

Novolink™ Polymer Detection Systems

Product No: RE7140-K, RE7150-K, RE7280-K, RE7290-K

Novolink™ Polymer

Product No: RE7200-K, RE7260-K

Novolink™ DAB (Polymer)

Product No: RE7230-K, RE7270-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 DA EL NL

Instructions for Use

Please read before using this product.

Mode d'emploi

À lire avant d'utiliser ce produit.

Istruzioni per L'uso

Si prega di leggere, prima di usare il prodotto.

Gebrauchsanweisung

Bitte vor der Verwendung dieses Produkts lesen.

Instrucciones de Uso

Por favor, leer antes de utilizar este producto.

Instruções de Utilização

Leia estas instruções antes de utilizar este produto.

Instruktioner vid Användning

Var god läs innan ni använder produkten.

Brugsanvisning

Læs venligst før produktet tages i brug.

Οδηγίες χρήσης

Παρακαλούμε διαβάστε τις οδηγίες πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν αυτό.

Instructies voor gebruik

Lees deze informatie voordat u dit product gebruikt.

Check the integrity of the packaging before use.

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

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

Vor dem Gebrauch die Verpackung auf Unversehrtheit überprüfen.

Comprobar la integridad del envase, antes de usarlo.

Verifique a integridade da embalagem antes de utilizar o produto.

Kontrollera att paketet är obrutet innan användning.

Kontroller, at pakken er ubeskadiget før brug.

Ελέγξτε την ακεραιότητα της συσκευασίας πριν από τη χρήση.

Controleer vóór gebruik de integriteit van de verpakking.

Novocastra™

Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests)

Product No: RE7280-K

Novolink™ Polymer Detection System (500 tests)

Product No: RE7150-K

Novolink™ Polymer Detection System (250 tests)

Product No: RE7140-K

Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests)

Product No: RE7290-K

Novolink™ Max Polymer (1250 tests)

Product No: RE7260-K

Novolink™ Polymer (250 tests)

Product No: RE7200-K

Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests

Product No: RE7270-K

Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests

Product No: RE7230-K

Intended Use

For *in vitro* diagnostic use.

Novolink™ Polymer Detection Systems are used for the visualization of mouse IgG, mouse IgM and rabbit IgG primary antibodies. Novolink™ Polymer and Novolink™ DAB (Polymer) contain component reagents of these systems and are intended for use in the procedure described below. 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

The first immunohistoperoxidase technique was reported by Nakane and Pierce.¹ Since then many developments have occurred, leading to increased sensitivity over earlier techniques. A recent development has been the use of polymeric labeling. This technology has been applied to both primary antibodies² and detection systems. The Novolink™ Polymer Detection Systems utilize a novel controlled polymerization technology to prepare polymeric HRP-linker antibody conjugates. Therefore, the problem of non-specific staining that can occur with Streptavidin/Biotin detection systems due to endogenous biotin does not occur.

These products are used in an immunohistochemical (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. If required by the primary antibody, sections are subjected to epitope retrieval prior to staining. Endogenous peroxidase activity is neutralized using the Peroxidase Block. This is followed by application of the Novocastra™ Protein Block to reduce non-specific binding of primary and polymer. The section is subsequently incubated with optimally diluted primary antibody. Post Primary (Rabbit anti Mouse IgG) is then used to detect mouse antibodies. The Novolink™ Polymer recognizes rabbit immunoglobulins, it detects the post primary and any tissue-bound rabbit primary antibodies. Sections are further incubated with the substrate/chromogen, 3,3' - diaminobenzidine (DAB), prepared from DAB Chromogen and Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer), as described below. Reaction with the peroxidase produces a visible brown precipitate at the antigen site. Sections are counterstained with Hematoxylin and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

Reagents Provided

Details of which reagents from the following list are supplied in each product are given in the table below.

1. Peroxidase Block. 3–4%(v/v) Hydrogen peroxide.
2. Protein Block. 0.4% Casein in phosphate-buffered saline, with stabilizers, surfactant, and 0.2% Bronidox L as a preservative.
3. Post Primary. Rabbit anti mouse IgG (<10 µg/mL) in 10% (v/v) animal serum in tris-buffered saline/0.09% ProClin™ 950.
4. Novolink™ Polymer. Anti-rabbit Poly-HRP-IgG (<25µg/mL) containing 10% (v/v) animal serum in tris-buffered saline/0.09% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen. 1.74% w/v 3,3' - diaminobenzidine, in a stabilizer solution.
6. Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Buffered solution containing ≤0.1% hydrogen peroxide and preservative.
7. Hematoxylin. <0.1% Hematoxylin.

Reagents	Product Number	Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests) RE7280-K	Novolink™ Polymer Detection System (500 tests) RE7150-K	Novolink™ Polymer Detection System (250 tests) RE7140-K	Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests) RE7290-K
Peroxidase Block	RE7101		2 x 25ml	1 x 25ml	
Protein Block	RE7102		2 x 25ml	1 x 25ml	
Post Primary	RE7111		2 x 25ml	1 x 25ml	
Novolink™ Polymer	RE7112		2 x 25ml	1 x 25ml	
DAB Chromogen	RE7105		1 x 3ml	1 x 3ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143		2 x 30ml	1 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107		2 x 25ml	1 x 25ml	
Peroxidase Block	RE7157	1 x 125ml			
Protein Block	RE7158	1 x 125ml			
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7162	1 x 8ml			
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163	1 x 150ml			
Hematoxylin	RE7164	1 x 125ml			
Peroxidase Block	RE7165				1 x 5ml
Protein Block	RE7166				1 x 5ml
Post Primary	RE7167				1 x 5ml
Novolink™ Polymer	RE7168				1 x 5ml
DAB Chromogen	RE7169				1 x 1ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7171				1 x 5ml
Hematoxylin	RE7172				1 x 5ml

Reagents	Product Number	Novolink™ Max Polymer (1250 tests) RE7260-K	Novolink™ Polymer (250 tests) RE7200-K	Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests RE7270-K	Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests RE7230-K
Post Primary	RE7111		1 x 25ml		
Novolink™ Polymer	RE7112		1 x 25ml		
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7105				1 x 3ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143				1 x 30ml
DAB Chromogen	RE7162			1 x 8ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163			1 x 150ml	

Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

The Peroxidase Block, Protein Block, Post Primary, Novolink™ Polymer and Hematoxylin are prediluted. Reconstitution, mixing, dilution, or titration of these reagents is not recommended. Further dilution may result in loss of antigen staining. The user must validate any such change.

The DAB Chromogen requires dilution to 1/20 in Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) prior to use. 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

DAB Chromogen

Contains <10% Biphenyl-3,3', 4,4'-Tetrahydroamine.

GHS08: Health hazard.

Signal words: Danger.

H341: Suspected of causing genetic defects.

H350: May cause cancer.

P201: Obtain special instructions before use.

P202: Do not handle until all safety precautions have been read and understood.

P281: Use personal protective equipment as required.

P308+313: IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.

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.

Do not mix reagents from different detection systems.

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.⁴

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

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

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

Procedure

A. Reagents required but not supplied

1. Standard solvents used in immunohistochemistry.
2. 50mM tris-buffered saline (TBS) pH7.6.
3. Antigen retrieval solution(s).
4. Enzyme retrieval solution(s).
5. Antibody diluent.
6. Primary antibody.
7. Mounting medium.

B. Equipment required but not supplied

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

C. Methodology

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

All steps must be followed as directed or performance may be impaired.

The combination of the 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).

For use on frozen tissue, cut sections and fix according to recommendations for primary antibody, commence at step 11.

1. Cut and mount sections on slides coated with a suitable tissue adhesive.
2. De-paraffinize sections in xylene or xylene substitutes.
3. Re-hydrate through graded alcohols.
4. Wash slides in running tap water.
5. Perform antigen retrieval as required (see **Recommendations for Use** for primary antibody).
6. Wash slides in de-ionized water.
7. Neutralize endogenous peroxidase using Peroxidase Block for 5 minutes.
8. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.

9. Incubate with Protein Block for 5 minutes.
10. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
11. Incubate with optimally diluted primary antibody (see **Recommendations for Use** for primary antibody).
12. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
13. Incubate with Post Primary for 30 minutes.
14. Wash in TBS for 2 x 5 minutes.
15. Incubate with Novolink™ Polymer for 30 minutes.
16. Wash in TBS for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
17. Develop peroxidase activity with DAB working solution (see DAB Working Solution) for 5 minutes.
18. Rinse slides in water.
19. Counterstain with Hematoxylin.
20. Rinse slides in water for 5 minutes.
21. Dehydrate, clear and mount sections.

DAB Working Solution

Add 50µl of DAB Chromogen to 1ml of Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Use within six hours of preparation.

Quality Control

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

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques. One positive tissue control should be included for each set of test conditions/primary antibody in each staining run. A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.⁵ For recommended positive control tissue see primary antibody Recommendations 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.⁶ 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 biotin⁷ (eg. liver, breast, brain, kidney). To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate-chromogen, with labeled polymer and substrate-chromogen or with Post Primary, labeled polymer and substrate-chromogen. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

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

Patient Tissue

Examine patient specimens 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.⁸

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.

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

Performance Characteristics

The performance of Novolink™ Polymer Detection Systems, Novolink™ Polymer and Novolink™ DAB (Polymer) have been validated using a range of Novocastra mouse IgG, mouse IgM* and rabbit IgG primary antibodies.

*Weak staining may be seen with some antibodies of IgM isotype.

These products are stable up to the expiry date(s) printed on the product label.

Bibliography

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14:929–931.
2. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International*. 1995; 45(2):108–115.
3. Shan-Rong Shi, Guo J Cote R J et al . *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 1999; 7:201-208.
4. 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.
5. 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.
6. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
7. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
8. 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

16 February 2015

Novocastra™

Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests)

Référence du produit: RE7280-K

Novolink™ Polymer Detection System (500 tests)

Référence du produit: RE7150-K

Novolink™ Polymer Detection System (250 tests)

Référence du produit: RE7140-K

Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests)

Référence du produit: RE7290-K

Novolink™ Max Polymer (1250 tests)

Référence du produit: RE7260-K

Novolink™ Polymer (250 tests)

Référence du produit: RE7200-K

Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests

Référence du produit: RE7270-K

Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests

Référence du produit: RE7230-K

Utilisation Prévue

Diagnostic *in vitro*.

Le Novolink™ Polymer Detection Systems sont destinés à la révélation des anticorps primaires de type IgG de souris, IgM de souris et IgG de lapin. Le Novolink™ Polymer et Novolink™ DAB (Polymer) renferment les composants réactifs de ces systèmes et sont destinés à être utilisés dans le cadre de la procédure décrite ci-dessous. L'interprétation clinique de tout marquage, ou absence de marquage, doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée par un pathologiste qualifié à la lumière des antécédents cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques.

Principe de la Procédure

La première technique immunoperoxydasique a été décrite par Nakane et Pierce.¹ Depuis lors, elle a fait l'objet de nombreux développements qui ont conduit à une augmentation de la sensibilité par rapport aux techniques plus précoces. L'emploi d'un marquage polymérique constitue un développement récent. Cette technologie a été appliquée aux anticorps primaires² et aux systèmes de détection. Les Novolink™ Polymer Detection Systems emploient une nouvelle technologie de polymérisation contrôlée pour préparer des conjugués polymériques HRP-anticorps de liaison. Par conséquent, le problème dû au marquage non spécifique susceptible de se produire avec les systèmes de détection Streptavidine/Biotine en raison de la présence de biotine endogène, ne se pose plus.

Ces produits sont utilisés dans le cadre d'une procédure immunohistochimique (IHC) qui permet une identification qualitative des antigènes par microscopie optique, dans des coupes fixées au formol, incluses en paraffine, par l'intermédiaire d'étapes séquentielles comportant des étapes de lavage. Préalablement au marquage, les coupes sont soumises à une restauration des épitopes, si l'anticorps primaire le nécessite. L'activité de la peroxydase endogène est neutralisée par le Peroxidase Block. Ceci est suivi par l'application du Protein Block afin de réduire la liaison non spécifique des anticorps primaire et secondaire. Les coupes sont ensuite incubées avec un anticorps primaire dilué de façon optimale. Post Primary (IgG de lapin anti-souris) est ensuite utilisé pour détecter les anticorps de souris. Le Novolink™ Polymer reconnaît les immunoglobulines de lapin, il détecte les anticorps post-primaires et tout anticorps primaire lié au tissu. Les coupes sont ensuite incubées avec le substrat chromogène, la 3,3' - diaminobenzidine (DAB), préparé à partir du DAB Chromogen et du Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) comme indiqué ci-dessous. La réaction avec la peroxydase produit un précipité brun visible au niveau du site antigénique. Les coupes font l'objet d'une coloration de contraste au Hématoxylin et sont placées sous une lamelle. Les résultats sont interprétés à l'aide d'un microscope optique et participent au diagnostic différentiel des processus physiopathologiques, susceptibles, ou non, d'être associés à un antigène particulier.

Réactifs Fournis

Le détail des réactifs de la liste suivante fournis avec chaque produit est donné dans le tableau ci-dessous.

1. Peroxidase Block. Peroxyde d'hydrogène à 3-4 %.
2. Protein Block. Caséine à 0,4 % dans une solution saline tampon phosphate, avec des agents de stabilisation, un surfactant, et un agent de conservation à 0,2 %, le Bronidox L.
3. Post Primary. IgG de lapin anti-souris (<10 mg/mL) dans 10 % (v/v) de sérum animal dans une solution saline tamponnée de Tris/ProClin™ 950 à 0,09 %.
4. Novolink™ Polymer. Poly-HRP-IgG anti-lapin (<25 µg/mL) contenant 10 % (v/v) de sérum animal dans une solution saline tamponnée de Tris/ProClin™ 950 à 0,09 %.
5. DAB Chromogen. 1,74 % w/v 3,3' - diaminobenzidine , dans une solution stabilisante.
6. Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Solution tamponnée contenant du peroxyde d'hydrogène à ≤0,1 % et un agent de conservation.
7. Hématoxylin. Hématoxyline à <0,1 %.

Réactifs	Référence du produit	Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests) RE7280-K	Novolink™ Polymer Detection System (500 tests) RE7150-K	Novolink™ Polymer Detection System (250 tests) RE7140-K	Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests) RE7290-K
Peroxidase Block	RE7101		2 x 25ml	1 x 25ml	
Protein Block	RE7102		2 x 25ml	1 x 25ml	
Post Primary	RE7111		2 x 25ml	1 x 25ml	
Novolink™ Polymer	RE7112		2 x 25ml	1 x 25ml	
DAB Chromogen	RE7105		1 x 3ml	1 x 3ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143		2 x 30ml	1 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107		2 x 25ml	1 x 25ml	
Peroxidase Block	RE7157	1 x 125ml			
Protein Block	RE7158	1 x 125ml			
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7162	1 x 8ml			
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163	1 x 150ml			
Hematoxylin	RE7164	1 x 125ml			
Peroxidase Block	RE7165				1 x 5ml
Protein Block	RE7166				1 x 5ml
Post Primary	RE7167				1 x 5ml
Novolink™ Polymer	RE7168				1 x 5ml
DAB Chromogen	RE7169				1 x 1ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7171				1 x 5ml
Hematoxylin	RE7172				1 x 5ml

Réactifs	Référence du produit	Novolink™ Max Polymer (1250 tests) RE7260-K	Novolink™ Polymer (250 tests) RE7200-K	Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests RE7270-K	Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests RE7230-K
Post Primary	RE7111		1 x 25ml		
Novolink™ Polymer	RE7112		1 x 25ml		
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7105				1 x 3ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143				1 x 30ml
DAB Chromogen	RE7162			1 x 8ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163			1 x 150ml	

Reconstitution, Mélange, Dilution, Titrage

Le Peroxidase Block, Protein Block, Post Primary, Novolink™ Polymer et Hematoxylin sont pré-dilués. Il n'est pas recommandé de reconstituer, mélanger, diluer, ou titrer ces réactifs. Une dilution supplémentaire est susceptible de se traduire par une perte de marquage des antigènes. Toute modification de ce type doit être validée par l'utilisateur.

