

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

English

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Intended Use:

For *in vitro* Diagnostic Use

The Betazoid DAB Chromogen Kit is intended for use in either manual or automated immunohistochemistry (IHC) staining protocols for the detection of target antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues when used in conjunction with the appropriate detection system and primary antibodies. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies and proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

## Summary and Explanation:

3,3' Diaminobenzidine (DAB) is a well-established chromogen used in IHC staining protocols that in the presence of a horseradish peroxidase (HRP) enzyme, produces a brown precipitate that is insoluble in organic solvents and can be coverslipped with a permanent mounting media. This product comes in a two-component system consisting of a liquid stable DAB chromogen and a DAB substrate buffer. The color of the chromogen buffer mixture may vary from colorless to pale brown. Staining properties are not affected by the color of the chromogen buffer mixture. Betazoid DAB is a formulation that is very stable. Betazoid DAB can be used both manually and on automated stainers.

## Principle of Procedure:

This DAB chromogen in the Betazoid DAB Chromogen Kit, when used in IHC testing of FFPE tissue sections, allows for the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody to the antigen (primary antibody), a secondary antibody to the primary antibody (optional link antibody/probe), an enzyme complex and a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained 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.

## Materials and Methods:

### Reagents Provided:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration:

The Betazoid DAB Chromogen Kit is optimized for use with Biocare antibodies and ancillary reagents and must be diluted just prior to use. Mix 1 drop (32µL) of DAB Chromogen per 1.0mL of DAB Substrate Buffer. The DAB working solution is stable for 5 days if stored at 2-8°C.

## Known Applications:

Immunohistochemistry (formalin-fixed paraffin-embedded tissues)

## Supplied As:

Betazoid DAB Chromogen

DAB solution. See Safety Data Sheet for additional details.

## Betazoid DAB Substrate Buffer

Buffered solution contains 3% Hydrogen Peroxide solution. See Safety Data Sheet for additional details.

## Materials and Reagents Needed But Not Provided:

Microscope slides, positively charged

Positive and negative tissue controls

Desert Chamber\* or similar Drying oven (optional)

Xylene or xylene substitute

Ethanol or reagent alcohol

Decloaking Chamber\* or similar pressure cooker (optional)

Deionized or distilled water

Wash buffer\*

Pretreatment reagents\* (optional)

Enzyme digestion\* (optional)

Peroxidase block\*

Protein block\* (optional)

Primary antibody\*

Negative control reagents\*

Detection kits\*

Hematoxylin\* (counterstain)

Bluing reagent\*

Mounting medium\*

Coverglass

Light Microscope (40-400X magnification)

\* Biocare Medical Products: Refer to the Biocare Medical website located at <http://biocare.net> for information regarding catalog numbers and ordering. Certain reagents listed above are based on specific application and detection system used.

## Storage and Stability:

Store at 2°C to 8°C. The product is stable to the expiration date printed on the vial label when stored under these conditions. Do not use after expiration date. Storage under any condition other than those specified must be verified. Diluted reagents should be used promptly as instructed. Unused diluted reagent is stable for 5 days if stored at 2-8°C. The stability of user diluted reagent beyond 5 days has not been established by Biocare.

Positive and negative controls should be run simultaneously with all patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Biocare's Technical Support at 1-800-542-2002 or via the technical support information provided on biocare.net.

## Specimen Preparation:

Tissues fixed in formalin are suitable for use prior to paraffin embedding. Osseous tissues should be decalcified prior to tissue processing to facilitate tissue cutting and prevent damage to microtome blades.<sup>1,2</sup>

Properly fixed and embedded tissues expressing the specified antigen target should be stored in a cool place. The Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) of 1988 requires in 42 CFR §493.1259(b) that "The laboratory must retain stained slides at least ten years from the date of examination and retain specimen blocks at least two years from the date of examination."<sup>3</sup>

## Treatment of Tissues Prior to Staining:

Perform Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) per recommended protocol below. The routine use of HIER prior to IHC has been shown to minimize inconsistency and standardize staining.<sup>4,5</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

English

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Warning and Precautions:

1. DAB is known to be a suspected carcinogen.
2. Do not expose DAB components to strong light or direct sunlight.
3. DAB may cause sensitization of skin. Avoid contact with skin and eyes.
4. Wear gloves and protective clothing and take reasonable precautions when handling as DAB is classified as a danger and may cause cancer and is suspected of causing genetic defects.
5. Handle materials of human or animal origin as potentially biohazardous and dispose such materials with proper precautions. In the event of exposure, follow the health directives of the responsible authorities where used.<sup>6,7</sup>
6. 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. Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come into contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.<sup>8</sup>
7. Microbial contamination of reagents may result in an increase in nonspecific staining.
8. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results. The user must validate any such change.
9. Do not use reagent after the expiration date printed on the vial.
10. The micro-polymer detection kit reagent(s) are optimized and ready to use with Biocare antibodies and ancillary reagents. Refer to the primary antibody and other ancillary reagent instructions for use for recommended protocols and conditions for use.
11. Follow local and/or state authority requirements for method of disposal.
12. The SDS is available upon request and is located at <http://biocare.net>.
13. Report any serious incidents related to this device by contacting the local Biocare representative and the applicable competent authority of the Member State or country where the user is located.

This chromogen kit contains components classified as indicated in the table below in accordance with the Regulation (EC) No. 1272/2008

Hazard	Code	Hazard Statement
	H314 H350	Suspected of causing genetic defects May cause cancer

## Instructions for Use:

The chromogen kit reagents are optimized for use with Biocare antibodies and ancillary reagents. Refer to the primary antibody and other ancillary reagent instructions for use for recommended protocols and conditions for use. Incubation times and temperatures will vary depending on the specific antibody protocol followed.

When using an automated staining instrument, consult the specific instrument operator manual and instructions for use for operating parameters.

### General procedural steps for performing IHC:

1. Deparaffinization: Deparaffinize slides in Slide Brite or xylene. Hydrate slides in a series of graded alcohols to water.
2. Peroxide Block: Block for 5 minutes with Peroxidized 1.
3. Pretreatment Solution/Protocol: Please refer to the respective primary antibody data sheet for recommended pretreatment solution and protocol.
4. Protein Block (Optional): Incubate for 5-10 minutes at room temperature (RT) with Background Punisher.
5. Primary Antibody: Please refer to the respective primary antibody data sheet for incubation time.
6. Probe (mouse antibodies only): Incubate for 5-15 minutes at RT with MACH 4 Mouse Probe.

7. Polymer: Incubate for 10-20 minutes for mouse antibodies or 30 minutes for rabbit antibodies at RT with MACH 4 HRP Polymer.
8. Chromogen: Incubate for 5 minutes at RT with Biocare's DAB.
9. Counterstain: Counterstain with hematoxylin. Rinse with deionized water. Apply Tacha's Bluing Solution for 1 minute. Rinse with deionized water.

## Technical Notes:

1. Use TBS for washing steps.

## Quality Control:

Refer to CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

### Positive Tissue Control:

External positive control materials should be fresh specimens fixed, processed, and embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s). Positive tissue controls are indicative of correctly prepared tissues and proper staining techniques. One positive external tissue control for each set of test conditions should be included in each staining run.

The tissues used for the external positive control materials should be selected from patient specimens with well-characterized low levels of the positive target activity that gives weak positive staining. The low level of positivity for external positive controls is designed so to ensure detection of subtle changes in the primary antibody sensitivity from instability or problems with the IHC methodology. Commercially available tissue control slides or specimens processed differently from the patient sample(s) validate reagent performance only and do not verify tissue preparation.

Known positive tissue controls should only be utilized for monitoring the correct performance of processed tissues and test reagents, rather than as an aid in formulating a specific diagnosis of patient samples. If the positive tissue controls fail to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

### Negative Tissue Control:

Use a negative tissue control fixed, processed, and embedded in a manner identical to the patient sample(s) with each staining run to verify the specificity of the IHC primary antibody for demonstration of the target antigen, and to provide an indication of specific background staining (false positive staining). Also, the variety of different cell types present in most tissue sections can be used by the pathologist as internal negative control sites to verify the IHC's performance specifications. The types and sources of specimens that may be used for negative tissue controls are listed in the Performance Characteristics section.

If specific staining (false positive staining) occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

### Nonspecific Negative Reagent Control:

Use a nonspecific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate nonspecific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site. Ideally, a negative reagent control contains an antibody produced and prepared (i.e. diluted to same concentration using same diluent) for use in the same way as the primary antibody but exhibits no specific reactivity with human tissues in the same matrix/solution as the primary antibody. Diluent alone may be used as a less desirable alternative to the previously described negative reagent controls. The incubation period for the negative reagent control should correspond to that of the primary antibody.

When panels of several antibodies are used on serial sections, the negatively staining areas of one slide may serve as a negative/nonspecific binding background control for other antibodies. To differentiate endogenous enzyme activity or nonspecific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

English

**BIOCARE**  
M E D I C A L

substrate-chromogen or enzyme complexes (PAP, avidin-biotin, streptavidin) and substrate-chromogen, respectively.

## Assay Verification:

Prior to initial use of an antibody or staining system in a diagnostic procedure, the user should verify the antibody's specificity by testing it on a series of in-house tissues with known immunohistochemical performance characteristics representing known positive and negative tissues. Refer to the quality control procedures previously outlined in this section of the product insert and to the quality control recommendations of the CAP Certification Program<sup>10</sup> for Immunohistochemistry and/or the NCCLS IHC guideline<sup>11</sup>. These quality control procedures should be repeated for each new antibody lot, or whenever there is a change in assay parameters. Tissues listed in the Performance Characteristics section are suitable for assay verification.

## Troubleshooting:

Follow the antibody specific protocol recommendations according to data sheet provided. If atypical results occur, contact Biocare's Technical Support at 1-800-542-2002.

## Interpretation of Staining:

The Betazoid DAB Chromogen Kit produces a brown color reaction at the antigen sites localized by the primary antibody. Prior to interpretation of patient results, the staining of controls must be evaluated by a qualified pathologist. Negative controls are evaluated and compared to stained slides to ensure any staining observed is not a result of nonspecific interactions.

### Positive Tissue Control:

The positive tissue control stained with indicated antibody should be examined first to ascertain that all reagents are functioning properly. The appropriate staining of target cells (as indicated above) is indicative of positive reactivity. If the positive tissue controls fail to demonstrate positive staining, any results with the test specimens should be considered invalid.

The color of the reaction product may vary depending on substrate chromogens used. Refer to substrate package inserts for expected color reactions. Further, metachromasia may be observed in variations of the method of staining.<sup>12</sup>

When a counterstain is used, depending on the incubation length and potency of the counterstain used, counterstaining will result in a coloration of the cell nuclei. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results. Refer to protocol(s) for recommended counterstain.

### Negative Tissue Control:

The 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. The absence of specific staining in the negative tissue control confirms the lack of antibody cross reactivity to cells/cellular components. If specific staining (false positive staining) occurs in the negative external tissue control, results with the patient specimen should be considered invalid.

Nonspecific 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 nonspecifically.

### Patient Tissue:

Examine patient specimens stained with indicated antibody last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any nonspecific 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.

Refer to Summary and Explanation, Limitations, and Performance Characteristics for specific information regarding indicated antibody immunoreactivity.

## Limitations:

### General Limitations:

1. For *in vitro* diagnostic (IVD) Use
2. This product is for professional use only: 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.
3. For use by physician prescription only. (Rx Only)
4. Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.<sup>14</sup>
5. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.
6. The clinical interpretation of any positive or negative staining should be evaluated within the context of clinical presentation, morphology, and other histopathological criteria. The clinical interpretation of any positive or negative staining should be complemented by morphological studies using proper positive and negative internal and external controls as well as other diagnostic tests. It is the responsibility of a qualified pathologist who is familiar with the proper use of IHC antibodies, reagents, and methods to interpret all the steps used to prepare and interpret the final IHC preparation.
7. The optimum protocols for a specific application can vary. These include, but are not limited to fixation, heat-retrieval method, incubation times, antibody dilution, tissue section thickness and detection kit used. Refer to the primary antibody and other ancillary reagent instructions for use for recommended protocols and conditions for use. The data sheet recommendations and protocols are based on exclusive use of Biocare products. Ultimately, it is the responsibility of the investigator to determine optimal conditions.
8. This product is not intended for use in flow cytometry. Performance characteristics have not been determined for flow cytometry.
9. Tissues from persons infected with hepatitis B virus and containing hepatitis B surface antigen (HBsAg) may exhibit nonspecific staining with horseradish peroxidase.<sup>14</sup>
10. Reagents may demonstrate unexpected reactions in previously untested tissues. The possibility of unexpected reactions even in tested tissue groups cannot be completely eliminated due to biological variability of antigen expression in neoplasms, or other pathological tissues.<sup>15</sup> Contact Biocare's Technical Support at 1-800-542-2002, or via the technical support information provided on biocare.net, with documented unexpected reaction(s).
11. Normal/nonimmune sera from the same animal source as secondary antisera used in blocking steps may cause false-negative or false-positive results due to autoantibodies or natural antibodies.
12. False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by pseudo peroxidase activity (erythrocytes), endogenous peroxidase activity (cytochrome C), or endogenous biotin (e.g., liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used.<sup>13</sup>
13. A negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells or tissue examined.

### Product Specific Limitations:

No additional product specific limitations

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

3/18



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

English

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Performance Characteristics:

Staining was performed using protocols provided in the antibody specific instructions for use or as specified. Sensitivity and specificity of staining was evaluated across a range of normal and neoplastic tissue types evaluated during development of primary antibodies.

## Reproducibility:

The reproducibility of Biocare's detection systems and system reagents is verified through a measurement of intermediate precision in which various reagent lots were tested over an extended period of time using various operators, analysts, reagent lots, tissue samples, and equipment. The staining obtained for each detection reagent evaluated was consistent and performed as expected.

## Troubleshooting:

1. No staining of any slides – Check to determine appropriate positive control tissue, antibody, and detection products have been used. Check for incomplete or improper wax removal or pretreatment.
2. Weak staining of all slides – Check to determine appropriate positive control tissue, antibody, and detection products have been used.
3. Excessive background of all slides – There may be high levels of endogenous biotin (if using biotin-based detection products), endogenous HRP activity converting chromogen to colored end product (use peroxidase block), or excess non-specific protein interaction (use a protein block, such as serum- or casein-based blocking solution).
4. Tissue sections wash off slides during incubation – Check slides to ensure they are positively charged.
5. Specific staining too dark – Check protocol to determine if proper antibody titer was applied to slide, as well as proper incubation times for all reagents. Additionally, ensure the protocol has enough washing steps to remove excess reagents after incubation steps are completed.

## References:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochim. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011.
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. AmJ Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Bulgarian

**BIOCARE**  
MEDICAL

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Предназначение:

Зайнвирто Диагностична употреба

The Betazoid DAB Chromogen Kit е предназначен за използване в протоколи за ръчно или автоматизирано имунохистохимично (ИХС) оцветяване за откриване на целеви антигени във фиксирани във формалин, вградени в парафин (FFPE) тъкани, когато се използва заедно с подходяща система за откриване и първични антитела. Клиничната интерпретация на всяко оцветяване или липсата му трябва да бъде допълнена от морфологични изследвания и подходящи контроли и трябва да бъде оценена в контекста на клиничната история на пациента и други диагностични тестове от квалифициран патолог.

## Резюме и обяснение:

3,3' диаминобензидин (DAB) е добре установен хромоген, използван в ИХС протоколите за оцветяване, който в присъствието на ензим пероксидаза от хрян (HRP) произвежда кафява утайка, която е неразтворима в органични разтворители и може да бъде покрита с постоянна среда за монтиране. Този продукт се предлага в двукомпонентна система, състояща се от течен стабилен DAB хромоген и DAB субстратен буфер. Цветът на хромогенната буферна смес може да варира от безцветен до бледокафяв. Свойствата на оцветяване не се влияят от цвета на хромогенната буферна смес. Betazoid DAB е формула, която е много стабилна. Betazoid DAB може да се използва както ръчно, така и на автоматични оцветители.

## Принцип на процедурата:

Този DAB хромоген в Betazoid DAB Chromogen Kit, когато се използва при ИХС тестване на FFPE тъканни срезове, позволява визуализация на антигени чрез последователно прилагане на специфично антитяло към антигена (първично антитяло), вторично антитяло към първичното антитяло (по избор свързващо антитяло/сонда), ензимен комплекс и хромогенен субстрат с въмъкнати стъпки на промиване. Ензимното активиране на хромогена води до видим реакционен продукт на мястото на антигена. След това образецът може да бъде насрещно оцветен и покрит с покривно стъкло. Резултатите се интерпретират с помощта на светлина микроскоп и помъщи при диференциалната диагноза на патофизиологични процеси, които могат или може да не са свързани с определен антиген.

## Материали и методи:

### Осигурени реагенти:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Разтваряне, смесване, разреждане, титруване:

Betazoid DAB Chromogen Kit е оптимизиран за използване с антитела на Biocare и спомагателни реагенти и трябва да се разрежда точно преди употреба. Смесете 1 капка (32 µL) DAB Chromogen на 1,0 mL DAB субстратен буфер. Работният разтвор на DAB е стабилен в продължение на 5 дни, ако се съхранява при 2-8°C.

## Известни приложения:

Имунохистохимия (фиксирани във формалин тъкани, вградени в парафин)

## Доставя се като:

*Betazoid DAB Chromogen*

DAB решение. Вижте Информационния лист за безопасност за допълнителни подробности.

## *Betazoid DAB субстратен буфер*

Буферираният разтвор съдържа 3% разтвор на водороден пероксид. Вижте Информационния лист за безопасност за допълнителни подробности.

## Необходими, но неосигуриeni материали и реагенти:

Предметни стъклa за микроскоп, положително заредени

Положителни и отрицателни тъканни контроли

Пустинна камера\* или подобна сушилня (по избор)

Ксилен или заместител на ксилен

Етанол или реактив алкохол

Камера за разкриване\* или подобна тенджера под налягане (по избор)

Дейонизирана или дестилирана вода

Измиващ буфер\*

Реагент за предварителна обработка\* (по избор)

Ензимно смилане\* (по избор)

Пероксидазен блок\*

Протеинов блок\* (по избор)

Първично антитяло\*

Реактиви за отрицателна контрола\*

Комплекти за откриване\*

Хематоксилин\* (контраоцветяване)

Посиняване реагент\*

Монтажна среда\*

Покривно стъкло

Светлинен микроскоп (40-400 пъти увеличение)

\* Медицински продукти на Biocare: Вижте уебсайта на Biocare Medical, намиращ се на адрес <http://biocare.net> за информация относно каталогните номера и поръчка. Определени реагенти, изброени по-горе, се основават на конкретно приложение и използвана система за откриване.

## Съхранение и стабилност:

Съхранявайте при 2°C до 8°C. Продуктът е стабилен до срока на годност, отпечатан върху етикета на флакона, когато се съхранява при тези условия. Да не се използва след изтичане на срока на годност. Съхранението при условия, различни от посочените, трябва да бъде проверено. Разредените реагенти трябва да се използват незабавно според инструкциите. Неизползваният разреден реагент е стабилен в продължение на 5 дни, ако се съхранява при 2-8°C. Стабилността на разредения от потребителя реагент след 5 дни не е установена от Biocare.

Положителните и отрицателните контроли трябва да се провеждат едновременно с всички пробы от пациенти. Ако се наблюдава

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Bulgarian

неочаквано оцветяване, което не може да се обясни с вариации в лабораторните процедури и се подозира проблем с антитялото, свържете се с техническата поддръжка на Biocare на 1-800-542-2002 или чрез информацията за техническа поддръжка, предоставена на biocare.net.

## Подготовка на пробата:

Тъканчетата, фиксирали във формалин, са подходящи за използване преди вграждане в парафин. Костните тъкани трябва да бъдат декалцифицирани преди обработката на тъканите, за да се улесни разрязването на тъканите и да се предотврати повреда на острите на микротома.<sup>1,2</sup>

Правилно фиксирали и вградени тъкани, експресиращи определената антигенна цел, трябва да се съхраняват на хладно място. Законът за подобряване на клиничната лаборатория (CLIA) от 1988 г. изисква в 42 CFR§493.1259(b), че „Лабораторията трябва да съхранява оцветени слайдове най-малко десет години от датата на изследване и съхранявайте блоковете с преби най-малко две години от датата на изследването.”<sup>3</sup>

## Третиране на тъкани преди оцветяване:

Извършете индуцирано от топлина извлечение на епитоп (HIER) съгласно препоръчания протокол по-долу. Доказано е, че рутинното използване на HIER преди ИНС минимизира несъответствието и стандартизира оцветяването.<sup>4,5</sup>

## Предупреждение и предпазни мерки:

1. Известно е, че DAB е предполагаем канцероген.
2. Не излагайте DAB компонентите на силна светлина или пряка слънчева светлина
3. DAB може да причини сенсибилизация на кожата. Избягвайте контакт с кожата и очите.
4. Носете ръкавици и защитно облекло и вземете разумни предпазни мерки при работа, тъй като DAB е класифициран като опасен и може да причини рак и се предполага, че причинява генетични дефекти.
5. Работете с материали от човешки или животински произход като потенциално биологично опасни и изхвърляйте такива материали с подходящи предпазни мерки. В случай на излагане, следвайте здравните директиви на отговорните органи, където се използва.<sup>6,7</sup>
6. Пробите, преди и след фиксиране, и всички материали, изложени на тях, трябва да се третират като способни да предадат инфекция и да се изхвърлят с подходящи предпазни мерки. Никога не пипетирайте реагенти с уста и избягвайте контакт на кожата и лигавиците с реагентите и пробите. Ако реактиви или преби влязат в контакт с чувствителни зони, измийте ги с обилно количество вода.<sup>8</sup>
7. Микробното замърсяване на реагентите може да доведе до увеличаване на неспецифичното оцветяване.
8. Инкубационни времена или температури, различни от посочените, могат да дадат грешни резултати. Потребителят трябва да потвърди всяка такава промяна.
9. Не използвайте реагент след срока на годност, отпечатан върху флакона.
10. Реагентът(ите) на комплекта за откриване на микрополимери са оптимизирани и готови за използване с антителата на Biocare и спомагателните реагенти. Обърнете се към инструкциите за първично антитяло и други спомагателни реагенти за употреба за препоръчителните протоколи и условия за употреба.
11. Следвайте изискванията на местните и/или държавните органи за метода на изхвърляне.
12. ИЛБ е достъпен при поискване и се намира на <http://biocare.net>.
13. Докладвате за всякакви сериозни инциденти, свързани с това устройство, като се свържете с местния представител на Biocare и съответния компетентен орган на държавата членка или държавата, в която се намира потребителят.

**BIOCARE**  
MEDICAL

Този хромогенен комплект съдържа компоненти, класифицирани както е посочено в таблицата по-долу в съответствие с Регламент (ЕО) № 1272/2008

Опасност	Код	Изявление за опасност
	H314 H350	Предполага се, че причинява генетични дефекти. Може да причини рак

## Инструкции за употреба:

Реагентите на хромогенния комплект са оптимизирани за използване с антитела на Biocare и спомагателни реагенти. Обърнете се към инструкциите за първично антитяло и други спомагателни реагенти за употреба за препоръчителните протоколи и условия за употреба. Времената и температурите на инкубация ще вариират в зависимост от следвания специфичен протокол за антитела.

Когато използвате автоматизиран инструмент за оцветяване, консултирайте се с конкретното ръководство за оператора на инструмента и инструкциите за употреба за работните параметри.

## Общи процедурни стъпки за извършване на ИНС:

1. Депарафинизиране: Депарафинизирайте предметните стъклца в Slide Brite или ксилен. Хидратът се плъзга в серия градирани алкоходи до вода.
2. Блокиране на пероксид: Блокирайте за 5 минути с Peroxidized 1.
3. Раствор/протокол за предварително третиране: Моля, вижте съответния лист с данни за първично антитяло за препоръчен разтвор и протокол за предварително третиране.
4. Протеинов блок (по избор): Инкубирайте за 5-10 минути при стайна температура (RT) с Background Punisher.
5. Първично антитяло: Моля, вижте съответния лист с данни за първично антитяло за времето на инкубация.
6. Сонда (само миши антитела): Инкубирайте за 5-15 минути при RT с MACH 4 Mouse Probe.
7. Полимер: Инкубирайте за 10-20 минути за миши антитела или 30 минути за заешки антитела при стайна температура с MACH 4 HRP полимер.
8. Хромоген: Инкубирайте за 5 минути при RT с DAB на Biocare.
9. Контраоцветяване: Контраоцветяване с хематоксилин. Изплакнете с дейонизирана вода. Нанесете Tacha's Bluing Solution за 1 минута. Изплакнете с дейонизирана вода.

## Технически бележки:

1. Използвайте TBS за стъпките на измиване.

## Контрол на качеството:

Обърнете се към стандартите за качество на CLSI за проектиране и прилагане на имунохистохимични анализи; Одобрено ръководство – второ издание (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA САЩ ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011 г.

## Положителен тъканен контрол:

Материалите за външна положителна контрола трябва да бъдат пресни преби, фиксирали, обработени и вградени възможно най-скоро по същия начин като пробата(ите) на пациента. Положителните тъкани контроли са показателни за правилно подгответи тъкани и подходящи техники за оцветяване. Във всеки цикъл на оцветяване трябва да се включи една положителна външна тъканна контрола за всеки набор от условия на теста.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Bulgarian

**BIOCARE**  
MEDICAL

Тъканите, използвани за материалите за външна положителна контрола, трябва да бъдат избрани от пробы от пациенти с добре охарактеризирани ниски нива на положителна целева активност, която дава слабо положително оцветяване. Ниското ниво на положителност за външни положителни контроли е проектирано така, че да осигури откриване на фини промени в чувствителността на първичното антитяло от нестабилност или проблеми с ИHC методологията. Предлаганите в търговската мрежа предметни стъклца за контрол на тъкани или преби, обработени по различен начин от пробата(ите) на пациента, валидират само ефективността на реагента и не проверяват подготовката на тъканите.

