

Novocastra

Novolink Max Polymer Detection System (1250 tests)

Ref. 4

Nr. produs RE7280-K

Novolink Polymer Detection System (500 tests)

Nr. produs RE7150-K

Novolink Polymer Detection System (250 tests)

Nr. produs RE7140-K

Novolink Min Polymer Detection System (50 tests)

Nr. produs RE7290-K

Novolink Max Polymer (1250 tests)

Nr. produs RE7260-K

Novolink Polymer (250 tests)

Nr. produs RE7200-K

Novolink Max DAB (Polymer) 1250 tests

Nr. produs RE7270-K

Novolink DAB (Polymer) 250 tests

Nr. produs RE7230-K

Utilizare prevăzută

Ref. 1

Pentru diagnosticare in vitro.

Novolink Polymer Detection Systems sunt utilizate pentru vizualizarea anticorpilor primari IgG de șoarece, IgM de șoarece și IgG de iepure. Novolink Polymer și Novolink DAB (Polymer) conțin reactivi componenți ai acestor sisteme și sunt prevăzute pentru utilizare în procedura descrisă mai jos. Interpretarea clinică a oricărei colorări sau a absenței acesteia trebuie completată cu studii morfologice utilizând controale adecvate și trebuie evaluată în contextul istoricului clinic al pacientului, precum și al altor teste de diagnosticare efectuate de către un patolog calificat.

Ref. 2

Principiul procedurii

Prima tehnică cu imunoperoxidază a fost raportată de Nakane și Pierce¹. De atunci au avut loc multe evoluții care au dus la creșterea sensibilității față de tehnicile mai vechi. O evoluție recentă a fost utilizarea etichetării polimerice. Această tehnologie a fost aplicată atât la anticorpii primari² cât și la sistemele de detecție. Novolink Polymer Detection Systems utilizează o tehnologie nouă de polimerizare controlată pentru prepararea conjugatelor de anticorp de legătură HRP. Prin urmare, nu apare problema colorației nespecifice care se poate produce cu sistemele de detecție cu Streptavidină/Biotină din cauza biotinei endogene.

Aceste produse sunt utilizate într-o procedură imunohistochimică (IHC), care permite identificarea calitativă prin microscopie optică a antigenilor în secțiuni de țesut fixat cu formalină, încorporat în parafină, prin etape secvențiale cu etape de spălare intercalate. Dacă este necesar pentru anticorpii primari, secțiunile sunt supuse recuperării epitopilor înainte de colorație. Activitatea peroxidazei endogene este neutralizată utilizând Peroxidase Block. Acesta este urmat de aplicarea Novocastra Protein Block pentru a reduce legarea nespecifică a anticorpului primar și a polimerului. Secțiunea este apoi incubată cu anticorp primar în diluție optimă. Apoi se utilizează Post Primary (IgG de iepure anti șoarece) pentru detectarea anticorpilor de șoarece. Novolink Polymer recunoaște imunoglobulinele de iepure, detectează Post Primary și orice anticorpi primari de iepure legați de țesut. Secțiunile sunt apoi incubate în continuare cu substratul/cromogen, 3,3'-diaminobenzidină (DAB), preparat din DAB Chromogen și Novolink DAB Substrate Buffer (Polymer), după cum se descrie mai jos. Reacția cu peroxidaza produce un precipitat cafeniu vizibil la situl antigenului. Secțiunile sunt contracolorate cu Hematoxylin și acoperite cu lamele. Rezultatele sunt interpretate folosind un microscop optic și ajută la diagnosticul diferențial al proceselor patofiziologice, care pot sau nu să fie asociate cu un anumit antigen.

Ref. 3

Reactivi furnizați

Detalii reactivilor din lista următoare care sunt furnizați în fiecare produs sunt date în tabelul de mai jos.

1. Peroxidase Block. apă oxigenată 3-4% (v/v).
2. Protein Block. 0,4% cazeină în soluție salină tamponată cu fosfat, cu stabilizatori, surfactant și 0,2% Bronidox L drept conservant.
3. Post Primary. IgG de iepure anti șoarece (<10 µg/ml) în ser animal 10% (v/v) în soluție salină tamponată cu trometamină/0,1% ProClin™ 950.
4. Novolink Polymer. Poly-HRP-IgG anti- iepure (<25 µg/ml) conținând 10% (v/v) ser animal în soluție salină tamponată cu trometamină/0,1% ProClin™ 950.
5. DAB Chromogen. 1,74% w/v 3,3' - diaminobenzidină, în soluție stabilizatoare.
6. Novolink DAB Substrate Buffer (Polymer). Soluție tamponată conținând apă oxigenată ≤ 0,1% și conservant.
7. Hematoxylin. Hematoxylin <0,1%.

