopos 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 epitopos presentes en el tejido que se han enmascarado durante la fijación. El desarrollo de la recuperación de epitopos mediante el calentamiento comenzó en 1991, con el informe de Shi et al.¹ Desde entonces, se han publicado numerosos estudios donde se examinan los efectos de las soluciones de recuperación del epitopos, la molaridad, el pH y los métodos de calentamiento.² No existe ninguna técnica universal de recuperación de epitopos adecuada para todos los epitopos y por eso se pueden usar muchos métodos distintos de calentamiento y distintas soluciones de recuperación de los epitopos, 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 epitopos 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 epitopos deben ser validadas el usuario, ya que dependen del tejido, fijación y/o del anticuerpo primario.

Reactivos suministrados

Uno de los siguientes.

RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l	Tampón basado en citrato, que contiene agente tensioactivo
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 l	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	Tampón basado en EDTA, que contiene agente tensioactivo
RE7117 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 l	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Tampón basado en Tris/EDTA, que contiene agente tensioactivo
RE7121 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 l	

Reconstitución, mezcla, dilución y titulación

Los productos Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 y RE7121 necesitan disolverse en agua desionizada 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.

Los productos Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 y RE7122 están prediluidos. No se recomienda reconstituir, mezclar, diluir ni titular estos reactivos. Una mayor dilución puede provocar la pérdida de la tinción del antígeno. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo.

Almacenamiento y estabilidad

Almacénelo a una temperatura de 2 a 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.novocastra.co.uk

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119), Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7121). Está disponible una Hoja de información sobre la seguridad del material, previa petición, o en www.novocastra.co.uk

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.³

No pipetee nunca los reactivos con la boca y evite el contacto de la piel y de las membranas mucosas con los reactivos y las muestras. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas 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 desesquemamiento). **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 epitopos, 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, RE7117, RE7119 o RE7121, prepare una solución de trabajo, mediante la dilución de una parte de concentrado en nueve partes de agua desionizada. Los productos Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 o RE7122 están prediluidos y no necesitan dilución antes de usarlos.

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 realizada. Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado que un tejido con una tinción positiva intensa para un control de calidad óptimo y para detectar niveles bajos de degradación del reactivo.⁴ En cuanto al 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.⁵ También pueden observarse falsos positivos causados por la unión no inmunológica de proteínas o de productos de reacción del sustrato. Estos falsos positivos pueden estar causados también por enzimas endógenas tales como la pseudoperoxidasa (eritrocitos), la peroxidasa endógena (citocromo C), o la biotina endógena⁶ (por ejemplo, de hígado, mama, cerebro o riñón). Para diferenciar la actividad de las enzimas endógenas o la unión inespecífica de las enzimas de la 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 de inclusión, o a irregularidades inherentes al tejido.⁷

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, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 y RE7122 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. 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

16 August 2005 (RE7113-K/CE/UK) (Formulario 711; rev. 17/06/04).

Epitope Retrieval Solutions

N.ºs dos produtos: RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121, RE7122

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos *in vitro*.

As soluções Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 e RE7122 foram concebidas para efectuar a recuperação de epítomos 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 epítomos 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 epítomos contidos no tecido que tinham permanecido dissimulados durante a fixação. O desenvolvimento da recuperação de epítomos por meio de calor teve início em 1991, com o relatório feito por Shi e outros¹. Desde essa altura que se têm publicado muitos estudos que consideraram os efeitos das soluções de recuperação de epítomos, a molaridade, o pH, e os métodos de aquecimento². Não existe uma técnica universal de recuperação de epítomos induzida pelo calor que seja apropriada para todos os epítomos, portanto podem empregar-se inúmeros métodos diferentes de aquecimento e de soluções de recuperação de epítomos, 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 epítomos 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 epítomos 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	Tampão à base de citrato contendo um tenso-activo
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1l	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1l	Tampão à base de EDTA contendo um tenso-activo
RE7117 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1l	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1l	Tampão à base de Tris/EDTA contendo um tenso-activo
RE7121 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1l	

Reconstituição, mistura, diluição, titulação

As Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 e RE7121 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.

As Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 e RE7122 encontram-se já diluídas. Não se recomenda a reconstituição, mistura, diluição ou titulação destes reagentes. Qualquer diluição adicional poderá resultar na perda de coloração do antígeno. O utilizador deve validar quaisquer alterações dessa natureza.

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.novocastra.co.uk

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119), Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7121). Encontra-se disponível uma Ficha de Dados de Segurança do Material, mediante pedido ou através do site www.novocastra.co.uk

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 infeções e devem ser descartados com as devidas precauções³.

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

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. Painel de pressão de aço inoxidável (recomendamos que se faça a mudança dos vedantes a intervalos regulares, a fim de se manterem níveis óptimos de recuperação). **Para se assegurar a utilização correcta e segura da panela 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 NovocastraTM Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 ou RE7121, preparar uma solução de trabalho, diluindo para tal 1 parte do produto concentrado para 9 partes de água desionizada. As soluções Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 ou RE7122 encontram-se pré-diluídas e não têm de ser diluídas antes de serem utilizadas.

2. Aquecer 1,5l da solução de trabalho numa panela 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 panela de pressão, certificando-se de que as lâminas ficam completamente submergidas na solução de recuperação. Engatar a tampa.

3. Quando a panela 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 panela de pressão da fonte de calor, e colocar sob a corrente de água fria de uma torneira, com a tampa em posição. **NÃO ABRIR A 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 proporcionarem um controlo de qualidade óptimo, bem como para detectar níveis reduzidos de degradação dos reagentes⁴. Consultar as Instruções de utilização do anticorpo primário para obter informações sobre o tecido de controlo positivo recomendado. Se o controlo de tecido positivo não demonstrar uma coloração positiva, os resultados obtidos com as amostras de testes devem ser considerados inválidos.

Controlo de tecido negativo

Este deve ser examinado depois do controlo de tecido positivo, para verificar a especificidade da marcação do antígeno objectivado pelo anticorpo primário. Consultar as Instruções de utilização do anticorpo primário para obter informações sobre o tecido de controlo negativo recomendado. Alternativamente, a variedade de diferentes tipos de células presentes na maioria das secções de tecidos oferece muitas vezes locais de controlo negativo, mas isto deve ser verificado pelo utilizador. A coloração não específica, caso ocorra, tem geralmente um aspecto difuso. A coloração esporádica do tecido conjuntivo pode também ter lugar em secções de tecido excessivamente fixado em formol. Devem utilizar-se células intactas para a interpretação dos resultados da coloração. As células necróticas ou degeneradas causam muitas vezes uma coloração não específica⁵. Podem verificar-se resultados falso-positivos devido à ligação não imunológica de proteínas ou de produtos da reacção do substrato. Esses resultados podem também ser causados por enzimas endógenas tais como a pseudoperoxidase (eritrócitos), a peroxidase endógena (citocromo C), ou a biotina endógena⁶ (ex. no fígado, mama, cérebro ou rim). Para 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^o.

Uma contraexatção 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 NovocastraTM 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 NovocastraTM Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 e RE7122 foi validado através da utilização de uma série de anticorpos primários NovocastraTM de IgG de rato, de IgM de rato 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. 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.

Emendas da edição anterior

Adicionámos mais informações à secção de **Advertências e Precauções**.

Data de emissão

16 August 2005 (RE7113-K/CE/UK) (Form 711, rev. 17/06/04).

Epitope Retrieval Solutions

Produktnummer: RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121, RE7122

Avsedd användning

För in vitro diagnostisk användning.

Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 och RE7122 är avsedda för värmeframkallad epitopätvinnning 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 epitopätvinnning 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 epitopätvinnning med hjälp av värme började 1991 med en rapport av Shi et al.¹ Sedan dess har ett stort antal studier publicerats som tittar på effekterna av epitopätvinningslösningar, molaritet, pH och uppvärmningsmetoder.² En universell värmeframkallad epitopätvinnningsteknik som passar alla epitoper existerar inte, därför kan ett antal olika uppvärmningsmetoder och epitopätvinningslösningar, 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 epitopätvinnning rekommenderas inte för alla antikroppar (se primär antikropp **Rekommendationer vid användning**). Optimala förhållanden för epitopätvinnning 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	Citratbaserad buffert innehållande yttaktivt medel
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1L	EDTA baserad buffert innehållande yttaktivt medel
RE7117 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L	Tris/EDTA baserad buffert innehållande yttaktivt medel
RE7121 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1L	

Rekonstitution, blandning, spädning, titrering

Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 and RE7121 kräver spädning med avjoniserat vatten för att förbereda brukslösningar (se **Metod**). Fortsatt spädning kan resultera i förlust av antigenfärgning. Användaren måste kontrollera sådana förändringar.

Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 and RE7122 är förspädda. Rekonstitution, blandning, spädning eller titrering av dessa reagens rekommenderas inte. 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 ovannämnda måste kontrolleras av användaren. Det finns inga tydliga tecken på att denna produkt är ostabil därför bör positiva och negativa kontroller köras samtidigt med patientprover.

Preparation av prov

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

Varningar och försiktighetsåtgärder

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.novocastra.co.uk

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.novocastra.co.uk

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.³

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

Minimera mikrobisk kontaminering av reagens annars kan en ökning av specifik 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 avmaskeringsförhållanden).
För att försäkra sig om säker och korrekt användning av tryckkokare bör användare läsa tillverkarens instruktioner.

2. Allmän immunhistokemisk laboratorietrustning.

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, RE7117, RE7119 or RE7121, förbered en brukslösning genom att späda 1 del koncentrat med 9 delar avjoniserat vatten. Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 eller RE7122 är förspädda och behöver inte spädas före användning.

2. Värm 1,5L brukslösning till kokpunkt i en tryckkokare. Täck med lås inte locket. Placera objektglaset på metalhyllorna (placera inte objektglaset nära varandra eftersom ojämn 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 kranvatten.

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.⁴ För rekommenderad positiv kontrollvävnad se primär antikropp Instruktioner vid användning. Om den positiva vävnadskontrollen misslyckas med att uppvisa positiv färgning bör resultat med testproverna anses vara ogiltiga.

Negativ vävnadskontroll

Bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen för att fastställa specificiteten för märkningen av 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. Ospezifisk färgning, om det förekommer, har ofta ett diffust utseende. Sporadisk färgning av bindväv kan också observeras i snitt från överflödigt formalinfixerade vävnader. Använd intakta celler för tolkning av färgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler färgar ofta ospezifiskt.⁵ Falskt positiva resultat kan ses p.g.a. icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erythrocyter), endogent peroxididas (cytokrom C), eller endogent biotin⁶ (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure). För att skilja endogen enzymaktivitet eller ospezifisk enzymbindning från specifik immunreaktivitet kan ytterligare patientvävnader färgas exklusivt med respektive substratkromogen eller Streptavidin-HRP eller märkt polymer och substrat-kromogen. Om specifik färgning sker i den negativa vävnadskontrollen bör resultat med patientprover anses vara ogiltiga.

Negativ reagenskontroll

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

Patientvävnad

Undersök färgade patientprover sist. Positiv färgningsintensitet bör utvärderas inom ramen för all ospezifisk bakgrundsfärgning 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.⁷

Överflödigt eller ofullständig kontrastfärgning kan äventyra korrekt tolkning av resultat.

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

Novocastra™ 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, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 och RE7122 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. 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.

Rättelser av tidigare utgivning

Ny information har lagts till avsnittet **Varningar och försiktighetsåtgärder**.

Utgivningsdatum

16 August 2005 (RE7113-K/CE/UK) (Form 711rev- 17/06/04).

Epitope Retrieval Solutions

Produkt nr.: RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121, RE7122

Tilsigtet anvendelse

Til in vitro diagnostisk anvendelse.

Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 og RE7122 er beregnet til varmeinduceret epitopgenfindning 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 epitopgenfindning 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 epitopgenfindning ved anvendelse af varme begyndte i 1991 med rapporten af Shi et al.¹ Siden da er der publiceret talrige studier, der har beskæftiget sig med virkningen af epitopgenfindingsopløsninger, molaritet, pH og opvarmningsmetoder.² En universel varmeinduceret epitopgenfindningsteknik 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 epitopgenfindning anbefales ikke for alle antistoffer (se **Anbefalinger vedrørende anvendelse** for det primære antistof). De optimale betingelser for epitopgenfindning 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	Citratbaseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 l	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	EDTA-baseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel
RE7117 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 l	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Tris/EDTA-baseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel
RE7121 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 l	

Rekonstituering, blanding, fortynding, titrering

Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 og RE7121 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.

Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 og RE7122 er forfortyndede. Rekonstituering, blanding, fortynding eller titrering af disse reagenser anbefales ikke. 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.novocastra.co.uk

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119), Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7121). Et datablad for materialesikkerhed kan fås efter anmodning eller er tilgængeligt på www.novocastra.co.uk
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.³

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. Trykkogger 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 trykkoggeren.**

2. Almindeligt laboratoriestyr 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, RE7117, RE7119 eller RE7121 fremstilles en brug opløsning ved fortynding af 1 del koncentrat med 9 dele deioniseret vand. Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 eller RE7122 er fortyndede og kræver ikke fortynding inden brug.

2. Opvarm 1,5 l af brug opløsningen til kogepunktet i en trykkogger. Læg låget på uden at låse det. Placer objektglassene i metalfarvningsstativerne (objektglassene må ikke stå for tæt, da der i så fald kan forekomme ujævn farvning), og sænk dem ned i trykkoggeren idet det sikres, at objektglassene er fuldstændig nedsænket i genfindingsopløsningen. Lås låget.

3. Når trykkoggeren 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. Trykkoggeren 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. Forsæt 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 reagensnedbrydning⁴. Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede positive kontrolvæv. Hvis den positive vævskontrol ikke udviser positiv farvning, skal resultater af testprøverne kasseres.

Negativ vævskontrol

Skal undersøges efter den positive vævskontrol for at sikre, at det primære antistof mærker måltantigenet specifikt. Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede negative kontrolvæv. Alternativt frembyder de mange forskellige cellyper, 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. Spørisksk farvning af bindevæv kan ligeledes observeres i vævssnit af væv, der er fikseret for kraftigt i formalin. Anvend intakte celler til fortolkning af farvningsresultaterne. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte mere uspecifikt.⁵ Der kan eventuelt ses falske positive resultater, der skyldes non-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. Dette kan ligeledes skyldes endogene enzymer, såsom pseudoperoxidase (erythrocytter), endogen peroxidase (cytochrom C) eller endogent biotin⁶ (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre). For at differentiere mellem endogen enzymaktivitet eller uspecifik enzymbinding og specifik immunreaktivitet kan yderligere patientvæv eventuelt farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen, 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 uregelmæssigheder indeholdt i vævet.⁷ For kraftigt 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, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 og RE7122 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. 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.

Rettelser til tidligere udgave

Der er tilføjet ny information i afsnittet **Advarsler og forholdsregler**.

Udgivelsesdato

16 August 2005 (RE7113-K/CE/UK) (Form711rev-17/06/04).

Epitope Retrieval Solutions

Κωδικοί ειδών: RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121, RE7122

Χρήση για την οποία προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Τα Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 και RE7122 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.¹ Έκτοτε, έχουν δημοσιευτεί πολυάριθμες μελέτες που εξετάζουν τις επιδράσεις των διαλυμάτων ανάκτησης επιτόπου, της μοριακότητας, του pH και των μεθόδων θέρμανσης.² Δεν υπάρχει μια γενική τεχνική θερμικά επαγόμενης 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 αντιβήματος). 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	Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση κητρικά που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L	Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση το EDTA που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα
RE7117 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L	Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση το Tris/EDTA που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα
RE7121 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L	

Ανασύσταση, ανάμιξη, αραίωση, τιπλοδότηση

Τα Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 και RE7121 απαιτούν αραίωση με απιονισμένο νερό για την παρασκευή διαλυμάτων εργασίας (δείτε την ενότητα **Μεθοδολογία**). Περαιτέρω αραίωση ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα απώλεια χρώσης του αντιγόνου. Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει τυχόν τέτοια αλλαγή.

Τα Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 και RE7122 είναι προαραιωμένα. Δε συνιστάται ανασύσταση, ανάμιξη, αραίωση ή τιπλοδότηση των αντιδραστηρίων αυτών. Περαιτέρω αραίωση ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα απώλεια χρώσης του αντιγόνου. Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει τυχόν τέτοια αλλαγή.