Известни положителни тъканни контроли трябва да се използват само за наблюдение на правилната работа на обработените тъкани и тестови реагенти, а не като помош при формулиране на конкретна диагноза на преби от пациенти. Ако положителните тъканни контроли не успят да покажат положително оцветяване, резултатите с тестовите преби трябва да се считат за невалидни.

#### Отрицателен тъканен контрол:

Използвайте отрицателна тъканна контрола, фиксирана, обработена и вградена по начин, идентичен с пробата(ите) на пациента при всяко оцветяване, за да проверите специфичността на ИHC първичното антитяло за демонстрация на целевия антиген и за предоставяне на индикация за специфично фоново оцветяване (фалшиво положително оцветяване). Освен това разнообразието от различни видове клетки, присъстващи в повечето тъканни срезове, може да бъдат използвани от лабораторията като вътрешни отрицателни контролни места за проверка на работата на ИHC спецификации. Типовете и източниците на преби, които могат да се използват за отрицателна тъкан контролите са изброени в раздела Характеристики на ефективността.

Ако се появи специфично оцветяване (фалшиво положително оцветяване) в отрицателната тъканна контрола, резултатите от пребите на пациента трябва да се считат за невалидни.

#### Неспецифичен отрицателен контролен реагент:

Използвайте неспецифична отрицателна контрола на реагента на мястото на първичното антитяло със секция от всяка преба от пациент, за да оцените неспецифичното оцветяване и позволяват по-добра интерпретация на специфичното оцветяване на антигенното място. В идеалния случай отрицателната реактивна контрола съдържа произведено и приготвено антитяло (т.е. разредено до същата концентрация с помощта на същия разредител) за използване по същия начин като първичното антитяло, но не проявява специфична реактивност с човешки тъкани в същата матрица/разтвор като първично антитяло. Само разредител може да се използва като по-малко желана алтернатива на описаните по-горе отрицателни реактивни контроли. Инкубационният период за отрицателната реактивна контрола трябва да съответства на този на първичното антитяло.

Когато се използват панели от няколко антитела върху серийни срезове, зоните с отрицателно оцветяване на един слайд могат да служат като отрицателна/неспецифична свързвща фонова контрола за други антитела. За разграничаване на ендогенна ензимна активност или неспецифично свързване на ензими от специфична имуноактивност, допълнителни тъкани на пациента могат да бъдат оцветени изключително със субстрат-хромоген или ензимни комплекси (PAP, avidin-биотин, стрептавидин) и съответно субстрат-хромоген.

#### Проверка на анализа:

Преди първоначалното използване на антитяло или система за оцветяване в диагностична процедура, потребителят трябва да провери специфичността на антитялото, като го тества върху поредица от

вътрешни тъкани с известни имунохистохимични характеристики, представляващи известни положителни и отрицателни тъкани. Обърнете се към процедурите за контрол на качеството, посочени по-рано в този раздел на листовката на продукта, и към препоръките за контрол на качеството на програмата за сертифициране на CAP<sup>10</sup> за имунохистохимия и/или насоките за IHC на NCCLS<sup>11</sup>. Тези процедури за контрол на качеството трябва да се повтарят за всяка нова партида антитяло или винаги, когато има промяна в параметрите на анализа. Тъканите, изброени в раздела Характеристики на ефективността, са подходящи за проверка на анализа.

#### **Отстраняване на неизправности:**

Следвайте препоръките за специфичен протокол за антитела съгласно предоставения лист с данни. Ако възникнат нетипични резултати, свържете се с техническата поддръжка на Biocare на 1-800-542-2002.

#### **Тълкуване на оцветяването:**

Betazoid DAB Chromogen Kit предизвиква кафява цветна реакция на антигенните места, локализирани от първичното антитяло. Преди тълкуване на резултатите от пациента, оцветяването на контролите трябва да бъде оценено от квалифициран патолог. Отрицателните контроли се оценяват и сравняват с оцветени слайдове, за да се гарантира, че всяко наблюдавано оцветяване не е резултат от неспецифични взаимодействия.

#### Положителен тъканен контрол:

Положителната тъканна контрола, оцветена с посоченото антитяло, трябва първо да се изследва, за да се установи, че всички реагенти функционират правилно. Подходящото оцветяване на прицелните клетки (като е посочено по-горе) е показателно за положителна реактивност. Ако положителните тъканни контроли не успят да покажат положително оцветяване, всички резултати с тестовите преби трябва да се считат за невалидни.

Цветът на реакционния продукт може да варира в зависимост от използваните субстратни хромогени. Вижте листовките на опаковката на субстрата за очакваните цветни реакции. Освен това метахромазията може да се наблюдава при вариации на метода на оцветяване.<sup>12</sup> Когато се използва противооцветяване, в зависимост от продължителността на инкубацията и ефикасността на използваното противооцветяване, противооцветяването ще доведе до оцветяване на клетъчните ядра. Прекомерното или непълно контрастно оцветяване може да компрометира правилното тълкуване на резултатите. Обърнете се към протокола(ите) за препоръчаното контро-оцветяване.

#### Отрицателен тъканен контрол:

Отрицателната тъканна контрола трябва да се изследва след положителната тъканна контрола, за да се провери специфичността на маркирането на целевия антиген от първичното антитяло. Липсата на специфично оцветяване в отрицателната тъканна контрола потвърждава липсата на кръстосана реактивност на антитела към клетки/клетъчни компоненти. Ако се появи специфично оцветяване (фалшиво положително оцветяване) в отрицателната външна тъканна контрола, резултатите от пребата от пациента трябва да се считат за невалидни.

Неспецифично оцветяване, ако е налице, обикновено има дифузен вид. Спорадично оцветяване на съединителната тъкан може да се наблюдава и в срезове от прекомерно фиксирани с формалин тъкани. Използвайте непокътнати клетки за тълкуване на резултатите от оцветяването. Некротичните или дегенерирали клетки често се оцветяват неспецифично.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

7/18



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Bulgarian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Тъкан на пациента:

Изследвайте пробы от пациенти, оцветени с посоченото антитяло последно. Положителният интензитет на оцветяване трябва да се оценява в контекста на всяко неспецифично фоново оцветяване на отрицателната контрола с реагент. Както при всеки имуноистохимичен тест, отрицателният резултат означава, че антигенът не е открит, а не че антигенът липсва в изследваните клетки/тъкан. Ако е необходимо, използвайте панел от антитела за идентифициране на фалшиво-отрицателни реакции.

Обърнете се към Резюме и обяснение, ограничения и характеристики на ефективността за конкретна информация относно посочената имунореактивност на антитела.

## Ограничения:

### Общи ограничения:

- Заинвирто диагностична (IVD) употреба
- Този продукт е само за професионална употреба: Имуноистохимията е многоетапен диагностичен процес, който се състои от специализирано обучение за избор на подходящи реагенти; подбор, фиксиране и обработка на тъкани; подготовка на ИИС слайд; и интерпретация на резултатите от оцветяването.
- За употреба само по лекарско предписание. (Само Rx)
- Оцветяването на тъкана зависи от обработката и обработката на тъкана преди оцветяването. Неправилното фиксиране, замразяване, разразяване, измиване, сушене, нагряване, нарязване или замърсяване с други тъкани или течности може да доведе до артефакти, улавяне на антитела или фалшиво отрицателни резултати. Непоследователните резултати може да се дължат на вариации в методите за фиксиране и вграждане или на присъщи нередности в тъкантата.<sup>14</sup>
- Прекомерното или непълно контрастно оцветяване може да компрометира правилното тълкуване на резултатите.
- Клиничната интерпретация на всяко положително или отрицателно оцветяване трябва да се оценява в контекста на клиничното представяне, морфологията и други хистопатологични критерии. Клиничната интерпретация на всяко положително или отрицателно оцветяване трябва да бъде допълнена от морфологични изследвания, като се използват подходящи положителни и отрицателни вътрешни и външни контроли, както и други диагностични тестове. Отговорност на квалифициран патолог, който е запознат с правилното използване на ИИС антитела, реагенти и методи, е да интерпретира всички стъпки, използвани за подготовка и тълкуване на крайния ИИС препарат.
- Оптималните протоколи за конкретно приложение могат да варират. Те включват, но не се ограничават до фиксация, метод за извлечение на топлина, времена на инкубация, разреждане на антитяло, дебелина на тъкания участък и използван комплект за откриване. Обърнете се към инструкциите за първично антитяло и други спомагателни реагенти за употреба за препоръчителните протоколи и условия за употреба. Препоръките и протоколите в информационния лист се основават на изключителното използване на продуктите Biocare. В крайна сметка отговорност на изследователя е да определи оптималните условия.
- Този продукт не е предназначен за използване в поточна цитометрия. Характеристиките на ефективността не са определени за поточна цитометрия.
- Тъкани от хора, заразени с вируса на хепатит В и съдържащи повърхностен антиген на хепатит В (HBsAg), могат да проявят неспецифично оцветяване с пероксидаза от хрян.<sup>14</sup>
- Реагентите могат да покажат неочеквани реакции в нетествани преди това тъкани. Възможността за неочеквани реакции дори в тестови тъканни групи не може да бъде напълно елиминирана поради биологичната вариабилност на експресията на антиген в

неоплазми или други патологични тъкани.<sup>15</sup> Свържете се с техническата поддръжка на Biocare на 1-800-542-2002 или чрез информациите за техническа поддръжка, предоставена на biocare.net, с документирани неочеквани реакции.

- Нормалните/неимунни серуми от същия животински източник като вторичните антисеруми, използвани в етапите на блокиране, могат да причинят фалшиво отрицателни или фалшиво положителни резултати поради автоантитела или естествени антитела.
- Могат да се наблюдават фалшиви положителни резултати поради неимунологично свързване на протеини или продукти на субстратна реакция. Те могат също да бъдат причинени от псевдопероксидазна активност (еритроцити), ендогенна пероксидазна активност (цитохром С) или ендогенен биотин (напр. черен дроб, гърди, мозък, бъбрец) в зависимост от вида на използваното имунооцветяване.<sup>13</sup>
- Отрицателен резултат означава, че антигенът не е бил открит, а не че антигенът е отсъствал в изследваните клетки или тъкан.

### Специфични за продукта ограничения:

Няма допълнителни специфични за продукта ограничения

### Характеристики на изпълнение:

Оцветяването се извършва, като се използват протоколи, предоставени в специфични инструкции за употреба на антитялото или както е посочено. Чувствителността и специфичността на оцветяването бяха оценени в редица нормални и неопластични тъканни типове, оценени по време на развитието на първични антитела.

### Възпроизводимост:

Възпроизводимостта на системите за откриване и системните реагенти на Biocare се проверява чрез измерване на международна прецизност, при което различни партиди реагенти са тествани за продължителен период от време с помощта на различни оператори, анализатори, партиди реагенти, тъканни пробы и оборудване. Оцветяването, получено за всеки оценен реагент за откриване, беше последователно и извършено според очакванията.

### Отстраняване на неизправности:

- Няма оцветяване на предметни стъклца – Проверете, за да определите, че са използвани подходящи тъкани за положителна контрола, антитела и продукти за откриване. Проверете за непълно или неправилно отстраняване или предварителна обработка.
- Слабо оцветяване на всички предметни стъклца – Проверете, за да определите, че са използвани подходящи тъкани за положителна контрола, антитела и продукти за откриване.
- Прекален фон на всички предметни стъклца – Възможно е да има високи нива на ендогенен биотин (ако се използват продукти за откриване на базата на биотин), ендогенна HRP активност, превръщаща хромогена в оцветен краен продукт (използвайте пероксидазен блок) или прекомерно неспецифично протеиново взаимодействие (използвайте протеин блок, като блокиращ разтвор на базата на серум или казеин).
- Тъканните срезове се измиват от предметните стъклца по време на инкубацията – Проверете предметните стъклца, за да се уверите, че са положително заредени.
- Специфично оцветяване е търде тъмно – Проверете протокола, за да определите дали към предметното стъкло е приложен правилен титър на антитела, както и правилните времена на инкубация за всички реагенти. Освен това се уверете, че протоколът има достатъчно стъпки на промиване, за да се отстранят излишните реагенти след приключване на стъпките на инкубация.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

8/18



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Bulgarian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Препратки:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. AmJ Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Chinese (Simplified)

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## 有可能的使用：

为了体外诊断用途

这 Betazoid DAB 显色剂试剂盒与适当的检测系统和一抗结合使用时，适用于手动或自动免疫组织化学 (IHC) 染色方案，用于检测福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织中的靶抗原。对任何染色或染色缺失的临床解释应辅以形态学研究和适当的对照，并应在患者的临床病史和由合格病理学家进行的其他诊断测试的背景下进行评估。

## 总结与说明：

3,3' 二氨基联苯胺 (DAB) 是一种成熟的显色剂，用于 IHC 染色方案，在辣根过氧化物酶 (HRP) 存在的情况下，会产生不溶于有机溶剂的棕色沉淀物，并且可以用永久封固剂盖上盖玻片。该产品采用双组分系统，由液体稳定的 DAB 显色剂和 DAB 底物缓冲液组成。显色剂缓冲液混合物的颜色可能从无色到浅棕色不等。染色特性不受显色剂缓冲混合物颜色的影响。Betazoid DAB 是一种非常稳定的制剂。Betazoid DAB 既可以手动使用，也可以在自动染色机上使用。

## 程序原则：

Betazoid DAB 显色剂试剂盒中的这种 DAB 显色剂在用于 FFPE 组织切片的 IHC 测试时，可以通过连续应用 抗原的特异性抗体（一抗）、一抗的二抗（可选连接抗体/探针）、酶复合物和显色底物以及插入的洗涤步骤。色原的酶促激活导致在抗原位点产生可见的反应产物。然后可以对样本进行复染并盖上盖玻片。使用光解释结果 显微镜并有助于病理生理过程的鉴别诊断，这可能或 可能与特定抗原无关。

## 材料和方法：

### 提供的试剂：

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## 重构、混合、稀释、滴定：

Betazoid DAB 显色剂试剂盒经过优化，可与 Biocare 抗体和辅助试剂一起使用，并且必须在使用前稀释。每 1.0mL DAB 底物缓冲液混合 1 滴 (32μL) DAB 显色剂。如果储存在 2-8°C，DAB 工作溶液可稳定 5 天。

## 已知应用：

免疫组织化学 (福尔马林固定石蜡包埋组织)

## 提供方式：

### Betazoid DAB 显色剂

DAB 溶液。有关更多详细信息，请参阅安全数据表。

### Betazoid DAB 底物缓冲液

缓冲溶液含有 3% 的过氧化氢溶液。有关更多详细信息，请参阅安全数据表。

## 需要但未提供的材料和试剂：

显微镜载玻片，带正电

阳性和平阴性组织对照

Desert Chamber\* 或类似干燥箱 (可选)

二甲苯或二甲苯替代品

乙醇或试剂醇

解密室\*或类似压力锅 (可选)

去离子水或蒸馏水

洗涤缓冲液\*

预处理试剂\* (可选)

酶消化\* (可选)

过氧化物酶阻断\*

蛋白质块\* (可选)

一抗\*

阴性对照试剂\*

检测套件\*

苏木精\* (复染)

上蓝试剂\*

封固剂\*

盖玻片

光学显微镜 (40-400X 放大倍率)

\* Biocare 医疗产品：有关目录号和订购的信息，请参阅 Biocare Medical 网站 <http://biocare.net>。上面列出的某些试剂基于具体应用和所使用的检测系统。

## 储存和稳定性：

储存于 2°C 至 8°C。在这些条件下储存时，该产品在小瓶标签上印刷的有效期内是稳定的。请勿在有效期后使用。必须验证在指定条件以外的任何条件下的储存。稀释后的试剂应按照说明立即使用。如果储存在 2-8°C，未使用的稀释试剂可稳定保存 5 天。Biocare 尚未确定用户稀释试剂超过 5 天的稳定性。

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Chinese (Simplified)

**BIOCARE**  
M E D I C A L

阳性和阴性对照应与所有患者标本同时进行。如果观察到意外染色，且无法通过实验室程序的变化来解释，并且怀疑抗体存在问题，请致电 1-800-542-2002 或通过 biocare.net 上提供的技术支持信息联系 Biocare 的技术支持。

## 样品制备：

用福尔马林固定的组织适合在石蜡包埋之前使用。在组织处理之前应将骨组织脱钙，以利于组织切割并防止损坏切片机刀片。<sup>1,2</sup>

正确固定和包埋表达特定抗原靶标的组织应保存在阴凉处。1988 年临床实验室改进法案 (CLIA) 要求 42 CFR§493.1259(b) 规定“实验室必须保留染色载玻片自染色之日起至少十年”检查并保留样本块自检查之日起至少两年。<sup>3</sup>

## 染色前组织的处理：

根据下面推荐的方案执行热诱导表位修复 (HIER)。在 IHC 之前常规使用 HIER 已被证明可以最大限度地减少不一致并使染色标准化。<sup>4,5</sup>

## 警告和注意事项：

1. DAB 被认为是一种可疑的致癌物质。
2. 请勿将 DAB 组件暴露在强光或阳光直射的地方。
3. DAB 可能引起皮肤过敏。避免与皮肤和眼睛接触。
4. 处理时请戴上手套和穿防护服，并采取合理的预防措施，因为 DAB 被归类为危险物质，可能导致癌症，并怀疑会导致遗传缺陷。
5. 将人类或动物来源的材料视为具有潜在生物危害性，并采取适当的预防措施处置此类材料。如果发生接触，请遵循使用场所主管部门的健康指示。<sup>6,7</sup>
6. 固定前后的标本以及所有暴露于其中的材料均应按照能够传播感染的方式进行处理，并采取适当的预防措施进行处置。切勿用嘴吸取试剂，并避免试剂和标本接触皮肤和粘膜。如果试剂或标本接触到敏感区域，请用大量水清洗。<sup>8</sup>
7. 试剂的微生物污染可能导致非特异性染色增加。
8. 未指定的孵育时间或温度可能会产生错误的结果。用户必须验证任何此类更改。
9. 试剂瓶上印有有效期后请勿使用。
10. 微聚合物检测试剂盒试剂经过优化，可与 Biocare 抗体和辅助试剂一起使用。有关推荐的使用方案和使用条件，请参阅一抗和其他辅助试剂的使用说明。
11. 遵循当地和/或国家当局对处置方法的要求。
12. SDS 可根据要求提供，位于 <http://biocare.net>。
13. 通过联系当地 Biocare 代表以及用户所在成员国或国家的适用主管当局，报告与此设备相关的任何严重事件。

该显色剂套件包含根据法规 (EC) 第 1272/2008 号分类如下表所示的组件

冒险	代码	危险声明
	H314 H350	疑似造成基因缺陷 可能致癌

## 使用说明：

显色剂试剂盒经过优化，可与 Biocare 抗体和辅助试剂一起使用。有关推荐的使用方案和使用条件，请参阅一抗和其他辅助试剂的使用说明。孵育时间和温度将根据所遵循的特定抗体方案而变化。

使用自动染色仪器时，请参阅特定仪器操作手册和操作参数使用说明。

## 执行 IHC 的一般程序步骤：

1. 脱蜡：在 Slide Brite 或二甲苯中对载玻片进行脱蜡。水合物在一系列梯度醇中滑变成水。
2. 过氧化物封闭：用过氧化物 1 封闭 5 分钟。
3. 预处理溶液/方案：推荐的预处理溶液和方案请参阅相应的一抗数据表。
4. 蛋白质块（可选）：使用背景惩罚器在室温 (RT) 下孵育 5-10 分钟。
5. 一抗：孵育时间请参阅相应一抗数据表。
6. 探针（仅限小鼠抗体）：使用 MACH 4 小鼠探针在室温下孵育 5-15 分钟。
7. 聚合物：使用 MACH 4 HRP 聚合物在室温下孵育小鼠抗体 10-20 分钟或兔抗体 30 分钟。
8. 显色剂：使用 Biocare 的 DAB 在室温下孵育 5 分钟。
9. 复染：用苏木精复染。用去离子水冲洗。使用 Tacha 的蓝化溶液 1 分钟。用去离子水冲洗。

## 技术说明：

1. 使用 TBS 进行洗涤步骤。

## 质量控制：

请参阅 CLSI 免疫组织化学检测设计和实施的质量标准；批准指南 - 第二版 (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org))。2011 年。

## 阳性组织对照：

外部阳性对照材料应为新鲜标本，尽快以与患者样本相同的方式固定、处理和包埋。阳性组织对照表明正确制备的组织和正确的染色技术。每次染色运行中应包括每组测试条件的一个阳性外部组织对照。

用于外部阳性对照材料的组织应选自具有良好特征的低水平阳性靶标活性的患者标本，该活性呈弱阳性染色。外部阳性对照的低阳性水平旨在确保检测由于 IHC 方法不稳定或问题而导致的一抗敏感性的细微变化。市售的组织对照载玻片或与患者样本不同处理的样本仅验证试剂性能，并不验证组织制备。

已知的阳性组织对照只能用于监测处理过的组织和测试试剂的正确性能，而不是帮助制定患者样本的具体诊断。如果阳性组织对照未能表现出阳性染色，则测试样本的结果应被视为无效。

## 阴性组织对照：

每次染色时，使用与患者样本相同的方式固定、处理和包埋的阴性组织对照，以验证 IHC 一抗的特异性 展示目标抗原，并提供特定背景染色的指示（假阳性染色）。此外，大多数组织切片中存在多种不同的细胞类型，可以 被实

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Chinese (Simplified)

**BIOCARE**  
M E D I C A L

验室人员用作内部阴性对照位点以验证 IHC 的性能 规格。可用于阴性组织的标本类型和来源 控制措施列于“性能特征”部分。

如果阴性组织对照中出现特异性染色（假阳性染色），则患者标本的结果应被视为无效。

## 非特异性阴性试剂对照：

使用非特异性阴性试剂对照代替一抗，并使用每个患者标本的切片来评估非特异性染色。

可以更好地解释抗原位点的特异性染色。理想情况下，阴性试剂对照包含产生和制备的抗体（即使用相同的稀释剂稀释至相同的浓度），其使用方式与一抗相同，但在与一抗相同的基质/溶液中与人体组织不表现出特异性反应性。一抗。单独的稀释剂可以用作先前描述的阴性试剂对照的不太理想的替代品。阴性试剂对照的孵育时间应与一抗的孵育时间相对应。

当在连续切片上使用多个抗体组时，一张载玻片的阴性染色区域可以用作其他抗体的阴性/非特异性结合背景对照。为了区分内源性酶活性或酶的非特异性结合与特异性免疫反应性，可以分别用底物-色原或酶复合物（PAP、亲和素-生物素、链霉亲和素）和底物-色原专门对其他患者组织进行染色。

## 测定验证：

在诊断程序中首次使用抗体或染色系统之前，用户应通过在一系列具有代表已知阳性和阴性组织的已知免疫组织化学性能特征的内部组织上进行测试来验证抗体的特异性。请参阅产品说明书本节中先前概述的质量控制程序以及 CAP 认证计划的质量控制建议<sup>10</sup> 用于免疫组织化学和/或 NCCLS IHC 指南<sup>11</sup>。对于每个新抗体批次，或每当测定参数发生变化时，都应重复这些质量控制程序。性能特征部分列出的组织适合用于测定验证。

## 故障排除：

根据提供的数据表，遵循抗体特定方案建议。如果出现非典型结果，请致电 1-800-542-2002 联系 Biocare 的技术支持。

## 染色解读：

Betazoid DAB 显色剂试剂盒在一抗定位的抗原位点产生棕色反应。在解释患者结果之前，对照的染色必须由合格的病理学家进行评估。对阴性对照进行评估并与染色玻片进行比较，以确保观察到的任何染色不是非特异性相互作用的结果。

## 阳性组织对照：

应首先检查用指定抗体染色的阳性组织对照，以确定所有试剂均正常工作。靶细胞的适当染色（如上所述）表明呈阳性反应。如果阳性组织对照未能表现出阳性染色，则测试样本的任何结果均应被视为无效。

反应产物的颜色可能会根据所使用的底物发色团而变化。有关预期的颜色反应，请参阅基材包装插页。此外，在染色方法的变化中可以观察到异染。<sup>12</sup>

当使用复染剂时，根据孵育长度和所用复染剂的效力，复染将导致细胞核着色。过度或不完整的复染可能会影响结果的正确解释。请参阅建议的复染方案。

## 阴性组织对照：

应在阳性组织对照后检查阴性组织对照，以验证一抗标记靶抗原的特异性。阴性组织对照中缺乏特异性染色证实了抗体与细胞/细胞成分不存在交叉反应性。如果在阴性外部组织对照中出现特异性染色（假阳性染色），则患者标本的结果应被视为无效。

非特异性染色（如果存在）通常呈弥漫性外观。在过度福尔马林固定的组织切片中也可以观察到结缔组织的零星染色。使用完整的细胞来解释染色结果。坏死或退化的细胞通常会出现非特异性染色。

## 患者组织：

检查用指定抗体染色的患者标本 最后的。阳性染色强度应在阴性试剂对照的任何非特异性背景染色的背景下进行评估。与任何免疫组织化学测试一样，阴性结果意味着未检测到抗原，而不是所检测的细胞/组织中不存在抗原。如有必要，使用一组抗体来识别假阴性反应。