Le DAB Chromogen doit être dilué au 1/20 dans du Novolink DAB Substrate Buffer (Polymer) avant emploi. 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

Conservé 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

DAB Chromogen

Contient <10% Biphényl-3,3',4,4'-Térayltetraamine.

GHS08: Danger pour la santé.

Mentions d'avertissement:
Danger.

H341: Susceptible d'induire des anomalies génétiques.
H350: Peut provoquer le cancer.

P201: Se procurer les instructions avant utilisation.

P202: Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.

P281: Utiliser l'équipement de protection individuel requis.

P308+313: EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.

P501: Éliminer le contenu/récipient dans point 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.

Ne pas mélanger les réactifs provenant de divers systèmes de détection.

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.⁴

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

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

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

Procédure

A. Réactifs Nécessaires mais non Fournis

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

B. Equipements Nécessaires mais non Fournis

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

C. Méthodologie

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

Toutes les étapes doivent être respectées comme indiqué sinon les performances sont susceptibles d'en être affectées.

L'association de l'anticorps primaire, sa dilution, et le système de détection doit être validée 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).

Pour l'utilisation sur les tissus congelés, découper et fixer les coupes selon les recommandations pour l'anticorps primaire, commencer à partir de l'étape 11.

1. Couper et monter les coupes sur des lames revêtues d'un adhésif adapté aux tissus.
2. Déparaffiner les coupes dans le xylène ou des substituts de xylène.
3. Réhydrater par l'intermédiaire d'alcools titrés.
4. Laver les lames à l'eau courante.

5. Mettre en oeuvre la restauration des antigènes si nécessaire (voir **Recommandations d'Utilisation** de l'anticorps primaire).
6. Laver les lames à l'eau désionisée.
7. Neutraliser la peroxydase endogène à l'aide de Peroxidase Block pendant 5 minutes.
8. Laver dans du TBS, 2 fois 5 minutes.
9. Incuber avec le Protein Block pendant 5 minutes.
10. Laver dans du TBS, 2 fois 5 minutes.
11. Incuber avec l'anticorps primaire dilué de façon optimale (voir **Recommandations d'Utilisation** de l'anticorps primaire).
12. Laver dans du TBS, 2 fois 5 minutes.
13. Incuber avec Post Primary pendant 30 minutes.
14. Laver dans du TBS, 2 fois 5 minutes.
15. Incuber avec Novolink™ Polymer pendant 30 minutes.
16. Laver dans du TBS, 2 fois 5 minutes sous agitation légère.
17. Laisser se développer l'activité de la peroxydase avec la solution de travail DAB (voir Solution de travail DAB) pendant 5 minutes.
18. Rincer les lames à l'eau.
19. Procéder à la coloration de contraste avec le Hematoxylin.
20. Rincer les lames sous l'eau pendant 5 minutes.
21. Déshydrater, assécher et monter les coupes.

Solution de Travail DAB

Ajouter 50 µl de DAB Chromogen à 1 ml de Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Utiliser dans les six heures qui suivent la préparation.

Contrôle de Qualité

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

Tissu de Contrôle Positif

Il est utilisé pour indiquer que les tissus ont été préparés correctement et que les techniques de marquage étaient appropriées. Un contrôle tissulaire positif doit être inclus dans toute opération de marquage pour chaque ensemble d'anticorps primaire/de conditions d'analyse. Un tissu présentant un marquage faiblement positif est plus adapté à un contrôle de qualité optimal qu'un tissu présentant un marquage fortement positif et il permet de détecter de moindres niveaux de dégradation du réactif.⁹ Pour le tissu de contrôle positif recommandé, voir les **Recommandations d'Utilisation** 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.⁹ Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique à des protéines ou à des produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être provoqués par des enzymes endogènes comme la pseudoperoxydase (érythrocytes), la peroxydase endogène (cytochrome C), ou la biotine endogène (foie, sein, cerveau, rein, par exemple). Pour différencier l'activité des enzymes endogènes ou la liaison non spécifique de l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être marqués exclusivement avec le substrat chromogène, avec le polymère marqué et le substrat chromogène, ou avec Post Primary, le polymère marqué et le substrat chromogène. 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 piègeage 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.⁸

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

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

Les Novolink Polymer Detection Systems et leurs composants doivent être utilisés sur des coupes incluses en paraffine avec des exigences spécifiques en matière de fixation. Une expression antigénique inattendue est susceptible de se produire, en particulier au niveau des néoplasmes. L'interprétation clinique de toute coupe tissulaire marquée doit comporter une analyse morphologique et l'évaluation des contrôles appropriés.

Caractéristiques de Performance

Les performances du Novolink™ Polymer Detection Systems, du Novolink™ Polymer et du Novolink™ DAB (Polymer) ont été validées à l'aide d'une gamme d'anticorps primaires de type IgG de souris, IgM* de souris et IgG de lapin Novocastra.

*Un marquage faible peut être observé avec les anticorps d'isotype IgM.

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

Bibliographie

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14:929–931.
2. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International*. 1995; 45(2):108–115.
3. Shan-Rong Shi, Guo J Cote R J et al . *Applied Immunohistochemistry & Molecular morphology*. 1999; 7:201-208.
4. 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.
5. 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.
6. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
7. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
8. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Amendements Apportés à la Version Précédente

Mises en garde et Précautions.

Date de Publication

16 février 2015

Novocastra™

Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests)

Cod. prodotto: RE7280-K

Novolink™ Polymer Detection System (500 tests)

Cod. prodotto: RE7150-K

Novolink™ Polymer Detection System (250 tests)

Cod. prodotto: RE7140-K

Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests)

Cod. prodotto: RE7290-K

Novolink™ Max Polymer (1250 tests)

Cod. prodotto: RE7260-K

Novolink™ Polymer (250 tests)

Cod. prodotto: RE7200-K

Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests

Cod. prodotto: RE7270-K

Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests

Cod. prodotto: RE7230-K

Uso Previsto

Per uso diagnostico *in vitro*.

Novolink™ Polymer Detection Systems sono destinati alla visualizzazione degli anticorpi primari IgG di topo, IgM di topo e IgG di coniglio. Novolink™ Polymer e Novolink™ DAB (Polymer) contengono reagenti componenti di tali sistemi e sono destinati all'uso nella tecnica descritta di seguito. 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

La prima tecnica immunostochimica con perossidasi è stata descritta da Nakane e Pierce.¹ A partire da quel momento sono stati fatti molti progressi, che hanno portato al miglioramento della sensibilità rispetto alle tecniche precedenti. Un recente sviluppo è stato l'impiego della marcatura polimerica. Questa tecnica è stata applicata sia agli anticorpi primari,² sia ai sistemi di determinazione. Novolink™ Polymer Detection Systems impiegano una nuova tecnica di polimerizzazione controllata, per la preparazione di coniugati anticorpali polimerici leganti HRP. Di conseguenza, non si presenta il problema della colorazione aspecifica, che si può verificare con i sistemi di determinazione che utilizzano streptavidina/biotina e che è dovuta alla biotina endogena.

Questi prodotti vengono impiegati nel corso di una tecnica immunostochimica (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. Se l'anticorpo primario lo richiede, prima della colorazione le sezioni tissutali vengono sottoposte a smascheramento degli epitopi. L'attività perossidasi endogena viene neutralizzata utilizzando Peroxidase Block. Segue quindi l'applicazione di Protein Block, per ridurre il legame aspecifico degli anticorpi primari e polimerici. La sezione tissutale viene successivamente incubata con anticorpo primario diluito in maniera ottimale. Post Primary (IgG di coniglio anti-topo) viene quindi utilizzato per rilevare anticorpi di topo. Novolink™ Polymer riconosce le immunoglobuline di coniglio e rileva gli anticorpi post-primari e qualsiasi anticorpo primario di coniglio legato ai tessuti. Le sezioni vengono poi incubate con il substrato/cromogeno, 3,3' - diaminobenzidina (DAB), preparato da DAB Chromogen e da Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer), come descritto più avanti. La reazione con le perossidasi produce un precipitato visibile di colore marrone in corrispondenza del sito antigenico. Le sezioni tissutali vengono controcolorate con Hematoxylin e coperte da vetrino coprioggetto. I risultati vengono interpretati mediante un microscopio ottico e sono utili nella diagnosi differenziale di processi fisiopatologici, che possono essere più o meno associati ad un particolare antigene.

Reagenti Forniti

Per ulteriori informazioni su quali reagenti della seguente lista siano forniti in ciascun prodotto, vedere la tabella in basso.

1. Peroxidase Block. Perossido di idrogeno 3–4%(v/v).
2. Protein Block. Caseina 0,4% in tampone fosfato, con stabilizzatori, surfattante e Bronidox L 0,2% come conservante.
3. Post Primary. IgG di coniglio anti-topo (<10 µg/mL) in siero animale al 10% (v/v) in soluzione salina tamponata con Tris/ProClin™ 950 allo 0,09%.
4. Novolink™ Polymer. Poly-HRP-IgG anti-coniglio (<25 µg/mL) contenente siero animale al 10% (v/v) in soluzione salina tamponata con Tris/ProClin™ 950 allo 0,09%.
5. DAB Chromogen. 3,3' - diaminobenzidina all'1,74% (p/v) in soluzione stabilizzante.
6. Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Soluzione tampone contenente lo ≤0,1% di perossido di idrogeno e conservante.
7. Hematoxylin. Ematossilina <0,1%

Reagenti	Cod. prodotto	Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests) RE7280-K	Novolink™ Polymer Detection System (500 tests) RE7150-K	Novolink™ Polymer Detection System (250 tests) RE7140-K	Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests) RE7290-K
Peroxidase Block	RE7101		2 x 25ml	1 x 25ml	
Protein Block	RE7102		2 x 25ml	1 x 25ml	
Post Primary	RE7111		2 x 25ml	1 x 25ml	
Novolink™ Polymer	RE7112		2 x 25ml	1 x 25ml	
DAB Chromogen	RE7105		1 x 3ml	1 x 3ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143		2 x 30ml	1 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107		2 x 25ml	1 x 25ml	
Peroxidase Block	RE7157	1 x 125ml			
Protein Block	RE7158	1 x 125ml			
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7162	1 x 8ml			
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163	1 x 150ml			
Hematoxylin	RE7164	1 x 125ml			
Peroxidase Block	RE7165				1 x 5ml
Protein Block	RE7166				1 x 5ml
Post Primary	RE7167				1 x 5ml
Novolink™ Polymer	RE7168				1 x 5ml
DAB Chromogen	RE7169				1 x 1ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7171				1 x 5ml
Hematoxylin	RE7172				1 x 5ml

Reagenti	Cod. prodotto	Novolink™ Max Polymer (1250 tests) RE7260-K	Novolink™ Polymer (250 tests) RE7200-K	Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests RE7270-K	Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests RE7230-K
Post Primary	RE7111		1 x 25ml		
Novolink™ Polymer	RE7112		1 x 25ml		
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7105				1 x 3ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143				1 x 30ml
DAB Chromogen	RE7162			1 x 8ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163			1 x 150ml	

Ricostituzione, Miscelazione, Diluizione, Titolazione

Peroxidase Block, Protein Block, Post Primary, Novolink™ Polymer e Hematoxylin sono prediluiti. Non si consiglia la ricostituzione, la miscelazione, la diluizione o la titolazione di questi reagenti. L'ulteriore diluizione potrebbe causare una perdita di colorazione dell'antigene. Tali eventuali variazioni devono essere convalidate dall'utente.

Prima dell'uso, DAB Chromogen va diluito 1/20 in Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). 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 al 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

DAB Chromogen

Contiene <10% Biphenyl-3,3', 4,4'-Tetrayltetraamine.

GHS08: Pericolo per la salute.

Avvertenze: Pericolo.

H341: Sospettato di provocare alterazioni genetiche.

H350: Può provocare il cancro.

P201: Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.

P202: Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.

P281: Utilizzare il dispositivo di protezione individuale richiesto.

P308+313: IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.

P501: Smaltire il prodotto / contenitori 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.

Non miscelare con reagenti di altri sistemi di determinazione.

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.⁴

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

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

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

Procedura

A. Reagenti Necessari ma non Forniti

1. Solventi standard utilizzati in immunocistochimica.
2. Tampone Tris salino (TBS) 50 mM a pH 7,6.
3. Soluzione/i per lo smascheramento antigenico.
4. Soluzione/i per lo smascheramento con enzimi.
5. Diluente per anticorpi.
6. Anticorpo primario.
7. Mezzo di montaggio.

B. Attrezzature Necessarie ma non Fornite

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

C. Metodologia

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

Tutte le fasi devono procedere come indicato, per non compromettere il rendimento.

La combinazione dell'anticorpo primario, la sua diluizione, assieme al sistema di determinazione vanno convalidate 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).

Per l'uso su tessuto congelato, tagliare e fissare le sezioni seguendo le raccomandazioni per l'anticorpo primario; cominciare dal punto 11.

1. Tagliare e montare le sezioni sui vetrini rivestiti da un adatto adesivo tissutale.
2. Deparaffinare le sezioni mediante xilene o suoi analoghi.
3. Reidratare mediante passaggi in alcool a gradazione decrescente.
4. Lavare i vetrini con acqua corrente.
5. Eseguire lo smascheramento antigenico come descritto (vedere Raccomandazioni per l'uso per l'anticorpo primario).
6. Lavare i vetrini con acqua deionizzata.

7. Neutralizzare la perossidasi endogena usando Peroxidase Block per 5 minuti.
8. Lavare 2 volte in TBS per 5 minuti.
9. Incubare con Protein Block per 5 minuti.
10. Lavare 2 volte in TBS per 5 minuti.
11. Incubare con anticorpo primario diluito in maniera ottimale (vedere Raccomandazioni per l'uso per l'anticorpo primario).
12. Lavare 2 volte in TBS per 5 minuti.
13. Incubare con Post Primary per 30 minuti.
14. Lavare 2 volte in TBS per 5 minuti.
15. Incubare con Novolink™ Polymer per 30 minuti.
16. Lavare 2 volte in TBS per 5 minuti, scuotendo delicatamente.
17. Sviluppare l'attività perossidasi con soluzione di lavoro DAB (vedere Soluzione di lavoro DAB) per 5 minuti.
18. Sciacquare i vetrini.
19. Controcolorare con Hematoxylin.
20. Sciacquare i vetrini per 5 minuti.
21. Disidratare, chiarificare e montare le sezioni.

Soluzione di Lavoro DAB

Aggiungere 50 µl di DAB Chromogen a 1 ml di Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Utilizzare entro sei ore dalla preparazione.

Controllo Qualità

Differenze nella processazione del tessuto e nelle tecniche in uso presso il laboratorio dell'utente possono produrre una discrepanza significativa nei risultati, rendendo necessaria la regolare esecuzione di controlli interni, in aggiunta alle procedure descritte di seguito. I controlli devono essere costituiti da campioni biologici freschi autoptici/bioptici/chirurgici e devono essere il più rapidamente possibile fissati in formalina, processati ed inclusi in paraffina, allo stesso modo dei campioni biologici ottenuti dal paziente.

