

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Product Code: RE7160-K

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



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

Instructions for Use

Please read before using this product.

Mode d'emploi

À lire avant d'utiliser ce produit.

Istruzioni per l'uso

Si prega di leggere, prima di usare il prodotto.

Gebrauchsanweisung

Bitte vor der Verwendung dieses Produkts lesen.

Instrucciones de uso

Por favor, leer antes de utilizar este producto.

Instruções de Utilização

Leia estas instruções antes de utilizar este produto.

Instruktioner vid Användning

Var god läs innan ni använder produkten.

Οδηγίες Χρήσης

Παρακαλούμε διαβάστε τις οδηγίες πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν αυτό.

Brugsanvisning

Læs venligst før produktet tages i brug.

Gebruiksaanwijzing

Lezen vóór gebruik van dit product.

Bruksanvisning

Vennligst les denne før du bruker produktet.

Kullanım Talimatları

Lütfen bu ürünü kullanmadan önce okuyunuz.

Инструкции за употреба

Моля, прочетете преди употреба на този продукт.

Használati utasítás

A termék használatba vétele előtt olvassa el.

Instruțiuni de utilizare

Citiți aceste instrucțiuni înainte de a utiliza produsul.

Инструкция по применению

Прочтите перед применением этого продукта.

Instrukcja obsługi

Przed użyciem tego produktu należy przeczytać instrukcję.

Navodila za uporabo

Preberite pred uporabo tega izdelka.

Návod k použití

Čtěte před použitím tohoto výrobku.

Návod na použitie

Prosím, prečítajte si ho pred použitím produktov.

Check the integrity of the packaging before use.

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

Prima dell'uso, controllare l'integrità della confezione. Vor dem Gebrauch die Verpackung auf Unversehrtheit überprüfen.

Comprobar la integridad del envase, antes de usarlo. Verifique a integridade da embalagem antes de utilizar o produto.

Kontrollera att paketet är obrutet innan användning. Ελέγξτε την ακεραιότητα της συσκευασίας πριν από τη χρήση.

Kontroller at pakken er ubeskadiget før brug. Controleer de verpakking vóór gebruik.

Sjekk at pakningen er intakt før bruk.

Kullanmadan önce ambalajın bozulmamış olmasını kontrol edin.

Проверете целостта на опаковката преди употреба.

Használat előtt ellenőrizze a csomagolás épségét. Verificați integritatea ambalajului înainte de a utiliza produsul.

Перед применением убедитесь в целостности упаковки.

Przed użyciem należy sprawdzić, czy opakowanie jest szczelne.

Pred uporabo preverite celovitost embalaže.

Před použitím zkontrolujte neporušenost obalu.

Pre použitím skontrolujte, či balenie nie je porušené.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Product No: RE7160-K

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) is intended for the enzymatic pretreatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections prior to incubation with a primary antibody in an immunohistochemical (IHC) procedure. This product can be used for epitope retrieval with Novocastra™ antibodies for which trypsin is recommended, known exceptions to this are: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p, and NCL-CYCLIN D1-GM. 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

Enzyme pretreatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections improves the staining of some antibodies by exposing epitopes within tissue that have been masked during fixation. The first proteolytic enzyme employed for epitope retrieval was trypsin.¹ Other proteolytic enzymes that can be used for this purpose include Protease XXIV and Pepsin.² More recently, proteinase K which is commonly used in in situ hybridization techniques has also been employed.

This product is used in an IHC procedure, which 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). Epitope retrieval by enzymatic pretreatment is recommended for a limited number of 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

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0.75 mL). Enzyme in 40% v/v glycerol containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, with 1 mM calcium acetate.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 mL). Tris-buffered saline, surfactant and 0.35% ProClin™ 950.
3. Empty dropper bottle.

Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K requires dilution in the Proteinase K Buffer RE7127 to prepare a working solution (see Proteinase K Working Solution). The user must validate any such change. 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

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Contains Proteinase K (<10%).

GHS08: Health hazard.

Signal words: Danger.

H334: May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.

P261: Avoid breathing dust/fumes/gas/mist/vapours/spray.

P284: [In case of inadequate ventilation] wear respiratory protection.

P304+P340: IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.

P342+P311: If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTRE or doctor.

P501: Dispose of contents/container to hazardous or special waste collection point.

A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from www.LeicaBiosystems.com

For Professional Users.

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

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

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

Procedure

A. Reagents required but not supplied

See primary antibody Instructions for Use

B. Equipment required but not supplied

General immunohistochemistry laboratory equipment.

C. Methodology

Prior to undertaking this methodology, users must be trained in immunohistochemical techniques and the use in combination of Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, primary antibody, its dilution, together with the detection system should be validated by the user on a series of known positive and negative controls.

Unless indicated, all steps are performed at room temperature (25 °C). The following steps should be undertaken prior to incubation with the primary antibody.

1. Wash slides in de-ionized water.
2. Incubate with Proteinase K Working Solution (see Proteinase K Working Solution) for 5 minutes.
3. Wash in TBS.
4. Proceed with IHC protocol according to manufacturers' Instructions for Use for the primary antibody and detection system.

Proteinase K Working Solution

Add 40 µL of Proteinase K Concentrate RE7126 to 6 mL of Proteinase K Buffer RE7127. Load solution into the dropper bottle provided.

The working solution is stable for up to 3 months when stored at 2–8 °C.

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 autopsies/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™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K is for use on paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Not all antigens require epitope retrieval. Optimum conditions for epitope retrieval should be validated by the user as these are dependant upon tissue, fixation and/or primary antibody. 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™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K has been validated using Novocastra™ primary antibodies for which trypsin is the recommended retrieval technique. This product is stable up to the expiry date indicated on the product label.

Bibliography

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7: 161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Amendments to Previous Issue

Warnings and Precautions.

Date of Issue

10 September 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Référence du produit : RE7160-K

Utilisation prévue

Diagnostic in vitro.

Le Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K est destiné au prétraitement enzymatique des coupes tissulaires, fixées au formol, incluses en paraffine, avant incubation avec un anticorps primaire dans le cadre d'une procédure immunohistochimique (IHC). Ce produit peut être utilisé pour la restauration des épitopes avec les anticorps Novocastra™ pour lesquels la trypsine est recommandée, à l'exception de, NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-III, et NCL-CYCLIN D1-GM. 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

Le prétraitement enzymatique des coupes tissulaires fixées au formol, incluses en paraffine, améliore le marquage de certains anticorps en exposant les épitopes présents dans les tissus qui ont été masqués au cours de la fixation. La première enzyme protéolytique employée pour la restauration des épitopes a été la trypsine.¹ D'autres enzymes protéolytiques, la protéase XXIV et la pepsine peuvent être utilisées dans ce but.² Plus récemment, la protéinase K, qui est couramment utilisée dans le cadre des techniques d'hybridation in situ, a également été employée.

Ce produit est utilisé dans le cadre d'une procédure 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 des épitopes par prétraitement enzymatique est recommandée pour un nombre limité d'anticorps (voir 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

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzyme dans du glycérol 40% v/v contenant du Tris-HCl, 10 mM, à 7,5 de pH, avec de l'acétate de calcium 1 mM.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Solution saline tamponnée de Tris, surfactant et ProClin™ 950 à 0,35 %
3. Flacon compte-gouttes vide.

Reconstitution, Mélange, Dilution, Titrage

Le Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K nécessite une dilution dans le Proteinase K Buffer RE7127 pour préparer une solution de travail (voir Solution de travail de Protéinase K). Toute modification de ce type doit être validée par l'utilisateur. 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

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Contient et Proteinase K
(<10%).

GHS08: Danger pour la santé.

Mentions d'avertissement:
Danger.

H334: Peut provoquer des
symptômes allergiques ou d'asthme
ou des difficultés respiratoires par
inhalation.

P261: Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/
brouillards/vapeurs/aérosols.

P284: [Lorsque la ventilation du local est insuffisante] porter
un équipement de protection respiratoire.

P304+P340: EN CAS D'INHALATION: transporter la
personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où
elle peut confortablement respirer.

P342+P311: En cas de symptômes respiratoires: appeler un
CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P501: Éliminer le contenu/réceptacle dans un centre de
collecte des déchets dangereux ou spéciaux.

Une Fiche de données de sécurité est disponible sur demande ou sur le site www.LeicaBiosystems.com

Pour Utilisateurs Professionnels.

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

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

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

Procédure

A. Réactifs nécessaires mais non fournis

Voir le Mode d'emploi de l'anticorps primaire

B. Equipements nécessaires mais non fournis

Equipements généraux d'un laboratoire d'immunohistochimie.

C. Méthodologie

Avant d'utiliser cette méthodologie, les utilisateurs doivent avoir été formés aux techniques immunohistochimiques et l'emploi en association de l'Enzyme Protéinase K (IHC) RE7160-K, de l'anticorps primaire, sa dilution, et le système de détection doit être validé par l'utilisateur sur une série de contrôles négatifs et positifs connus

Sauf mention contraire, toutes les étapes sont réalisées à température ambiante (25 °C). Les étapes suivantes doivent être mises en œuvre avant l'incubation avec l'anticorps primaire.

1. Laver les lames à l'eau désionisée.
2. Incuber avec la solution de travail Protéinase K (voir Solution de travail de Protéinase K) pendant 5 minutes.
3. Laver dans du TBS.
4. Mettre en œuvre le protocole IHC conformément aux Mode d'emploi fourni par le fabricant pour l'anticorps primaire et le système de détection.

Solution de travail Protéinase K

Ajouter 40 µL de Protéinase K Concentrate RE7126 à 6 ml de Protéinase K Buffer RE7127. Charger la solution dans le flacon compte-gouttes fourni.

La solution de travail est stable pendant 3 mois si elle est conservée à 2–8 °C.

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 négatif, mais ils doivent être vérifiés par un marquage fortement positif et il permet de détecter de moindres niveaux de dégradation du réactif. 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.

Le Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K doit être utilisé sur des coupes incluses en paraffine avec des exigences spécifiques en matière de fixation. Tous les antigènes ne nécessitent pas une restauration des épitopes. Les conditions optimales de restauration de l'épitope doivent être validées par l'utilisateur car elles sont dépendantes du tissu, de la fixation et/ou de l'anticorps primaire. Une expression antigénique inattendue est susceptible de se produire, en particulier au niveau des néoplasmes. L'interprétation clinique de toute coupe tissulaire marquée doit comporter une analyse morphologique et l'évaluation des contrôles appropriés.

Caractéristiques de performance

Les performances du Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K ont été validées à l'aide d'anticorps primaires Novocastra™ pour lesquels la trypsine constitue la technique de restauration recommandée. Ce produit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit.

Bibliographie

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
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.

Amendements apportés à la version précédente

Mises en garde et Précautions.

Date de publication

10 septembre 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Cod. prodotto: RE7160-K

Uso previsto

Per uso diagnostico in vitro.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K è destinato all'uso nel pretrattamento enzimatico di sezioni tissutali fissate in formalina e incluse in paraffina, prima dell'incubazione con un anticorpo primario, nel corso di una tecnica immunocitochimica (IHC). Questo prodotto può essere impiegato per lo smascheramento degli epitopi con anticorpi Novocastra™, per il quale si raccomanda l'uso di tripsina. Eccezioni note sono rappresentate da , NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p, e NCL-CYCLIN D1-GM. 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

Il pretrattamento enzimatico di sezioni tissutali fissate in formalina e incluse in paraffina, migliora la colorazione di alcuni anticorpi, esponendo gli epitopi presenti nel tessuto e mascherati durante la fissazione. Il primo enzima proteolitico impiegato per lo smascheramento degli epitopi è stato la tripsina.¹ Altri enzimi proteolitici che possono essere impiegati a tale scopo sono, ad esempio, la proteasi XXIV e la pepsina.² Più recentemente, è stata utilizzata anche la proteinasi K, comunemente impiegata nelle tecniche di ibridazione in situ.

Questo prodotto viene impiegato nel corso di una tecnica 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 dopo pretrattamento enzimatico è consigliato per un numero limitato di 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

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzima in glicerolo 40% v/v contenente 10 mM di Tris-HCl, a pH 7,5, con 1 mM di calcio acetato.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Tampone Tris, surfattante e 0,35% di ProClin™ 950.
3. Flaconcino contagocce vuoto.

Ricostituzione, miscelazione, diluizione, titolazione

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K richiede la diluizione in Proteinase K Buffer RE7127 per la preparazione di una soluzione di lavoro (vedere Soluzione di lavoro Proteinase K). Tali eventuali variazioni devono essere convalidate dall'utente. 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

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Contiene e Proteinase K
(<10%).

GHS08: Pericolo per la salute.

Avvertenze: Pericolo.

H334: Può provocare sintomi
allergici o asmatici o difficoltà
respiratorie se inalato.

P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i
vapori/gli aerosol.

P284: [Quando la ventilazione del locale è insufficiente]
indossare un apparecchio di protezione respiratoria.

P304+P340: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare
l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in
posizione che favorisca la respirazione.

P342+311: In caso di sintomi respiratori: contattare un
CENTRO ANTIVELENI o un medico.

P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un punto di raccolta
rifiuti pericolosi o speciali.

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

Per Uso Professionale.

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

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

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

Procedura

A. Reagenti necessari ma non forniti

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

B. Attrezzature necessarie ma non fornite

1. Attrezzatura di base del laboratorio di immunostochimica.

C. Metodologia

Prima di intraprendere questa metodologia, l'utente deve aver acquisito esperienza con le tecniche immunostochimiche e l'uso in combinazione di Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, dell'anticorpo primario, la sua diluizione, assieme al sistema di determinazione vanno convalidati dall'utente su una serie di controlli positivi e negativi noti.

Se non indicato diversamente, tutte le fasi vanno condotte a temperatura ambiente (25 °C). Effettuare le seguenti operazioni prima dell'incubazione con l'anticorpo primario.

1. Lavare i vetrini con acqua deionizzata.
2. Incubare con soluzione di lavoro Proteinase K (vedere Soluzione di lavoro Proteinase K) per 5 minuti.
3. Lavare in TBS.
4. Procedere con il protocollo IHC, seguendo le istruzioni per l'uso del fabbricante per l'anticorpo primario e per il sistema di determinazione.

Soluzione di lavoro Proteinase K

Aggiungere 40 µL di Proteinase K Concentrate RE7126 a 6 ml di Proteinase K Buffer RE7127. Caricare la soluzione nel flaconcino contagocce fornito.

La soluzione di lavoro rimane stabile fino a 3 mesi, se conservata a 2–8 °C.

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 dei 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'immunoattività 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'immunistoichimica 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™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K è destinato all'uso su sezioni tissutali incluse in paraffina con specifici requisiti di fissazione. Non tutti gli antigeni richiedono smascheramento degli epitopi. Le condizioni ottimali per lo smascheramento degli epitopi vanno convalidate dall'utente, poiché dipendono dal tessuto, dalla fissazione e/o dall'anticorpo primario. 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™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K è stato convalidato utilizzando anticorpi primari Novocastra™ per i quali la tripsina è la tecnica di smascheramento raccomandata. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Riferimenti bibliografici

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Modifiche alla pubblicazione precedente

Non applicabile.

Data di pubblicazione

10 settembre 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Produkt Nr.: RE7160-K

Verwendungszweck

Für in-vitro-Diagnostik.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K ist für die enzymatische Vorbehandlung formalinfixierter, paraffineingebetteter Gewebeschnitte vor der Inkubation mit einem primären Antikörper in einem immunhistochemischen (IHC-) Verfahren bestimmt. Dieses Produkt kann für die Epitopdemaskierung mit Novocastra™ Antikörpern, für die Trypsin empfohlen wird, verwendet werden. Bekannte Ausnahmen sind , NCL-BrU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-Ilp, und NCL-CYCLIN D1-GM. 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 Enzymvorbehandlung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verbessert die Färbung einiger Antikörper durch die Freilegung von Epitopen in Geweben, die während der Fixierung maskiert wurden. Das erste für die Epitopdemaskierung verwendete proteolytische Enzym war Trypsin.¹ Andere proteolytische Enzyme, die für diesen Zweck verwendet werden können, sind Protease XXIV und Pepsin.² In jüngerer Zeit ist außerdem Proteinase K, die gewöhnlich bei Techniken zur in-situ-Hybridisierung verwendet wird, eingesetzt worden.

Dieses Produkt wird in einem IHC-Verfahren verwendet, das den qualitativen Nachweis von Antigenen in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebeschnitten in mehreren aufeinander folgenden Schritten mit dazwischen liegenden Waschschritten mittels Lichtmikroskopie gestattet (die Verfahrensgrundlage der IHC-Färbung ist in den Gebrauchsanweisungen des entsprechenden Nachweissystems beschrieben). Die Epitopdemaskierung durch enzymatische Vorbehandlung wird für eine begrenzte Zahl von Antikörpern 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.

Gelieferte Reagenzien

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzym in 40 Vol.-% Glycerol, das 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5 mit 1 mmol/l Kalziumazetat enthält.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung, oberflächenaktive Substanz und 0,35% ProClin™ 950.
3. Leere Tropfflasche.

Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K muss zur Vorbereitung einer Arbeitslösung im Proteinase K Buffer RE7127 verdünnt werden (siehe Proteinase K-Arbeitslösung). Der Benutzer muss solche Änderungen zuvor validieren. 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

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Enthält und Proteinase K
(<10%).
GHS08: Gesundheitsgefahr.
Signalwörter: Gefahr.

H334: Kann bei Einatmen Allergie,
asthmaartige Symptome oder
Atembeschwerden verursachen.

P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/
Aerosol vermeiden.

P284: [Bei unzureichender Belüftung] Atemschutz tragen.
P304+P340: BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft
bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
P342+311: Bei Symptomen der Atemwege:
GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P501: Inhalt/Behälter zu einer Problemabfallentsorgung
zuführen.

Ein Material Sicherheits-Datenblatt ist auf Anfrage von www.LeicaBiosystems.com erhältlich.

Für geschultes Fachpersonal.

Vor und nach der Fixierung sind die Proben sowie alle Materialien, die mit ihnen in Kontakt gekommen sind, als potentiell infektiös zu behandeln und daher mit entsprechender Vorsicht zu entsorgen.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 entsprechenden nationalen und lokalen Bestimmungen und Vorschriften zur Entsorgung potentiell giftiger Komponenten sind einzuhalten.

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

Verfahren

A. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Reagenzien

Siehe Gebrauchsanweisungen des primären Antikörpers.

B. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Ausrüstung

1. Allgemeine immunhistochemische Laborausstattung.

C. Vorgehensweise

Vor Anwendung dieser Vorgehensweise müssen die Benutzer mit immunhistochemischen Techniken vertraut sein. Die Kombination aus Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, dem primären Antikörper und seiner Verdünnung zusammen mit dem Nachweissystem ist vom Benutzer auf einer Reihe bekannter positiver und negativer Kontrollen zu validieren.

Sofern nicht anderweitig vorgegeben, werden alle Schritte bei Raumtemperatur (25 °C) durchgeführt. Die folgenden Schritte sind vor der Inkubation mit dem primären Antikörper durchzuführen.

1. Die Objektträger unter entionisiertem Wasser abspülen.
2. Mit Proteinase K-Arbeitslösung (siehe Proteinase K-Arbeitslösung) 5 Minuten lang inkubieren.
3. In TBS waschen.
4. Anschließend mit dem IHC-Protokoll gemäß den Gebrauchsanweisungen des Herstellers für den primären Antikörper und das Nachweissystem fortfahren.