有关指定抗体免疫反应性的具体信息，请参阅摘要和解释、限制和性能特征。

## 限制：

### 一般限制：

1. 为了体外诊断 (IVD) 使用
2. 该产品仅供专业用途：免疫组织化学是一个多步骤的诊断过程，包括选择适当试剂的专门培训；组织选择、固定和处理；IHC 载玻片的制备；以及染色结果的解释。
3. 仅供医生处方使用。（仅限接收）
4. 组织染色取决于染色前组织的处理和处理。不正确的固定、冷冻、解冻、清洗、干燥、加热、切片或被其他组织或液体污染可能会产生伪影、抗体捕获或假阴性结果。结果不一致可能是由于固定和嵌入方法的变化，或组织内固有的不规则性。<sup>14</sup>
5. 过度或不完整的复染可能会影响结果的正确解释。
6. 任何阳性或阴性染色的临床解释应在临床表现、形态学和其他组织病理学标准的背景下进行评估。任何阳性或阴性染色的临床解释均应通过使用适当的阳性内部和外部对照以及其他诊断测试的形态学研究来补充。熟悉 IHC 抗体、试剂和方法的合格病理学家有责任解释用于准备和解释最终 IHC 制剂的所有步骤。
7. 针对特定应用的最佳协议可能会有所不同。这些包括但不限于固定、热回收方法、孵育时间、抗体稀释、组织切片厚度和使用的检测试剂盒。有关推荐的使用方案和使用条件，请参阅一抗和其他辅助试剂的使用说明。数据表建议和协议基于 Biocare 产品的独家使用。最终，研究者有责任确定最佳条件。
8. 本产品不适用于流式细胞术。流式细胞术的性能特征尚未确定。
9. 感染乙型肝炎病毒并含有乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的人的组织可能会出现辣根过氧化物酶的非特异性染色。<sup>14</sup>
10. 试剂可能会在先前未测试的组织中表现出意想不到的反应。由于肿瘤或其他病理组织中抗原表达的生物变异性，即使在测试的组织组中也不能完全消除意外反应的可能性。<sup>15</sup> 请致电 1-800-542-2002 联系 Biocare 的

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Chinese (Simplified)

**BIOCARE**  
M E D I C A L

- 技术支持，或通过 biocare.net 上提供的技术支持信息联系，并记录意外反应。
11. 由于自身抗体或天然抗体，与封闭步骤中使用的二抗血清来自相同动物来源的正常/非免疫血清可能会导致假阴性或假阳性结果。
  12. 由于蛋白质或底物反应产物的非免疫结合，可能会出现假阳性结果。它们也可能是由假过氧化物酶活性（红细胞）、内源性过氧化物酶活性（细胞色素 C）或内源性生物素（例如肝脏、乳腺、脑、肾）引起，具体取决于所用免疫染色的类型。<sup>13</sup>
  13. 阴性结果意味着未检测到抗原，而不是所检查的细胞或组织中不存在抗原。

#### 产品特定限制：

没有额外的产品特定限制

#### 性能特点：

使用抗体特定使用说明书中提供的方案或按照指定进行染色。在一抗开发期间评估的一系列正常和肿瘤组织类型中评估了染色的敏感性和特异性。

#### 重现性：

Biocare 检测系统和系统试剂的再现性是通过中间精度测量来验证的，其中使用不同的操作员、分析人员、试剂批次、组织样本和设备对不同的试剂批次进行了长时间的测试。评估的每种检测试剂获得的染色是一致的并且按预期进行。

#### 故障排除：

1. 任何载玻片均未染色 - 检查以确定是否使用了适当的阳性对照组织、抗体和检测产品。检查除蜡或预处理是否不完全或不正确。
2. 所有载玻片的弱染色 - 检查以确定是否使用了适当的阳性对照组织、抗体和检测产品。
3. 所有载玻片的背景过多 - 可能存在高水平的内源生物素（如果使用基于生物素的检测产品）、将色原转化为有色最终产物的内源 HRP 活性（使用过氧化物酶块）或过量的非特异性蛋白质相互作用（使用蛋白质封闭液，例如基于血清或酪蛋白的封闭液）。
4. 孵化过程中组织切片会从载玻片上洗掉——检查载玻片以确保它们带正电。
5. 特异性染色太深 - 检查实验方案以确定是否对载玻片应用了正确的抗体滴度以及所有试剂的正确孵育时间。此外，确保方案有足够的清洗步骤，以在孵育步骤完成后去除多余的试剂。

#### 参考：

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.

6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

13/118



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Chinese (Traditional)

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## 有可能的使用：

為了體外診斷用途

這 Betazoid DAB 顯色劑試劑盒與適當的檢測系統和一抗結合使用時，適用於手動或自動免疫組織化學 (IHC) 染色方案，用於檢測福馬林固定石蠟包埋 (FFPE) 純化的目標抗原。任何染色或染色缺失的臨床解釋應輔以形態學研究和適當的對照，並應在患者的臨床病史和由合格病理學家進行的其他診斷測試的背景下進行評估。

## 總結與說明：

3,3' 二氨基聯苯胺 (DAB) 是一種成熟的顯色劑，用於 IHC 染色方案，在辣根過氧化物酶(HRP) 存在的情況下，會產生不溶於有機溶劑的棕色沉澱物，並且可以用永久封固劑蓋上蓋玻片。本產品採用雙組分系統，由液體穩定的 DAB 顯色劑和 DAB 底物緩衝液組成。顯色劑緩衝液混合物的顏色可能從無色到淺棕色不等。染色特性不受顯色劑緩衝混合物顏色的影響。Betazoid DAB 是一種非常穩定的製劑。Betazoid DAB 既可以手動使用，也可以在自動染色機上使用。

## 程序原則：

Betazoid DAB 顯色劑試劑盒中的這種 DAB 顯色劑在用於 FFPE 純化的組織切片的 IHC 測試時，可以透過連續應用 抗原的特異性抗體（一抗）、一抗的二抗（可選連接抗體/探針）、酵素複合物和顯色底物以及插入的洗滌步驟。色原的酵素活化導致在抗原位點產生可見的反應產物。然後可以將樣本複染並蓋上蓋玻片。使用光解釋結果 顯微鏡並有助於病理生理過程的鑑別診斷，這可能或可能與特定抗原無關。

## 材料與方法：

### 提供的試劑：

套件目錄號	元件目錄號	組件說明	數量 x 體積
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB 顯色劑	1x1.0 毫升
	DS900H	Betazoid DAB 底物緩衝液	1x25 毫升
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB 顯色劑	1x4.0 毫升
	DS900H	Betazoid DAB 底物緩衝液	4x25 毫升
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB 顯色劑	2x20 毫升
	DS900MM	Betazoid DAB 底物緩衝液	1x1 升

## 重構、混合、稀釋、滴定：

Betazoid DAB 顯色劑試劑盒經過優化，可與 Biocare 抗體和輔助試劑一起使用，並且必須在使用前稀釋。每 1.0mL DAB 底物緩衝液混合 1 滴 (32μL) DAB 顯色劑。如果儲存在 2-8°C，DAB 工作溶液可穩定 5 天。

## 已知應用：

免疫組織化學 (福馬林固定石蠟包埋組織)

## 提供方式：

*Betazoid DAB 顯色劑*

DAB 溶液。有關更多詳細信息，請參閱安全資料表。

*Betazoid DAB 底物緩衝液*

緩衝溶液含有 3% 的過氧化氫溶液。有關更多詳細信息，請參閱安全資料表。

## 需要但未提供的材料和試劑：

顯微鏡載玻片，帶正電

陽性和陰性組織對照

Desert Chamber\* 或類似乾燥箱 (選購)

二甲苯或二甲苯替代品

乙醇或試劑醇

解密室\*或類似壓力鍋 (選購)

去離子水或蒸餾水

洗滌緩衝液\*

預處理試劑\* (選購)

酵素消化\* (可選)

過氧化物酶阻斷\*

蛋白質塊\* (可選)

一抗\*

陰性對照試劑\*

檢測套件\*

蘇木精\* (複染)

上藍試劑\*

封固劑\*

蓋玻片

光學顯微鏡 (40-400X 放大倍率)

\* Biocare 醫療產品：有關目錄編號和訂購的信息，請參閱 Biocare Medical 網站 <http://biocare.net>。上面列出的某些試劑是基於具體應用和所使用的檢測系統。

## 儲存和穩定性：

儲存於 2°C 至 8°C。在這些條件下儲存時，該產品在小瓶標籤上印刷的有效期內是穩定的。請勿在有效期限後使用。必須驗證在指定條件以外的任何條件下的儲存。稀釋後的試劑應依照說明立即使用。若儲存於 2-8°C，未使用的稀釋試劑可穩定保存 5 天。Biocare 尚未確定使用者稀釋試劑超過 5 天的穩定性。

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Chinese (Traditional)

**BIOCARE**  
M E D I C A L

陽性和陰性對照應與所有患者檢體同時進行。如果觀察到意外染色，且無法透過實驗室程序的變化來解釋，並且懷疑抗體存在問題，請致電 1-800-542-2002 或透過 biocare.net 上提供的技術支援資訊聯絡 Biocare 的技術支援。

## 樣品製備：

用福馬林固定的組織適合在石蠟包埋前使用。在組織處理之前應將骨組織脫鈣，以利於組織切割並防止損壞切片機刀片。<sup>1,2</sup>

正確固定和包埋表達特定抗原標靶的組織應保存在陰涼處。 1988 年臨床實驗室改進法案 (CLIA) 要求 42 CFR§493.1259(b) 規定“實驗室必須保留染色玻片自染色之日起至少十年” 檢查並保留樣本塊自檢查之日起至少兩年。<sup>3</sup>

## 染色前組織的處理：

根據下面建議的方案執行熱誘導表位修復 (HIER)。在 IHC 之前常規使用 HIER 已被證明可以最大限度地減少不一致並使染色標準化。<sup>4,5</sup>

## 警告和注意事項：

1. DAB 被認為是一種可疑的致癌物質。
2. 請勿將 DAB 組件暴露在強光或陽光直射的地方。
3. DAB 可能引起皮膚過敏。避免與皮膚和眼睛接觸。
4. 處理時請戴上手套和穿防護服，並採取合理的預防措施，因為 DAB 被歸類為危險物質，可能導致癌症，並懷疑會導致遺傳缺陷。
5. 將人類或動物來源的材料視為具有潛在生物危害性，並採取適當的預防措施處置此類材料。如果發生接觸，請遵循使用場所主管機關的健康指示。<sup>6,7</sup>
6. 固定前後的標本以及所有暴露於其中的材料應按照能夠傳播感染的方式進行處理，並採取適當的預防措施進行處置。切勿用嘴巴吸取試劑，並避免試劑和檢體接觸皮膚和黏膜。如果試劑或檢體接觸到敏感區域，請用大量水清洗。<sup>8</sup>
7. 試劑的微生物污染可能導致非特異性染色增加。
8. 未指定的孵育時間或溫度可能會產生錯誤的結果。用戶必須驗證任何此類更改。
9. 試劑瓶上印有有效期限後請勿使用。
10. 微聚合物檢測試劑盒試劑經過優化，可與 Biocare 抗體和輔助試劑一起使用。有關建議的使用方案和使用條件，請參閱一抗和其他輔助試劑的使用說明。
11. 遵循當地和/或國家當局對處置方法的要求。
12. SDS 可依要求提供，位於 <http://biocare.net>。
13. 透過聯絡當地 Biocare 代表以及使用者所在成員國或國家的適用主管當局，報告與此設備相關的任何嚴重事件。

此顏色劑套件包含依據法規 (EC) 第 1272/2008 號分類如下表所示的組件

冒險	程式碼	危險聲明
	H314 H350	疑似造成基因缺陷 可能致癌

## 使用說明：

顏色劑試劑盒經過優化，可與 Biocare 抗體和輔助試劑一起使用。有關建議的使用方案和使用條件，請參閱一抗和其他輔助試劑的使用說明。孵育時間和溫度將根據所遵循的特定抗體方案而變化。

使用自動染色儀器時，請參閱特定儀器操作手冊和操作參數使用說明。

## 執行 IHC 的一般程序步驟：

1. 脫蠟：在 Slide Brite 或二甲苯中對玻片進行脫蠟。水合物在一系列梯度醇中滑變成水。
2. 過氧化物封閉：用過氧化物 1 封閉 5 分鐘。
3. 預處理溶液/方案：建議的預處理溶液和方案請參閱對應的一抗資料表。
4. 蛋白質塊（選購）：使用背景懲罰器在室溫 (RT) 下孵育 5-10 分鐘。
5. 一抗：孵育時間請參閱對應一抗資料表。
6. 探針（僅限小鼠抗體）：使用 MACH 4 小鼠探針在室溫下孵育 5-15 分鐘。
7. 聚合物：使用 MACH 4 HRP 聚合物在室溫下孵育小鼠抗體 10-20 分鐘或兔抗體 30 分鐘。
8. 顏色劑：使用 Biocare 的 DAB 在室溫下孵育 5 分鐘。
9. 複染：用蘇木精複染。用去離子水沖洗。使用 Tacha 的藍化溶液 1 分鐘。用去離子水沖洗。

## 技術說明：

1. 使用 TBS 進行洗滌步驟。

## 品質控制：

請參閱 CLSI 免疫組織化學檢測設計和實施的品質標準；核准指南 - 第二版 (I/LA28-A2) CLSI Wayne, 美國賓州 ([www.clsi.org](http://www.clsi.org))。 2011 年。

## 陽性組織對照：

外部陽性對照材料應為新鮮標本，盡快以與病患樣本相同的方式固定、處理和包埋。陽性組織對照顯示正確製備的組織和正確的染色技術。每次染色運行中應包括每組測試條件的一個陽性外部組織對照。

用於外部陽性對照材料的組織應選自具有良好特徵的低水平陽性標靶活性的患者標本，該活性呈弱陽性染色。外部陽性對照的低陽性水平旨在確保檢測由於 IHC 方法不穩定或問題而導致的一抗敏感性的細微變化。市售的組織對照玻片或與病人樣本不同處理的樣本僅驗證試劑性能，並不驗證組織製備。

已知的陽性組織對照只能用於監測處理過的組織和測試試劑的正確性能，而不是幫助制定患者樣本的特定診斷。如果陽性組織對照未能表現出陽性染色，則測試樣本的結果應被視為無效。

## 陰性組織對照：

每次染色時，使用與患者樣本相同的方式固定、處理和包埋的陰性組織對照，以驗證 IHC 一抗的特異性 展示目標抗原，並提供特定背景染色的指示（假陽性染色）。此外，大多數組織切片中存在多種不同的細胞類型，可以 被實

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Chinese (Traditional)

**BIOCARE**  
M E D I C A L

驗室人員用作內部陰性對照位點以驗證 IHC 的性能 規格。可用於陰性組織的標本類型和來源 控制措施列於「性能特徵」部分。

如果陰性組織對照中出現特異性染色（假陽性染色），則病患檢體的結果應視為無效。

## 非特異性陰性試劑對照：

使用非特異性陰性試劑對照代替一抗，並使用每個患者標本的切片來評估非特異性染色。

可以更好地解釋抗原位點的特異性染色。理想情況下，陰性試劑對照包含產生和製備的抗體（即使用相同的稀釋劑稀釋至相同的濃度），其使用方式與一抗相同，但在與一抗相同的基質/溶液中與人體組織不表現出特異性反應性。一抗。單獨的稀釋劑可以用作先前描述的陰性試劑對照的不太理想的替代品。陰性試劑對照的孵育時間應與一抗的孵育時間相對應。

當在連續切片上使用多個抗體組時，一張玻片的陰性染色區域可以用作其他抗體的陰性/非特異性結合背景對照。為了區分內源性酵素活性或酵素的非特異性結合與特異性免疫反應性，可以分別以底物-色原或酵素複合物（PAP、親和素-生物素、鏈黴親和素）和底物-色原專門對其他患者組織進行染色。

## 測定驗證：

在診斷程序中首次使用抗體或染色系統之前，使用者應透過在一系列具有代表已知陽性和陰性組織的已知免疫組織化學性能特徵的內部組織上進行測試來驗證抗體的特異性。請參閱產品說明書本節中先前概述的品質控製程序以及 CAP 認證計劃的品質控制建議<sup>10</sup>。用於免疫組織化學和/或 NCCLS IHC 指南<sup>11</sup>。對於每個新抗體批次，或每當測定參數發生變化時，都應重複這些品質控製程序。性能特徵部分列出的組織適合用於測定驗證。

## 故障排除：

根據提供的數據表，遵循抗體特定方案建議。如果出現非典型結果，請致電 1-800-542-2002 聯絡 Biocare 的技術支援。

## 染色解讀：

Betazoid DAB 顯色劑試劑盒在一抗定位的抗原位點產生棕色反應。在解釋患者結果之前，對照組的染色必須由合格的病理學家進行評估。對陰性對照進行評估並與染色玻片進行比較，以確保觀察到的任何染色不是非特異性交互作用的結果。

## 陽性組織對照：

應先檢查用指定抗體染色的陽性組織對照，以確定所有試劑均正常運作。標靶細胞的適當染色（如上所述）顯示呈陽性反應。如果陽性組織對照未能表現出陽性染色，則測試樣本的任何結果應視為無效。

反應產物的顏色可能會根據所使用的底物髮色團而改變。有關預期的顏色反應，請參閱基材包裝插頁。此外，在染色方法的變化中可以觀察到異染。<sup>12</sup>

當使用複染劑時，根據培養長度和所用複染劑的效力，複染將導致細胞核著色。過度或不完整的複染可能會影響結果的正確解釋。請參閱建議的複染方案。

## 陰性組織對照：

應在陽性組織對照後檢查陰性組織對照，以驗證一抗標記標靶抗原的特異性。陰性組織對照中缺乏特異性染色證實了抗體與細胞/細胞成分不存在交叉反應性。如果在陰性外部組織對照中出現特異性染色（假陽性染色），則病患檢體的結果應被視為無效。

非特異性染色（如果存在）通常呈現瀰漫性外觀。在過度福馬林固定的組織切片中也可以觀察到結締組織的零星染色。使用完整的細胞來解釋染色結果。壞死或退化的細胞通常會出現非特異性染色。

## 患者組織：

檢查用指定抗體染色的病人標本 最後的。陽性染色強度應在陰性試劑對照的任何非特異性背景染色的背景下進行評估。與任何免疫組織化學測試一樣，陰性結果意味著未檢測到抗原，而不是所檢測的細胞/組織中不存在抗原。如有必要，請使用一組抗體來識別假陰性反應。

有關指定抗體免疫反應性的具體信息，請參閱摘要和解釋、限制和性能特徵。

## 限制：

### 一般限制：

1. 為了體外診斷 (IVD) 使用
2. 本產品僅供專業用途：免疫組織化學是一個多步驟的診斷過程，包括選擇適當試劑的專門培訓；組織選擇、固定和處理；IHC 輽玻片的製備；以及染色結果的解釋。
3. 僅供醫生處方使用。（僅限接收）
4. 組織染色取決於染色前組織的處理和處理。不正確的固定、冷凍、解凍、清洗、乾燥、加熱、切片或被其他組織或液體污染可能會產生偽影、抗體捕獲或假陰性結果。結果不一致可能是由於固定和嵌入方法的變化，或組織內固有的不規則性。<sup>14</sup>
5. 過度或不完整的複染可能會影響結果的正確解釋。
6. 任何陽性或陰性染色的臨床解釋應在臨床表現、形態學和其他組織病理學標準的背景下進行評估。任何陽性或陰性染色的臨床解釋應透過使用適當的陽性和陰性內部和外部對照以及其他診斷測試的形態學研究來補充。熟悉 IHC 抗體、試劑和方法的合格病理學家有責任解釋用於準備和解釋最終 IHC 製劑的所有步驟。
7. 針對特定應用的最佳協定可能會有所不同。這些包括但不限於固定、熱回收方法、孵育時間、抗體稀釋、組織切片厚度和使用的檢測試劑盒。有關建議的使用方案和使用條件，請參閱一抗和其他輔助試劑的使用說明。數據表建議和協議基於 Biocare 產品的獨家使用。最終，研究者有責任確定最佳條件。
8. 本產品不適用於流式細胞儀。流式細胞儀的性能特徵尚未確定。
9. 感染 B 型肝炎病毒並含有乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的人的組織可能會出現辣根過氧化物酶的非特異性染色。<sup>14</sup>
10. 試劑可能會在先前未測試的組織中表現出意想不到的反應。由於腫瘤或其他病理組織中抗原表達的生物變異性，即使在測試的組織組中也不能完全消除意外反應的可能性。<sup>15</sup> 請致電 1-800-542-2002 聯繫 Biocare 的

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Chinese (Traditional)

**BIOCARE**  
M E D I C A L

- 技術支持，或透過 biocare.net 上提供的技術支援資訊聯繫，並記錄意外反應。
11. 由於自體抗體或天然抗體，與封閉步驟中使用的二抗血清來自相同動物來源的正常/非免疫血清可能會導致假陰性或假陽性結果。
  12. 由於蛋白質或底物反應產物的非免疫結合，可能會出現假陽性結果。它們也可能是由假過氧化物酶活性（紅血球）、內源性過氧化物酶活性（細胞色素 C）或內源性生物素（例如肝臟、乳腺、腦、腎）引起，這取決於所用免疫染色的類型。<sup>13</sup>
  13. 陰性結果意味著未檢測到抗原，而不是所檢查的細胞或組織中不存在抗原。

#### 產品特定限制：

沒有額外的產品特定限制

#### 性能特點：

使用抗體特定使用說明書中提供的方案或依照指定進行染色。在一抗開發期間評估的一系列正常和腫瘤組織類型中評估了染色的敏感性和特異性。

#### 重現性：

Biocare 檢測系統和系統試劑的再現性是透過中間精確度測量來驗證的，其中使用不同的操作員、分析人員、試劑批次、組織樣本和設備對不同的試劑批次進行了長時間的測試。評估的每種檢測試劑所獲得的染色是一致的並且按預期進行。

#### 故障排除：

1. 任何玻片均未染色 - 檢查以確定是否使用了適當的陽性對照組織、抗體和檢測產品。檢查除蠅或預處理是否不完全或不正確。
2. 所有玻片的弱染色 - 檢查以確定是否使用了適當的陽性對照組織、抗體和檢測產品。
3. 所有玻片的背景過多 - 可能存在高水平的內源性生物素（如果使用基於生物素的檢測產品）、將色原轉化為有色最終產物的內源性 HRP 活性（使用過氧化物酶塊）或過量的非特異性蛋白質交互作用（使用蛋白質封閉液，例如基於血清或酪蛋白的封閉液）。
4. 孵化過程中組織切片會從載玻片上掉 - 檢查載玻片以確保它們帶正電。
5. 特異性染色太深 - 檢查實驗方案以確定是否對玻片應用了一正確的抗體滴度以及所有試劑的正確孵育時間。此外，確保方案有足夠的清洗步驟，以便在孵育步驟完成後去除多餘的試劑。

#### 參考：

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.

6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Croatian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Namjena:

Zain vitro Dijagnostička upotreba

The Betazoid DAB Chromogen Kit namijenjen je za upotrebu u protokolima ručnog ili automatiziranog imunohistokemijskog (IHC) bojenja za otkrivanje ciljnih antigena u tkivima fiksiranim u formalinu, umetnutim u parafin (FFPE) kada se koristi zajedno s odgovarajućim sustavom za otkrivanje i primarnim antitijelima. Kliničko tumačenje bilo kakvog bojenja ili njegovog izostanka trebalo bi nadopuniti morfološkim studijama i odgovarajućim kontrolama te bi ga kvalificirani patolog trebao procijeniti u kontekstu kliničke povijesti pacijenta i drugih dijagnostičkih testova.

## Sažetak i objašnjenje:

3,3' Diaminobenzidin (DAB) je dobro utvrđeni kromogen koji se koristi u IHC protokolima bojenja koji u prisutnosti enzima peroksidaze hrena (HRP) proizvodi smeđi talog koji je netopljiv u organskim otapalima i može se prekriti trajnim medijem za postavljanje. Ovaj proizvod dolazi u dvokomponentnom sustavu koji se sastoji od tekućeg stabilnog DAB kromogena i DAB supstratnog pufera. Boja smjese kromogenog pufera može varirati od bezbojne do bijedo smeđe. Na svojstva bojenja ne utječe boja smjese kromogenog pufera. Betazoid DAB je formulacija koja je vrlo stabilna. Betazoid DAB može se koristiti i ručno i na automatskim bojačima.

## Princip postupka:

Ovaj DAB kromogen u kompletu Betazoid DAB Chromogen Kit, kada se koristi u IHC testiranju FFPE presjeka tkiva, omogućuje vizualizaciju antigena putem sekvenčalne primjene specifično protutijelo na antigen (primarno protutijelo), sekundarno protutijelo na primarno protutijelo (neobavezna veza protutijelo/sonda), enzimski kompleks i kromogeni supstrat s umetnutim koracima ispiranja. Enzimska aktivacija kromogena rezultira vidljivim produktom reakcije na mjestu antigena. Uzorak se zatim može obojiti i prekriti stakalcem. Rezultati se tumače pomoću svjetla mikroskop i pomoći u diferencijalnoj dijagozi patofizioloških procesa, koji mogu ili ne moraju biti povezani s određenim antigenom.

## Materijali i metode:

### Priloženi reagensi:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Rekonstitucija, miješanje, razrjeđivanje, titracija:

Betazoid DAB Chromogen Kit optimiziran je za upotrebu s Biocare antitijelima i pomoćnim reagensima i mora se razrijediti neposredno prije upotrebe. Pomiješajte 1 kap (32 µL) DAB Chromogena na 1,0 mL DAB supstratnog pufera. Radna otopina DAB stabilna je 5 dana ako se čuva na 2-8°C.

## Poznate primjene:

Imunohistokemija (tkiva fiksirana formalinom i parafinom)

## Isporučuje se kao:

Betazoid DAB kromogen

DAB rješenje. Pogledajte Sigurnosno-tehnički list za dodatne pojedinosti.

## Betazoid DAB supstratni pufer

Puferirana otopina sadrži 3% otopinu vodikovog peroksida. Pogledajte Sigurnosno-tehnički list za dodatne pojedinosti.