Controllo Positivo del Tessuto

È usato per indicare tessuti correttamente preparati e tecniche di colorazione appropriate. Per ogni gruppo di condizioni del test/anticorpo primario e per ogni ciclo di colorazione, deve essere incluso un controllo positivo del tessuto. Un tessuto a debole colorazione positiva è più adatto di uno a colorazione positiva intensa per un ottimale controllo qualità e per mettere in evidenza livelli inferiori di degradazione del reagente.⁵ Per il tessuto raccomandato come controllo positivo, vedere le Raccomandazioni 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.⁶ 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 endogena⁷ (es. fegato, mammella, cervello, rene). Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame non specifico dall'immunoreattività specifica, si possono colorare ulteriori tessuti del paziente esclusivamente con substrato cromogeno, con polimero marcato e substrato cromogeno o con Post Primary, 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 del paziente. L'intensità della colorazione positiva va analizzata nel contesto di qualsiasi colorazione aspecifica di fondo del controllo negativo del reagente. Come per tutti gli altri test immunostochimici, un risultato negativo significa che l'antigene non è stato determinato, ma non necessariamente che fosse assente dalle cellule o dal tessuto esaminato. Se necessario, usare un pannello di anticorpi per identificare reazioni falsamente negative.

Limitazioni

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

La colorazione del tessuto dipende dalle modalità di manipolazione e di processazione del tessuto stesso, adottate prima della colorazione. La fissazione, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento o la sezione condotti in modo non corretto, o la contaminazione con altri tessuti o liquidi, può produrre artefatti, intrappolamento (trapping) anticorpale o risultati falsamente negativi. Risultati incompatibili possono essere dovuti a modifiche dei metodi di fissazione e di inclusione o ad irregolarità intrinseche al tessuto.⁸ 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.

Novolink Polymer Detection Systems e i loro componenti sono destinati all'uso su sezioni tissutali incluse in paraffina con specifici requisiti di fissazione. Un'espressione antigenica inattesa può manifestarsi in particolare nelle neoplasie. L'interpretazione clinica di ogni sezione tissutale colorata deve includere l'analisi morfologica e la valutazione dei controlli appropriati.

Caratteristiche di Rendimento

Il rendimento di Novolink™ Polymer Detection Systems, di Novolink™ Polymer e Novolink™ DAB (Polymer) è stato convalidato utilizzando una gamma di anticorpi primari Novocastra™ IgG di topo, IgM* di topo e IgG di coniglio.

*Con anticorpi di isotipo IgM, si può osservare una debole colorazione.

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

Riferimenti Bibliografici

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14:929–931.
2. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International*. 1995; 45(2):108–115.
3. Shan-Rong Shi, Guo J Cote R J et al . *Applied Immunohistochemistry & Molecular morphology*. 1999; 7:201-208.
4. 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.
5. 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.
6. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
7. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
8. 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

Avvertenze e Precauzioni.

Data di Pubblicazione

16 febbraio 2015

Novocastra™

Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests)

Produkt Nr.: RE7280-K

Novolink™ Polymer Detection System (500 tests)

Produkt Nr.: RE7150-K

Novolink™ Polymer Detection System (250 tests)

Produkt Nr.: RE7140-K

Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests)

Produkt Nr.: RE7290-K

Novolink™ Max Polymer (1250 tests)

Produkt Nr.: RE7260-K

Novolink™ Polymer (250 tests)

Produkt Nr.: RE7200-K

Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests

Produkt Nr.: RE7270-K

Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests

Produkt Nr.: RE7230-K

Verwendungszweck

Für *in-vitro*-Diagnostik.

Novolink™ Polymer Peroxidase Detection Systems sind zur Visualisierung primärer Maus-IgG-, Maus-IgM- und Kaninchen-IgG-Antikörper bestimmt. Novolink™ Polymer und Novolink™ DAB (Polymer) enthalten Komponentenreagenzien dieser Systeme und sind für die Verwendung im unten beschriebenen Verfahren bestimmt. Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Verfahrensgrundlage

Die erste Immunperoxidasetechnik wurde von Nakane und Pierce beschrieben.¹ Seitdem haben viele Entwicklungen auf diesem Gebiet zu einer erhöhten Empfindlichkeit heutiger Methoden gegenüber früheren Techniken geführt. Die Verwendung der polymeren Markierung wurde in jüngerer Zeit eingeführt. Diese Technologie ist sowohl auf primäre Antikörper² als auch Nachweissysteme angewandt worden. Die Novolink™ Polymer Detection Systems verwenden eine neuartige Technologie der kontrollierten Polymerisation zur Vorbereitung von polymeren HRP-Linker- Antikörperkonjugaten. Daher tritt das Problem einer unspezifischen Färbung, die bei Streptavidin/Biotin-Nachweissystemen aufgrund des endogenen Biotins vorkommen kann, hier nicht auf.

Diese Produkte werden in einem immunhistochemischen (IHC-) Verfahren verwendet, das den qualitativen Nachweis von Antigenen in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebeschnitten in mehreren aufeinander folgenden Schritten mit dazwischen liegenden Waschschritten mittels Lichtmikroskopie gestattet. Falls der primäre Antikörper dies verlangt, werden die Schnitte vor der Färbung einer Epitopdemaskierung unterworfen. Die endogene Peroxidaseaktivität wird mithilfe des Peroxidase Block neutralisiert. Daraufhin wird der Protein Block angewandt, um die unspezifische Bindung von primärem Antikörper und Polymer zu verringern. Der Schnitt wird daraufhin mit dem optimal verdünnten primären Antikörper inkubiert. Post Primary (Kaninchen-anti-Maus-IgG) wird dann zum Nachweis der Mausantikörper verwendet. Das Novolink Polymer erkennt Kaninchenimmunglobuline und weist die postprimären sowie alle gewebegebundenen Kaninchen-Primärantikörper nach. Die Schnitte werden mit dem Substrat/Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), das aus DAB Chromogen und Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) wie im Folgenden beschrieben vorbereitet wurde, weiter inkubiert. Die Reaktion mit der Peroxidase produziert ein sichtbares braunes Präzipitat an der Stelle des Antigens. Die Schnitte werden mit Hematoxylin gegengefärbt und abgedeckt. Die Ergebnisse werden mithilfe eines Lichtmikroskops interpretiert und unterstützen die Differentialdiagnose pathophysiologischer Prozesse, die mit einem bestimmten Antigen assoziiert sein könnten.

Gelieferte Reagenzien

Die Einzelheiten der in jedem Produkt enthaltenen Reagenzien aus der folgenden Liste werden in der unten aufgeführten Tabelle angegeben.

1. Peroxidase Block. 3–4%(v/v) Wasserstoffperoxid.
2. Protein Block. 0,4% Casein in einer phosphatgepufferten physiologischen Kochsalzlösung mit Stabilisatoren, oberflächenaktiver Substanz und 0,2% Bronidox L als Konservierungsmittel.
3. Post Primary. Kaninchen-anti-Maus-IgG (<10 µg/mL) in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung/0,09% ProClin™ 950, die 10% Tierserum enthält.
4. Novolink™ Polymer. Anti-Kaninchen-Poly-HRP-IgG (<25 µg/mL) in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung/0,09% ProClin™ 950, die 10% Tierserum enthält.
5. DAB Chromogen. 1,74 Gew.-% 3,3'-diaminobenzidin in einer Stabilisatorlösung.
6. Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Pufferlösung mit ≤0,1% Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel.
7. Hematoxylin. <0,1% Hämatoxylin.

Reagenzien	Produkt Nr.	Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests) RE7280-K	Novolink™ Polymer Detection System (500 tests) RE7150-K	Novolink™ Polymer Detection System (250 tests) RE7140-K	Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests) RE7290-K
Peroxidase Block	RE7101		2 x 25ml	1 x 25ml	
Protein Block	RE7102		2 x 25ml	1 x 25ml	
Post Primary	RE7111		2 x 25ml	1 x 25ml	
Novolink™ Polymer	RE7112		2 x 25ml	1 x 25ml	
DAB Chromogen	RE7105		1 x 3ml	1 x 3ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143		2 x 30ml	1 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107		2 x 25ml	1 x 25ml	
Peroxidase Block	RE7157	1 x 125ml			
Protein Block	RE7158	1 x 125ml			
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7162	1 x 8ml			
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163	1 x 150ml			
Hematoxylin	RE7164	1 x 125ml			
Peroxidase Block	RE7165				1 x 5ml
Protein Block	RE7166				1 x 5ml
Post Primary	RE7167				1 x 5ml
Novolink™ Polymer	RE7168				1 x 5ml
DAB Chromogen	RE7169				1 x 1ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7171				1 x 5ml
Hematoxylin	RE7172				1 x 5ml

Reagenzien	Produkt Nr.	Novolink™ Max Polymer (1250 tests) RE7260-K	Novolink™ Polymer (250 tests) RE7200-K	Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests RE7270-K	Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests RE7230-K
Post Primary	RE7111		1 x 25ml		
Novolink™ Polymer	RE7112		1 x 25ml		
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7105				1 x 3ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143				1 x 30ml
DAB Chromogen	RE7162			1 x 8ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163			1 x 150ml	

Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration

Peroxidase Block, Protein Block, Post Primary, Novolink™ Polymer und Hematoxylin sind vorverdünnt. Rekonstitution, Mischen, Verdünnung oder Titration dieser Reagenzien wird nicht empfohlen. Eine weitere Verdünnung könnte zum Verlust der Antigenfärbung führen. Der Benutzer muss solche Änderungen zuvor validieren.

Das DAB Chromogen muss vor dem Gebrauch in Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) auf 1/20 verdünnt werden. 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

DAB Chromogen

Enthält 10% Biphenyl-3,3',4,4'-Tetrayltetraamine.

GHS08: Gesundheitsgefahr.

Signalwörter: Gefahr.

H341: Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
H350: Kann Krebs erzeugen.

P201: Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P202: Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.

P281: Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.

P308+313: Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P501: Inhalt / Behälter der Problemafallentsorgung zuführen.

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

Für geschultes Fachpersonal.

Reagenzien aus unterschiedlichen Nachweissystemen dürfen nicht gemischt werden.

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.⁴

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

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

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

Verfahren

A. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Reagenzien

1. In der Immunhistochemie übliche Standardlösungsmittel.
2. 50 mmol/l Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (Tris-Buffered Saline, TBS) pH7,6.
3. Antigendemaskierungslösung(en).
4. Enzymdemaskierungslösung(en).
5. Antikörpervedünnung.
6. Primärer Antikörper.
7. Aufbringungsmedium.

B. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Ausrüstung

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

C. Vorgehensweise

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

Alle Schritte müssen gemäß Anweisung befolgt werden, anderenfalls könnte die Leistungsfähigkeit beeinträchtigt werden.

Die Kombination aus 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.

Zur Anwendung an gefrorenem Gewebe Schnitte wie für den Erstantikörper empfohlen fertigen und fixieren, Beginn mit Schritt 11.

1. Das Präparat schneiden und auf Objektträger aufbringen, die mit einem geeigneten Gewebekleber beschichtet sind.
2. Schnitte mit Xylol oder Xyloersatzstoffen von Paraffin säubern.
3. Mit abgestuft konzentriertem Alkohol rehydrieren.
4. Die Objektträger unter laufendem Leitungswasser abspülen.

5. Antigendemaskierung wie erforderlich durchführen (siehe Gebrauchsempfehlungen für den primären Antikörper).
6. Die Objektträger unter entionisiertem Wasser abspülen.
7. Die endogene Peroxidase 5 Minuten lang mit Peroxidase Block neutralisieren.
8. 2 x 5 Minuten lang in TBS waschen.
9. 5 Minuten lang mit Protein Block inkubieren.
10. 2 x 5 Minuten lang in TBS waschen.
11. Mit dem optimal verdünnten primären Antikörper inkubieren (siehe Gebrauchsempfehlungen für den primären Antikörper).
12. 2 x 5 Minuten lang in TBS waschen.
13. Mit Post Primary 30 Minuten lang inkubieren.
14. 2 x 5 Minuten lang in TBS waschen.
15. Mit Novolink™ Polymer 30 Minuten lang inkubieren.
16. Die Schnitte in TBS-Puffer 2 x 5 Minuten lang mit sanfter Kippbewegung spülen.
17. Die Peroxidaseaktivität mit DAB-Arbeitslösung (siehe DAB-Arbeitslösung) 5 Minuten lang entwickeln.
18. Objektträger in Wasser spülen.
19. Mit Hematoxylin gegenfärben.
20. Objektträger 5 Minuten lang in Wasser abspülen.
21. Schnitte dehydrieren, reinigen und aufbringen.

DAB-Arbeitslösung

50 µl DAB Chromogen zu 1 ml Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) hinzugeben. Innerhalb von sechs Stunden nach Vorbereitung verwenden.

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.⁵ Informationen über das positive Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsempfehlungen 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.⁶ 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 Biotin⁷ (beispielsweise Leber, Mamma, Gehirn, Niere) hervorgerufen werden. Zur Differenzierung der endogenen Enzymaktivität oder unspezifischen Bindung von der spezifischen Immunreaktivität lassen sich zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substrat-Chromogen, mit markiertem Polymer und Substrat-Chromogen oder mit Post Primary, markiertem Polymer und Substrat-Chromogen färben. 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 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.⁵

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.

Novolink™ Polymer Detection Systems und ihre Komponenten sind zur Verwendung auf paraffineingebetteten Schnitten mit spezifischen Fixierungsanforderungen bestimmt. Es kann insbesondere bei Neoplasmen zu einer unerwarteten Antigenexpression kommen. Die klinische Bewertung eines gefärbten Gewebeschnitts muss eine morphologische Analyse und die Auswertung der entsprechenden Kontrollen einschließen.

Leistungsmerkmale

Die Leistung von Novolink™ Polymer Detection Systems, Novolink™ Polymer und Novolink™ DAB (Polymer) wurde mithilfe einer Reihe primärer Novocastra™ Maus-IgG-, Maus-IgM*- und Kaninchen-IgG-Antikörper validiert.

*Bei Antikörpern vom IgM-Isotyp kann eine schwache Färbung beobachtet werden.

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

Literatur

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14:929–931.
2. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International*. 1995; 45(2):108–115.
3. Shan-Rong Shi, Guo J Cote R J et al . *Applied Immunohistochemistry & Molecular morphology*. 1999; 7:201-208.
4. 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.
5. 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.
6. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
7. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
8. 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.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen.

Ausgabedatum

16 Februar 2015

Novocastra™

Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests)

Referencia: RE7280-K

Novolink™ Polymer Detection System (500 tests)

Referencia: RE7150-K

Novolink™ Polymer Detection System (250 tests)

Referencia: RE7140-K

Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests)

Referencia: RE7290-K

Novolink™ Max Polymer (1250 tests)

Referencia: RE7260-K

Novolink™ Polymer (250 tests)

Referencia: RE7200-K

Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests

Referencia: RE7270-K

Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests

Referencia: RE7230-K

Indicaciones de uso

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Los productos Novolink™ Polymer Detection Systems están indicados para la visualización de anticuerpos primarios de IgG e IgM murinas, e IgG de conejo. Los productos Novolink™ Polymer y Novolink™ DAB (Polymer) contienen los reactivos que componen estos sistemas y están indicados para su uso en el procedimiento descrito más abajo. La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia se debe complementar con estudios morfológicos utilizando los controles adecuados, y un patólogo cualificado debe evaluarla en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Principio del procedimiento

La primera técnica de la inmunoperoxidasa fue descrita por Nakane and Pierce.¹ Desde entonces, se han producido muchos avances que han aumentado la sensibilidad con respecto a las primeras técnicas. Un desarrollo reciente ha sido el uso del marcado polimérico. Esta tecnología se ha aplicado tanto a los anticuerpos primarios² como a los sistemas de detección. Los productos Novolink™ Polymer Detection Systems utilizan una novedosa tecnología de polimerización controlada para preparar conjugados poliméricos de anticuerpos de unión con peroxidasa. Por lo tanto, no aparece el problema de la tinción no específica que puede producirse con los sistemas de detección mediante estreptavidina y biotina, debido a la biotina endógena.