Ref. 5

Ref. 4

Reactiv	Număr produs	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 25 ml	1 x 25 ml	
Protein Block	RE7102		2 x 25 ml	1 x 25 ml	
Post Primary	RE7111		2 x 25 ml	1 x 25 ml	
Novolink Polymer	RE7112		2 x 25 ml	1 x 25 ml	
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 25 ml	1 x 25 ml	
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

Ref. 5

Reactiv	Număr produs	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 25 ml		
Novolink Polymer	RE7112		1 x 25 ml		
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	

Reconstituire, amestecare, diluare, titrare

Peroxidase Block, Protein Block, Post Primary, Novolink Polymer și Hematoxylin sunt prediluate. Reconstituirea, amestecarea, diluarea sau titrarea acestor reactivi nu sunt recomandate. Diluarea poate duce la pierderea colorării antigenilor. Utilizatorul trebuie să valideze orice astfel de schimbare.

DAB Chromogen necesită diluare la 1/20 în Novolink DAB Substrate Buffer (Polymer) înainte de utilizare. Diluarea poate duce la pierderea colorării antigenilor. Utilizatorul trebuie să valideze orice astfel de schimbare.

Depozitare și stabilitate

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

Pregătirea specimenului

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

Avertismente și precauții

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

Pentru utilizatori profesioniști.

Nu amestecați reactivi din sisteme de detecție diferite.

Specimenele, înainte și după fixare, precum și toate materialele expuse la acestea, trebuie manipulate ca și când ar avea potențialul de a transmite infecții și trebuie eliminate luând măsurile de precauție adecvate.⁴

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

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

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

Procedură

A. Reactivi necesari care nu sunt însă furnizați

1. Solvenți standard folosiți în imunohistochimie.
2. Soluție salină tamponată cu trometamină 50 mM (SSTT) pH 7,6.
3. Soluție(i) de recuperare cu antigen.
4. Soluție(i) de recuperare cu enzime.
5. Diluant pentru anticorpi.
6. Anticorp primar.
7. Mediu de montare.

B. Echipamente necesare care nu sunt însă furnizate

1. Echipament necesar pentru recuperarea cu antigen, dacă este recomandată pentru anticorpii primari.
2. Echipament de laborator general pentru imunohistochimie.

C. Metodologie

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

Toți pașii trebuie urmați conform instrucțiunilor, în caz contrar putând fi afectată performanța.

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

Dacă nu se indică altfel, toate etapele se efectuează la temperatura camerei (25 °C).

Pentru utilizare pe țesut congelat, tăiați secțiuni și fixați conform recomandărilor pentru anticorpii primari, începeți la pasul 11.

1. Tăiați și montați secțiunile pe lame acoperite cu un adeziv tisular adecvat.
2. Deparafinizați secțiunile în xilen sau substitute de xilen.
3. Rehidratați cu ajutorul alcoolilor cu gradatie descrescătoare.
4. Spălați lamelele cu apă de la robinet.
5. Realizați recuperarea antigenilor după cum este necesar (a se vedea **Recomandări de utilizare** pentru anticorpii primari).
6. Spălați lamelele în apă deionizată.
7. Neutralizați peroxidaza endogenă utilizând Peroxidase Block timp de 5 minute.
8. Spălați în SSTT timp de 2 x 5 minute.
9. Incubați cu Protein Block timp de 5 minute.
10. Spălați în SSTT timp de 2 x 5 minute.
11. Incubați cu anticorpii primari diluați optim (a se vedea **Recomandări de utilizare** pentru anticorpii primari).
12. Spălați în SSTT timp de 2 x 5 minute.
13. Incubați cu Post Primary timp de 30 de minute.
14. Spălați în SSTT timp de 2 x 5 minute.

Ref. 6

Ref. 6

15. Incubați cu Novolink Polymer timp de 30 de minute.
16. Spălați în soluție tampon SSTT timp de 2 x 5 minute, legănând ușor.
17. Dezvoltați activitatea peroxidazei cu soluție de lucru DAB (a se vedea Soluție de lucru DAB) timp de 5 minute.
18. Clătiți lamele în apă.
19. Contracolorați cu Hematoxylin.
20. Clătiți lamelele în apă timp de 5 minute.
21. Deshidratați, curățați și montați secțiunile.