Φύλαξη και σταθερότητα

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

Παρασκευή δείγματος

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

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

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.novocastra.co.uk

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119), Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7121). Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού διατίθεται κατόπιν αιτήματος ή από τη διεύθυνση www.novocastra.co.uk

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 μετδόσης λοίμωξης και να απορρίπτονται με κατάλληλες προφυλάξεις.³

Μην αναρροφάτε ποτέ με πιπέτα τα αντιδραστήρια ή 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

1. Ατμοκλιβάνο πίεσης από ανοξείδωτο χάλυβα (συνιστάται η αλλαγή των παρεμβυσμάτων σε τακτικά διαστήματα για τη διατήρηση των βέλτιστων συνθηκών αποκάλυψης). Για να διασφαλιστεί η ασφαλής και η σωστή χρήση του ατμοκλιβάνου πίεσης, οι χρήστες πρέπει να διαβάσουν τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2. Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός ανοσοϊστοχημείας.

Γ. Μεθοδολογία

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

Ο συνδυασμός του πρωτοταγούς αντισώματος, της αραίωσης 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.

1. Εάν χρησιμοποιείτε τα Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 ή RE7121, παρασκευάστε ένα διάλυμα εργασίας με αραίωση 1 μέρους συμπυκνωμένου με 9 μέρη απιονισμένου νερού. Τα Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 ή RE7122 είναι προαραιωμένα και δεν απαιτούν αραίωση πριν από τη χρήση.

2. Θερμάνετε μέχρι βρασμού 1,5 L του διαλύματος εργασίας σε ατμοκλιβάνο 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 ανομοιομορφία χρώση) και χαμηλώστε μέσα στον ατμοκλιβάνο πίεσης, διασφαλίζοντας ότι οι αντικειμενοφόροι πλάκες είναι εντελώς εμβαπτισμένες σε διάλυμα ανάκτησης. Ασφαλίστε το καπάκι.

3. Όταν ο ατμοκλιβάνος 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).

4. Αφαιρέστε τον ατμοκλιβάνο πίεσης από την πηγή θερμότητας και αφήστε να τρέξει πάνω του κρύο νερό χωρίς να αφαιρέσετε το καπάκι. **ΜΗΝ ΑΝΟΙΞΕΤΕ ΤΟ ΚΑΠΑΚΙ ΠΡΟΤΩ Ο ΔΕΙΚΤΗΣ ΔΕΙΞΟΥΝ ΟΤΙ ΕΧΕΙ ΑΠΕΛΥΘΕΡΩΘΕΙ Η ΠΙΕΣΗ.** Ανοίξτε το καπάκι, αφαιρέστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες και τοποθετήστε τις αμέσως σε κρύο νερό βρύσης.

5. 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 επιπλέον των ακόλουθων 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 βέλτοιο 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 συνδεδετικού ιστού σε τομές από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με υπερβολική ποσότητα φορμόλης. Χρησιμοποιείτε θήκικα 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 δεσμεύσης των πρωτεϊνών των προϊόντων αντίδρασης του υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδοεπιπεραξιδόση (εμβροκυκίταρα), η ενδογενής υπερξειδοείδση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη⁶ (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός). Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δεσμεύσης των ενζύμων από ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπλέον ιστού ασθενών με υποστρώμα-χρωμόγονο, στρεπταβιδίνη-HRP ή σημειωμένο πολυμερές και υπόστρωμα-χρωμόγονο, αντίστοιχα. Εάν παρουσιαστεί ειδική χρώση στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενούς θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Αρνητικός μάρτυρας αντιδραστηρίου

Χρησιμοποιείται 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 χρωμασμένα δείγματα ασθενούς. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκμιάται στα πλαίσια τυχόν μη ειδικής χρώσης υποβάθρου του αρνητικού μάρτυρα αντιδραστηρίου. Όπως συμβαίνει με οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική εξέταση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα

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

Περιορισμοί

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

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

Τυχόν υπερβολική ή ατελής αντιχρώση ενδέχεται να 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, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 και RE7122 έχει επικυρωθεί με χρήση μιας σειράς πρωτοταγών αντισωμάτων IgG ποντικού, IgM ποντικού και IgG κουνελιού Novocastra™.