Proteinase K-Arbeitslösung

40 µL Proteinase K Concentrate RE7126 zu 6 ml Proteinase K Buffer RE7127 hinzugeben. Die Lösung in die mitgelieferte Tropfflasche einfüllen.

Die Arbeitslösung bleibt bei Lagerung bei 2–8 °C bis zu 3 Monate lang stabil.

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 ungültig betrachtet werden.

Negative Gewebekontrolle

Die negative Gewebekontrolle sollte nach der positiven Gewebekontrolle erfolgen, um die Spezifität der Zielantigenmarkierung durch den primären Antikörper zu verifizieren. Informationen über das empfohlene negative Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden. Alternativ bietet die Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen, die in den meisten Gewebeschnitten vorliegen, häufig Stellen für eine negative Kontrolle. Jedoch sollte dies vom Benutzer verifiziert werden. Liegt eine unspezifische Färbung vor, hat diese gewöhnlich ein diffuses Erscheinungsbild. Eine sporadische Färbung des Bindegewebes kann ebenfalls in Schnitten von übermäßig formalinfixierten Geweben beobachtet werden. Zur Bewertung der 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 Pseudoperoxidase (Erythrozyten), endogene Peroxidase (Zytochrom C) oder endogenes Biotin⁶ (beispielsweise Leber, Mamma, Gehirn, Niere) hervorgerufen werden. Um eine endogene Enzymaktivität bzw. eine unspezifische Enzymbindung von einer spezifischen Immunreaktivität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substratchromogen, Streptavidin-HRP bzw. markiertem Polymer plus Substratchromogen gefärbt werden. Falls im negativen Kontrollgewebe eine spezifische Färbung auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

Negative Reagenzkontrolle

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

Patientengewebe

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

Beschränkungen

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

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

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™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K ist zur Verwendung auf paraffineingebetteten Schnitten mit spezifischen Fixierungsanforderungen bestimmt. Nicht alle Antigene erfordern eine Epitopdemaskierung. Da die optimalen Bedingungen für die Epitopdemaskierung vom Gewebe, von der Fixierung und/oder vom primärem Antikörper abhängen, sind sie vom Benutzer zu validieren. 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 von Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K wurde mithilfe primärer Novocastra™ Antikörper, für die Trypsin die empfohlene Demaskierungstechnik darstellt, validiert. Dieses Produkt bleibt bis zum auf dem Behälteretikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Literatur

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen.

Ausgabedatum

10 September 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Referencia: RE7160-K

Indicaciones de uso

Para uso diagnóstico in vitro.

El producto Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K está indicado para el tratamiento enzimático de secciones de tejido fijadas con formol e incluidos en parafina, antes de la incubación con un anticuerpo primario, en un proceso inmunohistoquímico. Este producto se puede usar para recuperar los epítomos con anticuerpos Novocastra™ para los que se recomienda tripsina; excepciones conocidas a esta circunstancia son, NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-Ip, y NCL-CYCLIN D1-GM. 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

El tratamiento enzimático previo de secciones de tejido fijadas con formol e incluidos en parafina mejora la tinción de algunos anticuerpos, al exponer los epítomos presentes en el tejido que se han enmascarado durante la fijación. La primera enzima proteolítica empleada en la recuperación de los epítomos fue la tripsina.¹ Otras enzimas proteolíticas que se pueden usar con esta finalidad son la proteasa XXIV y la pepsina.² Recientemente, se ha utilizado también habitualmente la proteinasa K en las técnicas de hibridación in situ.

Este producto se usa en un procedimiento de inmunohistoquímica, lo que permite la identificación cualitativa, mediante microscopía óptica, de antígenos en cortes fijados con formol e incluidos en parafina, mediante pasos secuenciales, con pasos intermedios de lavado (vea el Principio del método de tinción inmunohistoquímica en las instrucciones de uso del sistema de detección adecuado). La recuperación de los epítomos mediante tratamiento enzimático previo se recomienda para unos pocos anticuerpos (consulte las Recomendaciones de uso del anticuerpo primario). Las condiciones óptimas para la recuperación de los epítomos deberán ser validadas por el usuario, ya que dependen del tejido, la fijación o el anticuerpo primario.

Reactivos suministrados

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzima en glicerol al 40% v/v, que contiene Tris-HCl 10 mM, a pH 7,5, con acetato cálcico 1 mM.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Solución salina tamponada con Tris, agente tensioactivo y ProClin™ 950 al 0,35%.
3. Frasco gotero vacío.

Reconstitución, mezclado, dilución y titulación

Es necesario diluir Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K en Proteinase K Buffer RE7127 para preparar la solución de trabajo (vea la Solución de trabajo de Proteinase K). El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo. Una mayor dilución puede provocar la pérdida de tinción del antígeno. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo.

Almacenamiento y estabilidad

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

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Contiene y Proteinase K (<10%).

GHS08: Peligro para la salud.

Palabras de advertencia:
Peligro.

H334: Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.

P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P284: [En caso de ventilación insuficiente,] llevar equipo de protección respiratoria.

P304+P340: EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración.

P342+311: En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.

P501: Eliminar el contenido/el recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.

Está disponible una Hoja de información sobre la seguridad del material, previa petición, o en www.LeicaBiosystems.com

Para usuarios profesionales.

Las muestras, antes y después de ser fijadas, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como capaces de transmitir una infección, y deberán eliminarse tomando las precauciones adecuadas.³

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

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

Reduzca al mínimo la contaminación microbiana de los reactivos; de lo contrario, podría producirse un aumento de la tinción no específica. Cualquier tiempo o temperatura de incubación que no sean los aquí especificadas 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

Equipo de laboratorio utilizado generalmente para inmunohistoquímica.

C. Metodología

Antes de utilizar esta metodología, los usuarios deben haber recibido formación en técnicas inmunohistoquímicas; su uso junto con Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, el anticuerpo primario, su dilución, junto con el sistema de detección, deberá ser validado por el usuario, en una serie de controles positivos y negativos conocidos.

A menos que se indique otra cosa, todos los pasos se llevan a cabo a temperatura ambiente (25 °C). Antes de la incubación con el anticuerpo primario se deben ejecutar los pasos siguientes.

1. Lave los portaobjetos en agua desionizada.
2. Incube con la solución de trabajo de Proteinase K (vea Solución de trabajo de Proteinase K) durante 5 minutos.
3. Lave con TBS.
4. Proceda con el protocolo de inmunohistoquímica conforme a las Instrucciones de uso del fabricante para el anticuerpo primario y del sistema de detección.

Solución de trabajo de Proteinase K

Añada 40 µl de Proteinase K Concentrate RE7126 a 6 ml de Proteinase K Buffer RE7127. Coloque la solución en el gotero que se suministra.

La solución de trabajo es estable durante un período de tres meses si se conserva a una temperatura de 2 –8 °C.

Control de calidad

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

Control tisular positivo

Se utiliza para indicar la preparación correcta de los tejidos y las técnicas de tinción adecuadas. Debe incluirse un control tisular positivo por cada conjunto de condiciones de ensayo y anticuerpo primario, en cada tinción o serie de tinciones realizada. Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado que un tejido con una tinción positiva intensa para un control de calidad óptimo y para detectar niveles bajos de degradación del reactivo.⁴ En cuanto al tejido de control 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 IHQ; e interpretación de los resultados de la tinción.

La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento del tejido previos a la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o seccionamiento incorrectos, o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede generar artefactos, atrapamiento del anticuerpo o falsos negativos. La aparición de resultados incoherentes puede deberse a variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, o a irregularidades inherentes al tejido.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 empleo del producto Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K está indicado en cortes incluidos en parafina, con requisitos de fijación específicos. No todos los antígenos requieren la recuperación de los epitopos. Las condiciones óptimas para la recuperación de los epitopos deberán ser validadas por el usuario, ya que dependen del tejido, la fijación y/o el anticuerpo primario.

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 Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K se ha validado con anticuerpos primarios Novocastra™ para los que la tripsina es la técnica de recuperación recomendada. Este producto es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto.

Bibliografía

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Correcciones a la publicación anterior

Advertencias y precauciones.

Fecha de publicación

10 de septiembre de 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

N.º do produto: RE7160-K

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos in vitro.

O produto Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K foi concebido para ser utilizado no pré-tratamento enzimático de secções de tecido fixadas em formol e envolvidas em parafina, antes da sua incubação com um anticorpo primário num procedimento imunohistoquímico (IHQ). Este produto pode ser empregado para a recuperação de epítomos com anticorpos Novocastra™, para o qual se recomenda a tripsina, com as seguintes excepções já estabelecidas: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p, e NCL-CYCLIN D1-GM. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos empregando os devidos controlos, e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico.

Princípio do procedimento

O pré-tratamento enzimático de secções de tecido fixadas em formol e envolvidas em parafina melhora o nível de coloração de alguns anticorpos, através da exposição de epítomos, contidos no tecido, os quais tinham permanecido dissimulados durante a fixação. A primeira enzima proteolítica empregada para a recuperação de epítomos foi a tripsina¹. Outras enzimas proteolíticas que se podem empregar para este fim incluem a Protease XXIV e a Pepsina². Mais recentemente também se tem empregado a Proteinase K, uma enzima normalmente utilizada em técnicas de hibridização in situ.

Este produto é utilizado em procedimentos de IHQ, os quais permitem a identificação qualitativa de antígenos, por microscopia óptica, em secções de tecido fixado com formalina e envolvido em parafina, através de etapas sequenciais intercaladas com etapas de lavagem (consultar as Instruções de utilização do sistema de detecção apropriado para obter informações sobre o princípio do procedimento da coloração IHQ). Recomenda-se a recuperação de epítomos por pré-tratamento enzimático para um número limitado de anticorpos (consultar a secção Recomendações sobre a utilização para obter informações sobre o 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

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzima em glicerina a 40% v/v contendo 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, com 1 mM de acetato de cálcio.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Soro tamponado com tris, um produto tenso-activo e ProClin™ 950 a 0,35%.
3. Frasco conta-gotas vazio.

Reconstituição, mistura, diluição, titulação

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K requer a diluição de Proteinase K Buffer RE7127 para a preparação de uma solução de trabalho (consultar a secção Solução de trabalho com protease K). O utilizador deve validar quaisquer alterações dessa natureza. 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

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Contém e Proteinase K
(<10%).

GHS08: Perigo para a saúde.

Palavras-sinal: Perigo.

H334: Quando inalado, pode
provocar sintomas de alergia ou de
asma ou dificuldades respiratórias.

P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/
vapores/aerossóis.

P284: [Em caso de ventilação inadequada] usar protecção
respiratória.

P304+P340: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa
para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que
não dificulte a respiração.

P342+311: Em caso de sintomas respiratórios: contacte
um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um
médico.

P501: Eliminar o conteúdo/recipiente em um local
autorizado para a recolha de resíduos perigosos ou
especiais.

Encontra-se disponível uma Ficha de Dados de Segurança do Material, mediante pedido ou através do site www.LeicaBiosystems.com

Apenas para utilizadores profissionais.

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

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

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

Procedimento

A. Reagentes necessários não fornecidos

Consultar as Instruções de utilização relativas ao anticorpo primário.

B. Equipamento necessário não fornecido

1. Equipamento geral de laboratório de imunohistoquímica.

C. Metodologia

Antes de adoptar esta metodologia, o utilizador deve receber formação em técnicas imunohistoquímicas, e a utilização combinada de Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, do anticorpo primário, e a sua diluição, juntamente com o sistema de detecção, devem ser validados pelo utilizador numa série de controlos positivos e negativos já conhecidos.

A não ser indicação em contrário, todas as etapas devem ser efectuadas à temperatura ambiente (25 °C). Devem adoptar-se as etapas que se seguem antes de se efectuar a incubação com o anticorpo primário.

1. Lavar as lâminas em água desionizada.
2. Incubar com a solução de trabalho de Proteinase K (consultar Solução de trabalho de Proteinase K) durante 5 minutos.
3. Lavar em TBS.
4. 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.

Solução de trabalho de Proteinase K

Adicionar 40 µl de Proteinase K Concentrate RE7126 a 6 ml of Proteinase K Buffer RE7127. Colocar a solução no frasco conta-gotas fornecido. A solução de trabalho permanece estável durante um máximo de 3 meses, se for armazenada a 2–8 °C.

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 tecido⁷.

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

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

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K serve para ser utilizado em secções envolvidas em parafina com requisitos especiais de fixação. Nem todos os antígenos requerem a recuperação de epítomos. 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. 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 da Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K foi validado através da utilização de anticorpos primários Novocastra™, para os quais a tripsina é a técnica de recomendação recomendada. Este produto é estável até ao prazo de validade indicado no seu rótulo.

Bibliografia

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline*. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Emendas da edição anterior

Avisos e precauções.

Data de emissão

10 de Setembro de 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Produkt nr.: RE7160-K

Avsedd användning

För in vitro diagnostisk användning.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K är avsedd för enzymatisk förbehandling av formalinfixerade paraffinbäddade vävnadssnitt före inkubation med en primär antikropp i en immunhistokemisk (IHC) procedur. Denna produkt kan användas för epitopativeringning med Novocastra™ antikroppar för vilka rekommenderas trypsin, kända undantag är , NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p, and NCL-CYCLIN D1-GM. 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

Enzymförbehandling av formalinfixerade paraffinbäddade vävnadssnitt förbättrar färgningen av vissa antikroppar genom att exponera epitopena inom vävnaden som har maskerats vid fixering. Den första proteolytiska enzymen som användes för epitopativeringning var trypsin.¹ Andra proteolytiska enzymer som kan användas i detta ändamål omfattar Protease XXIV och Pepsin.² På senare tid har Proteinase K som vanligtvis används för in situ hybridiseringstekniker också använts.

Denna produkt används i en 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). Epitopativeringning genom enzymatisk förbehandling rekommenderas för ett begränsat antal antikroppar (se primära antikroppar Rekommendationer vid användning). Optimala förhållanden för epitopativeringning bör kontrolleras av användaren eftersom dessa beror på vävnad, fixering och/eller primär antikropp.

Tillhandahållna reagens

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzym i 40 % v/v glycerol innehållande 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, med 1 mM kalcium acetat.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Trisbuffrad koksaltlösning med ytaktivt medel och 0,35 % ProClin™ 950.
3. Töm pipettflaska.

Rekonstitution, blandning, spädning, titrering

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K kräver spädning i Proteinase K Buffer RE7127 för att bereda en arbetslösning (se Proteinase K brukslösning). Användaren måste kontrollera sådana förändringar. Fortsatt spädning kan resultera i förlust av antigenfärgning. Användaren måste kontrollera sådana förändringar.

Förvaring och stabilitet

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

Preparation av prov

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

Varningar och försiktighetsåtgärder

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Innehåller och Proteinase K (<10%).

GHS08: Hälsöfara.

Signalord: Fara.

H334: Kan orsaka allergi- eller astmasymtom eller andningssvårigheter vid inandning.

P261: Undvik att andas damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej.

P284: [Vid otillräcklig ventilation], använd andningsskydd. P304+P340: VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att andningen underlättas.

P342+311: Vid besvär i luftvägarna: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.

P501: Innehållet/Behållaren lämnas till samlingsställe för farligt avfall.

Materialsäkerhetsdatablad finns att få på begäran eller från www.LeicaBiosystems.com

För professionella användare.

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

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

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

Procedur

A. Reagens som krävs men inte tillhandahålls

Se primär antikropp Instruktioner vid användning.

B. Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

Allmän immunhistokemisk laboratorieutrustning.

C. Metod

Innan denna metod används bör användare utbildas i immunhistokemiska tekniker och användningen i kombination med Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, primär antikropp, dess spädning, tillsammans med detektionssystemet bör kontrolleras av användaren med en serie kända positiva och

negativa kontroller.

Om inte annat anges utförs alla steg vid rumstemperatur (25 °C). Följande steg bör tas före inkubation med primär antikropp.

1. Tvätta objektglaset i avjoniserat vatten.
2. Inkuberar med Proteinase K brukslösning (se Proteinase K brukslösning) i 5 minuter.
3. Tvätta i TBS.
4. Fortsätt med IHC protokoll enligt tillverkarens instruktioner för Användning av primär antikropp och detektionssystem.

Proteinase K brukslösning

Tillsätt 40µl Proteinase K Concentrate RE7126 till 6ml Proteinase K Buffer RE7127. Ladda lösningen i pipettflaskan som medföljer.

Brukslösningen håller sig stabil i upp till 3 månader om den förvaras vid 2–8 °C.

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 ospecifikt.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 (erytrocyter), 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 substratkromogen. 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 bakgrunds färgning av den negativa reagenskontrollen. Som vid alla immunhistokemiska tester betyder ett negativt resultat att antigenet inte upptäcktes, inte att det inte förekom i de analyserade cellerna/vävnaderna. Använd vid behov en antikroppspanel för att identifiera falskt negativa reaktioner.

Begränsningar

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

Vävnadsfärgning är beroende av hantering och bearbetning av vävnaden före färgningen. Felaktig fixering, nedfrysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering med andra vävnader eller vätskor kan framställa artefakter, infångande av antikroppar eller falskt negativa resultat. Motsägelsefulla resultat kan bero på variationer av fixerings- och inbäddningsmetoder eller på naturliga oregelbundenheter inom vävnaden.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™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K är avsedd att användas på paraffinbäddade sektioner med specifika fixeringskrav. Det är inte alla antigen som kräver epitopativeringning. Optimala förhållanden för epitopativeringning bör kontrolleras av användaren eftersom dessa beror på vävnad, fixering och/eller primär antikropp. 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™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K prestanda har kontrollerats med Novocastra™ primära antikroppar för vilka trypsin är den rekommenderade återvinningstekniken. Denna produkt är stabil fram till utgångsdatumet på produktens etikett.

Bibliografi

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7: 161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Rättelser av tidigare utgivning

Varningar och försiktighetsåtgärder.

Utgivningsdatum

10 september 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Κωδικός είδους: RE7160-K

Χρήση για την οποία προορίζεται

Για in vitro διαγνωστική χρήση.

Το Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K προορίζεται για την ενζυμική προεπεξεργασία τομών ιστού μονιμοποιημένων με φορμόλη και εγκλεισμένων σε παραφίνη πριν από την επώαση με ένα πρωτοταγές αντίσωμα σε μια ανοσοϊστοχημική (IHC) διαδικασία. Το προϊόν αυτό είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για ανάκτηση επιτόπου με αντισώματα Novocastra™, για τα οποία συνιστάται η θρυψίνη. Γνωστές εξαιρέσεις σε αυτό είναι τα , NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-Ip, και NCL-CYCLIN D1-GM. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν ασωτούς μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογοανατόμο.

Αρχή της διαδικασίας

Η ενζυμική προεπεξεργασία τομών ιστού μονιμοποιημένων με φορμόλη και εγκλεισμένων σε παραφίνη βελτιώνει τη χρώση μερικών αντισωμάτων με έκθεση επιτόπων εντός του ιστού, οι οποίοι έχουν συγκαλυφθεί κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης. Το πρώτο πρωτεολυτικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για ανάκτηση επιτόπου ήταν η θρυψίνη.¹ Άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα που είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό περιλαμβάνουν την πρωτεάση XXIV και την πεψίνη.² Πιο πρόσφατα, έχει χρησιμοποιηθεί επίσης η πρωτεϊνάση K, η οποία χρησιμοποιείται συνήθως σε τεχνικές in situ υβρίδισμού.