## Potrebni materijali i reagensi koji nisu isporučeni:

Mikroskopska stakalca, pozitivno nabijena

Pozitivne i negativne kontrole tkiva

Pustinjska komora\* ili slična pećnica za sušenje (opcionalno)

Ksilen ili zamjena za ksilen

Etilanol ili reagens alkohol

Komora za skidanje presvlake\* ili sličan ekspres lonac (opcionalno)

Deionizirana ili destilirana voda

Pufer za pranje\*

Reagensi za prethodnu obradu\* (nije obavezno)

Enzimska probava\* (nije obavezno)

Blok peroksidaze\*

Proteinski blok\* (opcionalno)

Primarno antitijelo\*

Reagensi negativne kontrole\*

Kompleti za otkrivanje\*

Hematoksilin\* (kontrabojenje)

Reagens za plavljjenje\*

Medij za montažu\*

Pokriveno staklo

Svjetlosni mikroskop (40-400X povećanje)

\* Biocare Medical Products: Za informacije o kataloškim brojevima i naručivanju pogledajte web stranicu Biocare Medical koja se nalazi na <http://biocare.net>. Određeni gore navedeni reagensi temelje se na specifičnoj primjeni i korištenom sustavu detekcije.

## Skladištenje i stabilnost:

Cuvati na temperaturi od 2°C do 8°C. Proizvod je stabilan do datuma isteka roka valjanosti otisnutog na naljepnici bočice kada se čuva pod ovim uvjetima. Ne koristiti nakon isteka roka valjanosti. Mora se provjeriti skladištenje pod bilo kojim uvjetima osim navedenih. Razrijedjene reagensne treba upotrijebiti odmah prema uputama. Neiskorišteni razrijedjeni reagens stabilan je 5 dana ako se čuva na 2-8°C. Biocare nije utvrdio stabilnost reagensa razrijedjenog korisnikom dulje od 5 dana.

Pozitivne i negativne kontrole treba provesti istovremeno sa svim uzorcima pacijenata. Ako se primijeti neočekivano bojenje koje se ne može objasniti varijacijama u laboratorijskim postupcima i ako se sumnja na problem s antitijelima, obratite se Biocarevoj tehničkoj podršci na 1-800-542-2002 ili putem informacija o tehničkoj podršci na [biocare.net](http://biocare.net).

## Priprema uzorka:

Maramice fiksirane u formalinu prikladne su za upotrebu prije ugradnje u parafin. Koštana tkiva treba dekalcificirati prije obrade tkiva kako bi se olakšalo rezanje tkiva i spriječilo oštećenje oštrica mikrotoma.<sup>1,2</sup>

Ispravno fiksirana i ugrađena tkiva koja eksprimiraju specificirani ciljni antigen trebaju biti pohranjena na hladnom mjestu. Zakon o poboljšanju kliničkog laboratorija (CLIA) iz 1988. zahtijeva u 42 CFR§493.1259(b) da „laboratorij mora čuvati obojena stakalca najmanje deset godina od datuma

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Croatian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

ispitivanje i čuvati blokove uzoraka najmanje dvije godine od datuma ispitivanja.<sup>3</sup>

## Obrada tkiva prije bojenja:

Provode topinski inducirano vraćanje epitopa (HIER) prema dolje preporučenom protokolu. Pokazalo se da rutinska uporaba HIER-a prije IHC-a smanjuje nedosljednost i standardizira bojenje.<sup>4,5</sup>

## Upozorenje i mjere opreza:

1. Poznato je da je DAB za koji se sumnja da je kancerogen.
2. Ne izlažite DAB komponente jakom svjetlu ili izravnoj sunčevoj svjetlosti
3. DAB može uzrokovati osjetljivost kože. Izbjegavajte kontakt s kožom i očima.
4. Nosite rukavice i zaštitnu odjeću i poduzmite razumne mjere opreza pri rukovanju jer je DAB klasificiran kao opasan i može uzrokovati rak te se sumnja da uzrokuje genetske defekte.
5. Rukujte materijalima ljudskog ili životinjskog podrijetla kao potencijalno biološki opasnim i odlažite takve materijale uz odgovarajuće mjere opreza. U slučaju izlaganja, slijedite zdravstvene upute nadležnih tijela gdje se upotrebljava.<sup>6,7</sup>
6. Uzorcima, prije i nakon fiksacije, i svim materijalima koji su im bili izloženi treba rukovati kao da mogu prenijeti infekciju i treba ih zbrinuti uz odgovarajuće mjere opreza. Nikada nemojte pipetirati reagens u ustima i izbjegavajte kontakt kože i sluznice s reagensima i uzorcima. Ako reagensi ili uzorci dođu u dodir s osjetljivim područjima, operite ih velikom količinom vode.<sup>8</sup>
7. Mikrotna kontaminacija reagensa može rezultirati povećanjem nespecifičnog bojenja.
8. Vremena inkubacije ili temperature koje nisu navedene mogu dati pogrešne rezultate. Korisnik mora potvrditi svaku takvu promjenu.
9. Nemojte koristiti reagens nakon isteka roka valjanosti otisnutog na bočici.
10. Reagensi kompleta za detekciju mikropolimera optimizirani su i spremni za upotrebu s Biocare antitijelima i pomoćnim reagensima. Za preporučene protokole i uvjete za upotrebu pogledajte upute za uporabu primarnog protutijela i drugih pomoćnih reagensa.
11. Slijedite zahtjeve lokalnih i/ili državnih vlasti za način zbrinjavanja.
12. STL je dostupan na zahtjev i nalazi se na <http://biocare.net>.
13. Prijavite sve ozbiljne incidente povezane s ovim uređajem kontaktiranjem lokalnog predstavnika tvrtke Biocare i odgovarajućeg nadležnog tijela države članice ili zemlje u kojoj se korisnik nalazi.

Ovaj komplet za kromogen sadrži komponente klasificirane kako je navedeno u donjoj tablici u skladu s Uredbom (EZ) br. 1272/2008.

Opasnost	Kodirati	Oznaka opasnosti
	H314 H350	Sumnja se da uzrokuje genetske defekte. Može uzrokovati rak

## Upute za korištenje:

Reagensi kompleta kromogena optimizirani su za korištenje s Biocare antitijelima i pomoćnim reagensima. Za preporučene protokole i uvjete za upotrebu pogledajte upute za uporabu primarnog protutijela i drugih pomoćnih reagensa. Vrijeme inkubacije i temperature varirat će ovisno o protokolu s određenim antitijelima.

Kada koristite automatizirani instrument za bojenje, provjerite radne parametre u posebnom priručniku za rukovanje instrumentom i uputama za uporabu.

## Opći proceduralni koraci za izvođenje IHC:

1. Deparafinizacija: Deparafinizirajte stakalca u Slide Brite ili ksilenu. Hidrat klizi u nizu stupnjevanih alkohola u vodu.
2. Peroxide Block: Blokirajte 5 minuta s Peroxidized 1.
3. Otopina/protokol za predtretman: Molimo pogledajte odgovarajući list s podacima o primarnim antitijelima za preporučenu otopinu i protokol za predtretman.
4. Proteinski blok (izborni): Inkubirajte 5-10 minuta na sobnoj temperaturi (RT) s Background Punisher.
5. Primarno protutijelo: Molimo pogledajte odgovarajući list s podacima o primarnim protutijelima za vrijeme inkubacije.
6. Sonda (samo antitijela miša): Inkubirajte 5-15 minuta na sobnoj temperaturi s MACH 4 mišjom sondom.
7. Polimer: Inkubirajte 10-20 minuta za mišja protutijela ili 30 minuta za večja protutijela na sobnoj temperaturi s MACH 4 HRP polimerom.
8. Kromogen: Inkubirajte 5 minuta na sobnoj temperaturi s Biocare DAB.
9. Kontrabojenje: Kontrabojenje hematoksilinom. Isprati deioniziranom vodom. Nanesite Tachinu Bluing otopinu na 1 minutu. Isprati deioniziranom vodom.

## Tehničke napomene:

1. Koristite TBS za korake pranja.

## Kontrola kvalitete:

Pogledajte standarde kvalitete CLSI za dizajn i provedbu imunohistokemijskih testova; Odobrene smjernice-drugo izdanje (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA SAD ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

## Pozitivna kontrola tkiva:

Materijali za vanjsku pozitivnu kontrolu trebaju biti svježi uzorci fiksirani, obradeni i ugrađeni što je prije moguće na isti način kao i uzorci pacijenata. Pozitivne kontrole tkiva indikativne su za pravilno pripremljena tkiva i pravilne tehnike bojenja. Jedna pozitivna vanjska kontrola tkiva za svaki niz uvjeta ispitivanja treba biti uključena u svako bojenje.

Tkiva koja se koriste za materijale za vanjsku pozitivnu kontrolu trebaju se odabrati iz uzoraka pacijenata s dobro karakteriziranim niskim razinama pozitivne ciljne aktivnosti koja daje slabo pozitivno bojenje. Niska razina pozitivnosti za vanjske pozitivne kontrole dizajnirana je tako da osigura otkrivanje suptilnih promjena u primarnoj osjetljivosti antitijela zbog nestabilnosti ili problema s IHC metodologijom. Komercijalno dostupna kontrolna stakalca tkiva ili uzorci obrađeni na drugaćiji način od uzorka(a) pacijenta potvrđuju samo učinkovitost reagensa, a ne potvrđuju pripremu tkiva.

Poznate pozitivne kontrole tkiva trebale bi se koristiti samo za praćenje ispravne učinkovitosti obrađenih tkiva i testnih reagensa, a ne kao pomoć u formulirajući specifične dijagnoze uzoraka pacijenata. Ako pozitivne kontrole tkiva ne pokažu pozitivno bojenje, rezultate testnih uzoraka treba smatrati nevažećima.

## Negativna kontrola tkiva:

Upotrijebite negativnu kontrolu tkiva fiksiranu, obradenu i ugrađenu na način identičan uzorcima pacijenta sa svakim bojenjem kako biste potvrdili specifičnost IHC primarnog protutijela za demonstracija ciljnog antigena i davanje indikacije specifičnog pozadinskog bojenja (lažno pozitivno bojenje). Također, raznolikost različitih tipova stanica prisutnih u većini dijelova tkiva može koristiti ih laboratorij kao mesta interne negativne kontrole za provjeru rada IHC-a tehnički podaci. Vrste i izvori uzoraka koji se mogu koristiti za negativno tkivo kontrole su navedene u odjeljku Karakteristike izvedbe.

Ako dođe do specifičnog bojenja (lažno pozitivno bojenje) u negativnoj kontroli tkiva, rezultate s uzorcima pacijenata treba smatrati nevažećima.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Croatian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Nespecifična negativna kontrola reagensa:

Upotrijebite nespecifičnu negativnu kontrolu reagensa umjesto primarnog protutijela s dijelom svakog pacijentovog uzorka za procjenu nespecifičnog bojenja i omogućuju bolje tumačenje specifičnog bojenja na mjestu antiga. U idealnom slučaju, negativna kontrola reagensa sadrži proizvedeno i pripremljeno protutijelo (tj. razrijedeno na istu koncentraciju pomoću istog razrjeđivača) za upotrebu na isti način kao primarno protutijelo, ali ne pokazuje specifičnu reaktivnost s ljudskim tkivima u istoj matrici/otopini kao i primarno antitijelo. Sam razrjeđivač može se koristiti kao manje poželjna alternativa prethodno opisanim negativnim kontrolama reagensa. Razdoblje inkubacije za negativnu kontrolu reagensa treba odgovarati onom primarnog protutijela.

Kada se paneli nekoliko protutijela koriste na serijskim presjecima, negativno obojena područja jednog stakalca mogu poslužiti kao negativna/nespecifična pozadinska kontrola za druga protutijela. Kako bi se razlikovala endogena aktivnost enzima ili nespecifično vezanje enzima od specifične imunoreaktivnosti, dodatna tkiva bolesnika mogu se obojiti isključivo supstrat-kromogenom ili enzimskim kompleksima (PAP, avidin-biotin, streptavidin) odnosno supstrat-kromogenom.

## Provjera testa:

Prije početne upotrebe antitijela ili sustava bojenja u dijagnostičkom postupku, korisnik bi trebao potvrditi specifičnost antitijela testiranjem na nizu internih tkiva s poznatim karakteristikama imunohistokemijske učinkovitosti koja predstavljaju poznata pozitivna i negativna tkiva. Pogledajte postupke kontrole kvalitete prethodno navedene u ovom odjeljku uputa za proizvod i preporuke za kontrolu kvalitete CAP programa certifikacije<sup>10</sup> za imunohistokemijsku i/ili NCCLS IHC smjernice<sup>11</sup>. Ove postupke kontrole kvalitete treba ponoviti za svaku novu seriju antitijela ili kad god dođe do promjene parametara testa. Tkiva navedena u odjeljku Karakteristike izvedbe prikladna su za provjeru analize.

## Rješavanje problema:

Slijedite preporuke protokola specifičnih za antitijela u skladu s dostavljenom podatkovnom tablicom. Ako dođe do netipičnih rezultata, kontaktirajte Biocare tehničku podršku na 1-800-542-2002.

## Tumačenje bojenja:

Betazoid DAB Chromogen Kit proizvodi reakciju smeđe boje na antigenskim mjestima lokaliziranim primarnim antitijelima. Prije tumačenja rezultata pacijenta, bojenje kontrola mora procijeniti kvalificirani patolog. Negativne kontrole se procjenjuju i uspoređuju s obojenim stakalcima kako bi se osiguralo da uočeno bojenje nije rezultat nespecifičnih interakcija.

## Pozitivna kontrola tkiva:

Prvo treba ispitati pozitivnu kontrolu tkiva obojenu navedenim protutijelima kako bi se utvrdilo da svi reagensi ispravno funkcioniraju. Odgovarajuće bojenje ciljnih stanica (kako je gore navedeno) pokazatelj je pozitivne reaktivnosti. Ako pozitivne kontrole tkiva ne pokažu pozitivno bojenje, sve rezultate s ispitnim uzorcima treba smatrati nevažećima.

Boja produkta reakcije može varirati ovisno o korištenim kromogenima supstrata. Za očekivanje reakcije boja pogledajte upute za pakiranje supstrata. Nadalje, metakromazija se može uočiti u varijacijama metode bojenja.<sup>12</sup> Kada se koristi protubojenje, ovisno o duljini inkubacije i jačini korištenog protubojanja, suprotno bojenje će rezultirati obojenjem staničnih jezgri. Pretjerano ili nepotpuno kontrastno bojenje može ugroziti pravilno tumačenje rezultata. Pogledajte protokol(e) za preporučeno kontrastno bojenje.

## Negativna kontrola tkiva:

Negativnu kontrolu tkiva treba pregledati nakon pozitivne kontrole tkiva kako bi se potvrdila specifičnost obilježavanja ciljnog antiga primarnim protutijelom. Odsutnost specifičnog bojenja u negativnoj kontroli tkiva potvrđuje nedostatak unakrsne reaktivnosti protutijela na stanicu/stanične komponente. Ako dođe do specifičnog bojenja (lažno pozitivno bojenje) u negativnoj vanjskoj kontroli tkiva, rezultate uzorka s pacijenta treba smatrati nevažećima.

Nespecifično bojenje, ako je prisutno, obično ima difuzan izgled. Sporadično bojenje vezivnog tkiva također se može primijetiti u dijelovima tkiva koji su previše fiksirani formalinom. Koristite intaktnе stanice za tumačenje rezultata bojenja. Nekrotične ili degenerirane stanice često se boje nespecifično.

## Tkivo pacijenta:

Pregledajte uzorce pacijenata obojene navedenim protutijelima posljednji. Intenzitet pozitivnog bojenja treba procijeniti u kontekstu bilo kojeg nespecifičnog pozadinskog bojenja negativne kontrole reagensa. Kao i kod svakog imunohistokemijskog testa, negativan rezultat znači da antigen nije otkriven, a ne da antigen nije bio prisutan u testiranim stanicama/tkivu. Ako je potrebno, upotrijebite panel protutijela za identifikaciju lažno negativnih reakcija.

Pogledajte Sažetak i objašnjenje, Ograničenja i Radne karakteristike za specifične informacije u vezi s indiciranim imunoreaktivnošću protutijela.

## Ograničenja:

### Opća ograničenja:

- Za *in vitro* dijagnostička (IVD) upotrebu
- Ovaj proizvod je samo za profesionalnu upotrebu: Imunohistokemijska je višestupanjski dijagnostički proces koji se sastoji od specijalizirane obuke u odabiru odgovarajućih reagensa; selekcija, fiksacija i obrada tkiva; priprema IHC stakalca; i tumačenje rezultata bojenja.
- Za korištenje samo prema liječničkom receptu. (Samo Rx)
- Bojanje tkiva ovisi o rukovanju i obradi tkiva prije bojenja. Neodgovarajuće fiksiranje, zamrzavanje, odmrzavanje, pranje, sušenje, zagrijavanje, rezanje ili kontaminacija drugim tkivima ili tekućinama može proizvesti artefakte, hvatanje antitijela ili lažno negativne rezultate. Nedosljedni rezultati mogu biti posljedica varijacija u metodama fiksacije i ugradnje ili inherentnih nepravilnosti unutar tkiva.<sup>14</sup>
- Pretjerano ili nepotpuno kontrastno bojenje može ugroziti pravilno tumačenje rezultata.
- Kliničku interpretaciju bilo kojeg pozitivnog ili negativnog bojenja treba procijeniti u kontekstu kliničke slike, morfologije i drugih histopatoloških kriterija. Kliničku interpretaciju bilo kojeg pozitivnog ili negativnog bojenja treba nadopuniti morfološkim studijama uz korištenje odgovarajućih pozitivnih i negativnih unutarnjih i vanjskih kontrola, kao i drugih dijagnostičkih testova. Odgovornost je kvalificiranog patologa koji je upoznat s pravilnom upotreboom IHC protutijela, reagensa i metoda za tumačenje svih koraka korištenih za pripremu i tumačenje konačnog IHC pripravka.
- Optimalni protokoli za određenu aplikaciju mogu varirati. To uključuje, ali nije ograničeno na fiksaciju, metodu povrata topline, vrijeme inkubacije, razrjeđivanje antitijela, deblijnu presjeka tkiva i korišteni pribor za otkrivanje. Za preporučene protokole i uvjete za upotrebu pogledajte upute za uporabu primarnog protutijela i drugih pomoćnih reagensa. Preporuke i protokoli u podatkovnom listu temelje se na isključivoj uporabi Biocare proizvoda. U konačnici, odgovornost je istraživača da odredi optimalne uvjete.
- Ovaj proizvod nije namijenjen za upotrebu u protočnoj citometriji. Radne karakteristike nisu utvrđene za protočnu citometriju.
- Tkiva osoba zaraženih virusom hepatitisa B i koja sadrže površinski antigen hepatitisa B (HBsAg) mogu pokazivati nespecifično obojenje peroksidazom hrena.<sup>14</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Croatian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

10. Reagensi mogu pokazati neočekivane reakcije u prethodno netestiranim tkivima. Mogućnost neočekivanih reakcija čak ni u ispitivanim skupinama tkiva ne može se u potpunosti eliminirati zbog biološke varijabilnosti ekspresije antiga u novotvorinama, odnosno drugim patološkim tkivima.<sup>15</sup> Obratite se Biocare tehničkoj podršci na 1-800-542-2002 ili putem informacija o tehničkoj podršci na biocare.net, uz dokumentirane neočekivane reakcije.
11. Normalni/neimuni serumi iz istog životinjskog izvora kao i sekundarni antiserumi korišteni u koracima blokiranja mogu izazvati lažno negativne ili lažno pozitivne rezultate zbog autoantitijela ili prirodnih antitijela.
12. Lažno pozitivni rezultati mogu se vidjeti zbog neimunološkog vezanja proteina ili proizvoda reakcije supstrata. Također mogu biti uzrokovane aktivnošću pseudo peroksidaze (eritrociti), endogenom aktivnošću peroksidaze (citokrom C) ili endogenim biotinom (npr. jetra, dojka, mozik, bubreg) ovisno o vrsti korištenog imunološkog bojenja.<sup>13</sup>
13. Negativan rezultat znači da antigen nije detektiran, a ne da antigena nije bilo u ispitivanim stanicama ili tkivu.

#### Specifična ograničenja proizvoda:

Nema dodatnih specifičnih ograničenja proizvoda

#### Karakteristike izvedbe:

Bojanje je provedeno korištenjem protokola navedenih u uputama za uporabu specifičnih za antitijela ili kako je navedeno. Osjetljivost i specifičnost bojenja procijenjena je u nizu tipova normalnih i neoplastičnih tkiva procijenjenih tijekom razvoja primarnih protutijela.

#### Ponovljivost:

Ponovljivost Biocareovih sustava za otkrivanje i reagensa sustava potvrđena je mjerjenjem srednje preciznosti u kojem su različite serije reagensa testirane tijekom duljeg vremenskog razdoblja korištenjem različitih operatera, analitičara, serija reagensa, uzoraka tkiva i opreme. Bojanje dobiveno za svaki procijenjeni reagens za detekciju bilo je dosljedno i izvedeno prema očekivanjima.

#### Rješavanje problema:

1. Nema bojanja niti na jednom predmetnom stakalcu – Provjerite jesu li korištena odgovarajuća pozitivna kontrola tkiva, antitijela i proizvoda za otkrivanje. Provjerite postoji li nepotpuno ili nepravilno uklanjanje ili prethodna obrada voska.
2. Slabo bojenje svih stakalca – Provjerite je li korišteno odgovarajuće tkivo pozitivne kontrole, antitijela i proizvodi za otkrivanje.
3. Prevelika pozadina svih stakalaca – Mogu postojati visoke razine endogenog biotina (ako se koriste proizvodi za detekciju na bazi biotina), endogena HRP aktivnost koja pretvara kromogen u obojeni krajnji proizvod (koristite blok peroksidaze) ili prekomjerna nespecifična interakcija proteina (koristite protein blok, kao što je otopina za blokiranje na bazi seruma ili kazeina).
4. Dijelovi tkiva ispiru se sa stakalcima tijekom inkubacije – Provjerite stakalca kako biste bili sigurni da su pozitivno nabijena.
5. Specifično bojenje pretamno – Provjerite protokol kako biste utvrdili je li na stakalcu primijenjen ispravan titar protutijela, kao i ispravna vremena inkubacije za sve reagense. Osim toga, osigurajte da protokol ima dovoljno koraka ispiranja za uklanjanje viška reagensa nakon završetka koraka inkubacije.

#### Reference:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.

4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

21/118



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Czech

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Zamýšlené použití:

Pro *in vitro* Diagnostické použití

TheSada Betazoid DAB Chromogen Kit je určen pro použití v manuálních nebo automatizovaných imunohistochemických (IHC) protokolech barvení pro detekci cílových antigenů ve formaliném fixovaných, parafínových (FFPE) tkáních, pokud se používá ve spojení s vhodným detekčním systémem a primárními protilátkami. Klinická interpretace jakéhokoli zabarvení nebo jeho nepřítomnosti by měla být doplněna morfologickými studiemi a řádnými kontrolami a měla by být vyhodnocena v kontextu pacientovy klinické anamnézy a dalších diagnostických testů kvalifikovaným patologem.

## Shrnutí a vysvětlení:

3,3' diaminobenzidin (DAB) je dobře zavedený chromogen používaný v protokolech barvení IHC, který v přítomnosti enzymu křenové peroxidázy (HRP) vytváří hnědou sráženinu, která je neropustná v organických rozpouštědlech a může být překryta permanentním montážním médiem. Tento produkt je dodáván ve dvousložkovém systému sestávajícím z kapalného stabilního DAB chromogenu a DAB substrátového pufuru. Barva směsi chromogenového pufuru se může lišit od bezbarvé po světle hnědou. Barvící vlastnosti nejsou ovlivněny barvou směsi chromogenového pufuru. Betazoid DAB je formulace, která je velmi stabilní. Betazoid DAB lze použít jak ručně, tak na automatických barvírcích.

## Princip postupu:

Tento DAB chromogen v sadě Betazoid DAB Chromogen Kit, pokud je použit při IHC testování tkáňových řezů FFPE, umožňuje vizualizaci antigenů pomocí sekvenční aplikace specifická protilátka k antigenu (primární protilátka), sekundární protilátka k primární protilátky (volitelná vazba protilátka/sonda), enzymový komplex a chromogenní substrát s vloženými promývacími kroky. Enzymatická aktivace chromogenu vede k viditelnému reakčnímu produktu v místě antigenu. Vzorek pak může být kontrastně obarven a zakryt krycím sklíčkem. Výsledky jsou interpretovány pomocí světla mikroskop a pomůcky při diferenciální diagnostice patofiziologických procesů, které mohou popř nemusí být spojen s konkrétním antigenem.

## Materiály a metody:

### Dodávaná činidla:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Rekonstituce, míchání, ředění, titrace:

Sada Betazoid DAB Chromogen Kit je optimalizována pro použití s protilátkami Biocare a pomocnými činidly a musí být naředěna těsně před použitím. Smíchejte 1 kapku (32 µl) DAB Chromogenu na 1,0 ml DAB

substrátového pufuru. Pracovní roztok DAB je stabilní po dobu 5 dnů, pokud je skladován při 2-8°C.

## Známé aplikace:

Imunohistochemie (tkáně zalité v parafinu fixované formalinem)

## Dodáváno jako:

Betazoid DAB Chromogen

DAB řešení. Další podrobnosti viz Bezpečnostní list.

## Betazoid DAB substrátový pufur

Pufrovaný roztok obsahuje 3% roztok peroxidu vodíku. Další podrobnosti viz Bezpečnostní list.