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

Βιβλιογραφία

1. Shi S-R, Key RE and Kalra KL. Nuclear 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. 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.

Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Νέες πληροφορίες έχουν προστεθεί στην ενότητα **Προειδοποίηση και προφυλάξεις**.

Ημερομηνία έκδοσης

16 August 2005 (RE7113-K/CE/UK) (Form 711rev- 17/06/04).

Epitope Retrieval Solutions

Productnr.s.: RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121, RE7122

Beoogd gebruik

Voor diagnostisch gebruik in-vitro.

De Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 en RE7122 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 verwarming². 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	Op citraat gebaseerde buffer met daarin surfactans
RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 l	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	Op EDTA gebaseerde buffer met daarin surfactans
RE7117 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 l	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	Op tris/EDTA gebaseerde buffer met daarin surfactans
RE7121 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml	
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 l	

Reconstitutie, mengen, verdunnen, titreren

De Epitope Retrieval Solutions (x10 Concentrate) RE7113, RE7114, RE7116, RE7117, RE7119 en RE7121 moeten worden verdund met gedemineraliseerd water om werkoplossingen te maken (zie **Methodologie**). Verder verdunnen leidt mogelijk tot verlies aan antigeenkleuring. De gebruiker moet eventuele wijzigingen valideren.

De Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 en RE7122 zijn voorverdund. Reconstitutie, mengen, verdunnen of titreren van deze reagentia wordt niet aanbevolen. Verder verdunnen leidt mogelijk tot verlies aan antigeenkleuring. De gebruiker moet eventuele wijzigingen valideren.

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.

Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1L (RE7119), Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml (RE7121). Op verzoek is een veiligheidsinformatieblad leverbaar dat ook kan worden gedownload van www.novocastra.co.uk

Beroepsmatig gebruik.

Voor en na fixatie moeten specimen en alle eraan blootgestelde materialen worden behandeld alsof ze infectieus zijn; daarom moeten ze ook met de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd³.

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

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

Procedure

A. Benodigde maar niet geleverde reagentia

Zie de Gebruiksaanwijzing voor primair antilichaam.

B. Benodigde maar niet geleverde apparatuur

1. Roestvrijstaal 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 epitooptretrieval, 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, RE7117, RE7119 of RE7121 moet een werkoplossing worden bereid door verdunning van 1 deel concentraat met 9 delen gedemineraliseerd water. De Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 of RE7122 zijn voorverdund en hoeven voor gebruik niet verdund te worden.

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 kleuring⁴. Zie voor aanbevelen 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 aanbevelen negatief controleweefsel de Gebruiksaanwijzing voor primair antilichaam. Door de variëteit van verschillende cellypes 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 kleuringsresultaten. Necrotische of gedegenereerde cellen kleuren vaak niet-specifiek⁵. Niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten kan leiden tot vals-positieve resultaten. Zulke resultaten kunnen ook worden veroorzaakt door endogene enzymen als pseudoperoxidase (erythrocyten), endogeen peroxidase (cytochroom C) of endogeen biotine⁶ (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 controleereagens

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

Patiëntweefsel

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

Beperkingen

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

De kleuring van het weefsel is afhankelijk van de manier waarop het weefsel vóór de kleuring is behandeld en bewerkt. Het onjuist fixeren, invriezen, ontdoeien, 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 weefseigen afwijkingen⁷.

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, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 en RE7122 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. 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.

Wijzigingen ten opzichte van de voorgaande uitgave

Aan de paragraaf **Waarschuwingen en Voorzorgsmaatregelen** zijn nieuwe gegevens toegevoegd.

Datum van uitgave

16 August 2005 (RE7113-K/CE/UK) (formulier 711 rev- 17/06/04).

Epitope Retrieval Solutions

Čísla výrobků: RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121, RE7122

Zamýšlené použití

Pro diagnostické použití in vitro.