Το προϊόν αυτό χρησιμοποιείται 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 παρεμβλλόμενα βήματα πλύσης (για την Αρχή της διαδικασίας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, δείτε τις οδηγίες χρήσης του κατάλληλου συστήματος ανίχνευσης). Ανάκτηση επιτόπου με ενζυμική προεπεξεργασία συνιστάται για περιορισμένο αριθμό αντισωμάτων (δείτε την ενότητα Συστάσεις για τη χρήση του πρωτοταγούς αντισώματος). Οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάκτηση επιτόπου πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη, καθώς αυτές εξαρτώνται από τον ιστό, τη μονιμοποίηση ή/και το πρωτοταγές αντίσωμα.

Παρεχόμενα αντιδραστήρια

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Ένζυμο σε 40% v/v γλυκερόλη που περιέχει 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, με 1 mM οξικό ασβέστιο.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα Tris, επιφανειοδραστικός παράγοντας και 0,35% ProClin™ 950.
3. Κενή σταγονομετρική φιάλη.

Ανασύσταση, ανάμιξη, αραίωση, τιτλοδότηση

Το Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K απαιτεί αραίωση στο Proteinase K Buffer RE7127 για την παρασκευή ενός διαλύματος εργασίας (δείτε την ενότητα Διάλυμα εργασίας της πρωτεϊνάσης K). Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει τυχόν τέτοια αλλαγή. 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

ENZYM PROTEINASE K CONCENTRATE

Περιέχει και Proteinase K (<10%).

GHS08: Κίνδυνος για την υγεία.

Προειδοποιητές λέξεις: Κίνδυνος.

H334: Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής.

P261: Αποφεύγετε να αναπνεύετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα.

P284: [Σε περίπτωση ανεπαρκούς αερισμού] χρησιμοποιείστε μέσα ατομικής προστασίας της αναπνοής. P304+340: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ: Μεταφέρατε τον παθόντα στον καθαρό αέρα κα αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή.

P342+311: Εάν παρουσιάζονται αναπνευστικά συμπτώματα: Καλέστε το KENTPO.

ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή ένα γιατρό.

P501: Διάθεση του περιεχομένου/περιέκτη σε χώρο συλλογής επικινδύνων ή ειδικών αποβλήτων.

Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού διατίθεται κατόπιν αιτήματος ή από τη διεύθυνση www.LeicaBiosystems.com

Για επαγγελματίες χρήστες.

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

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

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

Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός ανοσοϊστοχημείας.

Γ. Μεθοδολογία

Πριν από την εφαρμογή της μεθοδολογίας αυτής, οι χρήστες πρέπει εκπαιδευτούν σε ανοσοϊστοχημικές τεχνικές και η χρήση σε συνδυασμό του Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, του πρωτοταγούς αντισώματος, της αραίωσής του, μαζί με το σύστημα ανίχνευσης πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη σε σειρά γνωστών θετικών και αρνητικών μαρτύρων.

Εκτός εάν υποδεικνύεται διαφορετικά, όλα τα βήματα εκτελούνται σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Τα ακόλουθα βήματα πρέπει να εκτελούνται πριν από την επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα.

1. Πλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με αποιονισμένο νερό.
2. Επώαστε με διάλυμα εργασίας της πρωτεΐνωσης K (δείτε την ενότητα Διάλυμα εργασίας της πρωτεΐνωσης K) επί 5 λεπτά.
3. Πλύνετε σε TBS.
4. Προχωρήστε με το πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας (IHC) σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης των κατασκευαστών για το πρωτοταγές αντίσωμα και το σύστημα ανίχνευσης.

Διάλυμα εργασίας της πρωτεΐνωσης K

Προσθέστε 40 μl του Proteinase K Concentrate RE7126 σε 6 ml του Proteinase K Buffer RE7127. Γεμίστε τη σταγονομετρική φιάλη που παρέχεται με το διάλυμα.

Το διάλυμα εργασίας είναι σταθερό επί έως ³ μήνες εφόσον φυλάσσεται στους 2–8 °C.

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

Θετικός μάρτυρας ιστού

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

Αρνητικός μάρτυρας ιστού

Θα πρέπει να εξετάζεται μετά τον θετικό μάρτυρα ιστού για την επαλήθευση της ειδικότητας της επισήμανσης του αντιγόνου-στόχου από το πρωτοταγές αντίσωμα. Για το συνιστώμενο ιστό αρνητικού μάρτυρα, δείτε τις οδηγίες χρήσης του πρωτοταγούς αντισώματος. Εναλλακτικά, η ποικιλία διαφόρων κυτταρικών τύπων που υπάρχουν στις περισσότερες τομές ιστών παρέχει συχνά θέσεις αρνητικού μάρτυρα, αλλά αυτό πρέπει να επαληθεύεται από το χρήστη. Μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, έχει συνήθως διάχυτη εμφάνιση. Ενδέχεται επίσης να παρατηρηθεί σποραδική χρώση του συνδετικού ιστού σε τομές από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με υπερβολική ποσότητα φορμόλης. Χρησιμοποιείτε άθικτα κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης. Νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα παρουσιάζουν συχνά μη ειδική χρώση.⁵ Ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ανοσολογικής δέσμευσης των πρωτεϊνών ή των προϊόντων αντίδρασης του υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδουπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη⁶ (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός). Για τη διαφύλαξη της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμευσης των ενζύμων από ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπλέον ιστοί ασθενών με υπόστρωμα-χρωμογόνο, στρεπταβιδίνη-HRP ή σημειωμένο πολυμερές και υπόστρωμα-χρωμογόνο, αντίστοιχα. Εάν παρουσιαστεί ειδική χρώση στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενούς θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Αρνητικός μάρτυρας αντιδραστηρίου

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

Ιστός ασθενούς

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

Περιορισμοί

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

Η χρώση του ιστού εξαρτάται από το χειρισμό και την επεξεργασία του ιστού πριν από τη χρώση. Τυχόν εσφαλμένη μονιμοποίηση, κατάμυξη, 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.

Το Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K προορίζεται για χρήση σε τομές εγκλεισμένες σε παραφίνη με ειδικές απαιτήσεις μονιμοποίησης. Δεν απαιτούν όλα τα αντιγόνα ανάκτηση επιτόπου. Οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάκτηση επιτόπου πρέπει να επικυρώνονται από τη χρήση, καθώς αυτές εξαρτώνται από τον ιστό, τη μονιμοποίηση ή/και το πρωτοταγές αντισώμα. Ενδέχεται να παρουσιαστεί μη αναμενόμενη έκφραση αντιγόνου, ειδικά σε νεοπλασμάτα. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε κερχωσμένης τομής ιστού πρέπει να περιλαμβάνει μορφολογική ανάλυση και την αξιολόγηση των κατάλληλων μαρτύρων.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Η απόδοση του Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K έχει επικυρωθεί με χρήση πρωτοταγών αντισωμάτων Novocastra™ για τα οποία η θρυψίνη είναι η συνιστώμενη τεχνική ανάκτησης. Το προϊόν αυτό είναι σταθερό έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην επικέτα του προϊόντος.

Βιβλιογραφία

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383-390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
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.

Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.

Ημερομηνία έκδοσης

10 Σεπτεμβρίου 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Produktnummer: RE7160-K

Tilsigtet anvendelse

Til in vitro-diagnostisk anvendelse.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) er beregnet til enzymatisk forbehandling af formalin-fikserede, paraffin-indlejrede vævssnit for inkubation med et primært antistof i en immunhistokemisk (IHC) procedure. Dette produkt kan anvendes til epitopgenfindning med Novocastra™-antistoffer, hvortil trypsin anbefales. Kendte undtagelser til dette er: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p og NCL-CYCLIN D1-GM. Den kliniske tolkning af en eventuel farvning eller fravær heraf skal suppleres med morfologiske undersøgelser ved anvendelse af passende kontroller og skal evalueres af en kvalificeret patolog på baggrund af patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests.

Procedureprincip

Enzymforbehandling af formalin-fikserede, paraffin-indlejrede vævssnit forbedrer farvningen af nogle antistoffer ved at eksponere epitoper i væv, der er blevet skjult under fiksering. Det første proteolytiske enzym, der blev anvendt til epitopgenfindning, var trypsin.¹ Andre proteolytiske enzymer, der kan anvendes til dette formål, indbefatter Protease XXIV og pepsin.² For nyligt er også blevet anvendt proteinase K, der er almindeligt anvendt i situ-hybridiseringssteknikker.

Dette produkt anvendes i en IHC-procedure, der åbner mulighed for kvalitativ identifikation ved lysmikroskopi af antigener i snit af formalin-fikseret, paraffin-indlejret væv ved anvendelse af sekventielle trin med mellemiggende vasketrin (for oplysninger om procedureprincippet for IHC-farvning henvises til brugsanvisningen til det anvendte detektionssystem). Epitopgenfindning ved hjælp af enzymatisk forbehandling anbefales til et begrænset antal af antistoffer (se primært antistof **Anbefalinger for anvendelse**). Optimale betingelser for epitopgenfindning skal valideres af brugeren, da disse afhænger af væv, fiksering og/eller primært antistof.

Medfølgende reagenser

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzym i 40 % volumen/volumen glycerol, der indeholder 10 mM TrisHCl, pH7,5, med 1 mM calciumacetat.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Trisbufferet saltvand, overfladeaktivt stof og 0,35 % ProClin™ 950.
3. Tom dråbetællerflaske

Rekonstituering, blanding, fortynding, titrering

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K kræver fortynding i Proteinase K Buffer RE7127 til fremstilling af en arbejdsopløsning (se Proteinase K-arbejdsopløsning). Brugeren skal validere en eventuel sådan ændring. Yderligere fortynding kan resultere i tab af antigenfarvning. Brugeren skal validere en eventuel sådan ændring.

Opbevaring og stabilitet

Opbevares ved 2–8 °C. Må ikke fryses. Returneres til 2–8 °C straks efter brug. Må ikke anvendes efter udløbsdatoen, der er angivet på produktetiketten. Opbevaringsbetingelser, der er forskellige fra de anførte, skal verificeres af brugeren. Der er ingen tydelige tegn, der viser ustabilitet for dette produkt, der skal derfor køres positive og negative kontroller samtidigt med patientprøver.

Klargøring af prøver

Det anbefalede fikseringsmiddel er 10 % neutralbufferet formalin til paraffin-indlejrede vævssnit.

Advarsler og forholdsregler

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Indeholder og Proteinase K
(<10%).

GHS08: Sundhedsfarer.

Signalord: Fare.

H334: Kan forårsage
allergi- eller astmasymptomer eller
åndedrætsbesvær ved indånding.

P261: Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray.

P284: [I tilfælde af utilstrækkelig ventilation], anvend
åndedrætsværn.

P304+P340: VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted
med frisk luft og sørg for, at vejtrækningen lettes.

P342+311: Ved luftvejssymptomer: Ring til en
GIFTINFORMATION eller en læge.

P501: Indholdet/Beholderen bortskaffes i et
indsamlingssted for farligt affald og problemaffald.

Et Materialesikkerhedsdataark kan rekvireres eller findes på www.LeicaBiosystems.com

Til anvendelse af uddannet fagpersonale.

Prøver før og efter fiksering samt alle materialer, der eksponeres for disse, skal håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under passende forholdsregler.³

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

Konsultér offentlige eller lokale regler for bortskaffelse af potentielt toksiske bestanddele.

Minimér mikrobiel kontaminering af reagenser, da dette kan medføre øget uspecifik farvning. Inkuberingstider eller temperaturer, der er anderledes end de anførte, kan medføre fejlagtige resultater. En eventuel sådan ændring skal valideres af brugeren.

Procedure

A. Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

Se brugsanvisningen til det primære antistof

B. Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

Almindeligt immunhistokemisk laboratorieudstyr.

C. Metodik

Før brugere gør brug af denne metodik, skal de være uddannet i immunhistokemiske teknikker, og brugen af kombinationen af Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, primært antistof, dets fortynding, sammen med detektionssystemet skal valideres af brugeren på en serie af kendte positive og negative kontroller.

Med mindre andet er anført, skal alle trin udføres ved stuetemperatur (25 °C). Følgende trin skal udføres før inkubation med det primære antistof.

1. Vask objektglas i deioniseret vand.
2. Inkubér med Proteinase K-arbejdsløsning (se Proteinase K-arbejdsløsning) i 5 minutter.
3. Vask i TBS.
4. Fortsæt med IHC-protokol i henhold til producentens brugsanvisning til det primære antistof og detektionssystemet.

Proteinase K-arbejdsløsning

Tilsæt 40 µl Proteinase K Concentrate RE7126 til 6 ml Proteinase K Buffer RE7127. Fyld opløsningen i den medfølgende dråbetællerflaske. Arbejdsløsningen er stabil i op til 3 måneder ved opbevaring ved 2–8 °C.

Kvalitetskontrol

Forskelle i vævsbehandling og tekniske procedurer i brugerens laboratorium kan medføre en signifikant variation i resultaterne, der nødvendiggør regelmæssig udførelse af interne kontroller foruden følgende procedurer. Kontrollerne skal være autopsi/biopsi/ kirurgiske prøver, der formalin-fikseres, behandles og paraffinvoxs-indstøbes så hurtigt som muligt på samme måde som patientprøven/ patientprøverne.

Positiv vævskontrol

Anvendes til visning af korrekt præpareret væv og korrekte farvningsteknikker. Der skal inkluderes én positiv vævskontrol for hvert sæt af testbetingelser/primært antistof i hver farvningskørsel. Et væv med svag positiv farvning er mere egnet end et væv med kraftig positiv farvning til optimal kvalitetskontrol og til detektion af mindre grader af reagensdegradering.⁴ For oplysninger om anbefalet positivt kontrolvæv henvises til brugsanvisningen til det primære antistof. Hvis den positive vævskontrol ikke viser positiv farvning, bør resultaterne fra patientprøverne betragtes som ugyldige.

Negativ vævskontrol

Skal undersøges efter den positive vævskontrol for at verificere specificiteten af mærkningen af målantigenet ved hjælp af det primære antistof. For oplysninger om anbefalet negativt kontrolvæv henvises til brugsanvisningen til det primære antistof. Alternativt giver varieteten af forskellige celletyper, der er til stede i de fleste vævssnit, ofte negative kontrolsteder, men dette bør verificeres af brugeren. Hvis der forekommer uspecifik farvning, har den ofte en diffus fremtoning. Sporadisk farvning af bindevæv kan også forekomme i snit fra kraftigt formalinfikserede væv. Brug intakte celler til tolkning af farvningsresultater. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte uspecifikt.⁵

Falsk positive resultater kan forekomme på grund af ikke-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan også skyldes endogene enzymer, såsom pseudoperoxidase (erythrocytter), endogen peroxidase (cytochrom C) eller endogen biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre). For at adskille endogene enzymaktivitet eller uspecifik binding af enzymer fra specifik immunreaktivitet kan yderligere patientvæv farves udelukkende med henholdsvis substratromogen, streptavidin-HRP eller mærket polymer og substratromogen. Hvis der forekommer specifik farvning i den negative vævskontrol, bør resultaterne af patientprøverne betragtes som ugyldige.

Negativ reagenskontrol

Brug en uspecifik negativ reagenskontrol i stedet for det primære antistof sammen med et snit af hver patientprøve for at vurdere uspecifik farvning og åbne mulighed for en bedre tolkning af specifik farvning i antigenstedet.

Patientvæv

Undersøg farvede patientprøver til sidst. Intensiteten af positiv farvning skal vurderes på baggrund af eventuel uspecifik baggrundsfarvning af den negative reagenskontrol. Som ved 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. Brug om nødvendigt et panel af antistoffer til at identificere falske negative reaktioner.

Begrænsninger

Immunhistokemi er en flertrins-diagnostisk proces, der består af specialiseret træning i valget af passende reagenser; vævsvalg, fiksering og forarbejdning; præparering af IHC-objektglasset; og tolkning af farvningsresultaterne.

Vævsfarvning afhænger af håndteringen og behandlingen af vævet før farvningen. Ukorrekt fiksering, frynsning, optøning, vask, tørring, opvarmning, skæring eller kontaminering med andre væv eller væsker kan frembringe artefakter, antistofindfangning eller falske negative resultater. Inkonsekvente resultater kan skyldes variationer i fikserings- og indstøbningsmetoder eller iboende uregelmæssigheder i selve vævet.⁷

Kraftig eller ufuldstændig kontrastfarvning kan påvirke en korrekt tolkning af resultaterne.

Den kliniske tolkning af en eventuel farvning eller fravær heraf skal suppleres med morfologiske undersøgelser ved anvendelse af passende kontroller og skal evalueres af en kvalificeret patolog på baggrund af patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests. Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K er til anvendelse på paraffin-indlejrede snit med specifikke fikseringskrav. Ikke alle antigener kræver epitopgenfindning. Optimale betingelser for epitopgenfindning skal valideres af brugeren, da disse afhænger af væv, fiksering og/eller primært antistof. Uventet antigenekspression kan forekomme, især i neoplasmer. Den kliniske tolkning af et farvet vævssnit skal inkludere en morfologisk analyse og en evaluering af passende kontroller.

Ydeevne-egenskaber

Ydeevnen for Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K er blevet valideret ved brug af Novocastra™ primære antistoffer, for hvilke trypsin er den anbefalede genfindingsteknik. Dette produkt er stabilt til udløbsdatoen, der er angivet på produktetiketten.

Litteraturliste

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7: 161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Ændringer til tidligere udgave

Advarsler og forholdsregler.

Udfærdigelsesdato

10 september 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Productnummer: RE7160-K

Beoogd gebruik

Voor diagnostisch gebruik in vitro.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) is bedoeld voor de enzymatische voorbehandeling van op formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde weefselcoupes voorafgaand aan incubatie met een primair antilichaam tijdens een immunohistochemische (IHC) procedure. Dit product kan gebruikt worden voor epitooferstel met Novocastra™ antilichamen waarvoor trypsine wordt aanbevolen. Bekende uitzonderingen hierop zijn: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-Ip en NCL-CYCLIN D1-GM. De klinische interpretatie van een kleuring of de afwezigheid hiervan moet worden aangevuld met morfologische studies en de juiste controles. Ook moeten er evaluaties worden uitgevoerd binnen de context van de klinische voorgeschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests uitgevoerd door een bevoegd patholoog.

Principe van de procedure

Enzymevoorbehandeling van op formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde weefselcoupes verbetert de kleuring van sommige antilichamen door epitopen die tijdens fixatie zijn gemaskeerd binnen weefsel bloot te stellen. Het eerste proteolytische enzym dat gebruikt werd voor epitooferstel was trypsine.¹ Overige proteolytische enzymen die hiervoor gebruikt kunnen worden zijn onder andere Protease XXIV en Pepsine.² Onlangs is proteinase K, dat vaak gebruikt wordt in in situ hybridisatietechnieken, ook toegepast.

Dit product wordt gebruikt in een IHC-procedure, waarmee kwalitatieve identificatie, met behulp van lichtmicroscopie, van antigenen in formaline-gefixeerde, in paraffine ingebedde weefselcoupes mogelijk is, via sequentiële stappen met ingevoegde spoelingsstappen (zie voor het principe van de procedure van de IHC-kleuring de gebruiksaanwijzing van het gepaste detectiesysteem). Epitooferstel door middel van enzymevoorbehandeling wordt aanbevolen voor een beperkt aantal antilichamen (zie primair antilichaam

Aanbevelingen voor het gebruik). Optimale condities voor epitooferstel moeten door de gebruiker gevalideerd worden omdat deze afhankelijk zijn van weefsel, fixatie en/of primair antilichaam.