Estos productos se usan en un procedimiento inmunohistoquímico, lo que permite la identificación cualitativa, por microscopía óptica, de antígenos en secciones de tejidos fijadas con formol e incluidas en parafina, mediante pasos sucesivos, con pasos intermedios de lavado. Si se necesita a causa del anticuerpo primario, las secciones se someten a recuperación de los epitopos antes de la tinción. La actividad de la peroxidasa endógena se neutraliza con Peroxidase Block. Esto va seguido de la aplicación de Protein Block para reducir la unión inespecífica de anticuerpos primarios y del polímero. A continuación, la sección se incuba con anticuerpo primario con una dilución óptima. Post Primary (IgG de conejo anti-ratón) por lo tanto se usa para detectar los anticuerpos murinos. El Novolink™ Polymer reconoce las inmunoglobulinas de conejo; detecta el anticuerpo post-primario y cualquier anticuerpo primario de conejo unido al tejido. Las secciones se incuban más tiempo con sustrato-cromógeno, 3,3'-diaminobenzidina (DAB), preparado a partir de DAB Chromogen y Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) tal y como se describe más abajo. La reacción con la peroxidasa produce un precipitado marrón visible en el lugar donde se encuentra el antígeno. Las secciones se someten a contratinción con Hematoxylin y se les aplica un cubreobjetos. Los resultados se interpretan utilizando un microscopio óptico y son de ayuda en el diagnóstico diferencial de los procesos fisiopatológicos, que pueden estar o no vinculados a un determinado antígeno.

Reactivos suministrados

En la tabla que aparece más abajo se ofrecen detalles de cuáles reactivos de la lista siguiente que se suministran con cada producto.

1. Peroxidase Block. Peróxido de hidrógeno al 3–4%(v/v).
2. Protein Block. Caseína al 0,4% en solución salina con tampón fosfato, con estabilizantes, agente tensioactivo y Bronidox L al 0,2% como conservante.
3. Post Primary. IgG de conejo anti-ratón (<10 µg/mL) en suero animal al 10% (v/v) en solución salina tamponada con tris y ProClin™ 950 al 0,09%.
4. Novolink™ Polymer. Poly-HRP-IgG anti-conejo (<25 µg/mL) que contiene suero animal al 10% (v/v) en solución salina tamponada con tris y ProClin™ 950 al 0,09%.
5. DAB Chromogen. 3,3'-diaminobenzidina al 1,74% peso/volumen, en solución estabilizante.
6. Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Solución tamponada que contiene peróxido de hidrógeno al ≤0,1% y conservante.
7. Hematoxylin. Hematoxilina al <0,1%.

Reactivos	Referencia	Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests) RE7280-K	Novolink™ Polymer Detection System (500 tests) RE7150-K	Novolink™ Polymer Detection System (250 tests) RE7140-K	Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests) RE7290-K
Peroxidase Block	RE7101		2 x 25ml	1 x 25ml	
Protein Block	RE7102		2 x 25ml	1 x 25ml	
Post Primary	RE7111		2 x 25ml	1 x 25ml	
Novolink™ Polymer	RE7112		2 x 25ml	1 x 25ml	
DAB Chromogen	RE7105		1 x 3ml	1 x 3ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143		2 x 30ml	1 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107		2 x 25ml	1 x 25ml	
Peroxidase Block	RE7157	1 x 125ml			
Protein Block	RE7158	1 x 125ml			
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7162	1 x 8ml			
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163	1 x 150ml			
Hematoxylin	RE7164	1 x 125ml			
Peroxidase Block	RE7165				1 x 5ml
Protein Block	RE7166				1 x 5ml
Post Primary	RE7167				1 x 5ml
Novolink™ Polymer	RE7168				1 x 5ml
DAB Chromogen	RE7169				1 x 1ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7171				1 x 5ml
Hematoxylin	RE7172				1 x 5ml

Reactivos	Referencia	Novolink™ Max Polymer (1250 tests) RE7260-K	Novolink™ Polymer (250 tests) RE7200-K	Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests RE7270-K	Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests RE7230-K
Post Primary	RE7111		1 x 25ml		
Novolink™ Polymer	RE7112		1 x 25ml		
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7105				1 x 3ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143				1 x 30ml
DAB Chromogen	RE7162			1 x 8ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163			1 x 150ml	

Reconstitución, mezclado, dilución y titulación

Los productos Peroxidase Block, Protein Block, Post Primary, Novolink™ Polymer y Hematoxylin están prediluidos. No se recomienda reconstituir, mezclar, diluir o titular estos reactivos. Una mayor dilución puede provocar la pérdida de la tinción del antígeno. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo.

Es necesario diluir DAB Chromogen a 1/20 en Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) antes de usarlo. Una mayor dilución puede provocar la pérdida de la tinción del antígeno. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo.

Almacenamiento y estabilidad

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

Preparación de las muestras

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

Advertencias y precauciones

DAB Chromogen

Contiene <10% Bifenil-3,3', 4,4'-Tetra(tetra)amine.

GHS08: Peligro para la salud.

Palabras de advertencia:
Peligro.

H341: Se sospecha que provoca defectos genéticos.

H350: Puede provocar cáncer.

P201: Pedir instrucciones especiales antes del uso.

P202: No manipular la sustancia antes de haber leído y comprendido todas las instrucciones de seguridad.

P281: Utilizar el equipo de protección individual obligatorio.

P308+313: EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

P501: Eliminar el contenido / el recipiente en un punto de recogida 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.

No mezcle reactivos procedentes de sistemas de detección diferentes.

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

No pipeteo nunca los reactivos con la boca; 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 especificados pueden conducir a resultados erróneos. Cualquier cambio de tal naturaleza debe ser validado por el usuario.

Procedimiento

A. Reactivos necesarios que no se suministran

1. Disolventes estándar utilizados en inmunohistoquímica.
2. Solución salina tamponada con Tris 50 mM (TBS), pH 7,6.
3. Soluciones de recuperación del antígeno.
4. Soluciones de recuperación de la enzima.
5. Diluyente de anticuerpos.
6. Anticuerpo primario.
7. Medio de montaje.

B. Equipo necesario que no se suministra

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

C. Metodología

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

Se deben cumplir todos los pasos según lo indicado, ya que de lo contrario la eficacia puede verse menoscabada.

La combinación del anticuerpo primario, su dilución, junto con el sistema de detección, debe ser validada por el usuario, sobre 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).

Para usarse en tejidos congelados, corte y fije las secciones conforme a las recomendaciones para el anticuerpo primario; comience en el paso 11.

1. Corte y monte las secciones recubiertas con un adhesivo de tejidos adecuado.
2. Desparafine las secciones en xileno o en sustitutos del xileno.
3. Rehidrate en alcoholes de gradación decreciente.
4. Lave los portaobjetos en agua del grifo corriente.

5. Realice la recuperación de los antígenos tal y como se necesite (vea las Recomendaciones de uso del anticuerpo primario).
6. Lave los portaobjetos en agua desionizada.
7. Neutralice la peroxidasa endógena con Peroxidase Block durante 5 minutos.
8. Lave en TBS durante 2 x 5 minutos.
9. Incube en Protein Block durante 5 minutos.
10. Lave en TBS durante 2 x 5 minutos.
11. Incube con anticuerpo primario de dilución óptima (vea las Recomendaciones de uso del anticuerpo primario).
12. Lave en TBS durante 2 x 5 minutos.
13. Incube con Post Primary durante 30 minutos.
14. Lave en TBS durante 2 x 5 minutos.
15. Incube con Novolink™ Polymer durante 30 minutos.
16. Lave en TBS durante 2 x 5 minutos aplicando una suave oscilación.
17. Revele la actividad peroxidásica con solución de trabajo DAB (vea Solución de trabajo DAB) durante 5 minutos.
18. Aclare los portaobjetos con agua.
19. Realice la contratinción con Hematoxylin.
20. Aclare los portaobjetos durante 5 minutos.
21. Deshidrate, aclare y monte las secciones.

Solución de trabajo DAB

Añada 50 µl de DAB Chromogen a 1 ml de Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Úsela antes de transcurridas seis horas desde la preparación.

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. Deberá 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.⁵ En cuanto al tejido de control positivo recomendado, vea las Recomendaciones 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.⁶ También pueden observarse falsos positivos causados por la unión no inmunológica a proteínas o a productos de reacción del sustrato. Estos falsos positivos pueden estar causados también por enzimas endógenas tales como la pseudoperoxidasa (eritrocitos), la peroxidasa endógena (citocromo C) o la biotina endógena⁷ (por ejemplo, de hígado, mama, cerebro o riñón). Para diferenciar entre la actividad enzimática endógena o la unión inespecífica y la inmunoreactividad específica, pueden teñirse tejidos adicionales del paciente exclusivamente con sustrato cromógeno, con polímero marcado y sustrato cromógeno o con Post Primary, polímero marcado y sustrato cromógeno. 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. 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.⁸

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.

Novolink™ Polymer Detection Systems y sus componentes, están indicados en secciones incluidas en parafina con requisitos de fijación específicos. Puede producirse una expresión inesperada del antígeno, especialmente en las neoplasias. La interpretación clínica de cualquier sección de tejido teñida debe incluir un análisis morfológico y la evaluación de los controles apropiados.

Características de la realización

La eficacia de Novolink™ Polymer Detection Systems, Novolink™ Polymer y Novolink™ DAB (Polymer) se ha validado con el uso de una gama de anticuerpos primarios de IgG e IgM* murinas, e IgG de conejo.

*Se puede observar tinción débil con anticuerpos del isotipo IgM.

Estos productos son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del producto.

Bibliografía

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14:929–931.
2. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International*. 1995; 45(2):108–115.
3. Shan-Rong Shi, Guo J Cote R J et al . *Applied Immunohistochemistry & Molecular morphology*. 1999; 7:201-208.
4. 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.
5. 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.
6. P6. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
7. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
8. 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

16 de Febrero de 2015

Novocastra™

Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests)

N.º do produto: RE7280-K

Novolink™ Polymer Detection System (500 tests)

N.º do produto: RE7150-K

Novolink™ Polymer Detection System (250 tests)

N.º do produto: RE7140-K

Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests)

N.º do produto: RE7290-K

Novolink™ Max Polymer (1250 tests)

N.º do produto: RE7260-K

Novolink™ Polymer (250 tests)

N.º do produto: RE7200-K

Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests

N.º do produto: RE7270-K

Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests

N.º do produto: RE7230-K

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos *in vitro*.

Os sistemas Novolink™ Polymer Detection Systems são próprios para a visualização de anticorpos primários da IgG de ratinho, da IgM de ratinho e da IgG de coelho. Os produtos Novolink™ Polymer e Novolink™ DAB (Polymer) contêm reagentes componentes destes sistemas, tendo sido concebidos para serem utilizados no procedimento descrito abaixo. 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

A primeira técnica de imunohistoperoxidase foi registada por Nakane e Pierce¹. Desde essa altura, ocorreram muitos desenvolvimentos que resultaram nas técnicas de imunoperoxidase normalmente utilizadas actualmente. O emprego de rótulos poliméricos constitui um desenvolvimento recente. Esta tecnologia tem sido aplicada tanto aos anticorpos primários² como aos sistemas de detecção. Os sistemas Novolink™ Polymer Detection Systems utilizam uma tecnologia nova de polimerização controlada para a preparação de conjugados de anticorpos poliméricos de ligação HRP. Assim, o problema da coloração não específica, que pode ocorrer com os sistemas de detecção de estreptavidina/biotina devido à biotina endógena, não ocorre.

Estes produtos são utilizados num procedimento imunohistoquímico (IHQ), o qual permite 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. Caso o anticorpo primário assim o exija, as secções são submetidas à recuperação de epítomos antes de serem coradas. A actividade endógena da peroxidase é neutralizada através da aplicação de Peroxidase Block. Segue-se a isto a aplicação do Protein Block, para reduzir a ligação não específica dos anticorpos primários e do polímero. Subsequentemente, a secção é incubada com um anticorpo primário a uma diluição óptima. Post Primary (IgG de coelho anti-ratinho) é portanto utilizado para a detecção de anticorpos de ratinho. O Novolink™ Polymer reconhece as imunoglobulinas de coelho e detecta os anticorpos pós-primários e quaisquer anticorpos primários de coelho ligados aos tecidos. As secções são ainda incubadas com o substrato/cromogénio 3,3' - diaminobenzidina (DAB), um produto da combinação de DAB Chromogen com Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer), conforme descrito a seguir. A reacção com a peroxidase produz um precipitado visível, de cor castanha, no local do antígeno. As secções são contrastadas com Hematoxylin e cobertas com uma lamela. Os resultados são interpretados por meio de um microscópio óptico, e ajudam a formular o diagnóstico diferencial dos processos fisiopatológicos, os quais podem ou não estar associados a antígenos específicos.

Reagentes fornecidos

Os pormenores dos reagentes, extraídos da lista que se segue e fornecidos em cada produto, são apresentados na tabela a seguir:

1. Peroxidase Block. Peróxido de hidrogénio a 3–4% (v/v).
2. Protein Block. Caseína a 0,4% em soro com tampão fosfato e produtos estabilizadores e surfactantes, bem como Bronidox L a 0,2% como produto conservante.
3. Post Primary. IgG de coelho anti-ratinho (<10 µg/mL) em soro animal a 10% (v/v) em solução salina tamponada com Tris/ProClin™ 950 a 0,09%.
4. Novolink™ Polymer. Poly-HRP-IgG anti-coelho (<25 µg/mL) contendo soro animal a 10% (v/v) em solução salina tamponada com Tris/ProClin™ 950 a 0,09%.
5. DAB Chromogen. 3,3' - diaminobenzidina a 1,74% p/v, numa solução estabilizadora.
6. Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Solução tamponada contendo peróxido de hidrogénio a ≤0,1% e um produto conservante.
7. Hematoxylin. Hematoxilina a <0,1%.

Reagentes	N.º do produto	Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests) RE7280-K	Novolink™ Polymer Detection System (500 tests) RE7150-K	Novolink™ Polymer Detection System (250 tests) RE7140-K	Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests) RE7290-K
Peroxidase Block	RE7101		2 x 25ml	1 x 25ml	
Protein Block	RE7102		2 x 25ml	1 x 25ml	
Post Primary	RE7111		2 x 25ml	1 x 25ml	
Novolink™ Polymer	RE7112		2 x 25ml	1 x 25ml	
DAB Chromogen	RE7105		1 x 3ml	1 x 3ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143		2 x 30ml	1 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107		2 x 25ml	1 x 25ml	
Peroxidase Block	RE7157	1 x 125ml			
Protein Block	RE7158	1 x 125ml			
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7162	1 x 8ml			
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163	1 x 150ml			
Hematoxylin	RE7164	1 x 125ml			
Peroxidase Block	RE7165				1 x 5ml
Protein Block	RE7166				1 x 5ml
Post Primary	RE7167				1 x 5ml
Novolink™ Polymer	RE7168				1 x 5ml
DAB Chromogen	RE7169				1 x 1ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7171				1 x 5ml
Hematoxylin	RE7172				1 x 5ml

Reagentes	N.º do produto	Novolink™ Max Polymer (1250 tests) RE7260-K	Novolink™ Polymer (250 tests) RE7200-K	Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests RE7270-K	Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests RE7230-K
Post Primary	RE7111		1 x 25ml		
Novolink™ Polymer	RE7112		1 x 25ml		
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7105				1 x 3ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143				1 x 30ml
DAB Chromogen	RE7162			1 x 8ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163			1 x 150ml	

Reconstituição, mistura, diluição, titulação

Os produtos Peroxidase Block, Protein Block, Post Primary, Novolink™ Polymer e Hematoxylin encontram-se pré-diluídos. Não se recomenda a reconstituição, mistura, diluição ou titulação destes reagentes. Qualquer diluição adicional poderá resultar na perda de coloração do antígeno. O utilizador deve validar quaisquer alterações dessa natureza.