## Potřebné materiály a činidla, které nejsou součástí dodávky:

Mikroskopická sklíčka, kladně nabité

Pozitivní a negativní tkáňové kontroly

Pouštní komora\* nebo podobná Sušicí pec (volitelně)

Xylen nebo náhrada xylenu

Ethanol nebo reagenční alkohol

Decloaking Chamber\* nebo podobný tlakový hrnec (volitelně)

Deionizovaná nebo destilovaná voda

Promývací pufr\*

Činidla pro předúpravu\* (volitelné)

Enzymové trávení\* (volitelné)

Peroxidázový blok\*

Proteinový blok\* (volitelné)

Primární protilátka\*

Negativní kontrolní činidla\*

Detectční sady\*

Hematoxylin\* (kontrabarva)

Blueingovo činidlo\*

Montážní médium\*

Krycí sklo

Světlý mikroskop (40-400x zvětšení)

\* Biocare Medical Products: Informace týkající se katalogových čísel a objednávek naleznete na webových stránkách Biocare Medical na adrese <http://biocare.net>. Některá výše uvedená činidla jsou založena na specifické aplikaci a použití detekčním systému.

## Skladování a stabilita:

Skladujte při teplotě 2°C až 8°C. Při skladování za těchto podmínek je přípravek stabilní do data expirace vytisklého na štítku lahvičky. Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti. Skladování za jakýchkoliv jiných než uvedených podmínek musí být ověřeno. Naředěná činidla by měla být použita okamžitě podle pokynů. Nepoužité naředěné činidlo je stabilní po dobu 5 dnů, pokud je skladováno při 2-8°C. Stabilita uživatelem naředěného činidla po 5 dnech nebyla společností Biocare stanovena.

Pozitivní a negativní kontroly by měly být prováděny současně se všemi vzorky pacientů. Pokud zpozorujete neočekávané zbarvení, které nelze vysvětlit odchylkami v laboratorních postupech, a máte podezření na problém s protilátkou, kontaktujte technickou podporu společnosti Biocare na čísle 1-800-542-2002 nebo prostřednictvím informací o technické podpoře na webu [biocare.net](http://biocare.net).

## Příprava vzorku:

Tkáně fixované ve formalínu jsou vhodné pro použití před zalitím parafínu. Kostní tkáň by měla být před zpracováním tkáň odvápněny, aby se usnadnilo řezání tkáň a zabránilo se poškození čepelí mikrotomu.<sup>1,2</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Czech

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Správně fixované a zapuštěné tkáně exprimující specifikovaný cílový antigen by měly být skladovány na chladném místě. Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) z roku 1988 vyžaduje v 42 CFR§493.1259(b), že „Laborator musí uchovávat obarvená sklíčka nejméně deset let od data vyšetření a uchovávat bloky vzorků nejméně dva roky od data vyšetření.“<sup>3</sup>

## Ošetření tkání před barvením:

Provedte Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) podle doporučeného protokolu níže. Ukázalo se, že rutinní použití HIER před IHC minimalizuje nekonzistence a standardizuje barvení.<sup>4,5</sup>

## Upozornění a bezpečnostní opatření:

1. Je známo, že DAB je podezřelý karcinogen.
2. Nevystavujte komponenty DAB silnému světlu nebo přímému slunečnímu záření
3. DAB může způsobit senzibilizaci kůže. Zabraňte kontaktu s pokožkou a očima.
4. Při manipulaci používejte rukavice a ochranný oděv a přijměte přiměřená opatření, protože DAB je klasifikován jako nebezpečný a může způsobit rakovinu a je podezřelý, že způsobuje genetické defekty.
5. Zacházejte s materiály lidského nebo zvířecího původu jako s potenciálně biologicky nebezpečnými a likvidujte je s náležitými opatřeními. V případě expozice se řídte zdravotními směrnicemi odpovědných úřadů, kde byly použity.<sup>6,7</sup>
6. Se vzorky před a po fixaci a se všemi materiály, které jim byly vystaveny, je třeba zacházet tak, jako by mohly přenášet infekci, a likvidovat je s náležitými opatřeními. Nikdy nepipetujte reagencie ústy a vyhněte se kontaktu kůže a sliznic s reagenciami a vzorky. Pokud se činidla nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody.<sup>8</sup>
7. Mikrobiální kontaminace činidel může vést ke zvýšení nespecifického barvení.
8. Jiné než specifikované inkubační doby nebo teploty mohou vést k chybným výsledkům. Uživatel musí každou takovou změnu potvrdit.
9. Nepoužívejte činidlo uplynutí doby použitelnosti vytíštěné na lahvičce.
10. Činidla mikropolymerové detekční soupravy jsou optimalizována a připravena k použití s protilátkami Biocare a pomocnými činidly. Doporučené protokoly a podmínky použití naleznete v pokynech k použití primární protilátky a dalších pomocných činidel.
11. Dodržujte požadavky místních a/nebo státních úřadů na způsob likvidace.
12. Bezpečnostní list je k dispozici na vyžádání a je umístěn na <http://biocare.net>.
13. Oznamte jakékoli vážné incidenty související s tímto zařízením kontaktováním místního zástupce společnosti Biocare a příslušného úřadu členského státu nebo země, kde se uživatel nachází.

Tato sada chromogenů obsahuje komponenty klasifikované tak, jak je uvedeno v tabulce níže v souladu s Nařízením (ES) č. 1272/2008

Nebezpečí	Kód	Prohlášení o nebezpečnosti
	H314 H350	Podezření na genetické poškození Může způsobit rakovinu

## Návod k použití:

Reagencie chromogenové sady jsou optimalizovány pro použití s protilátkami Biocare a pomocnými reagencii. Doporučené protokoly a podmínky použití naleznete v pokynech k použití primární protilátky a dalších pomocných činidel. Inkubační doby a teploty se budou lišit v závislosti na specifickém protokolu protilátek.

Při použití automatického barvícího přístroje si provozní parametry prostudujte v návodu k obsluze konkrétního přístroje a v návodu k použití.

## Obecné procedurální kroky pro provádění IHC:

1. Deparafinizace: Deparafinizujte sklíčka pomocí Slide Brite nebo xylenu. Hydratujte sklíčka v sérii odstupňovaných alkoholů do vody.
2. Peroxidový blok: Blokuje 5 minut pomocí Peroxidized 1.
3. Roztok/protokol pro předběžnou úpravu: Doporučený roztok a protokol pro předúpravu naleznete v příslušném datovém listu primární protilátky.
4. Proteinový blok (volitelně): Inkubujte 5-10 minut při pokojové teplotě (RT) pomocí Background Punisher.
5. Primární protilátky: Inkubační dobu naleznete v příslušném datovém listu primární protilátky.
6. Sonda (pouze myší protilátky): Inkubujte 5-15 minut při RT s MACH 4 Mouse Probe.
7. Polymer: Inkubujte 10-20 minut pro myší protilátky nebo 30 minut pro králičí protilátky při teplotě místořídkosti s MACH 4 HRP Polymer.
8. Chromogen: Inkubujte 5 minut při teplotě místořídkosti s Biocare's DAB.
9. Kontrabarva: Kontrabarva hematoxylinem. Opláchněte deionizovanou vodou. Aplikujte Tacha's Blueing Solution na 1 minutu. Opláchněte deionizovanou vodou.

## Technické poznámky:

1. Pro promývací kroky použijte TBS.

## Kontrola kvality:

Viz standardy kvality CLSI pro návrh a implementaci imunohistochemických testů; Schválená směrnice – druhé vydání (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

## Pozitivní tkáňová kontrola:

Materiály pro externí pozitivní kontrolu by měly být čerstvé vzorky fixované, zpracované a zalisté co nejdříve stejným způsobem jako vzorky pacienta. Pozitivní tkáňové kontroly ukazují na správně připravené tkáně a správné techniky barvení. V každém cyklu barvení by měla být zahrnuta jedna pozitivní externí tkáňová kontrola pro každou sadu testovacích podmínek.

Tkáně použité pro externí materiály pro pozitivní kontrolu by měly být vybrány ze vzorků pacientů s dobře charakterizovanou nízkou úrovni pozitivní cílové aktivity, která poskytuje slabé pozitivní barvení. Nízká úroveň pozitivity pro externí pozitivní kontroly je navržena tak, aby zajistila detekci jemných změn citlivosti primárních protilátek z nestability nebo problémů s IHC metodikou. Komerčně dostupná tkáňová kontrolní sklíčka nebo vzorky zpracované odlišně od vzorku (vzorků) pacienta pouze ověřují účinnost reagencii a neověřují přípravu tkáně.

Známé pozitivní tkáňové kontroly by se měly používat pouze pro monitorování správného výkonu zpracovaných tkání a testovacích činidel, spíše než jako pomůcka při formulování specifické diagnózy vzorků pacientů. Pokud pozitivní tkáňové kontroly nevykazují pozitivní zbarvení, výsledky s testovacími vzorky by měly být považovány za neplatné.

## Negativní tkáňová kontrola:

Použijte negativní tkáňovou kontrolu fixovanou, zpracovanou a zalistou stejným způsobem jako vzorek (vzorky) pacienta s každým barvením, abyste ověřili specifitu primární IHC protilátky pro prokázání cílového antigenu a poskytnutí indikace specifického barvení pozadí (falešně pozitivní barvení). Také může být rozmanitost různých typů buněk přítomných ve většině tkáňových rezů být používány laboratoří jako interní negativní kontrolní místa k ověření výkonu IHC Specifikace. Typy a zdroje vzorků, které lze použít pro negativní tkáň ovládající prvky jsou uvedeny v části Výkonné charakteristiky.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Czech

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Pokud se u negativní tkáňové kontroly objeví specifické zbarvení (falešně pozitivní barvení), výsledky se vzorky pacienta by měly být považovány za neplatné.

## Nespecifická kontrola negativních činidel:

Použijte nespecifickou negativní reagenční kontrolu místo primární protilátky s řezem každého vzorku pacienta k vyhodnocení nespecifického zbarvení a umožňují lepší interpretaci specifického zbarvení v místě antigenu. V ideálním případě negativní reagenční kontrola obsahuje protilátku vyrobenou a připravenou (tj. naředěnou na stejnou koncentraci za použití stejněho ředitla) pro použití stejným způsobem jako primární protilátku, ale nevykazuje žádnou specifickou reaktivitu s lidskými tkáněmi ve stejně matrici/roztoku jako primární protilátku. Samotné ředitlo může být použito jako méně žádoucí alternativa k dříve popsáným negativním reagenčním kontrolám. Inkubační doba pro negativní reagenční kontrolu by měla odpovídat inkubační době primární protilátky.

Když se na sériových řezech použijí panely několika protilátek, negativně barvené oblasti jednoho sklíčka mohou sloužit jako negativní/nespecifická vazebná kontrola pozadí pro jiné protilátky. Pro odlišení endogenní enzymové aktivity nebo nespecifické vazby enzymů od specifické imunoreaktivity mohou být další tkáně pacienta obarveny výhradně substrát-chromogen nebo komplexy enzymů (PAP, avidin-biotin, streptavidin) a substrát-chromogen, v daném pořadí.

## Ověření testu:

Před prvním použitím protilátky nebo barvíčko systému v diagnostickém postupu by měl uživatel ověřit specifitu protilátky testováním na řadě vlastních tkání se známými imunohistochemickými charakteristikami, které představují známé pozitivní a negativní tkáně. Viz postupy kontroly kvality dříve uvedené v této části příbalové informace k produktu a doporučení kontroly kvality certifikačního programu CAP<sup>10</sup> pro imunohistochemii a/nebo doporučení NCCLS IHC<sup>11</sup>. Tyto postupy kontroly kvality by se měly opakovat pro každou novou šárži protilátek nebo kdykoli dojde ke změně parametrů testu. Tkáně uvedené v části Výkonnostní charakteristiky jsou vhodné pro ověření testu.

## Odstraňování problémů:

Dodržujte doporučení specifického protokolu protilátek podle dodaného datového listu. Pokud se objeví atypické výsledky, kontaktujte technickou podporu Biocare na čísle 1-800-542-2002.

## Interpretace barvení:

Sada Betazoid DAB Chromogen Kit vytváří hnědou barevnou reakci na místech antigenu lokalizovaných primární protilátkou. Před interpretací výsledků pacienta musí barvení kontrol vyhodnotit kvalifikovaný patolog. Negativní kontroly se vyhodnotí a porovnají s obarvenými sklíčky, aby se zajistilo, že jakékoli pozorované zbarvení není výsledkem nespecifických interakcí.

## Pozitivní tkáňová kontrola:

Pozitivní tkáňová kontrola obarvená indikovanou protilátkou by měla být nejprve vyšetřena, aby se zjistilo, že všechna činidla fungují správně. Vhodné barvení cílových buněk (jak je uvedeno výše) svědčí o pozitivní reaktivitě. Pokud pozitivní tkáňové kontroly nevykazují pozitivní zbarvení, jakékoli výsledky s testovacími vzorky by měly být považovány za neplatné.

Barva reakčního produktu se může lišit v závislosti na použitých substrátových chromogenech. Očekávané barevné reakce naleznete v příbalových informacích substrátu. Dále může být ve variantách způsobu barvení pozorována metachromázie.<sup>12</sup>

Když se použije kontrastní barvivo, v závislosti na délce inkubace a síle použitého kontrastního barviva, povede kontrastní barvivo ke zbarvení

buněčných jader. Nadměrné nebo neúplné kontrastní barvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků. Doporučené kontrastní barvivo viz protokol(y).

## Negativní tkáňová kontrola:

Negativní tkáňová kontrola by měla být vyšetřena po pozitivní tkáňové kontrole, aby se ověřila specifita značení cílového antigenu primární protilátkou. Absence specifického barvení v negativní tkáňové kontrole potvrzuje nedostatek zkřížené reaktivnosti protilátek s buňkami/buněčnými složkami. Pokud se u negativní externí tkáňové kontroly objeví specifické zbarvení (falešně pozitivní barvení), výsledky se vzorkem pacienta by měly být považovány za neplatné.

Nespecifické zbarvení, pokud je přítomno, má obvykle difúzní vzhled. Sporadické barvení pojivové tkáně lze také pozorovat v řezech z tkání nadměrně fixovaných formalinem. Pro interpretaci výsledků barvení použijte neporušené buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky se často barví nespecificky.

## Pacientská tkáň:

Prohlédněte si vzorky pacientů obarvené indikovanou protilátkou poslední. Intenzita pozitivního barvení by měla být posouzena v kontextu jakéhokoli nespecifického zbarvení pozadí negativní kontroly reagencí. Jako u každého imunohistochemického testu negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli že antigen v testovaných buňkách/tkání chybí. V případě potřeby použijte panel protilátek k identifikaci falešně negativních reakcí.

Specifické informace týkající se indikované imunoreaktivity protilátek naleznete v části Souhrn a vysvělení, omezení a výkonnostní charakteristiky.

## Omezení:

### Obecná omezení:

1. *Pro in vitro diagnostické (IVD) Použití*
2. Tento produkt je určen pouze pro profesionální použití: Imunohistochemie je vícestupňový diagnostický proces, který se skládá ze specializovaného školení ve výběru vhodných činidel; výběr tkáně, fixace a zpracování; příprava sklíčka IHC; a interpretaci výsledků barvení.
3. Pro použití pouze na lékařský předpis. (Pouze Rx)
4. Barvení tkáně závisí na manipulaci a zpracování tkáně před barvením. Nesprávná fixace, zmrzování, rozmrazování, mytí, sušení, zahřívání, krájení nebo kontaminace jinými tkáněmi nebo tekutinami může způsobit artefakty, zachycení protilátek nebo falešně negativní výsledky. Nekonzistentní výsledky mohou být způsobeny odchylkami v metodách fixace a zalévání nebo přirozenými nepravidelnostmi v tkáni.<sup>14</sup>
5. Nadměrné nebo neúplné kontrastní barvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků.
6. Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního nebo negativního zbarvení by měla být vyhodnocena v kontextu klinické prezentace, morfologie a dalších histopatologických kritérií. Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního nebo negativního zbarvení by měla být doplněna morfologickými studiemi s použitím správných pozitivních a negativních interních a externích kontrol, jakož i dalších diagnostických testů. Je odpovědností kvalifikovaného patologa, který je obeznámen se správným použitím IHC protilátek, činidel a metod, aby interpretoval všechny kroky použité k přípravě a interpretaci konečného IHC přípravku.
7. Optimální protokoly pro konkrétní aplikaci se mohou lišit. Mezi ně patří mimo jiné fixace, metoda získávání tepla, inkubační doba, ředění protilátek, tloušťka řezu tkáně a použitá detekční souprava. Doporučené protokoly a podmínky použití naleznete v pokynech k použití primární protilátek a dalších pomocných činidel. Doporučení a protokoly datových listů jsou založeny na výhradním použití produktů

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Czech

**BIOCARE**  
M E D I C A L

- Biocare. V konečném důsledku je odpovědností vyšetřovatele určit optimální podmínky.
8. Tento produkt není určen pro použití v průtokové cytometrii. Výkonnostní charakteristiky nebyly pro průtokovou cytometrii stanoveny.
  9. Tkáně osob infikovaných virem hepatitidy B a obsahující povrchový antigen hepatitidy B (HBsAg) mohou vykazovat nespecifické barvení křenovou peroxidázou.<sup>14</sup>
  10. Reagencie mohou vykazovat neočekávané reakce v dříve netestovaných tkáních. Možnost neočekávaných reakcí i u testovaných skupin tkání nelze zcela eliminovat z důvodu biologické variability exprese antigenu v novotvarech nebo jiných patologických tkáních.<sup>15</sup> Kontaktujte technickou podporu společnosti Biocare na čísle 1-800-542-2002 nebo prostřednictvím informací o technické podpoře uvedených na biocare.net se zdokumentovanými neočekávanými reakcemi.
  11. Normální/neimunitní séra ze stejněho zvířecího zdroje jako sekundární antiséra použitá v blokovacích krocích mohou způsobit falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky v důsledku autoprotilátek nebo přirozených protilátek.
  12. Falešně pozitivní výsledky mohou být pozorovány v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce substrátu. Mohou být také způsobeny pseudoperoxidázovou aktivitou (erytrocyty), endogenní peroxidázovou aktivitou (cytochrom C) nebo endogenním biotinem (např. játra, prsa, mozek, ledviny) v závislosti na typu použitého imunobarvení.<sup>13</sup>
  13. Negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli že antigen ve vyšetřovaných buňkách nebo tkání chyběl.

## Specifická omezení produktu:

Žádná další specifická omezení produktu

## Výkonnostní charakteristiky:

Barvení bylo provedeno pomocí protokolů poskytnutých v pokynech pro použití specifických pro protilátku nebo jak je uvedeno. Citlivost a specificita barvení byla hodnocena v celé řadě normálních a neoplastických typů tkání hodnocených během vývoje primárních protilátek.

## Reprodukčnost:

Reprodukčnost detekčních systémů a systémových reagencí Biocare je ověřena měřením střední přesnosti, při kterém byly různé šárže reagencí testovány po delší dobu pomocí různých operátorů, analytiků, šarží reagencí, vzorků tkání a vybavení. Barvení získané pro každé hodnocené detekční činidlo bylo konzistentní a provedlo se podle očekávání.

## Odstraňování problémů:

1. Žádné barvení sklíček – Zkontrolujte, zda byly použity vhodné pozitivní kontrolní tkáně, protilátky a detekční produkty. Zkontrolujte neúplné nebo nesprávné odstranění vosku nebo předúpravu.
2. Slabé zabarvení všech sklíček – Zkontrolujte, zda byly použity vhodné pozitivní kontrolní tkáně, protilátky a detekční produkty.
3. Nadměrné pozadí všech preparátů – Mohou existovat vysoké hladiny endogenního biotinu (pokud používáte detekční produkty na bázi biotinu), endogenní aktivita HRP přeměňující chromogen na barevný konečný produkt (použijte peroxidázový blok) nebo nadměrná nespecifická proteinová interakce (použijte protein blok, jako je blokovací roztok na bázi séra nebo kaseinu).
4. Tkáňové řezy smyjte sklíčka během inkubace – Zkontrolujte sklíčka, abyste se ujistili, že jsou kladně nabité.
5. Specifické barvení je příliš tmavé – Zkontrolujte protokol, abyste zjistili, zda byl na sklíčku aplikován správný titr protilátek, a také správné inkubační doby pro všechna činidla. Dále zajistěte, aby protokol obsahoval dostatek promývacích kroků k odstranění přebytečných činidel po dokončení inkubačních kroků.

## Reference:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

25/18



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Danish

**BIOCARE**  
MEDICAL

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Anvendelsesformål:

Til *in vitro* Diagnostisk brug

Det Betazoid DAB Chromogen Kiter beregnet til brug i enten manuel eller automatiseret immunhistokemi (IHC)-farvningsprotokoller til påvisning af målantigener i formalinfikserede, paraffinindlejrede (FFPE) væv, når det bruges sammen med det passende detektionssystem og primære antistoffer. Den kliniske fortolkning af enhver farvning eller dens fravær bør suppleres af morfologiske undersøgelser og korrekte kontroller og bør evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske test af en kvalificeret patolog.

## Sammenfatning og forklaring:

3,3' Diaminobenzidin (DAB) er et veletableret kromogen, der anvendes i IHC-farvningsprotokoller, og som i nærvær af et peberrodsperoxidase (HRP) enzym producerer et brunt bundfald, der er uopløseligt i organiske oplosningsmidler og kan dækglas med et permanent monteringsmedie. Dette produkt kommer i et to-komponent system bestående af et væskestabilt DAB-kromogen og en DAB-substratbuffer. Farven på kromogenbufferblandingen kan variere fra farveløs til lysebrun. Farvningsegenskaberne påvirkes ikke af farven på kromogenbufferblandingen. Betazoid DAB er en formulering, der er meget stabil. Betazoid DAB kan bruges både manuelt og på automatiske farvningsmaskiner.

## Procedureprincip:

Dette DAB-kromogen i Betazoid DAB Chromogen Kit, når det bruges i IHC-test af FFPE-vævssnit, giver mulighed for visualisering af antigener via sekventiel påføring af en specifikt antistof til antigenet (primært antistof), et sekundært antistof til det primære antistof (valgfrit link-antistof/probe), et enzymkompleks og et kromogenet substrat med indskudte vasketrin. Den enzymatiske aktivering af kromogenet resulterer i et synligt reaktionsprodukt på antigenstedet. Prøven kan derefter modfarves og dækglas. Resultater fortolkes ved hjælp af et lys mikroskop og hjælp til differentialdiagnose af patofysiologiske processer, som evt. er muligvis ikke forbundet med et bestemt antigen.

## Materialer og metoder:

### Medfølgende reagenser:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Rekonstitution, blanding, fortynding, titrering:

Betazoid DAB Chromogen Kit er optimeret til brug med Biocare-antistoffer og hjælpereagenser og skal fortyndes lige før brug. Bland 1 dråbe (32µL) DAB

Chromogen pr. 1,0mL DAB Substrat Buffer. DAB-arbejdsopløsningen er stabil i 5 dage, hvis den opbevares ved 2-8°C.

## Kendte applikationer:

Immunhistokemi (formalinifikseret paraffinindlejret væv)

## Leveres som:

*Betazoid DAB Chromogen*

DAB løsning. Se sikkerhedsdatabladet for yderligere detaljer.

## *Betazoid DAB Substrat Buffer*

Bufret opløsning indeholder 3 % hydrogenperoxidopløsning. Se sikkerhedsdatabladet for yderligere detaljer.

## Nødvendige, men ikke medfølgende materialer og reagenser:

Mikroskopobjektglas, positivt ladede

Positive og negative vævskontroller

Desert Chamber\* eller lignende tørreovn (valgfrit)

Xylen eller xylenerstatning

Ethanol eller reagens alkohol

Decloaking Chamber\* eller lignende trykkoger (valgfrit)

Deioniseret eller destilleret vand

Vaskebuffer\*

Forbehandlingsreagenser\* (valgfrit)

Enzymfordøjelse\* (valgfrit)

Peroxidaseblok\*

Proteinblok\* (valgfrit)

Primært antistof\*

Negative kontrolreagenser\*

Detektionssæt\*

Hæmatoxylin\* (modfarvning)

Blåreagens\*

Monteringsmedium\*

Dækglas

Lysmikroskop (40-400X forstørrelse)

\* Biocare Medical Products: Se Biocare Medicals websted på <http://biocare.net> for at få oplysninger om katalognumre og bestilling. Visse reagenser anført ovenfor er baseret på specifik anvendelse og det anvendte detektionssystem.

## Opbevaring og stabilitet:

Opbevares ved 2°C til 8°C. Produktet er stabilt til den udløbsdato, der er trykt på hætteglasetiketten, når det opbevares under disse forhold. Må ikke bruges efter udløbsdatoen. Opbevaring under alle andre forhold end de specificerede skal verificeres. Fortyndede reagenser skal anvendes omgående som anvist. Ubrugt fortyndet reagens er stabilt i 5 dage, hvis det opbevares ved 2-8°C. Stabiliteten af brugerfortyndet reagens ud over 5 dage er ikke blevet fastslået af Biocare.

Positive og negative kontroller skal køres samtidigt med alle patientprøver. Hvis der observeres uventet farvning, som ikke kan forklares med variationer i laboratorieprocedurer, og der er mistanke om et problem med antistoffet, skal du kontakte Biocares tekniske support på 1-800-542-2002 eller via den tekniske supportinformation, der findes på biocare.net.