Geleverde reagentia

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzym in 40% v/v glycerol met 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, met 1 mM calciumacetaat.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Tris-gebufferde zoutoplossing, oppervlakte-actieve stof en 0,35% ProCin™ 950.
3. Leeg druppelflesje.

Reconstitutie, menging, verdunning of titratie

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K moet verdund worden in de Proteinase K Buffer RE7127 om een werkende oplossing te prepareren (zie Proteinase K-werkoplossing). Dergelijke wijzigingen moeten door de gebruiker worden gevalideerd. Verdere verdunning kan tot een verlies van antigeenkleuring leiden. Dergelijke wijzigingen moeten door de gebruiker worden gevalideerd.

Opslag en stabiliteit

Bewaar bij 2–8°C. Niet invriezen. Direct na gebruik weer bij 2–8°C opslaan. Niet gebruiken na de vervaldatum die op het label van het product staat. Andere dan de genoemde opslagcondities moeten door de gebruiker worden geverifieerd. Er zijn geen duidelijke tekenen die wijzen op instabiliteit van dit product. Daarom moeten positieve en negatieve controles gelijktijdig met patiëntenmonsters worden uitgevoerd.

Specimenpreparatie

Het aanbevolen fixermiddel is 10% neutraal gebufferde formaline voor in paraffine ingebedde weefselcoupes.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Bevat proteinase K (<10%).

GHS08: Gevaar voor de gezondheid.

Signaalwoorden: Gevaar.

H334: Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken.

P261: Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden.

P284: [Bij ontoereikende ventilatie] adembescherming dragen.

P304+P340: NA INADEMING: de persoon in de frisse lucht brengen en ervoor zorgen dat deze gemakkelijk kan ademen.

P342+P311: Bij ademhalingsymptomen: bel een ANTIGIFCENTRUM of arts.

P501: Inhoud/verpakking afvoeren naar een inzamelpunt voor gevaarlijk of speciaal afval.

Een veiligheidsinformatieblad is verkrijgbaar op aanvraag of op www.LeicaBiosystems.com

Voor professionele gebruikers.

Specimens, en alle materialen die eraan worden blootgesteld, moeten voor en na fixatie worden behandeld als potentiële overdragers van infecties en met inachtneming van de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd.³

Pipetteer reagentia nooit met de mond en vermijd dat de huid en slijmvliezen in aanraking komen met reagentia en specimens. Indien reagentia of specimens in aanraking komen met gevoelige gebieden, spoel deze dan overvloedig met water.

Raadpleeg de nationale, regionale en plaatselijke voorschriften voor de afvoer van alle potentiële giftige stoffen.

Minimaliseer de kans op microbiële contaminatie van reagentia, want dit kan de niet-specifieke kleuring verhogen. Andere incubatietijden of temperaturen dan hierin vermeld, kunnen onjuiste resultaten opleveren. Dergelijke wijzigingen moeten door de gebruiker worden gevalideerd.

Procedure

A. Benodigde, maar niet inbegrepen reagentia

Zie gebruiksaanwijzing primair antilichaam

B. Benodigde, maar niet inbegrepen apparatuur

Algemene immunohistochemische laboratoriumuitrusting.

C. Methodologie

Gebruikers moeten vóór het ondernemen van deze methodologie worden opgeleid in immunohistochemische technieken en gebruik in combinatie met Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, primair antilichaam, de verdunning ervan, samen met het detectiesysteem moeten door de gebruiker gevalideerd worden tijdens een aantal bekende positieve en negatieve controles.

Tenzij anders vermeld worden alle stappen uitgevoerd bij kamertemperatuur (25°C). De volgende handelingen moeten worden uitgevoerd voorafgaand aan incubatie met het primair antilichaam.

1. Spoel de objectglasjes in gedioniseerd water.
2. Incubeer 5 minuten lang met proteinase K werkoplossing (zie Proteinase K werkoplossing).
3. Was in TBS-bufferoplossing.
4. Ga door met IHC-protocol voor het primaire antilichaam- en detectiesysteem volgens de gebruiksaanwijzing van de fabrikant.

Proteinase K werkoplossing

Voeg 40 µL Proteinase K Concentrate RE7126 toe aan 6 ml Proteinase K Buffer RE7127. Doe de oplossing in de daarvoor bestemde geleverde fles.

De werkoplossing is tot 3 maanden stabiel indien opgeslagen bij 2–8°C.

Kwaliteitscontrole

Verschillen in weefselbewerking en technische procedures in het laboratorium van de gebruiker kunnen tot aanzienlijke variabiliteit in de resultaten leiden, waardoor het nodig is om regelmatig interne controles uit te voeren als aanvulling op de volgende procedures. Controles zijn verse autopsie-/biopsie-/chirurgische specimens die zo snel mogelijk en op dezelfde manier als het monster of de monsters van de patiënt zijn gefixeerd in formaline, bewerkt en ingebed in paraffinewas.

Positieve weefselcontrole

Wordt gebruikt om aan te geven dat weefsels correct geprepareerd zijn en dat passende kleuringstechnieken zijn gebruikt. Voor elke set testvoorwaarden/primaire antilichaam in elke kleuringrun moet één positieve weefselcontrole worden opgenomen. Voor optimale kwaliteitscontrole en detectie van lichte degeneratie van het reagens is een weefsel met zwakke positieve kleuring meer geschikt dan een weefsel met sterke positieve kleuring.⁴ Voor aanbevolen positieve controleweefsel, zie gebruiksinstructies primair antilichaam. Als de positieve weefselcontrole geen positieve kleuring vertoont, moeten de resultaten die met testspecimens zijn verkregen als ongeldig worden beschouwd.

Negatieve weefselcontrole

De negatieve weefselcontrole moet na de positieve weefselcontrole worden onderzocht om de specificiteit van de labeling van het doelantigeen door het primaire antilichaam te verifiëren. Voor aanbevolen negatieve controleweefsel, zie gebruiksinstructies primair antilichaam. Aan de andere kant levert de verscheidenheid aan diverse cellypen die in de meeste weefselcoupes aanwezig zijn, vaak negatieve controlelocaties op, maar dit moet wel worden geverifieerd door de gebruiker. Niet-specifieke kleuring, indien aanwezig, ziet er doorgaans diffuus uit. Een sporadische kleuring van bindweefsel kan ook worden waargenomen in coupes van overmatig in formaline gefixeerde weefsels. Gebruik intacte cellen voor het interpreteren van kleuringresultaten. Necrotische of gedegenerende cellen kleuren vaak niet-specifiek.⁵ Fout-positieve resultaten kunnen optreden als gevolg van niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten. Ze kunnen ook worden veroorzaakt door endogene enzymen zoals pseudoperoxidase (erythrocyten), endogene peroxidase (cytochrom C) of endogeen biotin⁶ (bv. lever, borst, hersenen, nier). Om activiteit van endogene enzymen of niet-specifieke binding van enzymen te onderscheiden van specifieke immunoreactiviteit, kunnen aanvullende patiëntweefsels uitsluitend worden gekleurd met substraatchromogeen, Streptavidin-HRP of gelabeld polymeer en substraatchromogeen. Als er specifieke kleuring optreedt in de negatieve weefselcontrole, moeten resultaten met de patiëntspecimens als ongeldig worden beschouwd.

Negatieve reagenscontrole

Gebruik een niet-specifieke negatieve reagenscontrole van het primaire antilichaam met een coupe van elk patiëntspecimen om niet-specifieke kleuring te evalueren en specifieke kleuring op de antigeenlocatie beter te kunnen interpreteren.

Patiëntweefsel

Onderzoek gekleurde patiëntspecimens het laatst. De intensiteit van de positieve kleuring moet worden geëvalueerd binnen de context van niet-specifieke achtergrondkleuring van de negatieve reagenscontrole. Zoals bij elke immunohistochemische test betekent een negatief resultaat dat het antigeen niet is gedetecteerd. Het betekent niet dat het antigeen afwezig was in de onderzochte cellen of het onderzochte weefsel. Gebruik zo nodig een panel van antilichamen om fout-negatieve reacties te identificeren.

Beperkingen

Immunohistochemie (IHC) is een diagnostisch meerstapsproces waarvoor een gespecialiseerde opleiding nodig is in het kiezen van de juiste reagentia, het selecteren, fixeren en bewerken van weefsel, het prepareren van IHC-objectglasjes en het interpreteren van de kleuringresultaten.

Weefselkleuring is afhankelijk van de manier waarop het weefsel vóór de kleuring wordt behandeld en bewerkt. Verkeerd fixeren, invriezen, ontdoien, wassen, drogen, verwarmen, snijden of contaminatie met andere weefsels of vloeistoffen kan tot artefacten, insluiting van antilichamen of fout-negatieve resultaten leiden. Inconsistente resultaten kunnen te wijten zijn aan variaties in de fixatie- en inbeddingsmethode, of aan intrinsieke onregelmatigheden in het weefsel.⁷

Een te sterke of onvolledige tegenkleuring kan een juiste interpretatie van de resultaten bemoeilijken of onmogelijk maken.

De klinische interpretatie van een kleuring of de afwezigheid hiervan moet worden aangevuld met morfologische studies en de juiste controles. Ook moeten er evaluaties worden uitgevoerd binnen de context van de klinische voorgeschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests uitgevoerd door een bevoegd patholoog.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K is bedoeld voor in paraffine ingebedde coupes met specifieke fixatievereisten. Niet alle antigenen vereisen epitoopherstel. Optimale condities voor epitoopherstel moeten door de gebruiker gevalideerd worden omdat deze afhankelijk zijn van weefsel, fixatie en/of primair antilichaam. Er kan onverwachte antigeenexpressie optreden, met name bij neoplasma's. De klinische interpretatie van gekleurde weefselcoupes moet een morfologische analyse en de evaluatie van overeenkomstige controles bevatten.

Prestatiekenmerken

De prestaties van Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K zijn gevalideerd met behulp van Novocastra™ primaire antilichamen waarvoor trypsine de aanbevolen herstelletechniek is. Het product is stabiel tot de vervaldatum die op het label van de verpakking is aangegeven.

Literatuurlijst

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7: 161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.

Datum uitgave

10 september 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Produkt nr.: RE7160-K

Tiltenkt bruk

Til in vitro-diagnostisk bruk.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) er tenkt for enzymatisk forbehandling av formalinfikserte, parafininnstøpte vevsnitt før inkubering med et primært antistoff i en immunhistokjemisk (IHC) prosedyre. Dette produktet kan brukes for epitop demaskering med Novocastra™ antistoffer som trypsin er anbefalt for, kjente unntak til dette er: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p, og NCL-CYCLIN D1-GM. Den kliniske tolkningen av en farging eller uteblitt farging skal suppleres av morfologiske studier ved bruk av riktige kontroller og skal evalueres av en kvalifisert patolog innenfor sammenhengen av pasientens sykehistorie og andre diagnostiske tester.

Prinsipp for prosedyren

Enzymforbehandling av formalinfikserte, parafininnstøpte vevsnitt forbedrer fargingen av noen antistoffer ved å eksponere epitoper i vevet som har blitt maskert under fikseringen. Det første proteolytiske enzymet som ble brukt for epitop demaskering var trypsin.¹ Andre proteolytiske enzymer som kan brukes til dette formålet inkluderer Protease XXIV og Pepsin.² I nyere tid har også proteinase K som er vanlig å bruke til in situ hybridiseringsteknikker, blitt brukt.

Dette produktet brukes i en IHC-prosedyre, som muliggjør kvalitativ identifisering med lysmikroskopering av antigener i snitt av formalinfiksert, parafininnstøpt vev, via sekvensielle trinn med mellomliggende vasketrinn (for IHC-fargingens prinsipp for prosedyren, se bruksanvisningen for det aktuelle deteksjonssystemet). Epitop demaskering gjennom enzymatisk forbehandling anbefales for et begrenset antall antistoffer (se primære antistoffers **anbefalinger for bruk**). Optimalte betingelser for epitop demaskering må valideres av brukeren, siden disse avhenger av vev, fiksering og/eller primært antistoff.

Medfølgende reagenser

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzym i 40 % v/v glyserol som inneholder 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, med 1 mM kalsiumacetat.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Tris-bufret saltvann, surfaktant og 0,35 % ProClin™ 950.
3. Tom dråpetellerflaske.

Rekonstitusjon, blanding, fortynning, titrering

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K krever fortynning i Proteinase K Buffer RE7127 for å forberede en arbeidsløsning (se Proteinase K arbeidsløsning). Brukeren må validere enhver slik endring. Ytterligere fortynning kan forårsake tap av antigenfarging. Brukeren må validere enhver slik endring.

Oppbevaring og stabilitet

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

Prøveklargjøring

Anbefalt fiksativ er 10 % nøytralbufret formalin for parafininnstøpte vevsnitt.

Advarsler og forholdsregler

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Inneholder Proteinase K (<10 %).

GHS08: Helsefare.

Signalord: Fare.

H334: Kan gi allergi eller astmasymptomer eller pustevansker ved innånding.

P261: Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damp/aerosoler.

P284: [Ved utilstrekkelig ventilasjon] bruk åndedrettsvern. P304+P340: HVIS INNÅNDET: Fjern person i frisk luft og hold deg komfortabel for å puste.

P342+P311: Ved symptomer i luftveiene: Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER eller en lege.

P501: Innholdet/beholderen leveres til et godkjent oppsamlingspunkt for farlig avfall og spesialavfall.

Materialsikkerhetsdatablad er tilgjengelig på forespørsel eller tilgjengelig fra www.LeicaBiosystems.com.

For helsepersonell.

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

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

Se lokale, regionale eller statlige forskrifter for avfallshåndtering av eventuelle potensielle giftkomponenter.

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

Prosedyre

A. Nødvendige reagenser som ikke følger med

Se bruksanvisningen for primært antistoff

B. Nødvendig utstyr som ikke følger med

Generelt immunhistokjemisk laboratorieutstyr.

C. Metodikk

Før denne metoden tas i bruk må brukerne få opplæring i immunhistokjemiske teknikker og deres bruk i kombinasjon med Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, primært antistoff, dets fortykning, sammen med deteksjonssystemet, må valideres av brukeren på en rekke kjente positive og negative kontroller.

Med mindre annet er angitt, utføres alle trinn ved romtemperatur (25 °C). Følgende trinn må gjennomføres før inkuberingen med det primære antistoffet.

1. Vask objektglassene i deionisert vann.
2. Inkuber med Proteinase K arbeidsløsning (se Proteinase K arbeidsløsning) i 5 minutter.
3. Vask i TBS.
4. Fortsett med IHC-protokollen i henhold til produsentens bruksanvisning for det primære antistoffet og deteksjonssystemet.

Proteinase K arbeidsløsning

Tilsett 40 µl med Proteinase K Concentrate RE7126 til 6 ml med Proteinase K Buffer RE7127. Fyll løsningen på dråpetellerflasken som følger med.

Arbeidsløsningen er stabil i opptil 3 måneder når den lagres ved 2–8 °C.

Kvalitetskontroll

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

Positivt kontrollvev

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

Negativt kontrollvev

Skal undersøkes etter det positive kontrollvevet for å verifisere spesifisiteten i merkingen av målantigenet med det primære antistoffet. For anbefalt negativt kontrollvev, se bruksanvisningen for primært antistoff. Alternativt gir variasjonen av forskjellige celletyper som kan finnes i de fleste vevsnett ofte rom for negativ kontroll, men dette må verifiseres av brukeren. Uspesifikk farging, hvis dette forekommer, har vanligvis et diffus utseende. Sporadisk farging av bindevev vil også kunne observeres i vevsnett som er fiksert i for mye formalin. Bruk intakte celler til tolkning av fargingsresultater. Nekrotiske eller degenererte celler farger ofte uspesifikt.⁵ Falske positive resultater kan sees på grunn av ikke-immunologisk binding av proteiner eller substratreaksjonsprodukter. De kan også være forårsaket av endogene enzymer slik som pseudoperoksidase (erytrocytter), endogen peroksidase (cytokrom C) eller endogent biotin⁶ (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre. For å differensiere endogen enzymaktivitet eller uspesifikk binding av enzymer fra spesifikk immunreaktivitet kan ekstra pasientvev farges eksklusivt med henholdsvis substratkromogen, Streptavidin-HRP eller merket polymer og substratkromogen. Hvis det forekommer spesifikk farging i det negative kontrollvevet, skal resultater med pasientprøvene betraktes som ugyldige.

Negativ reagenskontroll

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

Pasientvev

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

Begrensninger

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

Vevfargingen er avhengig av håndteringen og behandlingen av vevet før det farges. Uriktig fiksering, dypfrysing, optining, vasking, tørking, oppvarming, snitting eller kontaminering med annet vev eller væsker kan frembringe artefakter, farging av antistoff eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpsmetoder eller uregelmessigheter i vevet⁷

Overdreven eller ufullstendig kontrastfarging kan hindre riktig tolkning av resultater.

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

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K skal brukes på parafininnstøpte snitt med spesifikke fikseringskrav. Ikke alle antigener krever epitop demaskering. Optimale betingelser for epitop demaskering må valideres av brukeren, siden disse avhenger av vev, fiksering og/eller primært antistoff. Det kan forekomme uventet antigenuttrykk, spesielt i neoplasmer. Den kliniske tolkningen av ethvert farget vevsnett må inkludere morfologisk analyse og evaluering av egnede kontroller.

Ytelseegenskaper

Ytelsen til Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K har blitt validert ved hjelp av Novocastra™ primære antistoffer der trypsin er den anbefalte demaskeringsteknikken. Dette produktet er stabilt inntil utløpsdatoen som er vist på produktetiketten.

Bibliografi

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7: 161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Endringer på tidligere utgave

Advarsler og forholdsregler.

Utstedelsesdato

10 september 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Ürün No: RE7160-K

Kullanım Amacı

İn vitro diagnostik kullanım içindir.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC), immünohistokimyasal (IHC) bir prosedürde primer antikorla inkübasyondan önce formalinle fiks edilmiş, parafine gömülmüş doku kesitlerinin enzimatik ön işleme için kullanılır. Bu ürün, tripolisin tavsiye edilen Novocastra™ antikorlarının epitop geri kazanımı için kullanılabilir. Bilinen istisnalar şunlardır: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-Ip ve NCL-CYCLIN D1-GM. Herhangi bir boyamanın veya boyama yokluğunun klinik yorumu, morfolojik çalışmalar ve uygun kontrollerle tamamlanmalıdır ve nitelikli bir patolog tarafından hastanın klinik öyküsü ve diğer tanı testleri bağlamında değerlendirilmelidir.

Prosedür İkesi

Formalinle fiks edilmiş, parafine gömülmüş doku kesitlerinin enzim ön işleme, fiksasyon boyunca maskelenmiş doku içindeki epitoplara maruz kalarak bazı antikorların boyanmasını iyileştirir. Epitop geri kazanımı için kullanılmış ilk proteolitik enzim tripsindir.¹ Bu amaç için kullanılacak diğer proteolitik enzimler Proteaz XXIV ve Pepsindir.² Son zamanlarda in situ hibridizasyon tekniklerinde genellikle Proteinaz K da kullanılmıştır.