O DAB Chromogen tem de ser diluído à razão 1/20 em Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) antes de ser utilizado. 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 ativados 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

DAB Chromogen Contém <10% Bifenil-3,3', 4,4'-Tetrayltetraamine. GHS08: Perigo para a saúde. Palavras-sinal: Perigo.	H341: Suspeito de provocar anomalias genéticas. H350: Pode provocar cancro.	P201: Pedir instruções específicas antes da utilização. P202: Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança. P281: Usar o equipamento de protecção individual exigido. P308+313: EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico. P501: Eliminar o conteúdo / recipiente 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.

Não misturar reagentes de diferentes sistemas de detecção.

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 precauções⁴

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 mas não fornecidos

1. Solventes comuns utilizados em imunohistoquímica.
2. 50mM de tris-buffered saline (TBS) pH7,6.
3. Solução/soluções para a recuperação de antígenos.
4. Solução/soluções para a recuperação de enzimas.
5. Diluente de anticorpos.
6. Anticorpo primário.
7. Meio de montagem.

B. Equipamento necessário mas não fornecido

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

C. Metodologia

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

Seguir todas as etapas conforme indicado, caso contrário o desempenho pode ser prejudicado.

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

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

Para utilização em tecido congelado, efectuar os cortes e fixar de acordo com as recomendações para o anticorpo primário, começar na etapa 11.

1. Cortar e montar secções em lâminas revestidas de um tecido adesivo apropriado.
2. Desparafinizar as secções em xileno ou substitutos de xileno.
3. Reidratar através de álcoois graduados.
4. Lavar as lâminas em água corrente de torneira.
5. Efectuar a recuperação do antígeno conforme necessário (consultar a secção Recomendações sobre a utilização para obter informações sobre o anticorpo primário).

6. Lavar as lâminas em água desionizada.
7. Neutralizar a peroxidase endógena, empregando para tal Peroxidase Block durante 5 minutos.
8. Lavar em TBS durante 2 x 5 minutos.
9. Incubar as secções com Protein Block durante 5 minutos.
10. Lavar em TBS durante 2 x 5 minutos.
11. Incubar com anticorpo primário a uma diluição óptima (consultar a secção Recomendações sobre a utilização para obter informações sobre o anticorpo primário).
12. Lavar em TBS durante 2 x 5 minutos.
13. Incubar com Post Primary durante 30 minutos.
14. Lavar em TBS durante 2 x 5 minutos.
15. Incubar com Novolink™ Polymer durante 30 minutos.
16. Lavar em tampão TBS durante 2 x 5 minutos, agitando levemente.
17. Desenvolver a actividade da peroxidase com a solução de trabalho DAB (consultar Solução de trabalho DAB) durante 5 minutos.
18. Enxaguar as lâminas em água.
19. Contrastar com Hematoxylin.
20. Enxaguar as lâminas em água durante 5 minutos.
21. Desidratar, soltar e montar as secções.

Solução de trabalho DAB

Adicionar 50 µl de Novolink™ DAB Chromogen a 1ml de DAB Substrate Buffer (Polymer). Utilizar dentro de seis horas após a preparação.

Controlo da qualidade

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

Controlo de tecido positivo

Usado para assinalar os tecidos correctamente preparados e as técnicas de coloração indicadas. Por cada conjunto de condições de testes, em cada processo de coloração, deve incluir-se um controlo de tecido positivo. Os tecidos com uma coloração positiva fraca são mais apropriados do que os têm uma coloração positiva forte para proporcionarem um nível ideal de controlo da qualidade, bem como para detectarem níveis reduzidos de degradação dos reagentes⁵. Consultar as Recomendações 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 específica⁶. 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 endógena⁷ (p. ex. no fígado, mama, cérebro ou rim). Para diferenciar a actividade enzimática endógena ou a ligação não específica da imunoreactividade específica, podem corar-se tecidos adicionais dos doentes exclusivamente com cromogénio-substrato, com polímero marcado e cromogénio-substrato ou com Post Primary, polímero marcado e cromogénio-substrato. Se ocorrer a coloração específica no controlo de tecido negativo, os resultados dos testes feitos com as amostras do doente devem ser considerados inválidos.

Controlo de reagente negativo

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

Tecido do doente

Examinar as amostras do doente 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 tecido⁸.

Uma contração 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 controles, e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do histórico clínico do doente e de outros testes de diagnóstico.

Novolink™ Polymer Detection Systems e os seus componentes são próprios para serem empregados em secções envolvidas em parafina com requisitos de fixação específicos. Pode ocorrer uma expressão inesperada de antígeno, especialmente em neoplasmas. A interpretação clínica de qualquer secção de tecido colorido deverá incluir a análise morfológica e a avaliação de controles apropriados.

Características de desempenho

O desempenho dos sistemas Novolink™ Polymer Detection Systems, Novolink™ Polymer e Novolink™ DAB (Polymer) foi validado através do emprego de uma série de anticorpos primários Novocastra™ de IgG de rato, de IgM* de rato e de IgG de coelho.

*Pode verificar-se uma coloração fraca com anticorpos do isótipo IgM.

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

Bibliografia

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14:929–931.
2. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International*. 1995; 45(2):108–115.
3. Shan-Rong Shi, Guo J Cote R J et al . *Applied Immunohistochemistry & Molecular morphology*. 1999; 7:201-208.
4. 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.
5. 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.
6. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
7. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
8. 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

Princípio do procedimento, Reagentes fornecidos, Metodologia.

Avisos e precauções

16 de Fevereiro de 2015

Novocastra™

Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests)

Produktnr.: RE7280-K

Novolink™ Polymer Detection System (500 tests)

Produktnr.: RE7150-K

Novolink™ Polymer Detection System (250 tests)

Produktnr.: RE7140-K

Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests)

Produktnr.: RE7290-K

Novolink™ Max Polymer (1250 tests)

Produktnr.: RE7260-K

Novolink™ Polymer (250 tests)

Produktnr.: RE7200-K

Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests

Produktnr.: RE7270-K

Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests

Produktnr.: RE7230-K

Avsedd Användning

För *in vitro* diagnostisk användning.

Novolink™ Polymer Detection Systems är till för visualiseringen av mus IgG, mus IgM och kanin IgG primära antikroppar. Novolink™ Polymer och Novolink™ DAB (Polymer) innehåller reagens som är beståndsdelar i dessa system och är avsedda för användning i ovanbeskrivna procedur. Den kliniska tolkningen av all färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar som använder korrekta kontroller och utvärderas av kvalificerad patolog inom ramen för patientens kliniska anamnes och andra diagnostiska tester.

Metodens Princip

Den första immunperoxidastekniken rapporterades av Nakane och Pierce.¹ Sedan dess har mycket utvecklats vilket har lett till den immunperoxidastekniken som är vanlig idag. Användning av polymermärkning är en relativt ny utveckling. Denna teknologi har applicerats på både primära antikroppar² och detektionssystem. Novolink™ Polymer Detection Systems tillämpar en ny kontrollerad polymerisationsteknik för att bereda polymera HRP-länkade antikropps-konjugat. Därför förekommer inte problemet med ospecifik färgning som kan ske med Streptavidin/Biotin detektionssystem p.g.a. endogent biotin. Dessa produkter används i en immunhistokemisk (IHC) procedur som tillåter kvalitativ identifikation med ljusmikroskopi av antigener i sektioner av formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad via sekvenssteg med inlagda tvättsteg. Om den primära antikroppen så kräver undergår sektionerna epitopätervingning före färgning. Endogent peroxidaktivitet neutraliseras genom Peroxidase Block. Detta åtföljs av applicering av Protein Block för att minska ospecifik bindning av primära och polymer. Sektionen inkuberas sedan med optimalt utspädd primär antikropp. Post Primary (anti-mus-IgG från kanin) används sedan för detektion av musantikroppar. Novolink™ Polymer igenkänner immunoglobuliner från kanin, den detekterar postprimära och alla vävnadsbundna primära antikroppar från kanin. Sektionerna inkuberas vidare med substrat/kromogen, 3,3' - diaminobenzidin (DAB) som bereds med DAB Chromogen och Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) enligt beskrivning nedan. Reaktion med peroxid ger en synlig brun precipitering på antigenområdet. Sektioner kontrastfärgas med Hematoxylin och täcks med objektglas. Resultaten tolkas med ljusmikroskop och bidrar till differentialdiagnosen av patofysiologiska processer som eventuellt kan associeras till ett särskilt antigen.

Tillhandahållna Reagens

Uppgifter om reagens från följande lista som tillhandahålls med varje produkt ges i tabellen nedan.

1. Peroxidase Block. 3-4 % Väteperoxid.
2. Protein Block. 0,4 % kasein i fosfatbuffrad koksalltösning med stabiliseringsmedel, ytaktivt medel och 0,2 % Bronidox L som konserveringsmedel.
3. Post Primary. Anti-mus-IgG från kanin (<10 µg/mL) i 10 volymprocent djurserum i tris-buffrad koksalltösning/0,09 % ProClin™ 950.
4. Novolink™ Polymer. Anti-kanin-Poly-HRP-IgG (<25 µg/mL) innehållande 10 volymprocent djurserum i tris-buffrad koksalltösning/0,09 % ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen. 1,74 % w/v 3,3' - diaminobenzidin , i en stabiliseringslösning.
6. Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Buffrad lösning innehållande ≤0,1 % väteperoxid och konserveringsmedel.
7. Hematoxylin. <0,1 % Hematoxylin.

Reagens	Produktnr.	Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests) RE7280-K	Novolink™ Polymer Detection System (500 tests) RE7150-K	Novolink™ Polymer Detection System (250 tests) RE7140-K	Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests) RE7290-K
Peroxidase Block	RE7101		2 x 25ml	1 x 25ml	
Protein Block	RE7102		2 x 25ml	1 x 25ml	
Post Primary	RE7111		2 x 25ml	1 x 25ml	
Novolink™ Polymer	RE7112		2 x 25ml	1 x 25ml	
DAB Chromogen	RE7105		1 x 3ml	1 x 3ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143		2 x 30ml	1 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107		2 x 25ml	1 x 25ml	
Peroxidase Block	RE7157	1 x 125ml			
Protein Block	RE7158	1 x 125ml			
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7162	1 x 8ml			
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163	1 x 150ml			
Hematoxylin	RE7164	1 x 125ml			
Peroxidase Block	RE7165				1 x 5ml
Protein Block	RE7166				1 x 5ml
Post Primary	RE7167				1 x 5ml
Novolink™ Polymer	RE7168				1 x 5ml
DAB Chromogen	RE7169				1 x 1ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7171				1 x 5ml
Hematoxylin	RE7172				1 x 5ml

Reagens	Produktnr.	Novolink™ Max Polymer (1250 tests) RE7260-K	Novolink™ Polymer (250 tests) RE7200-K	Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests RE7270-K	Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests RE7230-K
Post Primary	RE7111		1 x 25ml		
Novolink™ Polymer	RE7112		1 x 25ml		
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7105				1 x 3ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143				1 x 30ml
DAB Chromogen	RE7162			1 x 8ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163			1 x 150ml	

Rekonstitution, Blandning, Spädning, Titring

Peroxidase Block, Protein Block, Post Primary, Novolink™ Polymer och Hematoxylin är förspädda. Rekonstitution, blandning, spädning eller titring av dessa reagens rekommenderas inte. Fortsatt spädning kan resultera i förlust av antigenfärgning. Användaren måste kontrollera sådana förändringar.

DAB Chromogen kräver utspädning 1/20 i Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) före användning. Fortsatt spädning kan resultera i förlust av antigenfärgning. Användaren måste kontrollera sådana förändringar.

Förvaring och stabilitet

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

Preparation av prov

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

Varningar och försiktighetsåtgärder

DAB Chromogen	H341: Misstänks kunna orsaka genetiska defekter.	P201: Inhämta särskilda instruktioner före användning.
Innehåller Bifenyl-3,3', 4,4'-Tetrayltetraamine.	H350: Kan orsaka cancer.	P202: Använd inte produkten innan du har läst och förstått säkerhetsanvisningarna.
GHS08: Hälsofara.		P281: Använd föreskriven personlig skyddsutrustning.
Signalord: Fara.		P308+313: Vid exponering eller misstanke om exponering Sök läkarhjälp.
		P501: Kasserera innehåll / behållare till farligt återvinningsstation.

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

För professionella användare.

Blanda inte reagens från olika detektionssystem.

Prover, före och efter fixering, och alla material som utsätts för dem, bör hanteras som om de kan överföra infektion och kasseras med lämpliga försiktighetsåtgärder.⁴

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.

Rådgör med federala, statliga eller lokala bestämmelser för hantering av potentiellt giftiga komponenter.

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

Procedur

A. Reagens som krävs men inte tillhandahålls

1. Standardlösningar som används inom immunhistokemi.
2. 50mM tris-buffrad koksallösning (TBS) pH7,6.
3. Antigenåtervinningslösningar.
4. Enzymåtervinningslösningar.
5. Antikroppslosning.
6. Primär antikropp.
7. Monteringsmedium.

B. Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

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

C. Metod

Innan metoden tillämpas måste användarna vara utbildade i immunhistokemiska tekniker.

Alla steg måste följas enligt instruktioner annars kan funktionen försämrats.

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

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

För användning på fryst vävnad, skär snitt och fixera enligt rekommendationer för primära antikroppar, börja från steg 11.

1. Klipp och montera sektionerna på objektglas beklädda med lämplig vävnadsklistor.
2. Avparaffinera sektionerna i xylene eller xylenersättningsmedel.
3. Avhydratisera genom graderad sprit.
4. Tvätta objektglasen under rinnande kranvatten.
5. Utför antigenåtervinning enligt behov (se Rekommendationer vid användning för primära antikroppar).
6. Tvätta objektglasen i avjoniserat vatten.
7. Neutralisera endogent peroxidase med Peroxidase Block i 5 minuter.
8. Tvätta i TBS i 2 x 5 minuter.
9. Inkubera med Protein Block i 5 minuter.

10. Tvätta i TBS i 2 x 5 minuter.
11. Inkubera med optimalt spädd primär antikropp (se Rekommendationer vid användning för primär antikropp).
12. Tvätta i TBS i 2 x 5 minuter.
13. Inkubera med Post Primary i 30 minuter.
14. Tvätta i TBS i 2 x 5 minuter.
15. Inkubera med Novolink™ Polymer i 30 minuter.
16. Tvätta i TBS 2 x 5 minuter och gunga varsamt.
17. Utveckla peroxidaktivitet med DAB brukslösning (se DAB brukslösning) i 5 minuter.
18. Skölj objektglasen i vatten.
19. Kontrastfärga med Hematoxylin.
20. Skölj objektglasen i vatten i 5 minuter.
21. Avhydratisera, rensa och montera sektionerna.

DAB brukslösning

Tillsätt 50µl av DAB Chromogen till 1ml av Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Använd inom sex timmar efter beredning.

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 färska obduktions-/biopsi-/kirurgiprover 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.⁵ För rekommenderad positiv kontrollvävnad se primär antikropp Rekommendationer vid användning. Om den positiva vävnadskontrollen misslyckas med att uppvisa positiv färgning bör resultat med testproverna anses vara ogiltiga.