## Prøveforberedelse:

Væv fikseret i formalin er velegnede til brug før paraffinindstøbning. Ossøst væv bør afkalkes før vævsbehandling for at lette vævsskæring og forhindre beskadigelse af mikrotomblade.<sup>1,2</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Danish

**BIOCARE**  
MEDICAL

Korrekt fikserede og indlejrede væv, der udtrykker det specifiserede antigenmål, skal opbevares på et koldt sted. Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) fra 1988 kræver i 42 CFR§493.1259(b), at "Laboratoriet skal opbevare farvede objektglas mindst ti år fra datoen for undersøgelse og behold prøveblokke mindst to år fra eksamensdatoen."<sup>3</sup>

## Behandling af væv før farvning:

Udfør Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) i henhold til den anbefalede protokol nedenfor. Den rutinemæssige brug af HIER før IHC har vist sig at minimere inkonsistens og standardisere farvning.<sup>4,5</sup>

## Advarsel og forholdsregler:

1. DAB er kendt for at være et mistænkt kræftfremkaldende stof.
2. Udsæt ikke DAB-komponenter for stærkt lys eller direkte sollys.
3. DAB kan forårsage sensibilisering af huden. Undgå kontakt med hud og øjne.
4. Bær handsker og beskyttelsestøj og tag rimelige forholdsregler ved håndtering, da DAB er klassificeret som en fare og kan forårsage kræft og er mistænkt for at forårsage genetiske defekter.
5. Håndter materialer af menneskelig eller animalsk oprindelse som potentielt biofarlige og bortskaf sådanne materialer med passende forholdsregler. I tilfælde af eksponering, følg sundhedsdirektiverne fra de ansvarlige myndigheder, hvor det anvendes.<sup>6,7</sup>
6. Prøver, før og efter fiksering, og alle materialer, der udsættes for dem, skal håndteres, som om de er i stand til at overføre infektion og bortskaffes med passende forholdsregler. Pipettér aldrig reagenser gennem munnen, og undgå at komme i kontakt med hud og slimhinder med reagenser og prøver. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skal du vaske med rigelige mængder vand.<sup>8</sup>
7. Mikrobiel kontaminering af reagenser kan resultere i en stigning i uspecifik farvning.
8. Andre inkubationstider eller temperaturer end de angivne kan give fejlagtige resultater. Brugeren skal validere enhver sådan ændring.
9. Brug ikke reagens efter den udløbsdato, der er trykt på hætteglasset.
10. Mikropolymerdetektionsreagenser er optimeret og klar til brug med Biocare-antistoffer og hjælpereagenser. Se instruktionerne til det primære antistof og andre hjælpereagenser til brug for anbefalede protokoller og betingelser for brug.
11. Følg lokale og/eller statslige myndigheders krav til bortskaffelsesmetode.
12. SDS er tilgængeligt efter anmodning og findes på <http://biocare.net>.
13. Rapporter alle alvorlige hændelser relateret til denne enhed ved at kontakte den lokale Biocare-repræsentant og den relevante kompetente myndighed i den medlemsstat eller det land, hvor brugeren befinner sig.

Dette kromogenkit indeholder komponenter, der er klassificeret som angivet i tabellen nedenfor i overensstemmelse med forordning (EF) nr. 1272/2008

Fare	Kode	Faresætning
	H314 H350	Mistænkt for at forårsage genetiske defekter Kan forårsage kræft

## Brugsanvisning:

Chromogen kit-reagenserne er optimeret til brug med Biocare-antistoffer og hjælpereagenser. Se instruktionerne til det primære antistof og andre hjælpereagenser til brug for anbefalede protokoller og betingelser for brug. Inkubationstider og temperaturer vil variere afhængigt af den specifikke antistofprotokol, der følges.

Når du bruger et automatiseret farningsinstrument, skal du se den specifikke betjeningsvejledning til instrumentet og brugsanvisningen for driftsparametre.

## Generelle proceduremæssige trin til udførelse af IHC:

1. Aparaffinering: Aparaffinér objektglas i Slide Brite eller xylen. Hydrat objektglas i en række graderede alkoholer til vand.
2. Peroxidblok: Bloker i 5 minutter med Peroxidized 1.
3. Forbehandlingsopløsning/-protokol: Se venligst det respektive primære antistofdatablad for anbefalet forbehandlingsopløsning og protokol.
4. Proteinblok (valgfrit): Inkuber i 5-10 minutter ved stuetemperatur (RT) med Background Punisher.
5. Primært antistof: Se venligst det respektive primære antistofdatablad for inkubationstid.
6. Probe (kun museantistoffer): Inkuber i 5-15 minutter ved stuetemperatur med MACH 4 museprobe.
7. Polymer: Inkuber i 10-20 minutter for museantistoffer eller 30 minutter for kaninantistoffer ved stuetemperatur med MACH 4 HRP-polymer.
8. Chromogen: Inkuber i 5 minutter ved stuetemperatur med Biocares DAB.
9. Modfarvning: Modfarvning med hæmatoxylin. Skyl med deioniseret vand. Påfør Tacha's Blueing Solution i 1 minut. Skyl med deioniseret vand.

## Tekniske noter:

1. Brug TBS til vasketrin.

## Kvalitetskontrol:

Se CLSI kvalitetsstandarder for design og implementering af immunhistokemiske analyser; Godkendt guideline-anden udgave (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

### Positiv vævskontrol:

Eksterne positive kontrolmaterialer skal være friske prøver fikset, behandlet og indlejet så hurtigt som muligt på samme måde som patientprøven/patienterne. Positive vævskontroller er tegn på korrekt forberedt væv og korrekte farvningsteknikker. En positiv ekstern vævskontrol for hvert sæt af testbetingelser bør inkluderes i hver farvningskørsel.

De væv, der anvendes til de eksterne positive kontrolmaterialer, bør vælges fra patientprøver med velkarakteriserede lave niveauer af den positive målaktivitet, der giver svag positiv farvning. Det lave niveau af positivitet for eksterne positive kontroller er designet til at sikre påvisning af subtile ændringer i det primære antistoffølsomhed fra ustabilitet eller problemer med IHC-metoden. Kommercielt tilgængelige vævskontrolobjektglas eller -prøver, der er behandlet anderledes end patientprøven(-erne), validerer kun reagensydelse og verificerer ikke vævsforberedelse.

Kendte positive vævskontroller bør kun bruges til at overvåge den korrekte ydeevne af behandlet væv og testreagenser, snarere end som en hjælp til at formulere en specifik diagnose af patientprøver. Hvis de positive vævskontroller ikke viser positiv farvning, bør resultaterne med testprøverne betragtes som ugyldige.

### Negativ vævskontrol:

Brug en negativ vævskontrol fikset, behandlet og indlejret på en måde, der er identisk med patientprøven/patienterne med hver farvningskørsel for at verificere specifiteten af det primære IHC-antistof for demonstration af målantigenet og for at give en indikation af specifik baggrundsfarvning (falsk positiv farvning). Det kan også være mange forskellige celletyper, der findes i de fleste vævssnit bruges af laboratoriet som interne negative kontrolsteder for at verificere IHC's ydeevne specifikationer. Typer og kilder til prøver, der kan bruges til negativt væv kontroller er angivet i afsnittet Ydelsesegenskaber.

Hvis der forekommer specifik farvning (falsk positiv farvning) i den negative vævskontrol, bør resultaterne med patientprøverne betragtes som ugyldige.

### Uspecifik negativ reagenskontrol:

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Danish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Brug en uspecifik negativ reagenskontrol i stedet for det primære antistof med et udsnit af hver patientprøve til at evaluere uspecifik farvning og tillade bedre fortolkning af specifik farvning på antigenstedet. Ideelt set indeholder en negativ reagenskontrol et antistof produceret og forberedt (dvs. fortyndet til samme koncentration ved hjælp af samme fortyndingsmiddel) til brug på samme måde som det primære antistof, men udviser ingen specifik reaktivitet med humant væv i samme matrix/oplosning som primært antistof. Fortyndingsmiddel alene kan anvendes som et mindre ønskeligt alternativ til de tidligere beskrevne negative reagenskontroller. Inkubationsperioden for den negative reagenskontrol skal svare til den for det primære antistof.

Når paneler af flere antistoffer anvendes på serielle snit, kan de negativt farvningsområder på et objektglas tjene som en negativ/uspecifik bindingsbaggrundskontrol for andre antistoffer. For at differentiere endogen enzymaktivitet eller uspecifik binding af enzymer fra specifik immunreakтивitet, kan yderligere patientvæv udelukkende farves med henholdsvis substrat-chromogen eller enzymkompleksler (PAP, avidin-biotin, streptavidin) og substrat-chromogen.

#### Assaybekræftelse:

Før den første brug af et antistof eller farvingssystem i en diagnostisk procedure, skal brugeren verificere antistoffets specificitet ved at teste det på en række interne væv med kendte immunhistokemiske præstationskarakteristika, der repræsenterer kendte positive og negative væv. Se de kvalitetskontrolprocedurer, der tidligere er beskrevet i dette afsnit af produktindlægget og til kvalitetskontrolanbefalingerne fra CAP-certificeringsprogrammet<sup>10</sup> til immunhistokemi og/eller NCCLS IHC guideline<sup>11</sup>. Disse kvalitetskontrolprocedurer bør gentages for hvert nyt antistoflot, eller når der er en ændring i assayparametrene. Væv, der er angivet i afsnittet Ydelsesegenskaber, er egnede til assayverifikation.

#### **Fejlfinding:**

Følg de antistofspecifikke protokolanbefalinger i henhold til det medfølgende datablad. Hvis der opstår atypiske resultater, skal du kontakte Biocares tekniske support på 1-800-542-2002.

#### **Fortolkning af farvning:**

Betazoid DAB Chromogen Kit producerer en brunfarvereaktion på antigenstederne lokaliseret af det primære antistof. Inden fortolkning af patientresultater skal farvningen af kontroller evalueres af en kvalificeret patolog. Negative kontroller evalueres og sammenlignes med farvede objektglas for at sikre, at enhver observeret farvning ikke er et resultat af uspecifikke interaktioner.

#### **Positiv vævskontrol:**

Den positive vævskontrol farvet med det angivne antistof bør undersøges først for at sikre, at alle reagenser fungerer korrekt. Den passende farvning af målceller (som angivet ovenfor) er tegn på positiv reaktivitet. Hvis de positive vævskontroller ikke viser positiv farvning, bør alle resultater med testprøverne betragtes som ugyldige.

Farven på reaktionsproduktet kan variere afhængigt af de anvendte substratkromogener. Se substratets indlægssejler for forventede farvereaktioner. Yderligere kan metakromasi observeres i variationer af farvningsmetoden.<sup>12</sup>

Når der anvendes en modfarvning, vil modfarvning, afhængigt af inkubationsstænget og styrken af den anvendte modfarvning, resultere i en farvning af cellekerne. Overdreven eller ufuldstændig modfarvning kan kompromittere korrekt fortolkning af resultater. Se protokollen(er) for anbefalet modfarvning.

#### **Negativ vævskontrol:**

Den negative vævskontrol bør undersøges efter den positive vævskontrol for at verificere specificiteten af mærkningen af målantigenet med det primære antistof. Fraværet af specifik farvning i den negative vævskontrol bekræfter manglen på antistofkrydsreaktivitet over for celler/cellulære komponenter. Hvis specifik farvning (falsk positiv farvning) forekommer i den negative eksterne vævskontrol, bør resultaterne med patientprøven betragtes som ugyldige.

Uspecifik farvning, hvis den er til stede, har normalt et diffust udseende. Sporadisk farvning af bindevæv kan også observeres i snit fra formalinfikseret væv. Brug intakte celler til fortolkning af farvningresultater. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte uspecifikt.

#### **Patientvæv:**

Undersøg patientprøver farvet med angivet antistof sidst. Positiv farvningsintensitet bør vurderes i sammenhæng med enhver uspecifik baggrundsfarvning af den negative reagenskontrol. Som med enhver immunhistokemisk test betyder et negativt resultat, at antigenet ikke blev påvist, ikke at antigenet var fraværende i de analyserede celler/væv. Brug om nødvendigt et panel af antistoffer til at identificere falsk-negative reaktioner.

Se Resumé og forklaring, begrænsninger og ydeevnekarakteristika for specifik information vedrørende indiceret antistof-immunreaktivitet.

#### **Begrænsninger:**

##### Generelle begrænsninger:

1. *Til/in vitro diagnostisk (IVD) brug*
2. Dette produkt er kun til professionel brug: Immunhistokemi er en flertrins diagnostisk proces, der består af specialiseret træning i udvælgelsen af de passende reagenser; vævsudvælgelse, fiksering og behandling; forberedelse af IHC-glassen; og fortolkning af farvningresultaterne.
3. Kun til brug efter lægerecept. (Kun Rx)
4. Vævsfarvning er afhængig af håndtering og behandling af vævet før farvning. Forkert fiksering, frysning, optønning, vask, tørring, opvarmning, sektionering eller kontaminering med andre væv eller væsker kan producere artefakter, antistoffangning eller falsk negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variationer i fikserings- og indlejningsmetoder eller iboende uregelmæssigheder i vævet.<sup>14</sup>
5. Overdreven eller ufuldstændig modfarvning kan kompromittere korrekt fortolkning af resultater.
6. Den kliniske fortolkning af enhver positiv eller negativ farvning bør evalueres i sammenhæng med klinisk præsentation, morfologi og andre histopatologiske kriterier. Den kliniske fortolkning af enhver positiv eller negativ farvning bør suppleres med morfologiske undersøgelser med korrekte positive og negative interne og eksterne kontroller samt andre diagnostiske tests. Det er en kvalificeret patologs ansvar, som er fortrolig med den korrekte brug af IHC-antistoffer, reagenser og metoder, at fortolke alle de trin, der bruges til at forberede og fortolke det endelige IHC-præparat.
7. De optimale protokoller til en specifik applikation kan variere. Disse omfatter, men er ikke begrænset til fiksering, varmehentningsmetode, inkubationstider, antistoffortyndning, vævssnitlykkelse og det anvendte detektionskit. Se instruktionerne til det primære antistof og andre hjælpereagenser til brug for anbefaede protokoller og betingelser for brug. Databladets anbefalinger og protokoller er baseret på eksklusiv brug af Biocare-produkter. I sidste ende er det efterforskerens ansvar at bestemme optimale forhold.
8. Dette produkt er ikke beregnet til brug i flowcytometri. Ydeevnekarakteristika er ikke blevet bestemt for flowcytometri.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Danish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

9. Væk fra personer inficeret med hepatitis B-virus og indeholdende hepatitis B-overfladeantigen (HBsAg) kan udvise uspecifik farvning med peberrodsperoxidase.<sup>14</sup>
10. Reagenser kan udvise uventede reaktioner i tidligere utestede væv. Muligheden for uventede reaktioner selv i testede vævsgrupper kan ikke fuldstændigt elimineres på grund af biologisk variabilitet af antigenekspression i neoplasmmer eller andre patologiske væv.<sup>15</sup> Kontakt Biocares tekniske support på 1-800-542-2002 eller via de tekniske supportoplysninger, der er angivet på biocare.net, med dokumenterede uventede reaktioner.
11. Normale/ikke-immune sera fra samme dyrekilde som sekundære antisera, der anvendes i blokeringstrin, kan forårsage falsk-negative eller falsk-positive resultater på grund af autoantistoffer eller naturlige antistoffer.
12. Falsk-positive resultater kan ses på grund af ikke-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan også være forårsaget af pseudoperoxidaseaktivitet (erythrocytter), endogen peroxidaseaktivitet (cytochrom C) eller endogen biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre) afhængigt af den anvendte type immunfarvning.<sup>13</sup>
13. Et negativt resultat betyder, at antigenet ikke blev påvist, ikke at antigenet var fraværende i de undersøgte celler eller væv.

#### Produktspecifikke begrænsninger:

Ingen yderligere produktspecifikke begrænsninger

#### Ydelseskarakteristika:

Farvning blev udført ved hjælp af protokoller, der er angivet i de antistofspecifikke brugsanvisninger eller som specificeret. Sensitivitet og specifitet af farvning blev evalueret på tværs af en række normale og neoplastiske vævtyper evalueret under udvikling af primære antistoffer.

#### Reproducerbarhed:

Reproducerbarheden af Biocares detektionssystemer og systemreagenser verificeres gennem en måling af mellemprecision, hvor forskellige reagenslots blev testet over en længere periode ved hjælp af forskellige operatører, analytikere, reagenslots, vævsprøver og udstyr. Farvningen opnået for hvert detektionsreagens, der blev evalueret, var konsistent og udført som forventet.

#### Fejlfinding:

1. Ingen farvning af nogen objektglas – Tjek for at fastslå, om der er brugt passende positivt kontrolvæv, antistof og detektionsprodukter. Tjek for fuldstændig eller ukorrekt voksfjernelse eller forbehandling.
2. Svag farvning af alle objektglas – Tjek for at fastslå, om der er anvendt passende positivt kontrolvæv, antistof og detektionsprodukter.
3. Overdreven baggrund af alle objektglas - Der kan være høje niveauer af endogen biotin (hvis der bruges biotinbaserede detektionsprodukter), endogen HRP-aktivitet, der omdanner kromogen til farvet slutprodukt (brug peroxidaseblok) eller overskydende uspecifik proteininteraktion (brug et protein blokering, såsom serum- eller kaseinbaseret blokeringsoplosning).
4. Vævssekctioner vasker objektglas af under inkubation – Tjek objektglas for at sikre, at de er positivt ladede.
5. Specifik farvning for mørk – Tjek protokollen for at bestemme, om korrekt antistoftiter blev anvendt på objektglasset, samt korrekte inkubationstider for alle reagenser. Sørg desuden for, at protokollen har nok vasketrin til at fjerne overskydende reagenser, efter at inkubationstrinene er afsluttet.

#### Referencer:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Dutch

**BIOCARE**  
MEDICAL

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Beoogd gebruik:

Voor *in vitro* Diagnostisch gebruik

DeBetazoid DAB-chromogeenkit is bedoeld voor gebruik in handmatige of geautomatiseerde immunohistochemische (IHC) kleuringsprotocollen voor de detectie van doelantigenen in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE) weefsels bij gebruik in combinatie met het juiste detectiesysteem en primaire antilichamen. De klinische interpretatie van eventuele kleuringen of de afwezigheid ervan moet worden aangevuld met morfologisch onderzoek en goede controles, en moet worden geëvalueerd binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests door een gekwalificeerde patholoog.

## Samenvatting en uitleg:

3,3' Diaminobenzidine (DAB) is een beproefd chromogeen dat wordt gebruikt in IHC-kleuringsprotocollen en dat in aanwezigheid van een mierikswortelperoxidase (HRP)-enzym een bruin neerslag produceert dat onoplosbaar is in organische oplosmiddelen en kan worden afgedekt met een permanent montagemedium. Dit product wordt geleverd in een tweecomponentensysteem bestaande uit een vloeibaar stabiel DAB-chromogeen en een DAB-substraatbuffer. De kleur van het chromogeenbuffermengsel kan variëren van kleurloos tot lichtbruin. De kleureigenschappen worden niet beïnvloed door de kleur van het chromogeenbuffermengsel. Betazoid DAB is een formulering die zeer stabiel is. Betazoid DAB kan zowel handmatig als op automatische kleurmachines worden gebruikt.

## Principe van procedure:

De DAB-chromogeen in de Betazoid DAB Chromogen Kit maakt, wanneer gebruikt bij IHC-testen van FFPE-weefselcoupes, de visualisatie van antigenen mogelijk via de sequentiële toepassing van een specifiek antilichaam tegen het antigen (primair antilichaam), een secundair antilichaam tegen het primaire antilichaam (optioneel verbindingsantilichaam/probe), een enzymcomplex en een chromogeen substraat met tussenliggende wasstappen. De enzymatische activering van het chromogeen resulteert in een zichtbaar reactieproduct op de antigenplaats. Het monster kan vervolgens worden tegengekleurd en afgedekt. De resultaten worden geïnterpreteerd met behulp van een lamp microscoop en hulp bij de differentiële diagnose van pathofysiologische processen, die mogelijk is mogelijk niet geassocieerd met een bepaald antigen.

## Materialen en methodes:

### Meegeleverde reagentia:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Reconstitutie, mengen, verdunnen, titratie:

De Betazoid DAB Chromogen Kit is geoptimaliseerd voor gebruik met Biocare-antilichamen en hulpreagentia en moet vlak voor gebruik worden verdunt. Meng 1 druppel (32 µl) DAB-chromogeen per 1,0 ml DAB-substraatbuffer. De DAB-werkoplossing is 5 dagen stabiel indien bewaard bij 2-8°C.

## Bekende toepassing:

Immunohistochemie (formaline-gefixeerde, in paraffine ingebedde weefsels)

## Geleverd als:

*Betazooide DAB-chromogeen*

DAB-oplossing. Zie het veiligheidsinformatieblad voor aanvullende details.

*Betazoid DAB-substraatbuffer*

Gebufferde oplossing bevat 3% waterstofperoxide-oplossing. Zie het veiligheidsinformatieblad voor aanvullende details.

## Materialen en reagentia die nodig zijn, maar niet worden meegeleverd:

Microscoogglaasjes, positief geladen

Positieve en negatieve weefselcontroles

Woestijnkamer\* of soortgelijke droogoven (optioneel)

Xyleen of xyleenvervanger

Ethanol of reagensalcohol

Onthulkamer\* of soortgelijke snelkookpan (optioneel)

Gedeioniseerd of gedestilleerd water

Wasbuffer\*

Voorbehandelingsreagentia\* (optioneel)

Enzymvertering\* (optioneel)

Peroxidaseblok\*

Eiwitblok\* (optioneel)

Primair antilichaam\*

Negatieve controlereagentia\*

Detectiekits\*

Hematoxyline\* (tegenkleuring)

Blauwingsreagens\*

Montagmedium\*

Dekglaasje

Lichtmicroscoop (40-400x vergroting)

\* Biocare Medical Products: Raadpleeg de Biocare Medical-website op <http://biocare.net> voor informatie over catalogusnummers en bestellingen. Bepaalde hierboven genoemde reagentia zijn gebaseerd op de specifieke toepassing en het gebruikte detectiesysteem.

## Opslag en stabiliteit:

Bewaren bij 2°C tot 8°C. Het product is stabiel tot de vervaldatum die op het etiket van de injectieflacon staat, wanneer het onder deze omstandigheden wordt bewaard. Niet gebruiken na de vervaldatum. Opslag onder alle andere omstandigheden dan gespecificeerd moet worden geverifieerd. Verdunde reagentia moeten onmiddellijk worden gebruikt volgens de instructies. Ongebruikt verdund reagens is 5 dagen stabiel als het bij 2-8°C wordt bewaard. De stabiliteit van door de gebruiker verdund reagens na 5 dagen is niet vastgesteld door Biocare.

Positieve en negatieve controles moeten gelijktijdig met alle patiëntmonsters worden uitgevoerd. Als er onverwachte kleuring wordt waargenomen die niet kan worden verklaard door variaties in laboratoriumprocedures en er wordt vermoed dat er een probleem is met het antilichaam, neem dan contact op met de technische ondersteuning van Biocare op 1-800-542-2002 of via de technische ondersteuningsinformatie op biocare.net.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Dutch

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Monstervoorbereiding:

In formaline gefixeerde weefsels zijn geschikt voor gebruik vóór het inbedden in paraffine. Botweefsel moet vóór de weefselverwerking worden ontkalkt om het snijden van het weefsel te vergemakkelijken en schade aan de microtoombladen te voorkomen.<sup>1,2</sup>

Goed gefixeerde en ingebedde weefsels die het gespecificeerde antigeendoel tot expressie brengen, moeten op een koele plaats worden bewaard. De Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) van 1988 vereist 42 CFR§493.1259(b) dat "Het laboratorium gekleurde objectglaasjes ten minste tien jaar vanaf de datum van onderzoeken en monsterblokken ten minste twee jaar na de datum van onderzoek bewaren."<sup>3</sup>

## Behandeling van weefsels voorafgaand aan kleuring:

Voer Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) uit volgens het aanbevolen protocol hieronder. Er is aangetoond dat het routinematische gebruik van HIER voorafgaand aan IHC de inconsistentie minimaliseert en de kleuring standaardiseert.<sup>4,5</sup>

## Waarschuwing en voorzorgsmaatregelen:

1. Het is bekend dat DAB vermoedelijk kankerverwekkend is.
2. Stel DAB-componenten niet bloot aan fel licht of direct zonlicht
3. DAB kan overgevoeligheid van de huid veroorzaken. Vermijd contact met huid en ogen.
4. Draag handschoenen en beschermende kleding en neem redelijke voorzorgsmaatregelen bij het hanteren, aangezien DAB als een gevaar is geclassificeerd en kanker kan veroorzaken en waarvan wordt vermoed dat het genetische defecten veroorzaakt.
5. Behandel materialen van menselijke of dierlijke oorsprong als potentieel biologisch gevaarlijk en voer dergelijke materialen met de juiste voorzorgsmaatregelen af. Volg in geval van blootstelling de gezondheidsrichtlijnen van de verantwoordelijke autoriteiten waar het wordt gebruikt.<sup>6,7</sup>
6. Monsters, voor en na fixatie, en alle materialen die eraan worden blootgesteld, moeten worden behandeld alsof ze infecties kunnen overbrengen, en moeten met de juiste voorzorgsmaatregelen worden verwijderd. Pipetteer reagentia nooit via de mond en vermijd contact van de huid en slijmvliezen met reagentia en monsters. Als reagentia of monsters in contact komen met gevoelige gebieden, spoel ze dan met grote hoeveelheden water.<sup>8</sup>
7. Microbiële contaminatie van reagentia kan resulteren in een toename van niet-specificke kleuring.
8. Andere incubatietijden of temperaturen dan gespecificeerd kunnen foutieve resultaten opleveren. De gebruiker moet een dergelijke wijziging valideren.
9. Gebruik geen reagens na de vervaldatum die op de injectieflacon staat vermeld.
10. De reagens(en) van de micropolymerdetectiekits zijn geoptimaliseerd en klaar voor gebruik met Biocare-antilichamen en aanvullende reagentia. Raadpleeg de gebruiksaanwijzingen voor het primaire antilichaam en andere aanvullende reagentia voor aanbevolen protocollen en gebruiksomstandigheden.
11. Volg de plaatselijke en/of nationale vereisten voor de verwijderingsmethode.
12. Het veiligheidsinformatieblad is op verzoek verkrijgbaar en bevindt zich op <http://biocare.net>.
13. Meld eventuele ernstige incidenten met betrekking tot dit apparaat door contact op te nemen met de plaatselijke Biocare-vertegenwoordiger en de toepasselijke bevoegde autoriteit van de lidstaat of het land waar de gebruiker zich bevindt.