Bu ürün, bir araya getirilmiş yıkama adımları ile sıralı basamaklar yoluyla formalinle fiks edilmiş, parafine gömülmüş dokunun bölümlerindeki antijenlerin ışık mikroskopisi ile kalitatif tanımlamaya izin veren IHC prosedüründe kullanılır (IHC boyaması Prosedür İkesi için bkz. uygun saptama sistemi Kullanım Talimatları). Enzimatik ön işleme epitop geri kazanımı, sınırlı sayıda antikorlar için önerilmektedir (bkz. primer antikor **Kullanım Önerileri**). Epitop geri kazanımı için optimal koşullar kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır; çünkü bu koşullar dokuya, fiksasyona ve/veya primer antikora bağlıdır.

Sağlanan Reaktifler

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 mL). 1 mM kalsiyum asetatla 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 içeren %40 v/v gliserolde enzim.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Tris tamponlu salin, sürfaktan ve %0,35 ProClın™ 950.
3. Boş damlalık şişesi.

Sulandırma, Karıştırma, Seyreltme, Titrasyon

Çalışma çözeltilisinin hazırlanması için Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K'nin Proteinase K Buffer RE7127 içinde seyreltilmesi gerekmektedir (bkz. Proteinase K Working Solution). Bu tür herhangi bir değişiklik kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Fazla seyreltme antijen boyanması kaybına yol açabilir. Bu tür herhangi bir değişiklik kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Saklama ve Stabilité

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

Örnek Hazırlama

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

Uyarılar ve Önlemler

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Proteinaz K içerir (<%10).
S08: Sağlık tehlikesi.
İkaz ifadeleri: Tehlike.

H334: Solunması halinde nefes alma zorlukları, astım nöbetleri veya alerjiye yol açabilir.

P261: Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumaktan kaçının.

P284: [Yetersiz havalandırma durumunda] solunum koruması kullanın.

P304+P340: SOLUNDUĞUNDA: Kişiyi temiz havaya çıkarın ve nefes almak için rahat bırakın.

P342+311: Solunum bulgularının görülmesi halinde: ZEHİR MERKEZİNİ veya doktoru/hekimi arayın.

P501: İçeriği/kabı tehlikeli veya özel atık toplama noktalarına bertaraf edin.

Malzeme Güvenlik Bilgileri Formu talep üzerine sağlanmaktadır ve www.LeicaBiosystems.com sitesinde mevcuttur.

Profesyonel kullanıcılar içindir.

Fiksasyondan önce ve sonra örnekler ve bunlara maruz kalmış bütün materyaller, enfeksiyon yayılabileceği gibi işleme görmelidir ve gerekli önlemler alınarak atılmalıdır.³

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

Potansiyel olarak toksik bileşenlerin atılmasıyla ilgili yerel, ulusal veya bölgesel düzenlemeleri dikkate alın.

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

Prosedür

A. Gereken ancak sağlanmayan reaktifler

Primer antikor Kullanım Talimatlarına bakın

B. Gereken ancak sağlanmayan ekipman

Genel immünohistokimya laboratuvar ekipmanı.

C. Metodoloji

Bu yöntemi uygulamadan önce kullanıcılar immünohistokimya teknikleri konusunda gerekli eğitimi almış olmalıdır ve saptama sistemiyle birlikte Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, primer antikor, seyreltilmiş, bilinen bir dizi pozitif ve negatif kontrollerle kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Aksi belirtilmedikçe tüm adımlar oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirilir. Primer antikorla inkübasyondan önce aşağıdaki adımlar izlenmelidir.

1. Lamları deiyonize suda yıkayın.
2. Proteinase K Working Solution ile 5 dakika boyunca inkübe edin (bkz. Proteinase K Working Solution).
3. TBS'de yıkayın.
4. Primer antikor ve saptama sistemini üreticinin Kullanım Talimatlarına göre IHC protokolüyle işleme alın.

Proteinase K Working Solution

6 ml Proteinase K Buffer RE7127'ye 40 µl Proteinase K Concentrate RE7126 ekleyin. Çözeltiyi, tedarik edilen damlalık şişesine yükleyin. Çalışma çözeltisi 2-8°C'de saklandığında 3 aya kadar stabildir.

Kalite Kontrol

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

Pozitif Doku Kontrolü

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

Negatif Doku Kontrolü

Primer antikor tarafından hedef antijenin etiketlenmesinin spesifikliğini doğrulamak için, pozitif doku kontrolünden sonra incelenmelidir. Önerilen negatif kontrol doku için primer antikor Kullanım Talimatlarına bakın. Alternatif olarak, doku kesitlerinin çoğunda bulunan farklı hücre tipi çeşitleri sıklıkla negatif kontrol bölgeleri sunar ancak bu kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Olduğu durumda, spesifik olmayan boyamanın görünümü genelde diffüzdür. Aşırı formalin fiksasyonlu dokulardan kesitlerde bağ dokusunun sporadik boyanması da görülebilir. Boyama sonuçlarının yorumlanması için intakt hücreler kullanın. Nekrotik ve dejenerer hücreler genellikle spesifik olmayan şekilde boyanır.⁵ Proteinlerin veya substrat reaksiyon ürünlerinin immünoojik olmayan bağlanması nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar görülebilir. Bunlar ayrıca psödoperoksidaz (eritrositler), endojen peroksidaz (sitokrom C) veya endojen biotin⁶ (ör. karaciğer, meme, beyin, böbrek) gibi endojen enzimler nedeniyle oluşabilir. Endojen enzim aktivitesini veya enzimlerin spesifik olmayan bağlanmasını spesifik immünoreaktiviteden ayırmak için ek hasta dokuları sırasıyla sadece substrat kromojenle, Streptavidin-HRP'yle ya da etiketlenmiş polimer ve substrat kromojenle boyanabilir. Negatif doku kontrolünde spesifik boyanma oluştursa hasta örneklerinin sonuçları geçersiz kabul edilmelidir.

Negatif Reaktif Kontrolü

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

Hasta Dokusu

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

Sınırlamalar

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

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

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

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

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, spesifik fiksasyon gereklilikleri olan parafine gömülmüş kesitlerde kullanım içindir. Antijenlerin hepsi için epitop geri kazanımı gerekmemektedir. Epitop geri kazanımı için optimal koşullar kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır; çünkü bu koşullar dokuya, fiksasyona ve/veya primer antikora bağlıdır. Özellikle neoplazmlarda beklenmeyen antijen ekspresyonu oluşabilir. Boyanmış herhangi bir doku kesitinin klinik yorumu, morfolojik analizi ve uygun kontrollerin değerlendirilmesini içermez.

Performans Özellikleri

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K'nin performansı, tripsin tavsiye edilen geri kazanım tekniği için Novocastra™ primer antikoları kullanılarak doğrulanmıştır. Bu ürün, ürün etiketinde belirtilen son geçerlilik tarihine kadar stabildir.

Kaynakça

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
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.

Önceki Sayıya Göre Değişiklikler

Uyarılar ve Önlemler.

Düzenlenme Tarihi

10 Eylül 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (ИНС)

Продуктов №: RE7160-K

Предназначение

За употреба при in vitro диагностика.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (ИНС) е предназначен за ензиматично предварително третиране на фиксирани във формалин и вградени в парафин тъканни срези преди инкубация с първично анти тяло при имунохистохимична (ИНС) процедура. Този продукт може да се използва за извличане на епитоп с Novocastra™ антитела, за които се препоръчва трипсин, като познати изключения са: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p и NCL-CYCLIN D1-GM. Клиничната интерпретация на всяко оцветяване или неговата липса следва да бъде допълнена от морфологични проучвания с помощта на подходящи контроли и трябва да се оценява в контекста на клиничната история на пациента и други диагностични изследвания от квалифициран патолог.

Принцип на процедурата

Предварителното третиране на ензимите на фиксирани във формалин и вградени в парафин тъканни срези подобрява оцветяването на някои антитела чрез излагане на епитопи с тъкан, която е била маскирана по време на фиксация. Първият протеолитичен ензим, използван за извличане на епитоп, е трипсинът.¹ Други протеолитични ензими, които могат да бъдат използвани за тази цел, включват Protease XXIV и Pepsin.² Наскоро протеиназа К, който се използва често в техниките на in situ хибридизация, също беше включен.

Този продукт се използва при имунохистохимична процедура, която позволява качествената идентификация с оптична микроскопия на антигени в срези на фиксирана във формалин и вградена в парафин тъкан, чрез последователни стъпки с вмъкнати стъпки за измиване (за принципа на процедурата за имунохистохимично оцветяване вижте инструкциите за употреба на съответната система за откриване). Извличането на епитоп чрез ензиматично предварително третиране се препоръчва за всички антитела (вж. „Препоръки за употреба за първично анти тяло“). Оптималните условия за извличане на епитоп трябва да бъдат валидирани от потребителя, тъй като зависят от тъканта, фиксацията и/или първичното анти тяло.

Предоставени реактиви

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 mL). Ензим с 40% v/v, съдържащ глицерол 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, с 1 mM калциев ацетат.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 mL). Трометамин-буфериран физиологичен разтвор, повърхностно активно вещество и 0,35% ProClin™ 950.
3. Изпразнете бутилката с капкомер.

Възстановяване, смесване, разреждане, титриране

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K трябва да се разреди в Proteinase K Buffer RE7127, за да се приготви работен разтвор (вж. „Proteinase K Working Solution“). Всички подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя. По-нататъшното разреждане може да доведе до загуба на оцветяване на антигена. Всички подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя.

Съхранение и стабилност

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

Подготовка на спесимени

Препоръчителният фиксиращ разтвор е неутрален буфериран формалин 10% за тъканни срези, вградени в парафин.

Предупреждения и предпазни мерки

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Съдържа Proteinase K (<10%).

GHS08: Опасност за здравето.

Сигнални думи: Опасност.

H334: Може да причини алергични или астматични симптоми или затруднения в дишането при вдишване.

P261: Избягвайте вдишване на прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли.

P284: [При недостатъчна вентилация] носете средства за защита на дихателните пътища.

P304+P340: ПРИ ВДИШВАНЕ: Изведете лицето на чист въздух и го поставете в позиция, улесняваща дишането.

P342+311: При симптоми на затруднено дишане: Обадете се на ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар.

P501: Съдържанието/съдът да се изхвърли в пункт за събиране на опасни или специални отпадъци.

Информационният лист за безопасност на материалите може да се получи при поискване или е на разположение от www.LeicaBiosystems.com

За професионална употреба.

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

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

Консултирайте се с федералните, държавните или местните регламенти относно изхвърлянето на потенциално токсични компоненти.

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

Процедура

A. Необходими, но непредоставени реактиви

Вижте инструкциите за употреба за първично анти тяло

B. Необходимо, но непредоставено оборудване

Общо имунохистохимично лабораторно оборудване.

C. Методология

Преди да пристъпят към тази методология, потребителите трябва да бъдат обучени за имунохистохимичните техники и използването в комбинация с Enzume Proteinase K (IHC) RE7160-K, като първичното анти тяло, неговият разтвор, заедно със системата за откриване, трябва да бъдат валидирани от потребителя при серия от познати позитивни и негативни контроли.

Освен ако не е указано друго, всички стъпки се извършват при стайна температура (25 °C). Преди инкубация с първичното анти тяло трябва да бъдат осъществени следните стъпки.

1. Измийте предметните стъкла с деионизирана вода.
2. Инкубирайте с Proteinase K Working Solution (вж. „Proteinase K Working Solution“) за 5 минути.
3. Направете промивка в TBS (триметамин-буфериран физиологичен разтвор).
4. Продължете с имунохистохимичния протокол според инструкциите за употреба на производителя за първичното анти тяло и системата за откриване.

Proteinase K Working Solution

Добавете 40 µL Proteinase K Concentrate RE7126 към 6 mL Proteinase K Buffer RE7127. Заредете разтвора в осигурената бутилка с капкомер.

Работният разтвор е стабилен до 3 месеца, ако се съхранява при температура от 2 – 8 °C.

Качествен контрол

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

Позитивна тъканна контрола

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

Негативна тъканна контрола

Трябва да се изследва след позитивната тъканна контрола, за да се провери специфичността на беляването на таргетния антиген от първичното анти тяло. За препоръчителна негативна контролна тъкан вижте инструкциите за употреба за първично анти тяло. Алтернативно, разнообразието от различни видове клетки, присъстващи в повечето тъканни срези, често предлага места за негативна контрола, но това трябва да се провери от потребителя. Неспецифичното оцветяване, ако присъства, обикновено е дифузно на вид. Спорадично оцветяване на съединителна тъкан може да се наблюдава и в части от прекомерно фиксирани във формалин тъкани. Използвайте интактни клетки за интерпретация на резултатите от оцветяването. Некротичните или дегенериралите клетки често се оцветяват неспецифично.⁵ Може да се видят неверни позитивни резултати поради неимунологично свързване на протеини или реакционни продукти на субстрата. Те може да са причинени и от ендогенни ензими като псевдопероксидаза (еритроцити), ендогенна пероксидаза (цитохром C) или ендогенен биотин⁶ (напр. черен дроб, пърда, мозък, бърбек). За диференциране на ендогенна ензимна активност или неспецифично ензимно свързване от специфична имунна реактивност ексклузивно може да се оцветят допълнителни тъкани от пациента, съответно със субстрат-хромоген, Streptavidin-HRP или маркиран полимер и субстрат-хромоген. Ако се появи специфично оцветяване в негативната тъканна контрола, резултатите от спесимените на пациентите трябва да се считат за невалидни.

Негативна контрола на реактива

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

Тъкан от пациента

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

Ограничения

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

Тъканното оцветяване зависи от боравенето с тъканта и нейната обработка преди оцветяването. Неправилната фиксация, замразяване, размразяване, промиване, изсушаване, затопляне, срязване или контаминацията с други тъкани или течности може да причини поява на артефакти, блокиране на антителата или неверни негативни резултати. Несъвместимите резултати може да са причинени от отклонения във фиксацията и методите на вграждане в парафина или от присъщи нередности вътре в тъканта.⁷ Прекаленото или непълно контраоцветяване може да компрометира правилната интерпретация на резултатите.

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

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K е за употреба с вградени в парафин срези със специфични изисквания за фиксация. Не всички антигени изискват извличане на епитоп. Оптималните условия за извличане на епитоп трябва да бъдат валидирани от потребителя, тъй като зависят от тъканта, фиксацията и/или първичното антитяло. Възможно е да настъпи неочаквана антигенна експресия, особено при неоплазми. Клиничната интерпретация на всеки оцветен тъканен срез трябва да включва морфологичен анализ и оценката на подходящи контроли.

Работни характеристики

Действието на Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K е валидирано с помощта на Novocastra™ първични антитела, за които трипсинът е препоръчителната техника на извличане. Този продукт е стабилен до изтичане на срока на годност, отпечатан на етикета му.

Библиография

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7: 161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Изменения на предишно издание

Предупреждения и предпазни мерки.

Дата на издаване

10 Септември 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Termékszám: RE7160-K

Alkalmazási terület

In vitro diagnosztikai használatra.

A Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmetszetek enzimes előkezelésére szolgál az immunhisztokémiai (immunohistochemical, IHC) eljárásban alkalmazott, elsődleges antitesttel történő inkubálás előtt. A termék epitópfeltárássra szolgál olyan Novocastra™ antitestek használatára esetén, amelyeknél javasolt a tripszin alkalmazása. A következő antitestek kivétel képeznek: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p és NCL-CYCLIN D1-GM. Minden festődés meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollokkal kell kiegészíteni, valamint az értékelést a beteg klinikai kórtörténete és egyéb diagnosztikai vizsgálatok figyelembevételével, képzett patológusnak kell elvégeznie.

Az eljárás elve

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmetszetek enzimes előkezelése hozzáférhetővé teszi a szövetben található, fixálás során elrejtett epitópokat, és így fokozza bizonyos antitestek festődését. Az epitópfeltárássra kifejlesztett első proteolitikus enzim a tripszin volt.¹ Ilyen célra használható proteolitikus enzim továbbá a proteáz XXIV és a pepszin is.² Ujabbban az in situ hibridizációs technikákban általánosan alkalmazott proteináz K-t is használják.

Ez a termék olyan IHC-eljáráshoz használandó, amely egymás utáni műveletekből és közbeiktatott mosási lépésekből álló munkafolyamat alkalmazásával lehetővé teszi a formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmetszetek antigénjeinek fénymikroszkópos vizsgálattal történő kvalitatív azonosítását (az IHC-festés eljárási elvének leírását lásd az adott detektáló rendszer használati útmutatójában). Az enzimes előkezeléssel végzett epitópfeltárást csak bizonyos antitestek esetében javasolt (lásd az elsődleges antitestre vonatkozó **Felhasználási javaslatokat**). Az epitópfeltárást optimális körülményeit a felhasználónak kell validálnia, mivel ezek függnek a szövetről, a fixálástól és/vagy az elsődleges antitesttől.

Biztosított reagensek

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzim 10 mM 7,5 pH értékű tris-HCl-t és 1 mM kalcium-acetátot tartalmazó 40 tétrogatszázalékos glicerinben.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Tris-pufferelt sóoldat, felületaktív anyag és 0,35% ProClin™ 950.
3. Üres csepegtető üveg.

Feloldás, elegyítés, hígítás és titrálás

A munkaoldat elkészítéséhez a Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K terméket fel kell hígítani a Proteinase K Buffer RE7127 használatával (lásd „A Proteinase K munkaoldat” című részt). A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatás validálnia kell. A további hígítás az antigénfestődés elvesztését okozhatja. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatás validálnia kell.

Tárolás és stabilitás

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

A minták előkészítése

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

Figyelmeztetések és óvintézkedések

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Proteináz K-t tartalmaz
(<10%).

GHS08: Egészségi veszély.

Jelzőszó: Veszély.

H334: Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat.

P261: Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését.

P284: [Nem megfelelő szellőzés esetén] légzésvédelem kötelező.

P304+P340: BELÉLEGZÉS ESETÉN: Az érintett személyt friss levegőre kell vinni, és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni.

P342+311: Légzési problémák esetén: forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.

P501: A tartalom/edény elhelyezése hulladéként: a veszélyes vagy különleges hulladékok gyűjtőhelyén.

Az anyagbiztonsági adatlapot igény esetén rendelkezésre bocsátjuk, illetve elérhető a www.LeicaBiosystems.com weboldalon is.

Szakemberek általi használatra.

A mintákat fixálás előtt és után, valamint a velük érintkező összes anyagot fertőzések terjesztésére képes anyagként kell kezelni, és megfelelő körültekintéssel kell ártalmatlanítani.³

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

Minden potenciálisan toxikus összetevő ártalmatlanításával kapcsolatban kövesse a szövetségi, állami és helyi előírásokat.

Minimálisan kell csökkenteni a reagensek mikrobiális szennyeződését, különben megnövekedhet a nem specifikus festődés.

A megadottaktól eltérő inkubációs idők és hőmérsékletek hibás eredményekhez vezethetnek. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatást validálnia kell.

Eljárás

A. Szükséges, de nem szállított reagensek

Lásd az elsődleges antitest használati útmutatóját.

B. Szükséges, de nem szállított felszerelés

Általános immunhisztokémiai laboratóriumi felszerelés.

C. Módszer

A módszer végrehajtása előtt a felhasználóknak képzésben kell részesülniük az immunhisztokémiai módszerekkel kapcsolatban, továbbá az Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K termék, az elsődleges antitest, a hígítás és a detektáló rendszer kombinációját a felhasználónak validálnia kell ismert pozitív és negatív kontrollszorokat alkalmazásával.