Negativ vävnadskontroll

Bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen för att fastställa specificiteten för märkningen av målantigenet med den primära antikroppen. För rekommenderad negativ kontrollvävnad se primär antikropp Instruktioner vid användning. Alternativt ger ofta en mängd olika celltyper som finns i de flesta vävnadssnitt negativa kontrollområden men detta bör kontrolleras av användaren. Ospezifisk färgning, om det förekommer, har ofta ett diffust utseende. Sporadisk färgning av bindväv kan också observeras i snitt från överflödigt formalinfixerade vävnader. Använd intakta celler för tolkning av färgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler färgar ofta ospezifiskt.⁶ Falskt positiva resultat kan ses p.g.a. icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erythrocyter), endogent peroxid (cytokrom C), eller endogent biotin⁷ (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure). För att särskilja specifik immunreaktivitet från endogen enzymaktivitet och icke-spezifisk bindning kan ytterligare patientprover färgas med enbart substratkromogen, med märkt polymer och substratkromogen, eller med Post Primary, 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 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.⁸

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.

Novolink™ Polymer Detection Systems samt deras komponenter är avsedda för att användas på paraffinbäddade sektioner med specifika fixeringskrav. Övriga antigenuttryck kan ske, speciellt i neoplasmer. Morfologisk analys och utvärdering av lämpliga kontroller måste ingå i den kliniska tolkningen av alla färgade vävnadssnitt.

Prestanda

Novolink™ Polymer Detection Systems, Novolink™ Polymer och Novolink™ DAB (Polymer) har kontrollerats med en rad Novocastra™ mus IgG, mus IgM* och kanin IgG primära antikroppar.

*Svag färgning kan märkas på IgM-isotypens antikroppar.

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

Bibliografi

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14:929–931.
2. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International*. 1995; 45(2):108–115.
3. Shan-Rong Shi, Guo J Cote R J et al . *Applied Immunohistochemistry & Molecular morphology*. 1999; 7:201-208.
4. 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.
5. 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.
6. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
7. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
8. 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

16 februari 2015

Novocastra™

Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests)

Produkt nr.: RE7280-K

Novolink™ Polymer Detection System (500 tests)

Produkt nr.: RE7150-K

Novolink™ Polymer Detection System (250 tests)

Produkt nr.: RE7140-K

Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests)

Produkt nr.: RE7290-K

Novolink™ Max Polymer (1250 tests)

Produkt nr.: RE7260-K

Novolink™ Polymer (250 tests)

Produkt nr.: RE7200-K

Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests

Produkt nr.: RE7270-K

Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests

Produkt nr.: RE7230-K

Tilsigtet anvendelse

Til *in vitro* diagnostisk anvendelse.

Novolink™ Polymer Detection Systems anvendes til visualisering af primære muse-IgG-, muse-IgM- og kanin-IgG-antistoffer. Novolink™ Polymer og Novolink™ DAB (Polymer) indeholder reagenskomponenter fra disse systemer, der er beregnet til anvendelse i proceduren beskrevet nedenfor. Klinisk fortolkning af farvning eller mangel derpå skal suppleres med morfologiske undersøgelser under anvendelse af passende kontroller og bør evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests af en kvalificeret patolog.

Procedureprincip

Den første immunhistoperoxidaseteknik blev rapporteret af Nakane og Pierce.¹ Siden da er teknikken udviklet flere gange, hvilket har ført til øget følsomhed i forhold til tidligere teknikker. En ny udvikling har været anvendelse af polymermærkning. Denne teknologi har været anvendt for både primære antistoffer² og detektionssystemer. Novolink™ Polymer Detection Systems benytter en hidtil ukendt, kontrolleret polymeriseringssteknologi til fremstilling af polymere HRP-linker-antistofkonjugater. Derfor opstår problemet med uspecifik farvning, der kan forekomme med streptavidin/biotin-detektionssystemer på grund af endogent biotin, ikke.

Disse produkter anvendes i en immunhistokemisk (IHC) procedure, der muliggør kvalitativ identifikation af antigener ved lysmikroskopi i vævssnit af formalinfikseret, paraffinindstøbt væv via sekventielle trin med indskudte vasketrin. Hvis krævet af det primære antistof underkastes vævssnittene epitopgenfindning inden farvning. Endogen peroxidaseaktivitet neutraliseres med Peroxidase Block. Dette efterfølges af tilsætning af Protein Block for at reducere uspecifik binding af primære antistoffer og polymer. Vævssnittet inkuberes herefter med optimalt fortyndet primært antistof. Post Primary (Kanin anti-mus IgG) anvendes derefter til at påvise museantistoffer. Novolink™ Polymer genkender kanin-immunoglobuliner, den påviser det post-primære og et hvilket som helst vævsbundet primært kaninantistof. Vævssnittene inkuberes yderligere med substrat/kromogenet 3,3' - diaminobenzidin (DAB) fremstillet ud fra DAB Chromogen og Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) som beskrevet nedenfor. Reaktion med peroxidasen frembringer et synligt, brunt præcipitat på stedet for antigenet. Vævssnittene kontrastfarves med Hematoxylin og dækkes med et dækglas. Resultaterne fortolkes ved anvendelse af et lysmikroskop og medvirker til differential diagnose af patofysiologiske processer, som muligvis kan være associeret med et bestemt antigen.

Leverede reagenser

Detaljer om hvilke af reagenserne fra følgende liste, der leveres sammen med hvert produkt, er givet i tabellen nedenfor.

1. Peroxidase Block. 3-4 % hydrogenperoxid.
2. Protein Block. 0,4 % Casein i fosfatbufferjusteret saltvandsopløsning med stabilisatorer, overfladeaktivt middel og 0,2 % Bronidox L som konserveringsmiddel.
3. Post Primary. Kanin anti-mus IgG (<10 µg/mL) i 10 % (volumen/volumen) animalsk serum i tris-bufferjusteret saltvandsopløsning/0,09 % ProClin™ 950.
4. Novolink™ Polymer. Anti-kanin Poly-HRP-IgG (<25 µg/mL) indeholdende 10 % (volumen/volumen) animalsk serum i tris-bufferjusteret saltvandsopløsning/0,09 % ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen. 1,74 % vægt/vol. 3,3' - diaminobenzidin i stabiliserende opløsning.
6. Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Bufferjusteret opløsning indeholdende ≤0,1 % hydrogenperoxid og konserveringsmiddel.
7. Hematoxylin. <0,1 % Hæmatoxylin.

Reagenser	Produkt Nr.	Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests) RE7280-K	Novolink™ Polymer Detection System (500 tests) RE7150-K	Novolink™ Polymer Detection System (250 tests) RE7140-K	Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests) RE7290-K
Peroxidase Block	RE7101		2 x 25ml	1 x 25ml	
Protein Block	RE7102		2 x 25ml	1 x 25ml	
Post Primary	RE7111		2 x 25ml	1 x 25ml	
Novolink™ Polymer	RE7112		2 x 25ml	1 x 25ml	
DAB Chromogen	RE7105		1 x 3ml	1 x 3ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143		2 x 30ml	1 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107		2 x 25ml	1 x 25ml	
Peroxidase Block	RE7157	1 x 125ml			
Protein Block	RE7158	1 x 125ml			
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7162	1 x 8ml			
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163	1 x 150ml			
Hematoxylin	RE7164	1 x 125ml			
Peroxidase Block	RE7165				1 x 5ml
Protein Block	RE7166				1 x 5ml
Post Primary	RE7167				1 x 5ml
Novolink™ Polymer	RE7168				1 x 5ml
DAB Chromogen	RE7169				1 x 1ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7171				1 x 5ml
Hematoxylin	RE7172				1 x 5ml

Reagenser	Produkt Nr.	Novolink™ Max Polymer (1250 tests) RE7260-K	Novolink™ Polymer (250 tests) RE7200-K	Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests RE7270-K	Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests RE7230-K
Post Primary	RE7111		1 x 25ml		
Novolink™ Polymer	RE7112		1 x 25ml		
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7105				1 x 3ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143				1 x 30ml
DAB Chromogen	RE7162			1 x 8ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163			1 x 150ml	

Rekonstituering, blanding, fortynding, titrering

Peroxidase Block, Protein Block, Post Primary, Novolink™ Polymer og Hematoxylin er forfortyndede. Rekonstituering, blanding, fortynding eller titrering af disse reagenser anbefales ikke. Yderligere fortynding kan resultere i tab af antigenfarvning. Brugeren skal kontrollere alle sådanne ændringer.

DAB Chromogen skal fortyndes 1/20 i Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) inden brug. Yderligere fortynding kan resultere i tab af antigenfarvning. Brugeren skal kontrollere alle sådanne ændringer.

Opbevaring og holdbarhed

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

Prøveklargøring

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

Advarsler og forholdsregler

DAB Chromogen

Indeholder <10% Biphenyl-3,3', 4,4'-Tetrayltetraamine.

GHS08: Sundhedsfarer.

Signalord: Fare.

H341: Mistænkt for at forårsage genetiske defekter.

H350: Kan fremkalde kræft.

P201: Indhent særlige anvisninger før brug.

P202: Anvend ikke produktet, før alle advarsler er læst og forstået.

P281: Anvend de påkrævede personlige værnemidler.

P308+313: VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp.

P501: Bortskaffelse af indholdet / beholderen indsamles og for farligt affald og Problemaffald.

Et datablad for materialesikkerhed kan fås efter anmodning eller er tilgængeligt på www.LeicaBiosystems.com

Må kun anvendes af uddannet fagpersonale.

Bland ikke reagenser fra forskellige detektionssystemer sammen.

Prøver skal før og efter fiksering, lige som alle materialer eksponeret mod prøverne, håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler.⁴

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

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

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

Procedure

A. Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

1. Standardopløsningsmidler anvendt i immunhistokemi.
2. 50 mM trisbufferjusteret saltvandsopløsning (TBS) pH 7,6.
3. Antigengennfindingsopløsning(er).
4. Enzymgennfindingsopløsning(er).
5. Antistofdiluent.
6. Primært antistof.
7. Monteringsmedium.

B. Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

1. Udstyr nødvendigt til antigengennfindning hvis anbefalet for det primære antistof.
2. Almindeligt laboratorieudstyr til immunhistokemi.

C. Metodologi

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

Alle trin skal følges som angivet, da reaktionen ellers kan forstyrres.

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

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

Til anvendelse på frosne vævssnit og fiksering ifølge anbefalingerne for primært antistof, begynd på trin 11.

1. Snit og monter vævssnittene på objektglas coatet med en passende vævsadhævis.
2. Afparaffiner snittene i xylen eller xylensubstituent.
3. Rehydrer med klassificeret alkohol.
4. Vask vævssnittene i rindende vandhanevand.
5. Udfør antigengennfindning som nødvendigt (se Anbefalinger vedrørende anvendelse for primært antistof).
6. Vask objektglassene i deioniseret vand.
7. Neutraliser endogen peroxidase med Peroxidase Block i 5 minutter.
8. Vask i TBS i 2 x 5 minutter.

9. Inkuber med Protein Block i 5 minutter.
10. Vask i TBS i 2 x 5 minutter.
11. Inkuber i optimalt fortyndet primært antistof (se Anbefalinger vedrørende anvendelse for primært antistof).
12. Vask i TBS i 2 x 5 minutter.
13. Inkuber med Post Primary i 30 minutter.
14. Vask i TBS i 2 x 5 minutter.
15. Inkuber med Novolink™ Polymer i 30 minutter.
16. Vask i TBS i 2 x 5 minutter, mens de vugges forsigtigt.
17. Fremkald peroxidaseaktiviteten med DAB-brugsopløsning (se DAB brugsopløsning) i 5 minutter.
18. Skyl objektglassene i vand.
19. Kontrastfarv med Hematoxylin.
20. Skyl objektglassene i vand i 5 minutter.
21. Tør, klar og monter vævssnittene.

DAB brugsopløsning

Tilsæt 50 µl DAB Chromogen til 1 ml Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Skal anvendes senest seks timer efter fremstillingen.

Kvalitetskontrol

Forskelle i behandlingen af væv og forskelle i tekniske procedurer i brugerens laboratorium kan frembringe betydeligt varierende resultater og nødvendiggøre regelmæssig udførelse af kontroller på stedet ud over nedenstående procedurer. Kontrollerne skal være friske autopsier/biopsier/kirurgiske prøver fikseret i formalin og behandlet og indstøbt i paraffin så hurtigt som muligt på samme måde som patientprøver.

Positiv vævskontrol

Anvendes til påvisning af, at vævet er fremstillet korrekt, og at der er anvendt korrekte farvningsteknikker. Der bør inkluderes en positiv vævskontrol for hvert sæt testbetingelser/primært antistof i hver farveeksel. Svagt positivt farvet væv er mere egnet end kraftigt positivt farvet væv til optimal kvalitetskontrol og påvisning af små niveauer af reagensnedbryning⁵. Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede positive kontrolvæv. Hvis den positive vævskontrol ikke udviser positiv farvning, skal resultater af testprøverne kasseres.

Negativ vævskontrol

Skal undersøges efter den positive vævskontrol for at sikre, at det primære antistof mærker målantigenet specifikt. Se brugsvejledningen for det primære antistof vedrørende det anbefalede negative kontrolvæv. Alternativt frembyder de mange forskellige celletyper, der er til stede i de fleste vævssnit, ofte negative kontrolsteder, men dette skal verificeres af brugeren. Uspecifik farvning har, hvis til stede, ofte et diffus udseende. Sporadisk farvning af bindevæv kan ligeledes observeres i vævssnit af væv, der er fikseret for kraftigt i formalin. Anvend intakte celler til fortolkning af farvningsresultaterne. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte mere uspecifikt.⁶ Der kan eventuelt ses falske positive resultater, der skyldes non-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. Dette kan ligeledes skyldes endogene enzymer, såsom pseudoperoxidase (erythrocytter), endogen peroxidase (cytochrom C) eller endogent biotin⁷ (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre). For at gøre det muligt at skelne specifik immunaktivitet fra endogen enzymaktivitet og uspecifik binding kan yderligere patientprøver farves udelukkende med substratkromogen, med mærket polymer og substratkromogen eller med Post Primary, mærket polymer og substratkromogen. Hvis der optræder specifik farvning i den negative vævskontrol, skal resultaterne af patientprøverne kasseres.

Negativ reagenskontrol

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

Patientvæv

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

Begrænsninger

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

Vævsfarvning er afhængig af håndteringen og behandlingen af vævet inden farvning. Forkert fiksering, frysning, optøning, vask, tørring, opvarmning, sektionering eller kontaminering med andet væv eller andre væsker kan frembringe artefakter, indfangning af antistof eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variationer i fikserings- og indstøbningsmetoder eller irregulariteter indeholdt i vævet.⁸

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

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

Novolink™ Polymer Detection Systems og deres komponenter er beregnet til anvendelse på paraffinindstøbte vævssnit med specifikke krav til fiksering. Der kan forekomme uventet antigenekspression, navnlig i neoplasmer. Den kliniske fortolkning af alle farvede vævssnit skal indbefatte morfologisk analyse og evaluering af passende kontroller.

Ydeevne

Ydelsen af Novolink™ Polymer Detection Systems, Novolink™ Polymer og Novolink™ DAB (Polymer) er blevet valideret ved anvendelse af en række primære Novocastra™ muse-IgG-, muse-IgM*- og kanin-IgG-antistoffer.

*Der kan ses svag farvning med antistoffer af IgM-isotype.

Produkterne er stabile til udløbsdatoen trykt på produkternes etiketter.

Bibliografi

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14:929–931.
2. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International*. 1995; 45(2):108–115.
3. Shan-Rong Shi, Guo J Cote R J et al . *Applied Immunohistochemistry & Molecular morphology*. 1999; 7:201-208.
4. 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.
5. 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.
6. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
7. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
8. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Rettelser til tidligere udgave

Advarsler og forholdsregler.