Soluție de lucru DAB

Adăugați 50μl de DAB Chromogen la 1ml de Novolink DAB Substrate Buffer (Polymer). Utilizați în maxim șase ore de la preparare.

Controlul calității

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

Țesutul de control pozitiv

Folosit pentru a indica țesuturile pregătite corect și tehnicile de colorare adecvate. O probă de țesut de control pozitiv trebuie să fie inclusă pentru fiecare set de condiții de testare/anticorp primar în fiecare etapă de colorație. Un țesut cu colorație pozitivă slabă este mai adecvat decât un țesut cu colorație pozitivă puternică pentru controlul optim al calității și pentru a detecta nivele minore de degradare a reactivilor.⁵ Pentru țesutul de control pozitiv recomandat a se vedea Recomandări de utilizare. Dacă țesutul de control pozitiv nu demonstrează colorația pozitivă, rezultatele obținute cu acele probe de testare trebuie considerate nevalide.

Țesutul de control negativ

Trebuie examinat după țesutul de control pozitiv pentru a verifica specificitatea informațiilor de etichetare ale antigenului țintă în funcție de anticorpul primar. Pentru țesutul de control negativ recomandat, a se vedea Instrucțiunile de utilizare pentru anticorpul primar. Ca alternativă, varietatea de tipuri diferite de celule prezente în majoritatea secțiunilor tisulare oferă frecvent locuri de control negativ, dar acest lucru trebuie verificat de către utilizator. Colorația nespecifică, dacă este prezentă, are, de obicei, un aspect difuz. Colorația sporadică a țesutului conjunctiv poate fi observată, de asemenea, în secțiuni de țesuturi fixate în mod excesiv în formalină. Folosiți celule intacte pentru interpretarea rezultatelor de colorație. Celulele necrotice sau degenerate se colorează deseori într-un mod nespecific.⁶ Se pot observa rezultate fals pozitive ca urmare a legării non-imunologice a proteinelor sau produșilor de reacție ai substratului. Acestea pot fi cauzate, de asemenea, de enzimele endogene precum pseudoperoxidaza (eritrocite), peroxidaza endogenă (citocromul C) sau biotina endogenă⁷ (de exemplu, ficat, sân, creier, rinichi). Pentru a diferenția activitatea enzimelor endogene sau legarea nespecifică de imunoreactivitatea specifică, pot fi colorate țesuturi suplimentare de la pacient numai cu substrat-cromogen, cu polimer etichetat și cu substrat-cromogen sau cu Post Primary, polimer etichetat și substrat-cromogen. În cazul în care colorația specifică are loc în țesutul de control negativ, rezultatele obținute pe eșantioanele pacientului trebuie să fie considerate nevalide.

Reactivul de control negativ

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

Țesutul pacientului

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

Limitări

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

Colorația tisulară depinde de manipularea și procesarea țesutului înainte de colorație. Fixarea, congelarea, dezghețarea, spălarea, uscarea, încălzirea, secționarea necorespunzătoare sau contaminarea cu alte țesuturi ori fluide pot cauza artefacte, captura anticorpilor sau rezultate fals negative. Rezultatele inconsecvente pot fi atribuite diferențelor în ceea ce privește metodele de fixare și încorporare, ori neregularităților inerente ale țesutului.⁸

Contracolorația excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea adecvată a rezultatelor.

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

Novolink Polymer Detection Systems și componentele acestora sunt pentru utilizare pe secțiuni încorporate în parafină cu cerințe specifice de fixare. Poate apărea expresia neașteptată a antigenului, în special în neoplasme. Interpretarea clinică a oricărei secțiuni tisulare colorate trebuie să includă analiza morfologică și evaluarea probelor de control adecvate.

Caracteristici de performanță

Performanța Novolink Polymer Detection Systems, Novolink Polymer și Novolink DAB (Polymer) a fost validată utilizând o varietate de anticorpi primari Novocastra IgG de șoarece, IgM* de șoarece IgG de iepure.

*Se poate observa o colorare slabă cu unii anticorpi din izotipul IgM.

Aceste produse sunt stabile până la data expirării indicată pe eticheta produsului.

Ref. 6