Ha nincs másként feltüntetve, minden lépést szobahőmérsékleten (25 °C) kell végrehajtani. Az elsődleges antitesttel végzett inkubálás előtt végre kell hajtani a következő lépéseket.

1. Mossa le a tárgylemezeket ionmentes vízben.
2. Inkubálja őket a Proteinase K munkaoldattal (lásd „A Proteinase K munkaoldat” című részt) 5 percig.
3. Mossa át TBS-ben.
4. Az elsődleges antitest és a detektáló rendszer gyártói használati útmutatójának megfelelően végezze el az IHC-protokollt.

A Proteinase K munkaoldat

Mérjen 40 µl Proteinase K Concentrate RE7126 terméket 6 ml Proteinase K Buffer RE7127 pufferhez. Töltse az oldatot a biztosított csepegtető üvegbe.

A munkaoldat 3 hónapig stabil, ha 2–8 °C-on tárolják.

Minőség-ellenőrzés

A felhasználó laboratóriumában alkalmazott szövetfeldolgozási és technikai eljárások eltérései jelentős különbséget okozhatnak az eredményekben, ami az alábbi eljárásokon túl belső kontrollok rendszeres futtatását teszi szükségessé. Kontrollként friss boncolási/biopsziás/sébeszeti mintákat kell használni, amelyeket a lehető leghamarabb a betegmintákkal megegyező módon kell formalinban fixálni, feldolgozni és paraffinvaszba ágyazni.

Pozitív szövetkontroll

A megfelelő szövet-előkészítés és festési technikák ellenőrzésére használatos. Minden tesztelési körülményegyüttes/elsődleges antitest esetében és minden megfestési sorozatban kell alkalmazni egy pozitív szövetkontrollt. A gyengégen pozitív festődésű szövet alkalmasabb az erősebben pozitív festődésű szövetnél az optimális minőség-ellenőrzéshez, valamint a kismértékű reagensbomlás észleléséhez.⁴

A javasolt pozitív kontrollszóvettel kapcsolatban lásd az elsődleges antitest használati útmutatóját. Ha a pozitív szövetkontroll nem mutat pozitív festődést, a vizsgált minták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Negatív szövetkontroll

A pozitív szövetkontroll után azért kell megvizsgálni, hogy a vizsgált antigén elsődleges antitest segítségével történő jelölésének specificitását ellenőrizni lehessen. A javasolt negatív kontrollszóvettel kapcsolatban lásd az elsődleges antitest használati útmutatóját. Ezenkívül a legtöbb szövetszövetben jelen lévő különböző sejttípusok gyakran használhatók negatív kontrollként, de ezeket a felhasználónak kell ellenőriznie. Ha van nem specifikus festődés, az rendszerint diffúz megjelenésű. A formalinban túlfixált szövetekből származó metszeteknél a kötőszövet szórványos festődése is megfigyelhető. A festési eredmények értelmezésére ép sejteket használjon. A nekrotizált vagy degenerálódott sejtek gyakran nem specifikusan festődnek meg.⁵ A fehérjék vagy a szubsztrát reakciótermékeinek nem immunológiai kötődése miatt álpozitív eredmények jelentkezhetnek. Álpozitív eredményeket okozhatnak olyan endogén enzimek is, mint a pszeudoperoxidáz (vörösvérsejtek), endogén peroxidáz (citokróm C), illetve endogén biotin⁶ (pl. máj, emlő, agy, vese). Az endogén enzim aktivitásának vagy az enzimek nem specifikus kötődésének a specifikus immunreakciótól való megkülönböztetésére további betegszövetek festhetők kizárólag szubsztrát–kromogén oldattal, Streptavidin-HRP-vel vagy jelölt polimerrel és szubsztrát–kromogénnel. Ha a negatív szövetkontroll specifikus festődést mutat, a betegminták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Negatív reagenskontroll

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

Betegszövet

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

Korlátozások

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

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

A túlzott vagy hiányos kontrasztfestés ronthatja az eredmények megfelelő értelmezését.

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

A Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K termék paraffinba ágyazott metszeteken történő alkalmazásra szolgál meghatározott fixálási követelmények mellett. Nem minden antigén esetében kell epitópfeltárást végezni. Az epitópfeltáráshoz optimális körülményeit a felhasználónak kell validálnia, mivel ezek függenek a szövettől, a fixálástól és/vagy az elsődleges antitesttől. Időnként váratlan antigén-expresszió fordulhat elő, különösen daganatok esetében. Bármely festett szövetmetszet klinikai értelmezéséhez morfológiai elemzést is kell végezni, és ki kell értékelni a megfelelő kontrollokat.

Teljesítményjellemzők

A Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K teljesítményét olyan Novocastra™ elsődleges antitestekkel validálták, amelyek esetében a tripszines feltárási eljárás javasolt. A termék a termékcímkén feltüntetett lejárati dátumig stabil.

Szakirodalom

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
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.

Módosítások az előző változathoz képest

Figyelmeztetések és óvintézkedések.

Kiadás dátuma

10 szeptember 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Nr. produs RE7160-K

Utilizare prevăzută

Pentru diagnosticare in vitro.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) este destinată pretratării enzimatice a secțiunilor de țesut fixate cu formalină, încorporate în parafină înainte de incubare cu un anticorp primar într-o procedură imunohistochimică (IHC). Acest produs poate fi utilizat pentru recuperarea epitopilor cu anticorpi Novocastra™ pentru care se recomandă tripsina; excepțiile cunoscute la aceasta sunt: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p și NCL-CYCLIN D1-GM. Interpretarea clinică a oricărei colorări sau a absenței acesteia trebuie completată cu studii morfologice utilizând controale adecvate și trebuie evaluată în contextul antecedentelor clinice ale pacientului, precum și al altor teste de diagnosticare efectuate de către un patolog calificat.

Principiul procedurii

Pretratarea cu enzime a secțiunilor de țesut fixate cu formalină, încorporate în parafină îmbunătățește colorația anumitor anticorpi prin expunerea epitopilor din țesut care au fost mascați la fixare. Prima enzimă proteolitică utilizată pentru recuperarea epitopilor a fost tripsina.¹ Alte enzime proteolitice care pot fi utilizate în acest scop includ Proteaza XXIV și Pepsina.² Mai recent a fost utilizată și proteinaza K utilizată de obicei în tehnici de hibridizare in situ.

Acest produs este utilizat într-o procedură IHC bazată pe peroxidază care permite identificarea calitativă prin microscopie optică a antigenilor în secțiuni de țesut fixat cu formalină, încorporat în parafină, prin etape secvențiale cu etape de spălare intercalate (pentru Principiul Procedurii de colorație IHC a se vedea Instrucțiunile de Utilizare ale sistemului de detecție corespunzător). Recuperarea epitopilor prin pretratare enzimatică este recomandată pentru un număr limitat de anticorpi (a se vedea **Recomandări de Utilizare** pentru anticorpul primar). Condițiile optime pentru recuperarea epitopilor trebuie validate de utilizator, întrucât acestea depind de țesut, fixare și/sau anticorpul primar.

Reactivi furnizați

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzimă în glicerol 40% v/v conținând 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, cu acetat de calciu 1 mM.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Soluție salină tamponată cu trometamină, surfactant și 0,35% ProClin™ 950.
3. Flacon picurător gol.

Reconstituire, amestecare, diluare, titrare

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K necesită diluare în Proteinase K Buffer RE7127 pentru a prepara o soluție de lucru (a se vedea Soluția de Lucru de Proteinază K). Utilizatorul trebuie să valideze orice astfel de schimbare. Diluarea poate duce la pierderea colorării antigenilor. Utilizatorul trebuie să valideze orice astfel de schimbare.

Depozitare și stabilitate

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

Pregătirea specimenului

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

Avertismente și precauții

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Conține Proteinază K (<10%).

GHS08: Pericol pentru sănătate.

Cuvinte de avertizare: Pericol.

H334: Poate provoca simptome de alergie sau astm sau dificultăți de respirație în caz de inhalare.

P261: Evitați să inspirați praful/fumul/gazul/ceapa/vaporii/spray-ul.

P284: [În cazul în care ventilarea este necorespunzătoare] purtați echipament de protecție respiratorie.

P304+340: ÎN CAZ DE INHALARE: transportați persoana la aer liber și mențineți-o într-o poziție confortabilă pentru respirație.

P342+311: În caz de simptome respiratorii: Sunați la un CENTRU DE TOXICOLOGIE sau un medic.

P501: Eliminați conținutul/recipientul la punctul de colectare pentru deșeuri periculoase sau speciale.

O Fișă tehnică de securitate a materialului este disponibilă la cerere sau poate fi obținută de pe site-ul www.LeicaBiosystems.com

Pentru utilizatori profesioniști.

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

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

Consultați reglementările naționale, județene sau locale pentru informații privind eliminarea la deșeuri a oricăror componente cu potențial toxic.

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

Procedură

A. Reactivi necesari care nu sunt însă furnizați

A se vedea Instrucțiunile de Utilizare pentru anticorpii primari

B. Echipamente necesare care nu sunt însă furnizate

Echipament de laborator general pentru imunohistochimie.

C. Metodologie

Înainte de a utiliza această metodologie, utilizatorii trebuie instruiți în tehnicile de imunohistochimie, iar utilizarea în combinație a Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, a anticorpului primar, diluarea acestuia, împreună cu sistemul de detecție trebuie validată de utilizator printr-o serie de controale pozitive și negative cunoscute.

Dacă nu se indică altfel, toate etapele se efectuează la temperatura camerei (25 °C). Trebuie realizate următoarele etape înainte de incubarea cu anticorpii primari.

1. Spălați lamelele în apă deionizată.
2. Incubați cu Soluția de lucru de Proteinază K (a se vedea Soluția de lucru de Proteinază K) timp de 5 minute.
3. Spălați în TBS.
4. Procedeți cu protocolul IHC conform Instrucțiunilor de utilizare ale producătorului pentru anticorpii primari și sistemul de detecție.

Soluția de lucru de Proteinază K

Adăugați 40 µL de Proteinase K Concentrate RE7126 la 6 ml de Proteinase K Buffer RE7127. Încărcați soluția în flaconul picurător furnizat.

Soluția de lucru este stabilă până la 3 luni când este depozitată la 2–8 °C.

Controlul calității

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

Țesutul de control pozitiv

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

Țesutul de control negativ

Trebuie examinat după țesutul de control pozitiv pentru a verifica specificitatea informațiilor de etichetare ale antigenului țintă în funcție de anticorpii primari. Pentru țesutul de control negativ recomandat, a se vedea Instrucțiunile de utilizare pentru anticorpii primari. Ca alternativă, varietatea de tipuri diferite de celule prezente în majoritatea secțiunilor tisulare oferă frecvent locuri de control negativ, dar acest lucru trebuie verificat de către utilizator. Colorația nespecifică, dacă este prezentă, are, de obicei, un aspect difuz. Colorația sporadică a țesutului conjunctiv poate fi observată, de asemenea, în secțiuni de țesuturi fixate în mod excesiv în formalină. Folosiți celule intacte pentru interpretarea rezultatelor de colorație. Celulele necrotice sau degenerate se colorează deseori într-un mod nespecific.⁵ Se pot observa rezultate fals pozitive ca urmare a legării non-immunologice a proteinelor sau produșilor de reacție ai substratului. Acestea pot fi cauzate, de asemenea, de enzimele endogene precum pseudoperoxidaza (eritrocite), peroxidaza endogenă (citocromul C) sau biotina endogenă⁶ (de exemplu, ficat, sân, creier, rinichi). Pentru a diferenția activitatea enzimelor endogene sau legarea nespecifică a enzimelor de imunoreactivitatea specifică, pot fi colorate țesuturi suplimentare de la pacient numai cu substrat cromogen, Streptavidin-HRP sau polimer etichetat și substrat cromogen. În cazul în care colorația specifică are loc în țesutul de control negativ, rezultatele obținute pe eșantioanele pacientului trebuie să fie considerate nevalide.

Reactivul de control negativ

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

Țesutul pacientului

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

Limitări

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

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

Contracolorația excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea adecvată a rezultatelor.

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

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K este destinată utilizării pe secțiuni încorporate în parafină cu cerințe specifice de fixare. Nu toți antigenii necesită recuperarea epitopilor. Condițiile optime pentru recuperarea epitopilor trebuie validate de utilizator, întrucât acestea depind de țesut, fixare și/sau anticorpus primar. Poate apărea expresia neașteptată a antigenului, în special în neoplasme. Interpretarea clinică a oricărei secțiuni tisulare colorate trebuie să includă analiza morfologică și evaluarea probelor de control adecvate.

Caracteristici de performanță

Performanța Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K a fost validată utilizând anticorpii primari Novocastra™ pentru care tripsina este tehnica de recuperare recomandată. Acest produs este stabil până la data expirării tipărită pe eticheta produsului.

Bibliografie

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7: 161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Amendamente la ediția anterioară

Avertismente și precauții.

Data publicării

10 septembrie 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (ИHC)

Продукция №: RE7160-K

Назначение

Для диагностики *in vitro*.

Фермент протеиназы Novocastra™ Enzyme Proteinase K (ИHC) предназначена для предварительной ферментной обработки зафиксированных в формалине и залитых в парафин срезов тканей перед инкубацией с первичным антителом в рамках иммуногистохимической (ИГХ) процедуры. Этот продукт может использоваться для демаскирования эпитопа с антителами Novocastra™, для которых рекомендован трипсин, при этом известные исключения для него это: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-Ip и NCL-CYCLIN D1-GM. Клиническая интерпретация любого окрашивания или его отсутствия должна быть дополнена морфологическими исследованиями с надлежащими контролями и должна быть оценена квалифицированным патологом с учетом анамнеза пациента и других диагностических тестов.

Принцип процедуры

Предварительная ферментная обработка зафиксированных в формалине и залитых в парафин срезов улучшает окрашивание некоторых антител за счет выявления эпитопов в ткани, которые были замаскированы в процессе фиксации. Первым протеолитическим ферментом, который использовали для демаскировки эпитопов, был трипсин.¹ Другие протеолитические ферменты, которые могут использоваться для этой же цели, включают Protease XXIV и пепсин.² Недавно стала использоваться proteinase K, которая обычно используется в методах гибридизации *in situ*.

Этот продукт используется в иммуногистохимических процедурах, делая возможным количественное определение методом световой микроскопии антигенов на срезах зафиксированных в формалине и залитых в парафин тканей последовательными этапами с промежуточными процедурами промывки. (Принцип иммуногистохимического окрашивания представлен в Инструкции по использованию соответствующей системы детекции). Демаскирование эпитопов посредством предварительной обработки ферментами рекомендуется для ограниченного числа антител (см. **Рекомендации по использованию** первичных антител). Оптимальные условия демаскировки эпитопов должны быть валидированы пользователем, поскольку они зависят от типа тканей, фиксации и/или первичных антител.

Реактивы, входящие в комплект поставки

1. Концентрат фермента протеиназа Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 млб). Фермент Enzyme в 40 % о/о глицерина, содержащего 10 мМ трис-соляной кислоты, pH 7,5, с 1 мМ кальция ацетата.
2. Буфер фермента протеиназы Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 млб). Трис-солевой буферный раствор, ПАВ и 0,35 % ProClin™ 950.
3. Пустой флакон-капельница.

Восстановление, смешивание, разведение, титрование

Концентрат фермента протеиназы Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K требует разведения в буферном растворе протеиназы Proteinase K Buffer RE7127 для приготовления рабочего раствора (см. «Рабочий раствор протеиназы K/Proteinase K Working Solution»). Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем. Дальнейшее разведение может привести к потере окрашивания антигена. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.

Хранение и стабильность

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

Подготовка образцов

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

Предупреждения и меры предосторожности

КОНЦЕНТРАТ ПРОТЕИНАЗЫ ФЕРМЕНТА K (ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE)

Содержит Proteinase K (<10 %).

GHS08: Опасность для здоровья человека.

Сигнальное слово: Опасно.

H334: При вдыхании может вызывать аллергические реакции, астматические симптомы или затруднение дыхания.

P261: Не вдыхайте пыль, дым, газ, туман, пары, распыления.

P284: [В случае неадекватной вентиляции] используйте средства защиты органов дыхания.

P304+340: ПРИ ВДЫХАНИИ: Если дыхание затруднено, вынесите пострадавшего на свежий воздух и обеспечьте ему покой в удобном для дыхания положении.

P342+311: Если отмечаются признаки поражения дыхательной системы: Обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или за медицинской помощью.

P501: Утилизируйте содержимое/контейнер в пункте, предназначенном для сбора специальных или опасных отходов.

Паспорт безопасности химической продукции предоставляется по запросу или доступен на сайте: www.LeicaBiosystems.com

Только для профессионального использования.

С образцами (до и после фиксации) и всеми материалами, на которые они воздействуют, следует обращаться как с потенциально способными к передаче инфекции и утилизировать, соблюдая соответствующие меры предосторожности³.

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

По вопросам утилизации любых возможно токсических компонентов выполняйте требования федеральных, региональных или местных нормативных документов.

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

Процедура

A. Необходимые реактивы, не входящие в комплект поставки

См. «Инструкции по использованию первичного антитела».

B. Необходимое оборудование, не входящее в комплект поставки

Стандартное лабораторное оборудование для иммуногистохимических исследований.

C. Методика

Прежде чем приступить к этой методике, пользователи должны пройти обучение проведению иммуногистохимических исследований и использованию в комбинации с ферментом Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, первичным антителом, его разведению, при этом применение системы обнаружения должно быть валидировано пользователем на серии известных положительных и отрицательных контролей.

Если не указано иное, выполняйте все этапы при комнатной температуре (25 °C). Перед инкубацией с первичным антителом следует предпринять следующие меры.

1. Промойте предметные стекла деионизированной водой.
2. Инкубируйте с рабочим раствором Proteinase K Working Solution (см. «Рабочий раствор протеиназы K/Proteinase K Working Solution») в течение 5 минут.
3. Промойте в растворе TBS (трис-солевом буферном растворе).
4. Следуйте ИГХ протоколу в соответствии с «Инструкциями по использованию первичных антител и системы обнаружения», подготовленными их производителями.

Рабочий раствор протеиназы K (Proteinase K Working Solution)

Добавьте 40 мкл концентрата протеиназы Proteinase K Concentrate RE7126 к 6 мл буферного раствора протеиназы Proteinase K Buffer RE7127. Загрузите раствор в предоставленный флакон-капельницу.

Рабочий раствор стабилен в течение 3 месяцев при хранении при 2–8 °C.

Контроль качества

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

Положительный контроль ткани

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

Отрицательный контроль ткани

Этот тест необходимо выполнять после положительного контроля ткани для проверки специфичности меченая целевого антигена первичным антителом. Для определения тканей, которые рекомендуется использовать в качестве отрицательного контроля, смотрите «Инструкции по использованию первичных антител». Кроме того, разнообразные типы клеток для отрицательного контроля можно часто найти в большинстве срезов тканей, однако такие препараты должны быть проверены пользователем. Неспецифическое окрашивание, если оно присутствует, обычно выглядит диффузным. В срезах тканей, избыточно фиксированных формалином, можно также иногда увидеть окрашивание соединительной ткани. Для интерпретации результатов окрашивания используйте интактные клетки. Что касается неокрашенных или разрушенных клеток, часто можно наблюдать неспецифическое окрашивание.⁵ Связывание белков или продуктов реакции субстрата, происходящее иммунологическим способом, может привести к ложноположительным результатам. Они могут быть обусловлены активностью эндогенных ферментов, таких как псевдопероксидаза (эритроцитов), эндогенная пероксидаза (цитохром C) или эндогенный биотин⁶ (например, в печени, молочной железе, головном мозге, почках). Чтобы отличить активность эндогенных ферментов или неспецифическое связывание ферментов от специфической иммунореактивности, можно выполнить окрашивание дополнительных тканей, взятых у пациента, с использованием исключительно хромогенного субстрата или с применением Стрептавидина, ковалентно конъюгированного с пероксидазой хрена (Streptavidin-HRP), или меченого полимера и хромогенного субстрата соответственно. При наличии специфического окрашивания в отрицательном контроле ткани результаты исследования полученных у пациентов образцов считаются недействительными.