Udgivelsesdato

16 februar 2015

Novocastra™

Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests)

Κωδικός είδους: RE7280-K

Novolink™ Polymer Detection System (500 tests)

Κωδικός είδους: RE7150-K

Novolink™ Polymer Detection System (250 tests)

Κωδικός είδους: RE7140-K

Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests)

Κωδικός είδους: RE7290-K

Novolink™ Max Polymer (1250 tests)

Κωδικός είδους: RE7260-K

Novolink™ Polymer (250 tests)

Κωδικός είδους: RE7200-K

Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests

Κωδικός είδους: RE7270-K

Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests

Κωδικός είδους: RE7230-K

Χρήση για την οποία προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Τα Novolink™ Polymer Detection Systems χρησιμοποιούνται για την οπτικοποίηση πρωτοπαγών αντισωμάτων IgG ποντικού, IgM ποντικού και IgG κουνελού. Τα Novolink™ Polymer και Novolink DAB (Polymer) περιέχουν αντιδραστήρια συστατικών των συστημάτων αυτών και προορίζονται για χρήση στη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν σωστούς μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογοανατόμο.

Αρχή της διαδικασίας

Η πρώτη τεχνική ανοσοϊστοπεροξειδάσης αναφέρθηκε από τους Nakane και Pierce.¹ Έκτοτε, έχουν σημειωθεί πολλές εξελίξεις που οδήγησαν σε αυξημένη ευαισθησία έναντι των προγενέστερων τεχνικών. Μια πρόσφατη εξέλιξη ήταν η χρήση πολυμερούς σήμανσης. Η τεχνολογία αυτή έχει εφαρμοστεί τόσο σε πρωτοπαγή αντισώματα² όσο και σε συστήματα ανίχνευσης. Τα Novolink™ Polymer Detection Systems χρησιμοποιούν μια νέα τεχνολογία ελεγχόμενου πολυμερισμού για την παρασκευή συζυγών πολυμερούς HRP-αντισώματος συνδέτη. Επομένως, το πρόβλημα της μη ειδικής χρώσης που είναι δυνατό να συμβεί με τα συστήματα ανίχνευσης στρεπταβιδίνης/βιοτίνης λόγω ενδογενούς βιοτίνης, δεν παρουσιάζεται. Η πρώτη τεχνική ανοσοϊστοπεροξειδάσης αναφέρθηκε από τους Nakane και Pierce.¹ Έκτοτε, έχουν σημειωθεί πολλές εξελίξεις που οδήγησαν σε αυξημένη ευαισθησία έναντι των προγενέστερων τεχνικών. Μια πρόσφατη εξέλιξη ήταν η χρήση πολυμερούς σήμανσης. Η τεχνολογία αυτή έχει εφαρμοστεί τόσο σε πρωτοπαγή αντισώματα² όσο και σε συστήματα ανίχνευσης. Τα Novolink™ Polymer Detection Systems χρησιμοποιούν μια νέα τεχνολογία ελεγχόμενου πολυμερισμού για την παρασκευή συζυγών πολυμερούς HRP-αντισώματος συνδέτη. Επομένως, το πρόβλημα της μη ειδικής χρώσης που είναι δυνατό να συμβεί με τα συστήματα ανίχνευσης στρεπταβιδίνης/βιοτίνης, δεν παρουσιάζεται.

Τα προϊόντα αυτά χρησιμοποιούνται σε μια ανοσοϊστοχημική (IHC) διαδικασία, η οποία επιτρέπει την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός αντιγόνων σε τομές ιστού μονιμοποιημένου με φορμόλη και εγκλεισμένου σε παραφίνη, μέσω διαδοχικών βημάτων με παρεμβαλλόμενα βήματα πλύσης. Εάν απαιτείται από το πρωτοπαγές αντίσωμα, οι τομές υποβάλλονται σε ανάκτηση επιτόπου πριν από τη χρώση. Η δραστηριότητα της ενδογενούς υπεροξειδάσης εξουδετερώνεται με χρήση του Peroxidase Block. Αυτό ακολουθείται από την εφαρμογή του Protein Block για τη μείωση της μη ειδικής δέσμευσης του πρωτοπαγούς αντισώματος και του πολυμερούς. Η τομή ακολουθώς επωάζεται με ένα βέλτιστα αραιωμένο πρωτοπαγές αντίσωμα. Το Post Primary (κονίκλειος IgG κατά ποντικού) χρησιμοποιείται κατόπιν για την ανίχνευση αντισωμάτων ποντικού. Το Novolink™ Polymer αναγνωρίζει κονίκλειος ανοσοσφαιρίνες, ανιχνεύει τα μετα-πρωτογενή και οποιαδήποτε δεσμευμένα σε ιστό πρωτογενή κονίκλεια αντισώματα. Οι τομές επωάζονται περαιτέρω με το υπόστρωμα/χρωμογόνο, 3,3'-διαμινοβενζιδίνη (DAB), που παρασκευάζεται από το DAB Chromogen και το Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer), όπως περιγράφεται παρακάτω. Η αντίδραση με την υπεροξειδάση παράγει ένα ορατό καστανό ίζημα στη θέση του αντιγόνου. Οι τομές αντιχρωματίζονται με Hematoxylin και καλύπτονται με καλυπτρίδα. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με χρήση μικροσκοπίου φωτός και βοηθούν στη διαφορική διάγνωση παθολογικών εξεργασιών, οι οποίες ενδέχεται ή όχι να σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται λεπτομέρειες εκείνων των αντιδραστηρίων από την ακόλουθη λίστα που παρέχονται σε κάθε προϊόν.

1. Peroxidase Block. Υπεροξειδίο του υδρογόνου 3–4% (v/v).
2. Protein Block. Καζείνη 0,4% σε ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα φωσφορικών, με σταθεροποιητές, επιφανειοδραστικό παράγοντα και 0,2% Bronidox L ως συντηρητικό.
3. Post Primary. Κονίκλειος IgG κατά ποντικού (<10 µg/mL) σε 10% (v/v) ζωικό ορό σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα Tris/0,09% ProClin™ 950.
4. Novolink™ Polymer. Poly-HRP-IgG κατά κονίκλου (<25µg/mL) που περιέχει 10% (v/v) ζωικό ορό σε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα Tris/0,09% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen. 1,74% w/v 3,3'-διαμινοβενζιδίνη, σε διάλυμα σταθεροποιητή.
6. Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει υπεροξειδίο του υδρογόνου ≤0,1% και συντηρητικό.
7. Hematoxylin. Αιματοξυλίνη <0,1%.

Αντιδραστήρια	Κωδικός είδους:	Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests) RE7280-K	Novolink™ Polymer Detection System (500 tests) RE7150-K	Novolink™ Polymer Detection System (250 tests) RE7140-K	Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests) RE7290-K
Peroxidase Block	RE7101		2 x 25ml	1 x 25ml	
Protein Block	RE7102		2 x 25ml	1 x 25ml	
Post Primary	RE7111		2 x 25ml	1 x 25ml	
Novolink™ Polymer	RE7112		2 x 25ml	1 x 25ml	
DAB Chromogen	RE7105		1 x 3ml	1 x 3ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143		2 x 30ml	1 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107		2 x 25ml	1 x 25ml	
Peroxidase Block	RE7157	1 x 125ml			
Protein Block	RE7158	1 x 125ml			
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7162	1 x 8ml			
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163	1 x 150ml			
Hematoxylin	RE7164	1 x 125ml			
Peroxidase Block	RE7165				1 x 5ml
Protein Block	RE7166				1 x 5ml
Post Primary	RE7167				1 x 5ml
Novolink™ Polymer	RE7168				1 x 5ml
DAB Chromogen	RE7169				1 x 1ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7171				1 x 5ml
Hematoxylin	RE7172				1 x 5ml

Αντιδραστήρια	Κωδικός είδους:	Novolink™ Max Polymer (1250 tests) RE7260-K	Novolink™ Polymer (250 tests) RE7200-K	Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests RE7270-K	Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests RE7230-K
Post Primary	RE7111		1 x 25ml		
Novolink™ Polymer	RE7112		1 x 25ml		
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7105				1 x 3ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143				1 x 30ml
DAB Chromogen	RE7162			1 x 8ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163			1 x 150ml	

Ανασύσταση, ανάμειξη, αραίωση, τιτλοδότηση

Τα Peroxidase Block, Protein Block, Post Primary, Novolink™ Polymer και Hematoxylin είναι προαραιωμένα. Δε συνιστάται ανασύσταση, ανάμειξη, αραίωση ή τιτλοδότηση των αντιδραστηρίων αυτών. Περαιτέρω αραίωση ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα απώλεια χρώσης του αντιγόνου. Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει τυχόν τέτοια αλλαγή.

Το DAB Chromogen απαιτεί αραίωση σε αναλογία 1/20 σε Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer) πριν από τη χρήση. 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.

Παρασκευαζόμενη δείγματα

DAB Chromogen

Περιέχει <10% Biphenyl-3,3',4,4'-Tetrayltetraamine.

GHS08: Κίνδυνος για την υγεία.

Προειδοποιητές λέξεις: Κίνδυνος.

H341: Ύποπτο για πρόκληση γενετικών ελαττωμάτων.

H350: Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο.

P201: Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.

P202: Μην το χρησιμοποιήσετε πριν διαβάσετε και κατανοήσετε τις οδηγίες προφύλαξης.

P281: Χρησιμοποιείτε μέσα ατομικής προστασίας όταν απαιτείται.

P308+313: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό.

P501: Απορρίψτε τα περιεχόμενα / περιέκτη σε επικίνδυνες ή ειδικό σημείο συλλογής αποβλήτων.

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

Για επαγγελματίες χρήστες.

Μην αναμειγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικά συστήματα ανίχνευσης.

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.⁴

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

Συμβουλευτείτε τους ομοσπονδιακούς, πολιτειακούς ή τοπικούς κανονισμούς για απόρριψη τυχόν δυνητικών τοξικών συστατικών.

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

Διαδικασία

A. Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Πρότυποι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημεία.
2. 50 mM αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος Tris (TBS) pH 7,6.
3. Διάλυμα(τα) ανάκτησης αντιγόνων.
4. Διάλυμα(τα) ανάκτησης ενζύμων.
5. Αραιωτικό αντισώματος.
6. Πρωτοταγές αντίσωμα.
7. Υλικό στερέωσης.

B. Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

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

Γ. Μεθοδολογία

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

Όλα τα βήματα πρέπει να ακολουθούνται σύμφωνα με τις οδηγίες, διαφορετικά η απόδοση ενδέχεται να είναι μειωμένη.

Ο συνδυασμός του πρωτοταγούς αντισώματος, της αραίωσής του, σε συνδυασμό 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).

Για χρήση σε παγωμένο ιστό, κόψτε τομές και μονιμοποιήστε σύμφωνα με τις συστάσεις για το πρωτογενές αντίσωμα, ξεκινήστε στο βήμα 11.

1. Κόψτε και στερεώστε τις τομές σε αντικειμενοφόρους πλάκες επιστρωμένες με κατάλληλο μέσο συγκόλλησης ιστών.
2. Αφαιρέστε την παραφίνη από τις τομές σε ξυλένιο ή υποκατάστατα ξυλένιο.
3. Επανενυδατώστε μέσω διαβαθμισμένων αλκοολών.
4. Πλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε τρεχούμενο νερό βρύσης.
5. Εκτελέστε ανάκτηση αντιγόνων όπως απαιτείται (δείτε την ενότητα Συστάσεις για τη χρήση για το πρωτοταγές αντίσωμα).
6. Πλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με αποιονισμένο νερό.
7. Εξουδετερώστε την ενδογενή υπεροξειδάση με χρήση του Peroxidase Block επί 5 λεπτά.

8. Πλύνετε σε TBS επί 2 x 5 λεπτά.
9. Επλώστε με Protein Block επί 5 λεπτά.
10. Πλύνετε σε TBS επί 2 x 5 λεπτά.
11. Επλώστε με βέλτιστο αραιωμένο πρωτοταγές αντίσωμα (δείτε την ενότητα Συστάσεις για τη χρήση για το πρωτοταγές αντίσωμα).
12. Πλύνετε σε TBS επί 2 x 5 λεπτά.
13. Επλώστε με το Post Primary επί 30 λεπτά.
14. Πλύνετε σε TBS επί 2 x 5 λεπτά.
15. Επλώστε με το Novolink™ Polymer επί 30 λεπτά.
16. Πλύνετε σε TBS επί 2 x 5 λεπτά με απαλή ανακίνηση.
17. Αναπτύξτε δραστηριότητα υπεροξειδάσης με διάλυμα εργασίας DAB (δείτε την ενότητα Διάλυμα εργασίας DAB) επί 5 λεπτά.
18. Εκπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με νερό.
19. Αντιχρωματίστε με Hematoxylin.
20. Εκπλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με νερό επί 5 λεπτά.
21. Αφυδατώστε, διαυγάστε και στερεώστε τις τομές.

Διάλυμα εργασίας DAB

Προσθέστε 50 μl DAB Chromogen σε 1 ml Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer). Χρησιμοποιήστε εντός 6 ωρών από την παρασκευή.

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 εγκλεισμένα σε κηρό παραφίνης, το συντομότερο δυνατό με τον ίδιο τρόπο με το(α) δείγμα(τα) του ασθενούς.

Θετικός μάρτυρας ιστού

Χρησιμοποιείται για να υποδεικνύει σωστά παρασκευασμένους ιστούς και σωστές τεχνικές χρώσης. Θα πρέπει να περιλαμβάνεται ένας θετικός μάρτυρας ιστού για κάθε σύνολο συνθηκών εξέτασης/πρωτοταγούς αντισώματος σε κάθε εκτέλεση χρώσης. Ένας ιστός με ασθενή θετική χρώση είναι πιο κατάλληλος από έναν ιστό με ισχυρή θετική χρώση για βέλτιστο ποιοτικό έλεγχο και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόμησης των αντιδραστηρίων.⁵ Για τον συνιστώμενο ιστό θετικού μάρτυρα, δείτε την ενότητα Συστάσεις για τη χρήση για το πρωτοταγές αντίσωμα. 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 άδικτα κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης. Νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα παρουσιάζουν συχνά μη ειδική χρώση.⁶ 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 ψευδοϋπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη⁷ (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός). Προκειμένου να γίνει διαφοροποίηση μεταξύ της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμευσης από την ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, επιπλέον ιστοί του ασθενούς μπορούν να υποστούν χρώση αποκλειστικά με χρωμογόνο υποστρώματος, με σημασμένο πολυμερές και ανιχνεύθηκε, όχι ότι το αντιγόνο δεν υπήρχε στα κύτταρα/στον ιστό που εξετάστηκε. 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 επιτρέπει καλύτερη ερμηνεία της ειδικής χρώσης στη θέση του αντιγόνου.

Ιστός ασθενούς.

Εξετάστε τελευταία τα 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 ανιχνεύθηκε, 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.

Περιορισμό

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, απόμυξη, 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.⁸

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

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

Τα Novolink™ Polymer Detection Systems και τα συστατικά τους προορίζονται για χρήση σε τομές εγκλεισμένες με παραφίνη με ειδικές απαιτήσεις μονιμοποίησης. Ενδέχεται να παρουσιαστεί μη αναμενόμενη έκφραση αντιγόνου, ειδικά σε νεοπλασμάτα. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε κεχρωσμένης τομής ιστού πρέπει να περιλαμβάνει μορφολογική ανάλυση και την αξιολόγηση των κατάλληλων μαρτύρων.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Η απόδοση των Novolink™ Polymer Detection Systems, Novolink™ Polymer και Novolink™ DAB (Polymer) έχει επικυρωθεί με χρήση μιας σειράς πρωτοπαγών αντισωμάτων IgG ποντικού, IgM* ποντικού και IgG κουνελιού Novocastra.