Roztoky k vyvolání epitopu Novocastra™ Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 a RE7122 jsou určeny k teplem indukovanému odmaskování epitopu na tkáňových řezech fixovaných formalínem a zalitých do parafínu, které je součástí imunohistochemického postupu. Klinická interpretace zabarvení či nezabarvení by měla být doplněna morfologickými studiemi 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 zahrívání 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 zahrívání 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 citrátů s obsahem povrchové aktivního činidla
RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Ready to Use) 1 l	
RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l	
RE7117 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 500 ml	Pufr na bázi EDTA s obsahem povrchové aktivního činidla
RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Ready to Use) 1 l	
RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l	
RE7121 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 500 ml	Pufr na bázi Tris/ EDTA s obsahem povrchové aktivního činidla
RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 l	

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 zabarvení antigenu. Každou takovou změnu musí uživatel validovat.

Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 a RE7122 jsou předem zředěny. Rekonstituce, míchání, ředění nebo titrace těchto činidel se nedoporučují. Další ředění může mít za následek ztrátu zabarvení 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 rezy 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.novocastra.co.uk

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.novocastra.co.uk

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 rádných bezpečnostních opatření.

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 zabarvení. 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 hrnec 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 laborator.

C. Metodologie

Před provedením těchto metod musí být uživatel vyškolen 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, RE7117, RE7119 nebo RE7121 připravte pracovní roztok zředěním 1 dílu koncentráty s 9 díly deionizované vody. Epitope Retrieval Solutions (Ready to Use) RE7115, RE7118 nebo RE7122 jsou předem naředěny a nevyžadují před použitím další ředění.

2. Zahříváte 1.5L pracovního roztoku až k bodu varu v tlakovém hrnci. Prikryjte víkem, ale víko neuzamykejte. Umístěte sklíčka do kovových stojanů (nedávejte sklíčka blízko vedle sebe, protože může dojít k nepravidelnému zabarvení) a ponořte je do tlakového hrnce tak, aby byly v odmaskovacím roztoku zcela ponořeny. Uzamkněte víko.

3. Jakmile tlakový hrnec 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 hrnec 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 detekčním systémem od výrobce.

Řízení jakosti

Rozdíly ve zpracování tkání a v technických postupech v laboratorii 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.

Pozitivní tkáňová kontrola

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

Negativní tkáňová kontrola

Negativní tkáňová kontrola by měla být provedena pro kontrolu pozitivní tkáni k ověření specificity označení cílového antigenu primární protilátkou. Doporučené tkáňe pro negativní kontrolu jsou uvedeny v Návodě k použití pro primární protilátku. 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 tkáňe 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.⁵ Falešné pozitivní výsledky lze pozorovat v důsledku neimunologického navázání proteinu nebo produktu reakce se substrátem. Mohou být způsobeny také endogenními enzymy, jako například pseudoperoxidázou (erytrocyty), endogenní peroxidázou (cytochrom C) nebo endogenním biotinem⁶ (např. játra, prs, mozek, ledvina). K odlišení aktivity endogenního enzymu nebo nespecifického navázání enzymů od specifické imunoreaktivity lze provést barvení další tkáňe 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 zbarvení a pro lepší interpretaci specifického zbarvení v místě antigenu použijte negativní kontrolu nespecifickým činidlem namísto primární protilátky s využitím rezu z každého vzorku pacienta.

Tkáň pacienta

Jako poslední vyhodnocujte zbarvené vzorky od pacienta. Intenzitu pozitivního zbarvení je třeba posuzovat v kontextu jakéhokoliv nespecifického zbarvení 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/tkáni 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.

Zbarvení 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 nepravidlostí tkáně.⁷

Rádnou interpretaci výsledků může ohrozit i nadměrné nebo neúplné kontrastní zbarvení.

Klinická interpretace jakéhokoliv zbarvení nebo jeho nepřítomnosti by měla být doplněna morfologickými studiemi s využitím řádných kontrola výsledky by měly být vyhodnoceny kvalifikovaným patologem v kontextu klinické historie pacienta a dalších diagnostických zkoušek. Roztoky k vyvolání epitopy 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, RE7115, RE7116, RE7117, RE7118, RE7119, RE7121 a RE7122 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, 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.

Změny oproti předchozímu vydání

Nepoužity.

Datum vydání

16. srpna 2005 (RE7113-K/CE/UK) (Form 711rev- 17/06/04).