Отрицательный контроль реактива

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

Ткань, полученная у пациента

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

Ограничения

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

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

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

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

Фермент протеиназа Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K предназначен для использования на залитых в парафин средах с особыми требованиями к фиксации. Не все антигены требуют демаскирования эпитопов. Оптимальные условия демаскировки эпитопов должны быть валидированы пользователем, поскольку они зависят от типа тканей, фиксации и/или первичных антител. Возможна непредвиденная экспрессия антигена, особенно в опухолях. Клиническая интерпретация любого окрашенного среза ткани должна включать морфологический анализ и оценку соответствующих контролей.

Эксплуатационные характеристики

Эффективность фермента протеиназы Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K была валидирована с использованием первичных антител, для которых в качестве метода демаскировки рекомендован трипсин. Данная продукция остается стабильной до истечения срока годности, который указан на ее этикетке.

Список литературы

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
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.

Дополнения к предыдущему выпуску

Предупреждения и меры предосторожности.

Дата выпуска

10 Сентябрь 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Nr produktu: RE7160-K

Przeznaczenie

Do diagnostyki in vitro.

Preparat Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) jest przeznaczony do enzymatycznej obróbki wstępnej utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie skrawków tkanek przed inkubacją z przeciwciałem pierwszorzędowym w procedurze immunohistochemicznej (IHC). Ten produkt może być stosowany do odmaskowywania epitopu przy pomocy przeciwciał Novocastra™, dla których zalecana jest trypsina. Znanyymi wyjątkami są: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p, and NCL-CYCLIN D1-GM. Klinczną interpretację barwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. Ocenę powinien przeprowadzić wykwalifikowany patolog w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych.

Zasady postępowania

Enzymatyczna obróbka wstępna utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie skrawków tkanek poprawia barwienie niektórych przeciwciał w wyniku eksponowanie w tkance epitopów, które zostały zamaskowane podczas utrwalania. Pierwszym enzymem proteolitycznym stosowanym do odmaskowywania epitopów była trypsina.¹ Inne enzymy proteolityczne, które mogą być stosowane do tego celu, to proteaza XXIV i pepsyna.² Ostatnio zastosowano również proteinazę K, która jest powszechnie stosowana w technikach hybridacji in situ.

Produkt ten jest stosowany w procedurze IHC, która pozwala na jakościową identyfikację za pomocą mikroskopii świetlnej antygenów w skrawkach utrwalonych w formalinie i zatopionej w parafinie tkanki, w kolejnych etapach przedzielonych przemywaniem (Zasady Postępowania podczas barwienia IHC są opisane w Instrukcji stosowania odpowiedniego systemu detekcji). Odmaskowywanie epitopu przez enzymatyczną obróbkę wstępną jest zalecane dla ograniczonej liczby przeciwciał (zob. **Zalecenia dotyczące stosowania** dla przeciwciał pierwszorzędowych). Optymalne warunki odmaskowywania epitopu powinny zostać zweryfikowane przez użytkownika, ponieważ są one zależne od tkanki, utrwalania i/lub przeciwciała pierwszorzędowego.

Odczynniki znajdujące się w zestawie

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzym w 40% v/v glicerolu zawierającym 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, z 1 mM octanu wapnia.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 mL). Roztwór soli fizjologicznej buforowany odczynnikiem Tris, surfaktant i 0,35% ProClin™ 950.
3. Pusta butelka z kropelniczką.

Dodawanie wody, mieszanie, rozcieńczanie, miareczkowanie.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K wymaga rozcieńczenia w Proteinase K Buffer RE7127 w celu przygotowania roztworu roboczego (zob. Roztwór roboczy proteinazy K). Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika. Dalsze rozcieńczanie może prowadzić do niemożliwości przeprowadzenia barwienia antygeny. Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Przechowywanie i trwałość

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

Przygotowanie próbek

Zalecanym utrwalaczem jest 10-procentowa obojętna buforowana formalina do zatopionych w parafinie skrawków tkankowych.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Zawiera proteinazę K (<10%).

GHS08: Zagrożenie dla zdrowia.

Słowa sygnalizujące:
Niebezpieczeństwo.

H334: Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.

P261: Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.

P284: [W przypadku nieodpowiedniej wentylacji] stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych.

P304+340: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.

P342+311: W przypadku w przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: Skontaktować się z OŚRODKIEM KONTROLI ZATRUĆ lub lekarzem.

P501: Zawartość/pojemnik zutilizować w punkcie zbiórki odpadów niebezpiecznych lub specjalnych.

Karta charakterystyki jest udostępniana na żądanie lub można ją pobrać ze strony www.LeicaBiosystems.com

Dla profesjonalnych użytkowników.

Próbki przed i po utrwaleniu oraz wszelkie materiały narażone na kontakt z nimi należy traktować jak materiały potencjalnie zakaźne i należy je utylizować z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności.³

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

Wszelkie potencjalnie toksyczne składniki należy utylizować zgodnie z krajowymi lub lokalnymi przepisami.

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

Procedura

A. Odczynniki wymagane, lecz niedostarczane

Zob. Instrukcja stosowania przeciwciała pierwszorzędowego

B. Sprzęt wymagany, lecz niedostarczany

Ogólne wyposażenie laboratorium immunohistochemicznego.

C. Metodologia

Przed zastosowaniem tej metodologii użytkownicy muszą zostać przeszkoleni w zakresie technik immunohistochemicznych, a zastosowanie Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, przeciwciała pierwszorzędowego i jego rozcieńczalnika w systemie detekcji powinno zostać zweryfikowane przez użytkownika podczas serii powszechnie stosowanych kontroli pozytywnych i negatywnych.

O ile nie wskazano inaczej, wszystkie etapy należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej (25 °C). Przed inkubacją z pierwszorzędowym przeciwciałem należy wykonać następujące kroki.

1. Przepłukać preparaty w dejonizowanej wodzie.
2. Inkubować z roztworem roboczym proteinyzy K (zob. Roztwór roboczy proteinyzy K) przez 5 minut.
3. Przemycić w TBS (roztworze soli fizjologicznej buforowanej odczynnikiem Tris).
4. Należy postępować zgodnie z protokołem IHC (badania immunohistochemicznego) określonym w Instrukcji dołączonej przez producenta dotyczącej przeciwciała pierwszorzędowego i systemu detekcji.

Roztwór roboczy proteinyzy K

Dodać 40 µl Proteinase K Concentrate RE7126 do 6 ml Proteinase K Buffer RE7127. Wlać roztwór do butelki z zakraplaczem znajdującej się w zestawie.

Roztwór roboczy jest stabilny do 3 miesięcy przy przechowywaniu w temperaturze 2-8 °C.

Kontrola jakości

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

Tkankowa kontrola pozytywna

Stosowana w celu wskazania prawidłowo przygotowanych tkanek i prawidłowych technik barwienia. W każdej serii barwienia każdy zestaw warunków testowych/przeciwciała pierwszorzędowych powinien uwzględnić jedną tkankową kontrolę pozytywną. Do optymalnej kontroli jakości i do wykrywania niewielkich poziomów degradacji odczynników bardziej nadaje się tkanka o słabym barwieniu pozytywnym niż tkanka o silnym barwieniu pozytywnym.⁴ Informacje na temat zalecanej pozytywnej kontroli tkankowej zob. Instrukcja stosowania przeciwciała pierwszorzędowego. Jeśli tkankowa kontrola pozytywna nie wykaże odpowiedniego barwienia pozytywnego, wyniki testu przeprowadzonego na próbkach pobranych od pacjenta należy uznać za nieważne.

Tkankowa kontrola negatywna

Należy ją wykonać po tkankowej kontroli pozytywnej, aby sprawdzić swoistość znakowania docelowego antygenu przez przeciwciała pierwszorzędowe. W przypadku zalecanej negatywnej kontroli tkankowej zob. Instrukcja stosowania przeciwciała pierwszorzędowego. Ewentualnie tkankowa kontrola negatywna może obejmować różne typy komórek obecne w większości skrawków tkankowych, jednak powinno to zostać zweryfikowane przez użytkownika. Barwienie niespecyficzne, jeżeli jest obecne, zwykle ma charakter rozproszony. Na skrawkach wykonanych z materiału tkankowego nadmiernie utrwalonego w formalinie można również zaobserwować sporadyczne barwienie tkanki łącznej. Do interpretacji wyników barwienia należy używać nieszkodzonych komórek. Komórki martwicowe lub zdegenerowane często powodują barwienie niespecyficzne.⁵ Wyniki fałszywie pozytywne mogą pojawić się w następstwie nieimmunologicznego wiązania białek lub występowania produktów reakcji substratów. Mogą być również spowodowane przez enzymy endogenne, takie jak pseudoperoxydaza (erytrocyty), peroxydaza endogenna (cytochrom C) lub biotylna endogenna⁶ (np. wątroba, sutki, nerki). Aby odróżnić endogenną aktywność enzymatyczną lub niespecyficzne wiązanie enzymów od swoistej immunoreaktywności, dodatkowe tkanki pacjenta mogą być barwione - odpowiednio - wyłącznie substratem chromogenem, preparatem Streptavidin-HRP lub znakowanym polimerem i substratem chromogenicznym. Jeśli w trakcie tkankowej kontroli negatywnej nastąpi barwienie niespecyficzne, wyniki testu przeprowadzonego na próbkach pobranych od pacjenta należy uznać za nieważne.

Negatywna kontrola odczynnika

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

Tkanka pacjenta

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

Ograniczenia

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

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

Nadmierne lub niepełne barwienie ujemne może pogarszać interpretację wyników.

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

Preparat Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K są przeznaczone do skrawków zatopionych w parafinie o określonych wymogach dotyczących utrwalań. Nie wszystkie antygeny wymagają odmaskowywania epitopu. Optymalne warunki odmaskowywania epitopu powinny zostać zweryfikowane przez użytkownika, ponieważ są one zależne od tkanki, utrwalań i/lub przeciwciała pierwszorzędowego. Może wystąpić nieoczekiwana ekspresja antygeny, szczególnie w przypadku nowotworów. Interpretacja kliniczna wybarwionych skrawków musi obejmować analizę morfologiczną oraz ocenę przeprowadzoną w ramach odpowiednich kontroli.

Charakterystyka działania

Skuteczność Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K została zweryfikowana za pomocą przeciwciał pierwszorzędowych Novocastra™, w przypadku których do odmaskowywania stosuje się trypsynę. Produkt zachowuje stabilność do wpływu daty ważności umieszczonej na etykiecie.

Bibliografia

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7: 161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Ostrzeżenia i środki ostrożności.

Data publikacji

10 września 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Kataloška številka: RE7160-K

Predvidena uporaba

Za diagnostično uporabo in vitro.

Izdelek Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) je namenjen encimski predhodni obdelavi rezin tkiva, fiksiranih s formalinom in vstavljenih v parafin, pred inkubacijo s primarnim protitelesom pri imunohistokemijskem (IHC) postopku. Ta izdelek se lahko uporablja za pridobivanje epitopa s protitelesi Novocastra™, pri katerih je priporočen tripsin; znane izjeme so: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p in NCL-CYCLIN D1-GM. Klinično razlago obarvanja ali odsotnosti le-tega morajo dopoljevati morfološke študije ustreznih kontrolnih vzorcev, ki jih v okviru klinične anamneze bolnika in drugih diagnostičnih testov oceni usposobljen patolog.

Načelo postopka

Encimska predhodna obdelava rezin tkiva, fiksiranih s formalinom in vstavljenih v parafin, izboljša obarvanje nekaterih protiteles, saj izpostavi epitope v tkivu, ki so bili maskirani med fiksacijo. Prvi proteolitični encim, ki so ga uporabili za pridobivanje epitopov, je bil tripsin.¹ Drugi proteolitični encimi, ki se lahko uporabljajo za ta namen, vključujejo proteazo XXIV in pepsin.² V zadnjem času se uporablja tudi proteinaza K, ki se običajno uporablja pri hibridizaciji in situ.

Ta izdelek se uporablja pri postopku IHC, ki omogoča svetlobno-mikroskopsko kvalitativno identifikacijo antigenov v rezinah tkiva, fiksiranih s formalinom in vstavljenih v parafin, z zaporednimi koraki in vmesnimi koraki izpiranja (za načelo postopka IHC glejte navodila za uporabo ustreznega sistema za zaznavanje). Pridobivanje epitopa z encimsko predhodno obdelavo je priporočeno za omejeno število protiteles (glejte **priporočila za uporabo** primarnih protiteles). Optimalne pogoje pridobivanja epitopa mora uporabnik validirati, saj so ti odvisni od tkiva, fiksacije in/ali primarnega protitelesa.

Priloženi reagenti

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Encim v 40-% v/v glicerolu, ki vsebuje 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, z 1 mM kalcijevim acetatom.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Fiziološka raztopina s pufrom tris, surfaktantom in 0,35 % ProClin™ 950.
3. Prazna steklenička s kapalko.

Rekonstitucija, mešanje, redčenje, titracija

Izdelek Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K je treba razredčiti v pufru Proteinase K Buffer RE7127 za pripravo delovne raztopine (glejte Delovna raztopina proteinaze K). Uporabnik mora potrditi vsako takšno spremembo. Nadaljnje redčenje lahko privede do neobarvanja antigena. Uporabnik mora potrditi vsako takšno spremembo.

Shranjevanje in stabilnost

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

Priprava vzorcev

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

Opozorila in previdnostni ukrepi

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Vsebuje proteinazo K (< 10 %).

GHS08: Nevarno za zdravje.

Signalne besede: Nevarno.

H334: Lahko povzroči simptome alergije ali astme ali težave z dihanjem pri vdihavanju.

P261: Ne vdihavati prahu/dima/plina/meglice/hlapov/ razpršila.

P284: [Ob nezadostnem prezračevanju] nositi opremo za zaščito dihal.

P304+340: PRI VDIHAVANJU: Prenesti osebo na svež zrak in jo pustiti v udobnem položaju, ki olajša dihanje.

P342+311: Pri respiratornih simptomih: Pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE ali zdravnika.

P501: Odstraniti vsebino/posodo na točko za zbiranje nevarnih ali posebnih odpadkov.

Varnostni list je na voljo na zahtevo ali na spletnem mestu www.LeicaBiosystems.com.

Za poklicne uporabnike.

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

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

Sledite zveznim, državnim ali lokalnim predpisom za odstranjevanje katerih koli morebitno strupenih sestavin.

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

Postopek

A. Potrebni reagenti, ki niso priloženi

Glejte navodila za uporabo primarnih protiteles

B. Potrebna oprema, ki ni priložena

Spošna oprema za imunohistokemijski laboratorij.

C. Metodologija

Pred uporabo te metodologije morajo biti uporabniki usposobljeni za delo z imunohistokemijskimi tehnikami in njihovo uporabo v kombinaciji z izdelkom Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K. Primarna protitelesa, njihovo razredčitev in sistem za zaznavanje mora validirati uporabnik pri nizu znanih pozitivnih in negativnih kontrol.

Vse korake izvajajte pri sobni temperaturi (25 °C), razen če je navedeno drugače. Pred inkubacijo s primarnim protitelesom je treba izvesti naslednje korake.

1. Preparate operite v deionizirani vodi.
2. Inkubirajte 5 minut v delovni raztopini proteinaze K (glejte poglavje Delovna raztopina proteinaze K).
3. Izperite s TBS.
4. Nadaljujte s protokolom IHC v skladu z navodili izdelovalca primarnega protitelesa in sistema za zaznavanje.

Delovna raztopina proteinaze K

Dodajte 40 µl izdelka Proteinase K Concentrate RE7126 v 6 ml pufru Proteinase K Buffer RE7127. Vlijte raztopino v priloženo stekleničko s kapalko.

Delovna raztopina je stabilna največ 3 mesece, če jo shranjujete pri temperaturi 2–8 °C.

Kontrola kakovosti

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

Pozitivni kontrolni vzorci tkiva

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

Negativni kontrolni vzorci tkiva

Pregledati jih morate po pregledu pozitivnih kontrolnih vzorcev tkiva, da preverite specifičnost oznake ciljnega antigena glede na primarno protitelo. Za priporočeno negativno kontrolno tkivo glejte navodila za uporabo primarnega protitelesa. Drugače pa se kot negativni kontrolni vzorci pogosto uporablja vrsta različnih celic, ki so prisotne v večini rezin tkiv, vendar pa mora tako uporabo preveriti uporabnik. Nespecifično barvanje, če je prisotno, je običajno razpršeno. Opazite lahko tudi posamično obarvanje vezivnega tkiva v rezinah tkiv, kot posledica premočnega fiksiranja s formalinom. Za razlago rezultatov obarvanja uporabite nespremenjene celice. Obarvanje nekrotičnih ali degeneriranih celic je pogosto nespecifično.⁵ Lažno pozitivni rezultati se lahko pojavijo zaradi ne-immunološke vezave proteinov ali produktov reakcije substrata. Povzročijo jih lahko tudi endogeni encimi, kot so psevdoperoksidaza (eritrociti), endogena peroksidaza (citokrom C) ali endogeni biotin⁶ (npr. jetra, dojke, možgani, ledvice). Za razlikovanje med endogeno aktivnostjo encimov ali nespecifično vezavo encimov od specifične imunske reaktivnosti, lahko barvate dodatna tkiva bolnikov izključno s kombinacijami substrat-kromogen, streptavidin-HRP ali označeni polimer in substrat-kromogen. Če pride do specifičnega obarvanja negativnih kontrolnih vzorcev tkiva, morate rezultate vzorcev bolnika zavreči kot neveljavne.

Negativni kontrolni reagent

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

Bolnikovo tkivo

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

Omejitve

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

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

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

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

Izdelek Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K je namenjen uporabi pri rezinah, vstavljenih v parafin, s specifičnimi zahtevami za fiksacijo. Pridobivanje epitopa ni potrebno pri vseh antigenih. Optimalne pogoje pridobivanja epitopa mora uporabnik validirati, saj so ti odvisni od tkiva, fiksacije in/ali primarnega protitelesa. Lahko pride do nepričakovanega izražanja antigena, zlasti pri neoplazmah. Pri klinični razlagi obarvane rezine tkiva morate upoštevati morfološko analizo in oceno ustreznih kontrol.

Značilnosti učinkovitosti

Učinkovitost izdelka Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K so validirali s primarnimi protitelesi Novocastra™, pri katerih je priporočena tehnika pridobivanja s tripsinom. Izdelek je stabilen do datuma izteka roka uporabnosti, ki je naveden na oznaki izdelka.

Literatura

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
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.

Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji

Opozorila in previdnostni ukrepi.