*Ενδέχεται να παρατηρηθεί ασθενής χρώση με αντισώματα του ιστύπου IgM.

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

Βιβλιογραφία

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14:929–931.
2. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International*. 1995; 45(2):108–115.
3. Shan-Rong Shi, Guo J Cote R J et al . *Applied Immunohistochemistry & Molecular morphology*. 1999; 7:201-208.
4. 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.
5. 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.
6. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
7. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
8. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Παρασκευή δείγματος.

Ημερομηνία έκδοσης

16 Φεβρουαρίου 2015

Novocastra™

Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests)

Productnr.: RE7280-K

Novolink™ Polymer Detection System (500 tests)

Productnr.: RE7150-K

Novolink™ Polymer Detection System (250 tests)

Productnr.: RE7140-K

Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests)

Productnr.: RE7290-K

Novolink™ Max Polymer (1250 tests)

Productnr.: RE7260-K

Novolink™ Polymer (250 tests)

Productnr.: RE7200-K

Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests

Productnr.: RE7270-K

Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests

Productnr.: RE7230-K

Beoogd gebruik

Voor diagnostisch gebruik *in-vitro*.

Novolink™ Polymer Detection Systems zijn bedoeld voor het visualiseren van muis IgG, muis IgM en konijn IgG primaire antilichamen. Novolink™ Polymer en Novolink™ DAB (Polymer) bevatten componentreagentia van deze systemen en zijn bedoeld voor gebruik in de onderstaand beschreven procedure. De klinische interpretatie van elke kleuring of het ontbreken ervan moet worden aangevuld door morfologische onderzoeken met correcte controles en moet binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests worden geëvalueerd door een deskundig patholoog.

Principe van de procedure

De eerste immunoperoxidasetechniek is beschreven door Nakane en Pierce¹. De daarop volgende ontwikkelingen hebben geleid tot een hogere gevoeligheid, vergeleken met eerdere technieken. Een recente ontwikkeling is het gebruik van polymeerlabeling. Deze technologie is toegepast bij zowel primaire antilichamen² als detectiesystemen. De Novolink™ Polymer Detection Systems maken gebruik van een nieuwe techniek van gecontroleerde polymerisatie waarmee polymere HRP-linker-antilichaamconjugaten worden bereid. Daardoor wordt het probleem voorkomen van de niet-specifieke kleuring die bij streptavidine/biotinedetectiesystemen kan optreden door endogeen biotine.

Deze producten worden gebruikt in een immunohistochemische (IHC) procedure waarbij met een lichtmicroscop een kwalitatieve identificatie kan worden uitgevoerd van antigenen in coupes van in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel, via opeenvolgende behandelingen met tussendoor spoelen. Als dit vanwege het primaire antilichaam nodig is wordt er vóór de kleuring met de coupes een epitooptrieval uitgevoerd. Endogene peroxidaseactiviteit wordt geneutraliseerd met Peroxidase Block. Vervolgens wordt Protein Block opgebracht waarmee de niet-specifieke binding tussen primaire en polymere antilichamen wordt verminderd. Vervolgens wordt de coupe geïncubeerd met optimaal verdund primair antilichaam. Post Primary (konijnen-anti-muis-IgG) wordt vervolgens gebruikt om muizen-antilichamen te detecteren. Novolink™ Polymer herkent konijnen-immunoglobulinen, het detecteert post-primaire en weefselgebonden primaire konijnen-antilichamen. Daarna worden de coupes geïncubeerd met substraat/chromogeen, 3,3' - diaminobenzidine (DAB), bereid van DAB Chromogen en Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer), zoals hieronder beschreven. Door de reactie met peroxidase wordt op de antigeenplaats een zichtbaar bruin precipitaat gevormd. De coupes worden tegengekleurd met Hematoxylin en afgedekt. De resultaten worden geïnterpreteerd met een lichtmicroscop en ondersteunen de differentieële diagnose van pathofysiologische processen die al dan niet verband houden met een bepaald antigeen.

Geleverde reagentia

Details over welke reagentia op de volgende lijst met welk product geleverd worden staan in de onderstaande tabel.

1. Peroxidase Block. 3–4% (v/v) waterstofperoxide.
2. Protein Block. 0,4% caseïne in fosfaatgebufferde fysiologische zoutoplossing, met stabilisatoren, surfactans en 0,2% Bronidox L als conserveermiddel.
3. Post Primary. Konijnen-anti-muis-IgG (<10 µg/ml) in 10% (v/v) dierlijk serum in tris-gebufferde zoutoplossing/0,09% ProClin™ 950.
4. Novolink™ Polymer. Anti-konijn-Poly-HRP-IgG (<25 µg/ml); bevat 10% (v/v) dierlijk serum in tris-gebufferde zoutoplossing/0,09% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen. 1,74% g/v 3,3' - diaminobenzidine in een stabilisatoroplossing.
6. Novolink DAB Substrate Buffer (Polymer). Gebufferde oplossing, bevat ≤0,1% waterstofperoxide en conserveermiddel.
7. Hematoxylin. <0,1% Hematoxylin.

Reagentia	Productnr.	Novolink™ Max Polymer Detection System (1250 tests) RE7280-K	Novolink™ Polymer Detection System (500 tests) RE7150-K	Novolink™ Polymer Detection System (250 tests) RE7140-K	Novolink™ Min Polymer Detection System (50 tests) RE7290-K
Peroxidase Block	RE7101		2 x 25ml	1 x 25ml	
Protein Block	RE7102		2 x 25ml	1 x 25ml	
Post Primary	RE7111		2 x 25ml	1 x 25ml	
Novolink™ Polymer	RE7112		2 x 25ml	1 x 25ml	
DAB Chromogen	RE7105		1 x 3ml	1 x 3ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143		2 x 30ml	1 x 30ml	
Hematoxylin	RE7107		2 x 25ml	1 x 25ml	
Peroxidase Block	RE7157	1 x 125ml			
Protein Block	RE7158	1 x 125ml			
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7162	1 x 8ml			
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163	1 x 150ml			
Hematoxylin	RE7164	1 x 125ml			
Peroxidase Block	RE7165				1 x 5ml
Protein Block	RE7166				1 x 5ml
Post Primary	RE7167				1 x 5ml
Novolink™ Polymer	RE7168				1 x 5ml
DAB Chromogen	RE7169				1 x 1ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7171				1 x 5ml
Hematoxylin	RE7172				1 x 5ml

Reagentia	Productnr.	Novolink™ Max Polymer (1250 tests) RE7260-K	Novolink™ Polymer (250 tests) RE7200-K	Novolink™ Max DAB (Polymer) 1250 tests RE7270-K	Novolink™ DAB (Polymer) 250 tests RE7230-K
Post Primary	RE7111		1 x 25ml		
Novolink™ Polymer	RE7112		1 x 25ml		
Post Primary	RE7159	1 x 125ml			
Novolink™ Polymer	RE7161	1 x 125ml			
DAB Chromogen	RE7105				1 x 3ml
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7143				1 x 30ml
DAB Chromogen	RE7162			1 x 8ml	
Novolink™ DAB Substrate Buffer (Polymer)	RE7163			1 x 150ml	

Reconstitutie, mengen, verdunnen, titreren

Peroxidase Block, Protein Block, Post Primary, Novolink Polymer en Hematoxylin zijn voorverdund. Reconstitutie, mengen, verdunnen of titreren van deze reagentia wordt niet aanbevolen. Verder verdunnen leidt mogelijk tot verlies aan antigeenkleuring. De gebruiker moet eventuele wijzigingen valideren.

DAB Chromogen moet vóór gebruik 1 : 20 worden verdund in Novolink DAB Substrate Buffer (Polymer). Verder verdunnen leidt mogelijk tot verlies aan antigeenkleuring. De gebruiker moet eventuele wijzigingen valideren.

Bewaren en stabiliteit

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

Specimenbereiding

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

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

DAB Chromogen

Bevat <10% Biphenyl-3,3',4,4'-Tetrahydraamine.

GHS08: Gezondheidsgevaar

Signaalwoorden: Gevaar.

H341: Verdacht van het veroorzaken van genetische schade.

H350: Kan kanker veroorzaken.

P201: Alvorens te gebruiken de speciale aanwijzingen raadplegen.

P202: Pas gebruiken nadat u alle veiligheidsvoorschriften gelezen en begrepen heeft.

P281: De nodige persoonlijke beschermingsuitrusting gebruiken.

P308+313: NA (mogelijke) blootstelling: een arts raadplegen.

P501: Inhoud / verpakking naar gevaarlijk of bijzonder afval brengen.

Op verzoek is een veiligheidsinformatieblad leverbaar dat ook kan worden gedownload van www.LeicaBiosystems.com

Beroepsmatig gebruik.

Meng geen reagentia van verschillende detectiesystemen.

Voor en na fixatie moeten specimens en alle eraan blootgestelde materialen worden behandeld alsof ze infectieus zijn; daarom moeten ze ook met de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd⁴.

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

Werk volgens de plaatselijke of landelijke voorschriften voor het afvoeren van mogelijk giftige stoffen.

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

Procedure

A. Benodigde maar niet geleverde reagentia

1. Standaard oplosmiddelen die in de immunohistochemie gebruikt worden.
2. 50 mM tris-gebufferde fysiologische zoutoplossing (TBS) pH 7,6.
3. Antigeenretrievaloplossing(en).
4. Enzymretrievaloplossing(en).
5. Verdunningsvloeistof voor antilichaam.
6. Primair antilichaam.
7. Plakmiddel.

B. Benodigde maar niet geleverde apparatuur

1. Voor antigeenretrieval benodigde apparatuur, indien dit voor het primaire antilichaam aanbevolen wordt.
2. Algemene laboratoriumapparatuur voor immunohistochemie.

C. Methodologie

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

Als niet alle stappen zoals aangegeven worden uitgevoerd kan dit de prestatie beïnvloeden.

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

Tenzij anders aangegeven worden alle stappen uitgevoerd bij kamertemperatuur (25 °C).

Voor gebruik op bevroren weefsel snijdt u vriescoupes en fixeert u volgens de aanbevelingen voor primaire antilichamen. Begin in dat geval bij stap 11.

1. Snij de coupes en plak ze op glaasjes, gecoat met een geschikt plakmiddel voor weefsel.
2. Deparaffiniseer coupes in xyleen of xyleenvervangers.
3. Rehydreer in aflopende alcoholreeks.
4. Spoel de glaasjes onder stromend kraanwater.
5. Voer een antigeenretrieval uit zoals vereist (zie Aanbevelingen voor gebruik voor primair antilichaam).
6. Spoel de glaasjes in gedemineraliseerd water.
7. Neutraliseer endogeen peroxidase met Peroxidase Block gedurende 5 minuten.

8. Spoel 2 x 5 minuten in TBS.
9. Incubeer 5 minuten met Protein Block.
10. Spoel 2 x 5 minuten in TBS.
11. Incubeer met optimaal verdund primair antilichaam (zie Aanbevelingen voor gebruik voor primair antilichaam).
12. Spoel 2 x 5 minuten in TBS.
13. Incubeer 30 minuten met Post Primary.
14. Spoel 2 x 5 minuten in TBS.
15. Incubeer 30 minuten met Novolink™ Polymer.
16. Spoel 2 x 5 minuten in TBS met voorzichtig schudden.
17. Ontwikkel peroxidaseactiviteit met DAB werkoplossing (zie DAB Working Solution) gedurende 5 minuten.
18. Spoel glaasjes in water.
19. Tegenkleuren met Hematoxylin.
20. Spoel glaasjes 5 minuten in water.
21. Dehydreer de coupes, maak ze schoon en plak ze op.

DAB Working Solution

Voeg 50 µl DAB Chromogen toe aan 1 ml Novolink DAB Substrate Buffer (Polymer). Gebruik binnen zes uur na bereiding.

Kwaliteitscontrole

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

Positief controleweefsel

Dit wordt gebruikt ter controle van correct bereide weefsels en juist uitgevoerde kleuringstechnieken. Bij elke kleuringstest behoort een positief controleweefsel deel uit te maken van elke set testcondities/primair antilichaam. Weefsel met een zwakke positieve kleuring is beter geschikt voor een goede kwaliteitscontrole en voor het detecteren van lage niveaus van reagensafbraak dan weefsel met een sterke positieve kleuring⁶. Zie voor aanbevelen positief controleweefsel de Aanbevelingen voor primair antilichaam. Als het positieve controleweefsel geen positieve kleuring vertoont moeten de resultaten van de testspecimens als ongeldig beschouwd worden.

Negatief controleweefsel

Dit moet na het positieve controleweefsel worden onderzocht zodat de specificiteit van de labeling van het targetantigeen door het primaire antilichaam kan worden geverifieerd. Zie voor aanbevelen negatief controleweefsel de Gebruiksaanwijzing voor primair antilichaam. Door de variëteit van verschillende celtypes in de meeste weefselcoupes komen er vaak negatieve controleplaatsen voor; dit moet door de gebruiker worden geverifieerd. Eventuele niet-specifieke kleuring ziet er vaak diffuus uit. Ook in weefselcoupes die zeer sterk in formaline gefixeerd zijn kan sporadisch kleuring van bindweefsel worden waargenomen. Gebruik intacte cellen voor de interpretatie van de kleuringresultaten. Necrotische of gedegenereerde cellen kleuren vaak niet-specifiek⁶. Niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten kan leiden tot vals-positieve resultaten. Zulke resultaten kunnen ook worden veroorzaakt door endogene enzymen als pseudoperoxidase (erythrocyten), endogeen peroxidase (cytochrom C) of endogeen biotine⁷ (bv. lever, borst, hersenen en nier). Om onderscheid te endogene enzym activiteit of niet-specifieke binding van specifieke immunoreactiviteit, kunnen extra patiënt weefsels uitsluitend met substraat-chromogeen worden gekleurd, met gelabelde polymeer en substraat-chromogeen of met Post primaire, gelabeld polymeer en substraat-chromogeen. Als bij het negatieve controleweefsel specifieke kleuring optreedt moeten de resultaten van de patiëntspecimens als ongeldig worden beschouwd.

Negatief controle reagens

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

Patiëntweefsel

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

Beperkingen

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

De kleuring van het weefsel is afhankelijk van de manier waarop het weefsel vóór de kleuring is behandeld en bewerkt. Het onjuist fixeren, invriezen, ontdoien, spoelen, drogen, verwarmen, snijden en besmetting met andere weefsels of vloeistoffen kan leiden tot artefacten, antilichaam-trapping of vals-negatieve resultaten. Inconsistente resultaten zijn mogelijk te wijten aan variaties in de methodes van fixeren en inbedden of aan weefselgeleigen afwijkingen⁸.

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

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

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

Eigenschappen

De prestaties van Novolink™ Polymer Detection Systems, Novolink™ Polymer en Novolink™ DAB (Polymer) zijn gevalideerd met een reeks Novocastra™ muis IgG, muis IgM en konijn IgG primaire antilichamen.

*Er kan een zwakke kleuring optreden bij antilichamen van isotype IgM.

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

Literatuurlijst

1. Nakane PK and Pierce GB. Enzyme labeled antibodies : Preparations and applications for the localization of antigens. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1967; 14:929–931.
2. Tsutsumi Y, Serizawa A and Kawai K. Enhanced polymer one-step staining (EPOS) for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen-applications to intraoperative frozen diagnosis. *Pathology International*. 1995; 45(2):108–115.
3. Shan-Rong Shi, Guo J Cote R J et al . *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 1999; 7:201-208.
4. 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.
5. 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.
6. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
7. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
8. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Wijzigingen ten opzichte van de voorgaande uitgave

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.

Datum van uitgave

16 februari 2015

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