Deze chromogenkit bevat componenten die zijn geclassificeerd zoals aangegeven in de onderstaande tabel in overeenstemming met Verordening (EG) nr. 1272/2008

Gevaar	Code	Gevarenaanduiding
	H314 H350	Verdacht van het veroorzaken van genetische schade. Kan kanker veroorzaken

## Gebruiksaanwijzing:

De chromogenkit-reagentia zijn geoptimaliseerd voor gebruik met Biocare-antilichamen en aanvullende reagentia. Raadpleeg de gebruiksaanwijzingen voor het primaire antilichaam en andere aanvullende reagentia voor aanbevolen protocollen en gebruiksomstandigheden. De incubatietijden en -temperaturen zullen variëren afhankelijk van het gevolgde specifieke antilichaamprotocol.

Wanneer u een geautomatiseerd kleuringsinstrument gebruikt, raadpleeg dan de specifieke bedieningshandleiding van het instrument en de gebruiksinstructies voor de bedrijfsparameters.

## Algemene procedurestappen voor het uitvoeren van IHC:

1. Deparaffineren: Deparaffineer objectglaasjes in Slide Brite of xyleen. Hydrateer dia's in een reeks gesorteerde alcoholen tot water.
2. Peroxide Block: Blokkeer gedurende 5 minuten met Peroxidized 1.
3. Voorbehandelingsoplossing/protocol: Raadpleeg het betreffende gegevensblad voor primaire antilichamen voor de aanbevolen voorbehandelingsoplossing en het protocol.
4. Eiwitblok (optioneel): Incubeer gedurende 5-10 minuten bij kamertemperatuur (RT) met Background Punisher.
5. Primair antilichaam: Raadpleeg het betreffende gegevensblad voor het primair antilichaam voor de incubatietijd.
6. Probe (alleen muizenantilichamen): Incubeer gedurende 5-15 minuten bij kamertemperatuur met MACH 4 Mouse Probe.
7. Polymeer: Incubeer gedurende 10-20 minuten voor muizenantilichamen of 30 minuten voor konijnenantilichamen bij kamertemperatuur met MACH 4 HRP-polymeer.
8. Chromogen: Incubeer gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur met DAB van Biocare.
9. Tegenkleuring: Tegenkleuring met hematoxyline. Spoelen met gedeioniseerd water. Breng Tacha's Blueing Solution aan gedurende 1 minuut. Spoelen met gedeioniseerd water.

## Technische opmerkingen:

1. Gebruik TBS voor wasstappen.

## Kwaliteitscontrole:

Raadpleeg de CLSI-kwaliteitsnormen voor ontwerp en implementatie van immunohistochemische tests; Goedgekeurde richtlijn-tweede editie (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

## Positieve weefselcontrole:

Externe positieve controlematerialen moeten verse monsters zijn die zo snel mogelijk op dezelfde manier zijn gefixeerd, verwerkt en ingebed als de patiëntmonsters. Positieve weefselcontroles duiden op correct geprepareerde weefsels en juiste kleuringstechnieken. Bij elke kleuringstrun moet voor elke reeks testomstandigheden één positieve externe weefselcontrole worden meegenomen.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Dutch

**BIOCARE**  
M E D I C A L

De weefsels die voor de externe positieve controlematerialen worden gebruikt, moeten worden geselecteerd uit patiëntenpecimens met goed gekarakteriseerde lage niveaus van de positieve doelactiviteit die een zwakke positieve kleuring veroorzaken. Het lage niveau van positiviteit voor externe positieve controles is zo ontworpen dat detectie van subtiele veranderingen in de primaire antilichaamgevoeligheid als gevolg van instabiliteit of problemen met de IHC-methodologie wordt gegarandeerd. In de handel verkrijgbare objectglaasjes of monsters voor weefselcontrole die op een andere manier zijn verwerkt dan het/de patiëntmonster(s), valideren alleen de prestaties van het reagens en verifiëren de weefselpreparatie niet.

Bekende positieve weefselcontroles mogen alleen worden gebruikt voor het monitoren van de juiste prestatie van verwerkte weefsels en testreagentia, en niet als hulpmiddel bij het formuleren van een specifieke diagnose van patiëntmonsters. Als de positieve weefselcontroles geen positieve kleuring vertonen, moeten de resultaten met de testmonsters als ongeldig worden beschouwd.

## Negatieve weefselcontrole:

Gebruik bij elke kleuringsrun een negatieve weefselcontrole die is gefixeerd, verwerkt en ingebed op een manier die identiek is aan het/de patiëntmonster(s) om de specificiteit van het primaire IHC-antilichaam te verifiëren. demonstratie van het doelantigeen, en om een indicatie te geven van specifieke achtergrondkleuring (vals-positieve kleuring). Ook de verscheidenheid aan verschillende celtypen die in de meeste weefselcoupes aanwezig zijn, kan dat doen door het laboratorium worden gebruikt als interne negatieve controlelocaties om de prestaties van de IHC te verifiëren specificaties. De soorten en bronnen van specimens die voor negatief weefsel kunnen worden gebruikt bedieningselementen vindt u in het gedeelte Prestatiekenmerken.

Als er specifieke kleuring (vals-positieve kleuring) optreedt in de negatieve weefselcontrole, moeten de resultaten met de patiëntenpecimens als ongeldig worden beschouwd.

## Niet-specifieke negatieve reagenscontrole:

Gebruik een niet-specifieke negatieve reagenscontrole in plaats van het primaire antilichaam met een deel van elk patiëntmonster om niet-specifieke kleuring en maken een betere interpretatie van specifieke kleuring op de antigenplaats mogelijk. Idealliter bevat een negatieve reagenscontrole een antilichaam dat is geproduceerd en bereid (d.w.z. verduld tot dezelfde concentratie met hetzelfde verdunningsmiddel) voor gebruik op dezelfde manier als het primaire antilichaam, maar vertoont geen specifieke reactiviteit met menselijke weefsels in dezelfde matrix/oplossing als het primair antilichaam. Alleen verdunningsmiddel kan worden gebruikt als een minder wenselijk alternatief voor de eerder beschreven negatieve reagenscontroles. De incubatietijd voor de negatieve reagenscontrole moet overeenkomen met die van het primaire antilichaam.

Wanneer op seriële secties panels van verschillende antilichamen worden gebruikt, kunnen de negatief kleurende gebieden van één objectglaasje dienen als een negatieve/niet-specifieke bindende achtergrondcontrole voor andere antilichamen. Om endogene enzymactiviteit of niet-specifieke binding van enzym te onderscheiden van specifieke immuunreactiviteit, kunnen aanvullende patiëntweefsels uitsluitend worden gekleurd met respectievelijk substraat-chromogeen of enzymcomplexen (PAP, avidine-biotine, streptavidine) en substraat-chromogeen.

## Assayverificatie:

Voorafgaand aan het eerste gebruik van een antilichaam of kleursysteem in een diagnostische procedure moet de gebruiker de specificiteit van het antilichaam verifiëren door het te testen op een reeks interne weefsels met bekende immunohistochemische prestatiekenmerken die bekende positieve

en negatieve weefsels vertegenwoordigen. Raadpleeg de kwaliteitscontroleprocedures die eerder in dit gedeelte van de productbijsluiter zijn beschreven en de aanbevelingen voor kwaliteitscontrole van het CAP-certificeringsprogramma<sup>10</sup> voor immunohistochemie en/of de NCCLS IHC-richtlijn<sup>11</sup>. Deze kwaliteitscontroleprocedures moeten worden herhaald voor elke nieuwe partij antilichamen, of telkens wanneer er een verandering in de testparameters optreedt. Weefsels vermeld in de sectie Prestatiekenmerken zijn geschikt voor assayverificatie.

## Probleemoplossen:

Volg de antilichaamspecifieke protocolaanbevelingen volgens het meegeleverde gegevensblad. Als er atypische resultaten optreden, neem dan contact op met de technische ondersteuning van Biocare op 1-800-542-2002.

## Interpretatie van kleuring:

De Betazoid DAB Chromogen Kit produceert een bruine kleurreactie op de antigenplaatsen die door het primaire antilichaam zijn gelokaliseerd. Voordat de patiëntresultaten worden geïnterpreteerd, moet de kleuring van controles worden beoordeeld door een gekwalificeerde patholoog. Negatieve controles worden geëvalueerd en vergeleken met gekleurde objectglaasjes om er zeker van te zijn dat eventuele waargenomen kleuring niet het resultaat is van niet-specifieke interacties.

## Positieve weefselcontrole:

De positieve weefselcontrole, gekleurd met het aangegeven antilichaam, moet eerst worden onderzocht om er zeker van te zijn dat alle reagentia goed functioneren. De juiste kleuring van doelcellen (zoals hierboven aangegeven) is indicatief voor positieve reactiviteit. Als de positieve weefselcontroles geen positieve kleuring vertonen, moeten alle resultaten met de testmonsters als ongeldig worden beschouwd.

De kleur van het reactieproduct kan variëren afhankelijk van de gebruikte substraatchromogeenen. Raadpleeg de bijsluuters van het substraat voor de verwachte kleurreacties. Verder kan metachromasie worden waargenomen bij variaties op de kleuringsmethode.<sup>12</sup>

Wanneer een tegenkleuring wordt gebruikt, zal de tegenkleuring, afhankelijk van de incubatieduur en de sterke van de gebruikte tegenkleuring, resulteren in een verkleuring van de celkernen. Overmatige of onvolledige tegenkleuring kan de juiste interpretatie van de resultaten in gevaar brengen. Raadpleeg protocol(len) voor aanbevolen tegenkleuring.

## Negatieve weefselcontrole:

De negatieve weefselcontrole moet na de positieve weefselcontrole worden onderzocht om de specificiteit van de labeling van het doelantigeen door het primaire antilichaam te verifiëren. De afwezigheid van specifieke kleuring in de negatieve weefselcontrole bevestigt het ontbreken van kruisreactiviteit van antilichamen met cellen/cellulaire componenten. Als er specifieke kleuring (vals-positieve kleuring) optreedt in de negatieve externe weefselcontrole, moeten de resultaten met het patiëntmonster als ongeldig worden beschouwd.

Niet-specifieke kleuring, indien aanwezig, heeft gewoonlijk een diffus uiterlijk. Sporadische kleuring van bindweefsel kan ook worden waargenomen in coupes van overmatig formalinegefixeerd weefsel. Gebruik intacte cellen voor de interpretatie van kleuringsresultaten. Necrotische of gedegenererde cellen kleuren vaak niet-specifiek.

## Patiëntenweefsel:

Onderzoek patiëntenpecimens die zijn gekleurd met het aangegeven antilichaam laatst. De positieve kleurintensiteit moet worden beoordeeld binnen de context van eventuele niet-specifieke achtergrondkleuring van de negatieve reagenscontrole. Zoals bij elke immunohistochemische test betekent een negatief resultaat dat het antigeen niet is gedetecteerd, en niet

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Dutch

**BIOCARE**  
M E D I C A L

dat het antigeen afwezig was in de geteste cellen/weefsels. Gebruik indien nodig een panel antilichamen om vals-negatieve reacties te identificeren.

Raadpleeg de Samenvatting en uitleg, beperkingen en prestatiekenmerken voor specifieke informatie over de aangegeven immunoreactiviteit van antilichamen.

## Beperkingen:

### Algemene beperkingen:

1. Voor *in vitro* diagnostisch (IVD) gebruik
2. Dit product is uitsluitend bedoeld voor professioneel gebruik: Immunohistochemie is een uit meerdere stappen bestaand diagnostisch proces dat bestaat uit gespecialiseerde training in de selectie van de juiste reagentia; weefselselectie, fixatie en verwerking; voorbereiding van het IHC-glaasje; en interpretatie van de kleuringsresultaten.
3. Alleen voor gebruik op doktersvoorschrift. (Alleen Rx)
4. Weefselkleuring is afhankelijk van de behandeling en verwerking van het weefsel voorafgaand aan de kleuring. Onjuiste fixatie, invriezen, onttdooien, wassen, drogen, verwarmen, snijden of contaminatie met andere weefsels of vloeistoffen kan artefacten, het opsluiten van antilichamen of vals-negatieve resultaten veroorzaken. Inconsistente resultaten kunnen te wijten zijn aan variaties in de fixatie- en inbeddingssmethoden, of aan inherente onregelmatigheden in het weefsel.<sup>14</sup>
5. Overmatige of onvolledige tegenkleuring kan de juiste interpretatie van de resultaten in gevaar brengen.
6. De klinische interpretatie van elke positieve of negatieve kleuring moet worden beoordeeld binnen de context van de klinische presentatie, morfologie en andere histopathologische criteria. De klinische interpretatie van elke positieve of negatieve kleuring moet worden aangevuld met morfologisch onderzoek waarbij gebruik wordt gemaakt van de juiste positieve en negatieve interne en externe controles, evenals andere diagnostische tests. Het is de verantwoordelijkheid van een gekwalificeerde patholoog die bekend is met het juiste gebruik van IHC-antilichamen, reagentia en methoden om alle stappen te interpreteren die worden gebruikt om het uiteindelijke IHC-preparaat voor te bereiden en te interpreteren.
7. De optimale protocollen voor een specifieke toepassing kunnen variëren. Deze omvatten, maar zijn niet beperkt tot, fixatie, warmtegewinningsmethode, incubatiertijden, antilichaamverdunning, dikte van de weefselsectie en de gebruikte detectiekit. Raadpleeg de gebruiksaanwijzingen voor het primaire antilichaam en andere aanvullende reagentia voor aanbevolen protocollen en gebruiksomstandigheden. De aanbevelingen en protocollen in het gegevensblad zijn gebaseerd op exclusief gebruik van Biocare-producten. Uiteindelijk is het de verantwoordelijkheid van de onderzoeker om optimale omstandigheden te bepalen.
8. Dit product is niet bedoeld voor gebruik bij flowcytometrie. Prestatiekenmerken zijn niet bepaald voor flowcytometrie.
9. Weefsels van personen die zijn geïnfecteerd met het hepatitis B-virus en die hepatitis B-oppervlakteantigenen (HBsAg) bevatten, kunnen niet-specificke kleuring vertonen met mierikswortelperoxidase.<sup>14</sup>
10. Reagentia kunnen onverwachte reacties vertonen in niet eerder geteste weefsels. De mogelijkheid van onverwachte reacties, zelfs in geteste weefselgroepen, kan niet volledig worden uitgesloten vanwege de biologische variabiliteit van antigeenexpressie in neoplasmata of andere pathologische weefsels.<sup>15</sup> Neem contact op met de technische ondersteuning van Biocare op 1-800-542-2002, of via de technische ondersteuningsinformatie op biocare.net, met gedocumenteerde onverwachte reactie(s).
11. Normale/niet-immune sera uit dezelfde dierlijke bron als secundaire antisera die bij blokkingsstappen worden gebruikt, kunnen vals-negatieve of vals-positieve resultaten veroorzaken als gevolg van auto-antilichamen of natuurlijke antilichamen.

12. Er kunnen vals-positieve resultaten optreden als gevolg van niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten. Ze kunnen ook worden veroorzaakt door pseudo-peroxidase-activiteit (erytrocyten), endogene peroxidase-activiteit (cytochrom C) of endogene biotine (bijv. Lever, borst, hersenen, nier), afhankelijk van het gebruikte type immunokleuring.<sup>13</sup>
13. Een negatief resultaat betekent dat het antigeen niet is gedetecteerd en niet dat het antigeen afwezig is in de onderzochte cellen of weefsels.

### Productspecifieke beperkingen:

Geen aanvullende productspecifieke beperkingen

## Prestatiekenmerken:

De kleuring werd uitgevoerd met behulp van de protocollen die in de antilichaamspecifieke gebruiksinstructies zijn vermeld of zoals gespecificeerd. De gevoeligheid en specificiteit van de kleuring werden geëvalueerd voor een reeks normale en neoplastische weefseltypen die werden beoordeeld tijdens de ontwikkeling van primaire antilichamen.

## Reproduceerbaarheid:

De reproduceerbaarheid van de detectiesystemen en systeemreagentia van Biocare wordt geverifieerd door middel van een meting van gemiddelde nauwkeurigheid, waarbij verschillende partijen reagens gedurende een langere periode werden getest met behulp van verschillende operators, analisten, partijen reagens, weefselmonsters en apparatuur. De kleuring die voor elk geëvalueerd detectiereagens werd verkregen, was consistent en werd uitgevoerd zoals verwacht.

## Probleemplossen:

1. Geen kleuring van objectglaasjes – Controleer of er geschikt positief controleweefsel, antilichaam en detectieproducten zijn gebruikt. Controleer op onvolledige of onjuiste wasverwijdering of voorbehandeling.
2. Zwakke kleuring van alle objectglaasjes – Controleer of er geschikt positief controleweefsel, antilichaam en detectieproducten zijn gebruikt.
3. Overmatige achtergrond van alle objectglaasjes – Er kunnen hoge niveaus van endogene biotine zijn (bij gebruik van op biotine gebaseerde detectieproducten), endogene HRP-activiteit die chromogeen omzet in gekleurd eindproduct (gebruik peroxidaseblok) of overmatige niet-specifieke eiwitinteractie (gebruik een eiwit blok, zoals een blokkeeroplossing op basis van serum of caseïne).
4. Weefselcoupes worden tijdens de incubatie van de objectglaasjes gewassen – Controleer de objectglaasjes om er zeker van te zijn dat ze positief geladen zijn.
5. Specifieke kleuring te donker – Controleer het protocol om te bepalen of de juiste antilichaamtiter op het objectglaasje is aangebracht, evenals de juiste incubatiertijden voor alle reagentia. Zorg er bovendien voor dat het protocol voldoende wasstappen heeft om overtollige reagentia te verwijderen nadat de incubatiestappen zijn voltooid.

## Referenties:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

33/18



## Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Dutch

**BIOCARE**  
M E D I C A L

6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Lab Med* 1983; 14:767.
14. 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. *AmJ Clin Path* 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfent EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Estonian

**BIOCARE**  
MEDICAL

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Mõeldud kasutamiseks:

Sest *in vitro* Diagnostiline kasutamine

The Betazoid DAB kromogeeni komplekton mõeldud kasutamiseks kas käitsi või automatiseritud immunohistokeemia (IHC) värvimisprotokollides sihtantigenide tuvastamiseks formaliniga fikseeritud, parafiiniga manustatud (FFPE) kudedes, kui seda kasutatakse koos sobiva tuvastamissüsteemi ja primaarsete antikehadega. Mis tahes värvimise või selle puudumise kliinilist tõlgendamist peaksid täiendama morfoloogilised uuringud ja nõuetekohased kontrollid ning kvalifitseeritud patoloog peaks seda hindama patsiendi kliinilise ajaloo ja muude diagnostiliste testide kontekstis.

## Kokkuvõte ja selgitus:

3,3' diaminobensiidi (DAB) on väljakujunenud kromogeen, mida kasutatakse IHC värvimisprotokollides, mis ensüümi mädarööka peroksidaasi (HRP) juuresolekul tekitab pruuni sademe, mis ei lahustu orgaanilistes lahustites ja mida saab katta püsiva paigalduskandjaga. See toode on saadaval kahekomponeentilises süsteemis, mis koosneb vedelikukindlast DAB-kromogeenist ja DAB-substraadipuhrist. Kromogeense puhversegu värvus võib varieeruda värvitust kuni kahvatupruunini. Värvimisomadusi ei mõjuta kromogeeni puhversegu värvus. Betazoid DAB on väga stabiilne ravimvorm. Betazoid DAB-i saab kasutada nii käsitsi kui ka automatiseritud värvimisseadmetel.

## Menetluse põhimõte:

See Betazoid DAB kromogeenkomplekti DAB kromogeen, mida kasutatakse FFPE koelöökude IHC testimisel, võimaldab antigeene visualiseerida järgestikulise antigeeni vastane spetsiifiline antikeha (primaarne antikeha), primaarse antikeha sekundaarne antikeha (valikuline linkantikeha/sond), ensüümikompleks ja kromogeenne substraat, millesse on paigutatud pesemisetapid. Kromogeeni ensüümaatilne aktiveerimine annab antigeeni kohas nähtava reaktsioniprodukti. Seejärel võib proovi rõrvida ja katta katteklaasiga. Tulemusi tõlgendatakse valguse abil mikroskoop ja abi patofüsioloogiliste protsesside diferentsiaaldiagnostikas, mis võivad või ei pruugi olla seotud konkreetse antigeniga.

## Materjalid ja meetodid:

### Kaasasolevad reaktiivid:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Lahustumine, segamine, lahjendamine, tiitrimine:

Betazoid DAB Chromogen Kit on optimeeritud kasutamiseks koos Biocare'i antikehade ja abireaktiividega ning seda tuleb vahetult enne kasutamist

lahjendada. Segage 1 tilk (32 µL) DAB Chromogen 1,0 ml DAB substraadipuhri kohta. DAB töölahus on stabiilne 5 päeva, kui seda hoitakse temperatuuril 2-8°C.

## Tundud rakendused:

Immunohistokeemia (formaliiniga fikseeritud parafiiniga kaetud koed)

## Tarnitakse järgmiselt:

*Betasoid DAB kromogeen*

DAB lahendus. Lisateabe saamiseks vaadake ohutuskaarti.

## *Betasoid DAB substraadipuhver*

Puhverdatud lahus sisaldb 3% vesinikperorsiidi lahust. Lisateabe saamiseks vaadake ohutuskaarti.

## Vajalikud materjalid ja reaktiivid, mida pole kaasas:

Mikroskoobi slaidid, positiivselt laetud  
Positiivsed ja negatiivsed koekontrollid  
Desert Chamber\* või sarnane kuivatusahi (valikuline)  
Ksüleen või ksüleeni asendaja  
Etanol või reaktiivalkohol  
Decloaking Chamber\* või sarnane kiirkeetja (valikuline)  
Deioniseeritud või destilleeritud vesi  
pesupuhver\*  
Eeltöötlusreaktiivid\* (valikuline)  
Ensüümi seedimine\* (valikuline)  
peroksidaasi blokaad\*  
Valguplokk\* (valikuline)  
Primaarne antikeha\*  
Negatiivsed kontrollreaktiivid\*  
Tuvastamiskomplektid\*  
Hematoksüliin\* (vastuvärv)  
Sinistamise reaktiiv\*  
Paigaldusvahend\*  
Katteklas  
Valgusmikroskoop (40-400X suurendus)

\* Biocare Medical Products: katalooginumbrite ja tellimise kohta teabe saamiseks vaadake Biocare Medicali veebisaiti aadressil <http://biocare.net>. Teatud ülaltoodud reaktiivid põhinevad konkreetsel kasutusel ja kasutataval tuvastamissüsteemil.

## Säilitamine ja stabiilsus:

Hoida temperatuuril 2°C kuni 8°C. Toode on sellistes tingimustes säilitamisel stabiilne kuni viaali etiketile trükitud aegumiskuupäevani. Ärge kasutage pärast aegumiskuupäeva. Säilitamist muudes tingimustes kui ette nähtud tuleb kontrollida. Lahjendatud reaktiive tuleb vastavalt juhistele viivitamatult kasutada. Kasutamata lahjendatud reaktiv on stabiilne 5 päeva, kui seda hoitakse temperatuuril 2-8°C. Biocare ei ole kindlaks teinud kasutaja lahjendatud reaktiivi stabiilsust kauem kui 5 päeva.

Positiivsed ja negatiivsed kontrollid tuleb läbi viia samaaegselt kõigi patsiendi proovidega. Kui täheldatakse ootamatut värvimist, mida ei saa seletada erinevustega laboratoorieses protseduurides, ja kahtlustate probleemi antikehaga, võtke ühendust Biocare'i tehnilise toega numbril 1-800-542-2002 või veebisaidil biocare.net pakutava tehnilise toe teabe kaudu.