Datum izdaje

10 september 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Č. výrobku: RE7160-K

Zamýšlené použití

Pro diagnostické použití in vitro.

Produkt Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) je určen k enzymatické předběžné úpravě formálním fixovaných řezů tkáně zalitých v parafínu před inkubací s primární protilátkou v rámci imunohistochemického (IHC) postupu. Tento produkt lze použít k odmaskování epitopu s protilátkami Novocastra™, pro které je doporučován trypsin. Znamé výjimky tvoří: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-Ip a NCL-CYCLIN D1-GM. Klinickou interpretaci jakéhokoliv barvení nebo jeho nepřítomnosti je nutné doplnit morfologickým vyšetřením s použitím správných kontrol a zhodnotit je musí kvalifikovaný patolog v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a jinými diagnostickými testy.

Princip metody

Předběžná úprava enzymem formálním fixovaných řezů tkáně zalitých v parafínu zlepšuje barvení některých protilátek exponováním epitopů v rámci tkání, které byly během fixace maskovány. Prvním proteolytickým enzymem, který se používal k odmaskování epitopu, byl trypsin.¹ Další proteolytické enzymy, které lze použít k tomuto účelu, zahrnují proteázu XXIV a pepsin.² Poslední dobou se v technických hybridizace in situ běžně používá proteináza K.

Tento produkt se používá v rámci metod imunohistochemického (IHC) barvení, který umožňuje kvalitativní identifikaci světelnou mikroskopii ve tkáni fixované formálním a zalité v parafínu prostřednictvím sekvenčních kroků s interponovanými omývacími kroky (princip metody IHC barvení viz návod k použití příslušného detekčního systému). Pro omezený počet protilátek se doporučuje odmaskování epitopu v rámci enzymatické předběžné úpravy (viz **Doporučení k použití** primární protilátky). Optimální podmínky pro odmaskování epitopu musí být validovány uživatelem, protože jsou závislé na tkáni, fixaci anebo primární protilátce.

Dodávané reagensie

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzym představuje 40 % obj. % glycerolu obsahující 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, s 1 mM octanu vápenatého.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Fyziologický roztok pufovaný roztokem tris-pufu, surfaktant a 0,35 % ProClin™ 950.
3. Prázdná nádoba s kapátkem.

Rekonstituce, Míchání, Ředění, Titrace

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K vyžaduje přípravu pracovního roztoku ředěním v pufru Proteinase K Buffer RE7127 (viz Proteinase K Working Solution). Všechny takové změny musí být uživatelem validovány. Další ředění může vést k ztrátě barvení antigenu. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

Skladování a stabilita

Uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Nezmrazujte. Okamžitě po použití vraťte do teploty 2–8 °C. Nepoužívejte po uplynutí data expirace uvedeného na štítku výrobku. Podmínky skladování jiné než uvedené musí uživatel validovat. Neexistují zjevné známky, které by indikovaly kontaminaci anebo nestabilitu. Současně s neznámými vzorky je proto u vzorků pacienta třeba provést i hodnocení příslušné pozitivní a negativní tkáňové kontroly.

Příprava vzorku

Fixační roztok doporučený pro řezy tkáně zalité v parafínu je 10 % formalin pufovaný na neutrální pH.

Varování a bezpečnostní opatření

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Obsahuje proteinázu K
(< 10 %).

GHS08: Ohrožení zdraví.

Signální slova: Nebezpečí.

H334: Při vdechování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže.

P261: Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosólů.

P284: [V případě nedostatečného větrání] použijte vybavení pro ochranu dýchacích cest.

P304+340: PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání.

P342+311: Při dýchacích potížích: Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.

P501: Obsah/obal zlikvidujte ve sběrném místě pro nebezpečný nebo zvláštní odpad.

Bezpečnostní list materiálu je k dispozici na požádání nebo na webu www.LeicaBiosystems.com

Pro profesionální uživatele.

Se vzorky, před fixací i po fixaci, a se všemi materiály, které s nimi přišly do kontaktu, je nutno zacházet, jako by mohly přenášet infekci, a zlikvidovat je s použitím příslušných bezpečnostních opatření.³

Nikdy reagensie nepipetujte ústy a zabraňte kontaktu reagensi a vzorků s kůží a sliznicemi. Pokud se reagensie nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody.

Údaje o likvidaci jakýchkoli potenciálně toxických komponent prostudujte ve federálních, státních nebo místních nařízeních.

Minimalizujte mikrobiální kontaminaci reagensi, mohlo by dojít ke zvýšení výskytu nespecifického barvení. Inkubační doby nebo teploty jiné než předepsané mohou vést k chybným výsledkům. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

Postup

A. Potřebné reagensie, které nejsou součástí dodávky

Viz návod k použití primární protilátky

B. Potřebné vybavení, které není dodáno

Obecné vybavení imunohistochemické laboratoře.

C. Metodika

Před prováděním metody musí být uživatelé vyškoleni v imunohistochemických technikách. Použití kombinace Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, primární protilátky, její ředění, společně s detekčním systémem musí být musí uživatel validovat při sérii známých pozitivních a negativních kontrol.

Pokud není uvedeno jinak, provádějí se všechny kroky při pokojové teplotě (25 °C). Před inkubací s primární protilátkou je třeba provést následující kroky.

1. Sklíčka omyje deionizovanou vodou.
2. Inkubujte s pracovním roztokem Proteinase K Working Solution (viz Proteinase K Working Solution) po dobu 5 minut.
3. Omyjte v TBS.
4. Postupujte podle imunohistochemického protokolu v souladu s návodem k použití pro primární protilátku a detekční systém od výrobce.

Pracovní roztok proteináza K

Přidejte 40 µl roztoku Proteinase K Concentrate RE7126 do 6 ml pufru Proteinase K Buffer RE7127. Roztok nalijte do dodané lahvičky s kapátkem.

Pokud je pracovní roztok uchovávan při teplotě 2–8 °C, je stabilní nejméně 3 měsíce.

Kontrola jakosti

Rozdíly ve zpracování tkání a v technických postupech v laboratoři uživatele mohou způsobit významnou variabilitu výsledků, což vyžaduje kromě níže uvedených postupů i pravidelné provádění kontrol v laboratoři. Kontroly musí být čerstvé pitevni/bioptické/operační vzorky ko nejdříve fixované formalinem, zpracované a zalité do parafinového vosku, stejným způsobem jako vzorek/vzorky pacienta.

Positivní tkáňová kontrola

Používá se k průkazu správné připravených tkání a správných barvicích technik. V každém barvicím cyklu musí být použita jedna pozitivní tkáňová kontrola pro každý soubor testovacích podmínek/primárních protilátek. Pro optimální kontrolu jakosti a k detekci menšího stupně degradace reagentie je vhodnější tkáň se slabým pozitivním barvením než tkáň se silným pozitivním barvením.⁴ Doporučená pozitivní tkáňová kontrola je stanovena v návodu k použití primární protilátky. Pokud pozitivní tkáňová kontrola nevykazuje pozitivní barvení, musí být výsledky testovaných vzorků považovány za neplatné.

Negativní tkáňová kontrola

Musi být vyšetřena po pozitivní tkáňové kontrole k ověření specifity označení cílového antigenu primární protilátkou. Doporučená negativní tkáňová kontrola je stanovena v návodu k použití primární protilátky. Alternativně často představuje místa negativní kontroly řada různých typů buněk přítomných ve většině tkáňových řezů, to ale musí uživatel validovat. Nespecifické barvení, je-li přítomno, má obvykle difúzní vzhled. V řezech ze tkání nadměrně fixovaných formalinem může být také zjištěno sporadické barvení pojivové tkáně. K interpretaci výsledků barvení použijte neporušené buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky se často barví nespecificky.⁵ Falešné pozitivní výsledky mohou být důsledkem neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakčního substrátu. Mohou být také způsobeny endogenními enzymy, jako je např. pseudoperoxidáza (erytrocyty), endogenní peroxidáza (cytochrom C) nebo endogenní biotin⁶ (např. játra, prs, mozek, ledviny). K odlišení aktivity endogenních enzymů či nespecifické vazby enzymů od specifické imunoreaktivity mohou být barveny další tkáně pacienta výlučně chromogenním substrátem, Streptavidin-HRP nebo značeným polymerem a chromogenním substrátem, v tomto pořadí. Pokud dojde v negativní tkáňové kontrole ke specifickému barvení, musí být výsledky vzorků pacienta považovány za neplatné.

Negativní reagenční kontrola

K vyhodnocení nespecifického barvení a umožnění lepší interpretace specifického barvení v místě antigenu použijte na řezu z každého vzorku pacienta nespecifickou negativní reagenční kontrolu místo primární protilátky.

Tkáň pacienta

Nakonec vyšetřete barvené vzorky pacienta. Intenzita pozitivního barvení musí být zhodnocena v kontextu se vším nespecifickým barvením pozadí u negativní reagenční kontroly. Jako u každého imunohistochemického vyšetření, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl zjištěn, nikoli, že antigen není ve vyšetřovaných buňkách/tkáňích přítomen. V případě potřeby použijte k identifikaci falešně negativních reakcí panel protilátek.

Omezení

Imunohistochemické vyšetření je vícekrokový diagnostický proces, který spočívá ve specializovaném školení ve výběru vhodných reagentů; výběru, fixaci a zpracování tkání; přípravě IHC sklíčka; a v interpretaci výsledků barvení.

Barvení tkáně závisí na manipulaci s tkání a jejím zpracování před barvením. Nesprávným postupem při fixaci, zmrazení, rozmrazení, omývání, sušení, zahřívání, krájení řezů nebo kontaminací jinými tkáněmi či tekutinami mohou vzniknout artefakty, může dojít k vychytávání protilátek nebo k falešně negativním výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem odchylek ve fixačních metodách a metodách zalití v konzervačním médiu, nebo přirozených odchylek ve tkáni.⁷

Nadměrné nebo nedostatečné kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.

Klinickou interpretaci jakéhokoli barvení nebo jeho nepřítomnosti je nutné doplnit morfologickým vyšetřením s použitím správných kontrol a zhodnotit je musí kvalifikovaný patolog v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a jinými diagnostickými testy.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K je určena k použití s řezy zalitými v parafínu se specifickými fixačními požadavky. Všechny antigeny nevyžadují odmaskování epitopu. Optimální podmínky pro odmaskování epitopu musí být validovány uživatelem, protože jsou závislé na tkáni, fixaci anebo primární protilátce. Může dojít k expresi neočekávaných antigenů, zejména u nádorů. Klinická interpretace jakéhokoli barveného tkáňového řezu musí zahrnovat morfologickou analýzu a zhodnocení příslušných kontrol.

Vlastnosti výkonu

Výkonnost Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K byla validována pomocí primárních protilátek Novocastra™, pro které je pro techniku odmaskování doporučen trypsin. Tento produkt je stabilní až do data expirace uvedeného na štítku výrobku.

Literatura

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
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, Ashcavaí 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.

Opravy předchozího vydání

Varování a bezpečnostní opatření

Datum vydání

10 září 2018

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Č. produktu: RE7160-K

Zamýšľané použitie

Na diagnostické použitie in vitro.

Prípravok Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) je určený na enzymatickú predprípravu rezov tkaniva zaliateho do parafínu a fixovaného formalínom pred inkubáciou s primárnou protilátkou pri imunohistochemických postupoch (IHC). Tento produkt sa môže používať na záchyt epitopu s protilátkami Novocastra™, pre ktoré sa odporúča trypsin. Známe výnimky sú nasledujúce: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-Ip a NCL-CYCLIN D1-GM. Klinická interpretácia akéhokoľvek farbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými vyšetreniami za použitia zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a iných diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.

Princíp postupu

Enzymatická predpríprava rezov tkaniva zaliateho do parafínu a fixovaného formalínom zlepšuje farbenie niektorých protilátok prostredníctvom odhalenia epitopov v tkanive, ktoré boli počas fixácie zakryté. Prvý proteolytický enzým použitý na záchyt epitopu bol trypsin.¹ Medzi ďalšie proteolytické enzýmy, ktoré sa dajú použiť na tento účel, patria Proteáza XXIV a Pepsín.² V poslednej dobe sa tiež používa proteináza K, ktorá sa bežne používa pri technikách hybridizácie in situ.

Tento produkt sa používa pri postupoch IHC a umožňuje kvalitatívnu identifikáciu prostredníctvom svetelnej mikroskopie antigénov v rezoch tkaniva zaliateho do parafínu a fixovaného formalínom postupnými krokmi a medzikrokmi umývania (informácie týkajúce sa princípov postupu farbenia IHC nájdete v návode na použitie k príslušnému detekčnému systému). Záchyt epitopu prostredníctvom enzymatickej predprípravy sa odporúča pre obmedzený počet protilátok (pozrite si časť **Odporúčania na použitie** pre primárne protilátky). Používateľ musí validovať optimálne podmienky záchytu epitopu, pretože závisia od tkaniva, fixácie alebo primárnej protilátky.

Dodané činidlá

1. Koncentrát Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzým v 40 % v/v glycerole s obsahom 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 s 1 mM octanu vápenatého.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Tris-pufrovaný fyziologický roztok, povrchovo aktívne činidlo a 0,35 % prípravok ProClin™ 950.
3. Prázdna fľaša na odkvapkávanie.

Rekonštitúcia, miešanie, riedenie, titrácia

Prípravok Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K sa musí zriediť s prípravkom Proteinase K Buffer RE7127 na prípravu pracovného roztoku (pozrite si časť Pracovný roztok Proteinase K). Každú takúto zmenu musí validovať používateľ. Ďalšie zriedenie môže viesť k strate antigénového zafarbenia. Každú takúto zmenu musí validovať používateľ.

Ukladnenie a stabilita

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

Príprava vzorky

Odporúčaný fixačný prípravok je 10 % neutrálny pufrovaný formalín pre bločky tkaniva zaliate do parafínu.

Varovania a bezpečnostné opatrenia

PRÍPRAVOK ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Obsahuje proteinázu K (< 10 %).

GHS08: Nebezpečný pre zdravie.

Signálne slová:
Nebezpečenstvo.

H334: Pri vdýchnutí môže vyvolať alergiu alebo príznaky astmy, alebo dýchacie ťažkosti.

P261: Zamedzte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pary/aerosólov.

P284: [V prípade nedostatočného vetrania] používajte ochranu dýchacích ciest.

P304+340: PO VDÝCHNUTÍ: Presuňte osobu na čerstvý vzduch a umožnite jej pohodlne dýchať.

P342+311: Pri sťaženom dýchaní: Zavolajte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM alebo lekára.

P501: Obsah/zásobník zlikvidujte v zberní nebezpečného alebo špeciálneho odpadu.

Materiálový bezpečnostný list je k dispozícii na požiadanie alebo na stránkach www.LeicaBiosystems.com

Určené pre odborníkov.

So vzorkami pred fixáciou a po nej a všetkými materiálmi, ktoré s nimi prišli do kontaktu, je nutné manipulovať ako s potenciálne infekčnými a zlikvidovať ich pri dodržaní zodpovedajúcich bezpečnostných opatní.³

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

Likvidáciu prípadných potenciálne toxických súčastí definujú federálne, štátne alebo miestne predpisy.

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

Postup

A. Požadované, ale nedodávané činidlá

Pozrite si návod na použitie pre primárnu protilátku

B. Požadované, ale nedodávané vybavenie

Všeobecné vybavenie imunohistochemického laboratória

C. Metóda

Pred realizáciou tejto metodológie musí byť používateľ vyškolený v oblasti imunohistochemických techník a ich používanie v kombinácii s prípravkom Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, primárnymi protilátkami a ich riedeniami s detekčným systémom musí používateľ overiť prostredníctvom série známych pozitívnych a negatívnych kontrol.

Ak nie je uvedené inak, všetky kroky sa vykonávajú pri izbovej teplote (25 °C). Pred inkubáciou s primárnou protilátkou sa musia vykonať nasledujúce kroky.

1. Sklíčka umyte v deionizovanej vode.
2. Inkubujte použitím pracovného roztoku proteinázy K (pozrite si časť Pracovný roztok proteinázy K) na 5 minút.
3. Premyte v TBS.
4. Postupujte podľa protokolu IHC v súlade s návodom na použitie od výrobcu primárnej protilátky a detekčného systému.

Pracovný roztok proteinázy K

Pridajte 40 µl prípravku Proteinase K Concentrate RE7126 do 6 ml prípravku Proteinase K Buffer RE7127. Vložte roztok do dodanej fľaše na odkvapkávanie.

Pracovný roztok je stabilný 3 mesiace, ak sa skladuje pri teplote 2 – 8 °C.

Kontrola kvality

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

Pozitívna kontrola tkanivom

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

Negatívna kontrola tkanivom

Nutné vyšetriť po pozitívnej kontrole tkanivom s cieľom overiť špecifickosť značenia cieľového antigénu primárnou protilátkou. Odporúčanú negatívnu kontrolu tkanivom si pozrite v návode na použitie primárnej protilátky. Ako negatívnu kontrolu je možné použiť aj rôzne typy buniek zafarbenia vo väčšine tkanivových rezov, takýto postup si však vyžaduje validáciu používateľom. Prípadné nešpecifické farbenie má obvykle difúzný vzhľad. V rezoch tkanív silne fixovaných formálnom môže byť pozorované sporadické farbenie spojiva. Na interpretáciu výsledkov farbenia používajte intaktné bunky. Nekrotické alebo degenerované bunky sa často farbja nešpecificky.⁵ Falošne pozitívne výsledky môžu byť pozorované v dôsledku neimunologickej väzby proteínov alebo produktov reakcie substrátu. Môžu byť spôsobené aj endogénnymi enzýmami, ako napr. pseudoperoxidázou (erytrocyty), endogénnou peroxidázou (cytochróm C) alebo endogénnym biotínom⁶ (napr. peččeň, prsník, mozog, oblička). S cieľom diferencovať endogénnu enzymatickú aktivitu alebo nešpecifickú väzbu enzýmov od špecifickej imunoreaktivity môžete nafarbiť ďalšie vzorky tkanív pacienta výhradne substrátovým chromogénom, prípravkom Streptavidin-HRP, resp. značeným polymérom alebo substrátovým chromogénom. V prípade špecifického farbenia v negatívnej kontrole tkanivom je nutné výsledky vzoriek pacienta považovať za neplatné.

Negatívna kontrola činidlom

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

Tkanivo pacienta

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

Obmedzenia

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

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

Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže narušiť správnu interpretáciu výsledkov.

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

Prípravok Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K je určený na použitie na rezoch zaliatych do parafínu so špecifickými požiadavkami na fixáciu. Nie všetky antigény vyžadujú záchyt epitopu. Používateľ musí validovať optimálne podmienky záchytu epitopu, pretože závisia od tkaniva, fixácie alebo primárnej protilátky. Najmä pri neopláziách môže dôjsť k nečakanej expresii antigénov. Klinická interpretácia akýchkoľvek farbených tkanivových rezov musí zahŕňať morfológickú analýzu a vyhodnotenie zodpovedajúcich kontrol.

Parametre výkonu

Výkonnosť prípravku Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K bola overená použitím primárnych protilátok Novocastra™, pre ktoré je odporúčanou technikou záchytu trypsin. Tento produkt je stabilný až do dátumu expirácie, ktorý je uvedený na štítku produktu.

Literatúra

1. Huang SN, Minasian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
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.

Úpravy predchádzajúceho vydania

Varovania a bezpečnostné opatrenia.

Dátum vydania

10 septembra 2018

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



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

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

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