## Proovi ettevalmistamine:

Formaliinis fikseeritud koed sobivad kasutamiseks enne parafiini manustamist. Luukuded tuleb enne kudede töötlemist katlakivi eemaldada, et hõlbustada kudede lõikamist ja vältida mikrotoomi labade kahjustamist.<sup>1,2</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Estonian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Korralikult fikseeritud ja sisestatud kudesid, mis ekspressoerivad määratud sihtmärikantigeeni, tuleb hoida jahedas. 1988. aasta Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) nõub 42 CFR-i §493.1259(b), et „Labor peab säilitama värvitud objektiklaase vähemalt kümme aastat alates uurige ja säilitage prooviplokid vähemalt kaks aastat alates uurimise kuupäevast.“<sup>5</sup>

## Kudede töötlemine enne värvimist:

Tehke kuumuse põhjustatud epitoopide otsimine (HIER) vastavalt alolevale soovitud protokollile. On näidatud, et HIER-i rutiinne kasutamine enne IHC-d vähendab ebakõlasid ja standardiseerib värvimist.<sup>4,5</sup>

## Hoiatus ja ettevaatusabinõud:

1. DAB on teadaolevalt kantserogeen.
2. Ärge jätké DAB-komponente tugeva valguse ega otsese päikesevalguse kätte
3. DAB võib põhjustada nahale ülitundlikkust. Vältida kokkupuudet nahale ja silmadega.
4. Kandke kindaid ja kaitseriuetust ning rakendage käsitsemisel mõistlikke ettevaatusabinõusid, kuna DAB on klassifitseeritud ohtlikuks ja võib põhjustada vähki ja kahtlustatakse geneetiliste defektide tekitamises.
5. Käitlege inim- või loomset päritolu materjale kui potentsiaalselt bioloogiliselt ohtlikke materjale ja kõrvaldage need materjalid asjakohaste ettevaatusabinõudega. Kokkupuute korral järgige kasutamise korral vastutavate asutuste tervisejuhiseid.<sup>6,7</sup>
6. Proove enne ja pärast fikseerimist ning kõiki nendega kokkupuutuvaid materjale tuleb käsitseda nii, nagu need oleksid võimalised nakkust edasi kandma, ning need tuleb kõrvaldada nõuetekohaste ettevaatusabinõudega. Ärge kunagi pipeteerige reaktiive suu kaudu ning vältige reaktiivid ja proovid puutuvad kokku tundlike piirkondade, peske neid rohke veega.
7. Reaktiivid mikroobne saastumine võib põhjustada mittespetsiifilise värvumise suurenemist.
8. Ettenähtust erinevad inkubatsioonijad või temperatuurid võivad anda ekslikke tulemusi. Kasutaja peab kõik sellised muudatused kinnitama.
9. Ärge kasutage reaktiivi pärast viaalile trükitud kõlplikkusaega.
10. Mikropolümeeride tuvastamise komplekti reaktiiv(id) on optimeeritud ja valmis kasutamiseks koos Biocare'i antikehade ja abireaktiividega. Soovitatavate protokollide ja kasutustingimuste kohta vaadake esmase antikeha ja teiste lisareaktiividre kasutusjuhiseid.
11. Järgige kõrvaldamismetodi osas kohalike ja/või riigiasutuste nõudeid.
12. Ohutuskaupa on saadaval nõudmisel ja asub aadressil <http://biocare.net>.
13. Teatage kõigist selle seadmega seotud töölistest vahejuhtumitest, võttes ühendust kohaliku Biocare'i esindaja ja selle liikmesriigi või riigi pädeva asutusega, kus kasutaja asub.

See kromogeeni komplekt sisaldab komponente, mis on klassifitseeritud alolevas tabelis näidatud viisil vastavalt määrusele (EÜ) nr 1272/2008

Oht	Kood	Ohuavaldus
	H314 H350	Arvatavasti põhjustab geneetilisi defekte Võib põhjustada vähki

## Kasutusjuhend:

Kromogeeni komplekti reaktiivid on optimeeritud kasutamiseks koos Biocare'i antikehade ja abireagentidega. Soovitatavate protokollide ja kasutustingimuste kohta vaadake esmase antikeha ja teiste lisareaktiividre kasutusjuhiseid. Inkubatsioonijad ja temperatuurid varieeruvad sõltuvalt järgitavast spetsiifilisest antikehade protokolist.

Automaatse värvimisinstrumendi kasutamisel lugege tööparametrite kohta konkreetse instrumendi kasutusjuhendit ja kasutusjuhendit.

## Üldised protseduurietapid IHC läbiviimiseks:

1. Parafiini eemaldamine: Deparafineerige slaidid Slide Brite'is või ksüeenis. Hüdraatseerige slaidid sorteeritud alkoholide seerias vette.
2. Peroksiidplokk: blokeerige 5 minutit Peroxidized 1-ga.
3. Eeltöötluslahus/-protokoll: soovitatud eeltöötluslahuse ja -protokolli leiate vastava primaarse antikeha andmelehe.
4. Protein Block (valikuline): inkubeerige 5-10 minutit toatemperatuuril (RT) Background Punisheriga.
5. Primaarne antikeha: inkubatsioonija kohta vaadake vastavat primaarse antikeha andmelehte.
6. Sond (ainult hiire antikehad): inkubeerige 5-15 minutit toatemperatuuril MACH 4 Mouse Probe'iga.
7. Polümeer: inkubeerige 10-20 minutit hiire antikehade jaoks või 30 minutit küüliku antikehade jaoks toatemperatuuril MACH 4 HRP polümeeriga.
8. Kromogeen: inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril Biocare'i DAB-ga.
9. Vastuvärv: hematoksüliiniga vastuvärv. Loputage deioniseeritud veega. Kandke Tacha sinisetuslahust 1 minutiks. Loputage deioniseeritud veega.

## Tehnilised märkused:

1. Kasutage pesemisetappideks TBS-i.

## Kvaliteedi kontroll:

Vaadake CLSI kvaliteedistandardide immunohistokeemiliste analüüside kavandamiseks ja rakendamiseks; Heaksidetud juhiste teine väljaanne (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011. aastal<sup>8</sup>

## Positiivne koekontroll:

Välised positiivse kontrolli materjalid peaksid olema värsked proovid, mis on fikseeritud, töödeldud ja sisestatud võimalikult kiiresti samamoodi nagu patsiendi proovid. Positiivsed koekontrollid näitavad õigesti ettevalmistatud kudesid ja õigeid värvimistehnikaid. Igasse värvimistsüklisse tuleks lisada üks positiivne väline koekontroll iga katsetingimuste komplekti kohta.

Väliste positiivsete kontrollmaterjalide jaoks kasutatavad koed tuleks valida patsiendi proovidest, millel on hästi iseloomustatud madal positiivse sihtaktiivsuse tase, mis annab nõrga positiivse värvumise. Väliste positiivsete kontrollide madal positiivsuse tase on loodud selleks, et tagada ebastabiilsusest või IHC metoodikaga seotud probleemidest tingitud peente muutustele tuvastamine primaarse antikeha tundlikkuses. Kaubanduslikult saadavad koekontrolli objektiklaasid või patsiendi proovidest erinevalt töödeldud proovid kinnitavad ainult reaktiivi toimivust ega kontrolli koe ettevalmistamist.

Teadaolevaid positiivseid koekontrolle tuleks kasutada ainult töödeldud kudesid ja testreaktiividõe toimimise jälgimiseks, mitte abivahendina patsiendi proovide spetsiifilise diagnoosi koostamisel. Kui positiivsed koekontrollid ei näita positiivset värvumist, tuleks analüüsivate proovide tulemused lugeda kehtetuks.

## Negatiivsete kudede kontroll:

Kasutage igas värvimistsüklis negatiivset koekontrolli, mis on fikseeritud, töödeldud ja sisestatud patsiendi proovi(de)ga identsel viisil, et kontrollida IHC primaarse antikeha spetsiifilisust. sihtantigeeni demonstreerimine ja spetsiifilise taustavärvimise indikaator (valepositiivne värvamine). Samuti võivad enamikus koeosades esinevad erinevad rakutüübidi labori poolt kasutada sisemiste negatiivsete kontrolli kohtadena, et kontrollida IHC toimivust spetsifikatsioonid. Negatiivse koe jaoks kasutatavate proovide tüübidi ja allikad juhetele mündid on loetletud jaotises Toimivusnäitajad.

Kui negatiivse koekontrolli puhul ilmneb spetsiifiline värvamine (valepositiivne värvamine), tuleb patsiendi proovide tulemusi lugeda kehtetuks.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Estonian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Mittespetsiifiline negatiivse reaktiivi kontroll:

Kasutage primaarse antikeha asemel mittespetsiifilist negatiivset reagendi kontrolli koos iga patsiendi proovi osaga, et hinnata mittespetsiifilist värvimist ja võimaldavad paremini tõlgendada spetsiifilist värvumist antigeeni saidil. Ideaalis sisaldb negatiivne reaktiivi kontroll antikeha, mis on toodetud ja valmistasitud (st lahjendatud sama kontsentratsioonini, kasutades sama lahjendit) kasutamiseks samal viisil kui primaarne antikeha, kuid sellel ei ole spetsiifilist reaktsionivõimet inimese kudedega samas maatriksis/lahuses kui primaarne antikeha. Ainuküksi lahjendit võib kasutada vähem soovitava alternatiivina eelnevalt kirjeldatud negatiivsete reaktiivide kontrollidele. Negatiivse reaktiivi kontrolli inkubatsiooniperiood peaks vastama primaarse antikeha inkubatsiooniperioodile.

Kui seerialöikudel kasutatakse mitme antikeha paneele, võivad ühe objektiklaasi negatiivselt värvunud alad toimida negatiivse/mittespetsiifilise seondumise taustakontrollina teiste antikehade jaoks. Endogeense ensüümi aktiivuse või ensüümide mittespetsiifilise seondumise eristamiseks spetsiifilist immunoreaktiivsusest võib täiendavaid patsiendi kudesid värvida ainult substraat-kromogeeni või ensüümi kompleksidega (PAP, avidiin-biotiin, streptavidiin) ja substraat-kromogeeniga.

## Testi kinnitamine:

Enne antikeha või värvimissüsteemi esmakordset kasutamist diagnostilises protseduuris peaks kasutaja kontrollima antikeha spetsiifilist, testides seda mitmel ettevõttesisesel kudedel, millel on teadaolevad immunohistokeemilised omadused, mis esindavad teadaolevaid positiivseid ja negatiivseid kedesid. Vaadake eelnevalt selles tootelehe jaotises kirjeldatud kvaliteedikontrolli protseduure ja CAP sertifitseerimisprogrammi kvaliteedikontrolli soovitusi,<sup>10</sup> immunohistokeemia ja/või NCCLS IHC juhiste jaoks<sup>11</sup>. Neid kvaliteedikontrolli protseduure tuleks korrrata iga uue antikehaharjutuse puhul või alati, kui analüüsiparametrid muutuvad. Katse kontrollimiseks sobivad koed, mis on loetletud jaotises Performance Characteristics.

## Veaotsing:

Järgige antikehaspetsiifilise protokolli soovitusi vastavalt kaasasolevale andmelehele. Ebatüüpiliste tulemuste ilmnemisel võtke ühendust Biocare'i tehnilise toega numbril 1-800-542-2002.

## Värvimise tõlgendamine:

Betazoid DAB Chromogen Kit tekib primaarse antikeha poolt lokaliseeritud antigeenikohtades pruuni värvuse reaktsiooni. Enne patsiendi tulemuste tõlgendamist peab kvalifitseeritud patoloog kontrollide värvimist hindama. Negatiivseid kontolle hinnatakse ja võrreldakse värvitud objektiklaasidega, et tagada, et tähedatud värvamine ei ole mittespetsiifiliste interaktsioonide tagajärg.

## Positiivne koekontroll:

Näidatud antikehaga värvitud positiivset koekontrolli tuleks esmalt uurida, et teha kindlaks, kas kõik reaktiivid töötavad korralikult. Siitrakkude sobiv värvimine (nagu ülapool näidatud) näitab positiivset reaktsionivõimet. Kui positiivsed koekontrollid ei näita positiivset värvumist, tuleks katseproovide tulemused lugeda kehtetuks.

Reaktsioniprodukti värvus võib varieeruda sõltuvalt kasutatud substraadi kromogeenidest. Oodatavate värvireaktsioonide kohta vaadake aluspinna pakendi infolehti. Lisaks võib metakromaasiat tähdelda värvimismeetodi variatsioonides.<sup>12</sup>

Kui kasutatakse vastuvärvi, olenevalt kasutatud vastuvärvi inkubatsiooni pikkukest ja töhususest, põhjustab vastuvärvimine raku tuumade värvuse. Liigne või mittetäielik vastuvärvimine võib kahjustada tulemuste õiget tõlgendamist. Soovitatud vastuvärvimise kohta vaadake protokolli/protokollis.

## Negatiivsete kudedete kontroll:

Negatiivset koekontrolli tuleks uurida pärast positiivset koekontrolli, et kontrollida sihtantigeeni märgistamise spetsiifilist negatiivsete koekontrollis kinnitab antikehade ristreaktiivsuse puudumist rakkude/rakukomponentide suhtes. Kui negatiivse väliskoe kontrolli korral ilmneb spetsiifiline värvamine (valepositiivne värvamine), tuleb patsiendi proovi tulemusi lugeda kehtetuks.

Mittespetsiifiline värvamine, kui see on olemas, on tavaiselt hajusa välimusega. Sidekoe juhuslikku värvimist võib tähdada ka liigselt formaliniiga fikseeritud kudedel lõikudes. Värvimistulemuste tõlgendamiseks kasutage terveid rakke. Nekrotilised või degenererunud rakud värvuvad sageli mittespetsiifiliselt.

## Patsiendi kude:

Uurige näidatud antikehaga värvitud patsiendi proove viimane. Positiivset värvimise intensiivsust tuleks hinnata negatiivse reaktiivi kontrolli mis tahes mittespetsiifilise taustvärvimise kontekstis. Nagu iga immunohistokeemilise testi puhul, tähendab negatiivne tulemus seda, et antigeeni ei tuvastatud, mitte seda, et antigen ei olnud analüüsitud rakkudes/koes. Vajadusel kasutage valenegatiivsete reaktsioonide tuvastamiseks antikehade paneeli.

Täpsemat teavet näidatud antikehade immunoreaktiivsuse kohta leiate jaotisest Kokkuvõte ja selgitus, Piirangud ja Toimivusomadused.

## Piirangud:

### Üldised piirangud:

1. Sest *in vitro* diagnostika (IVD) kasutamine
2. See toode on mõeldud ainult professionaalseks kasutamiseks: Immunohistokeemia on mitmeastmeline diagnostiline protsess, mis koosneb sobivate reaktiivide valimise erikoolitusest; kudedel valik, fikseerimine ja töötlemine; IHC slaidi ettevalmistamine; ja värvimistulemuste tõlgendamine.
3. Kasutamiseks ainult arsti retsepti alusel. (Ainult Rx)
4. Kudedel värvimine sõltub koe käsitsemisest ja töötlemisest enne värvimist. Ebaõige fikseerimine, külmutamine, sulatamine, pesemine, kuivatamine, kuumutamine, lõikamine või saastumine teiste kudedel või vedelikega võib põhjustada artefakte, antikehade kinnijäämist või valenegatiivseid tulemusi. Ebajärjekindlad tulemused võivad olla tingitud fikseerimis- ja kinnistamismeetodite erinevustest või koe omastest ebakorrapärasustest.<sup>14</sup>
5. Liigne või mittetäielik vastuvärvimine võib kahjustada tulemuste õiget tõlgendamist.
6. Iga positiivse või negatiivse värvumise kliinilist tõlgendust tuleks hinnata kliinilise pildi, morfoloogia ja muude histopatoloogiliste kriteeriumide kontekstis. Positiivse või negatiivse värvumise kliinilist tõlgendamist tuleks täiendada morfoloogiliste uuringutega, milles kasutatakse nõuetekohast positiivset ja negatiivset sise- ja väliskontrolli ning muid diagnostilisi teste. Kvalifitseeritud patoloog, kes tunneb IHC antikehade, reaktiivid ja meetodite õiget kasutamist, vastutab kõigi IHC lõpliku preparaadi ettevalmistamiseks ja tõlgendamiseks kasutatud etappide tõlgendamise eest.
7. Konkreetsesse rakenduse optimaalsed protokollid võivad erineda. Nende hulka kuuluvad (kuid mitte ainult) fikseerimine, kuumuse taastamine meetod, inkubatsiooniajad, antikehade lahjendamine, koelõike paksus ja kasutatud tuvastamiskomplekt. Soovitatavate protokollide ja kasutustingimustega kohta vaadake esmase antikeha ja teiste lisareaktiividate kasutusjuhiseid. Andmelehe soovitused ja protokollid põhinevad ainult Biocare toodete kasutamisel. Löppkokkuvõttes vastutab urija optimaalsete tingimuste kindlaksääramise eest.
8. See toode ei ole ette nähtud kasutamiseks voolutsütomeetrias. Voolutsütomeetria jõudlusnäitajaid ei ole määratud.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Estonian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

9. B-hepatiidi viirusega nakatunud ja B-hepatiidi pinnaantigeeni (HBsAg) sisaldavate inimeste kudedel võib ilmneda mädaröika peroksüdaasiga mottespetsifiline värvamine.<sup>14</sup>
10. Reaktiivid võivad avaldada ootamatuid reaktsioone varem testimata kudedes. Ootamatute reaktsioonide võimalust isegi testimud koerühmades ei saa täielikult välistada antigeeni ekspressiooni bioloogilise varieeruvuse tõttu kasvajates või muudes patoloogilistes kudedes.<sup>15</sup> Dokumenteeritud ootamatu(te) reaktsiooni(de)ga võtke ühendust Biocare'i tehniline toega numbril 1-800-542-2002 või veebisaidil biocare.net pakutava tehnilise toe teabe kaudu.
11. Normaalsed/mitteimmunused seerumid, mis pärinevad samast loomsest allikast kui blokeerimisetappides kasutatavad sekundaarsed antiseerumid, võivad autoantikehade või looduslike antikehade tõttu põhjustada valenegativseid või valepositiivseid tulemusi.
12. Valepositiivsed tulemusi võib näha valkude või substraadi reaktsiooniproduktide mitteimmunoloogilise seondumise tõttu. Need võivad olla põhjustatud ka pseudoperoksidaasi aktiivsusest (erütrotsüüdid), endogeense peroksidaasi aktiivsusest (tsütokroom C) või endogeensed biotiinist (nt maks, rind, aju, neer), olenevalt kasutatavast immunovärvi tüübist.<sup>13</sup>
13. Negatiivne tulemus tähendab, et antigeeni ei tuvastatud, mitte seda, et uuritud rakkudes või koes antigeen puudus.

## Tootepõhised piirangud:

Täiendavaid tootespetsiifilisi piiranguid pole

## Jõudlusnäitajad:

Värvimine viidi läbi, kasutades protokolle, mis on esitatud antikehaspetsiifilistes kasutusujuhistes või vastavalt täpsustatule. Värvimise tundlikkust ja spetsiifilust hinnati mitmesuguste normaalsete ja neoplastiliste koetüüpide puhul, mida hinnati primaarsete antikehade väljatöötamise ajal.

## Reprodutseeritavus:

Biocare'i tuvastussüsteemide ja süsteemireaktiivid reprodutseeritavust kontrollitakse keskmise täpsusega möõtmise teel, mille käigus testiti erinevaid reaktiivpartisiid pikema aja jooksul, kasutades erinevaid operaatoreid, analüütikuid, reaktiivpartisiid, kooproove ja seadmeid. Iga hinnatud tuvastamisreagendi värvimine oli järgjepidev ja viidi läbi ootuspäraselt.

## Veotsing:

1. Objektiiklaasid ei värvunud – Kontrollige, kas on kasutatud sobivat positiivset kontrollkudet, antikeha ja tuvastamisprodukte. Kontrollige, kas vaha eemaldamine või eeltöötlemine on puudulik või vale.
2. Kõigi objektiiklaaside nõrk värvamine – Kontrollige, kas on kasutatud sobivat positiivset kontrollkudet, antikeha ja tuvastamistooteid.
3. Kõigi slaidide liigne taust – võib esineda kõrge endogeense biotiini tase (kui kasutate biotiinipõhiseid tuvastamistooteid), endogeenset HRP aktiivsust, mis muudab kromogeeni värviliseks lõptooteks (kasutage peroksidaasi plokki), või võib esineda liigne mottespetsifiline valgu interaktsioon (kasutage valku). blokk, nagu seerumi- või kaseiniipõhine blokeeriv lahus).
4. Koeosad pesevad slaididelt inkubeerimise ajal maha – Kontrollige slайдe, et veenduda, et need on positiivselt laetud.
5. Spetsiifiline värvamine on liiga tume – kontrollige protokoli, et teha kindlaks, kas objektiiklaasile on rakendatud õige antikehade tiiter, samuti kõigi reaktiivide õiged inkubatsioonijad. Lisaks veenduge, et protokolis on piisavalt pesemisetappe, et eemaldada pärast inkubatsioonietappide lõppu liigsed reaktiivid.

## Viited:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Finnish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Käyttötarkoitus:

varten *in vitro* Diagnostinen käyttö

The Betazoid DAB kromogeenisarjaon tarkoitettu käytettäväksi joko manuaalisissa tai automatisoiduissa immunohistokemian (IHC) väärjäysmenetelmissä kohdeantigeenien havaitsemiseksi formalinilla kiinnitetyissä, parafiini upotetuissa (FFPE) kudoksissa, kun sitä käytetään yhdessä sopivan tunnistusjärjestelmän ja primääristen vasta-aineiden kanssa. Minkä tahansa väärjäytymisen tai sen puuttumisen kliinistä tulkinta tulisi täydentää morfologisilla tutkimuksilla ja asianmukaisilla kontrollleilla, ja pätevän patologin tulee arvioida potilaan klinisen historian ja muiden diagnostisten testien yhteydessä.

## Yhteenveto ja selitys:

3,3' diaminobentsidiini (DAB) on vakiintunut kromogeeni, jota käytetään IHC-väärjäysmenetelmissä ja joka tuottaa piparijuriperoksidaasi (HRP)-entsyymin läsnäollessa ruskean sakan, joka ei liukene orgaanisiin liuottimiin ja joka voidaan peittää pysyvällä kiinnitysväliaineella. Tämä tuote toimitetaan kaksikomponenttisessa järjestelmässä, joka koostuu nestestabilisti DAB-kromogeneenista ja DAB-substraattipuskurista. Kromogeneenipuskuriseoksen väri voi vaihdella värittömästä vaaleanruskeaan. Kromogeneenipuskuriseoksen väri ei vaikuta väärjäytymisominaisuuksiin. Betazoid DAB on formulaatio, joka on erittäin vakaa. Betazoid DAB:ta voidaan käyttää sekä manuaalisesti että automatisoiduissa väärjäykoneissa.

## Menettelyn periaate:

Tämä Betazoid DAB Chromogen Kit -sarjan DAB-kromogeeni, kun sitä käytetään FFPE-kudosleikkeiden IHC-testauksessa, mahdollistaa antigeenien visualisoinnin käytämällä peräkkäistä spesifinen vasta-aine antigeenille (primaarinen vasta-aine), sekundaarinen vasta-aine primaariselle vasta-aineelle (valinnainen linkivasta-aine/koetin), entsyymikompleksi ja kromogeneenin substraatti, jossa on pesuvaiheet. Kromogeenin entsyymaattinen aktivaatio johtaa näkyvään reaktiotuotteeseen antigeenikohdassa. Näyte voidaan sitten vastavärijätä ja peittää. Tulokset tulkitaan valon avulla mikroskooppi ja apu patofysiologisten prosessien erotusdiagoosissa, jotka voivat tai olla ei välttämättä liity tiettyyn antigeeniihin.

## Materiaalit ja menetelmät:

### Mukana toimitetut reagenssit:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Liuottaminen, sekoitus, laimennus, titraus:

Betazoid DAB Chromogen Kit on optimoitu käytettäväksi Biocare-vasta-aineiden ja apureagenssien kanssa, ja se on laimennettava juuri ennen käyttöä. Sekoita 1 tippa (32 µL) DAB-kromogeenia 1,0 mL:aan DAB-substraattipuskuria. DAB-työliuos on stabiili 5 päivää, jos sitä säilytetään 2-8 °C:ssa.

## Tunnetut sovellukset:

Immunohistokemia (formaliinilla kiinnitetyt parafiiniin upotetut kudokset)

## Toimitettu nimellä:

*Betatsoidi DAB kromogeeni*

DAB-ratkaisu. Katso lisätietoja käyttöturvallisuuustiedotteesta.

## Betatsoid DAB -substraattipuskuri

Puskuroitu liuos sisältää 3 % vetyperoksidiliusta. Katso lisätietoja käyttöturvallisuuustiedotteesta.

## Tarvittavat materiaalit ja reagenssit, joita ei toimiteta:

Mikroskoopin objektilasit, positiivisesti varautuneet

Positiiviset ja negatiiviset kudoskontrollit

Desert Chamber\* tai vastaava kuivausuuni (valinnainen)

Ksyleeni tai ksyleenin korvice

Etanol tai reagensialkoholi

Decoaking Chamber\* tai vastaava painekattila (valinnainen)

Deionisoitu tai tislattu vesi

Pesupuskuri\*

Esikäsitteilyreagenssit\* (valinnainen)

Entsyymisulatus\* (valinnainen)

peroksidaasi esto\*

Proteiinilohko\* (valinnainen)

Primaarinen vasta-aine\*

Negatiiviset kontrollireagenssit\*

Tunnistussarjat\*

Hematoksyliini\* (vastavärijäys)

Sinitiesreagenssi\*

Asennusväline\*

Suojalasi

Valomikroskooppi (40-400X suurenus)

\* Biocare Medical Products: Lisätietoja luettelonumeroista ja tilauksesta on Biocare Medicalin verkkosivustolla osoitteessa <http://biocare.net>. Tietty edellä luetellut reagenssit perustuvat tiettyyn sovellukseen ja käytettyyn tunnistusjärjestelmään.

## Varastointi ja vakaus:

Säilytä 2°C - 8°C. Tuote säilyy näissä olosuhteissa säilytettynä injektiopullon etikettiin painettuna viimeiseen käyttöpäivään asti. Älä käytä viimeisen käyttöpäivän jälkeen. Varastointi muissa kuin määritellyissä olosuhteissa on tarkistettava. Laimennetut reagenssit tulee käyttää viipyväällä ohjeiden mukaisesti. Käytämätön laimennettu reagenssi säilyy 5 päivää, jos sitä säilytetään 2-8°C:ssa. Biocare ei ole vahvistanut käyttäjän laimennetun reagenssin stabiilisuutta yli 5 päivän ajan.

Positiiviset ja negatiiviset kontrollit tulee suorittaa samanaikaisesti kaikkien potilasnäytteiden kanssa. Jos havaitaan odottamatonta väärjäytymistä, jota ei voida selittää laboratoriomenetelmien vaihtelulla, ja epäillään vasta-aineongelmaa, ota yhteyttä Biocaren tekniseen tukeen numeroon 1-800-542-2002 tai biocare.net-sivustolla olevien teknisen tuen tietojen kautta.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Finnish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Näytteen valmistus:

Formaliiniin kiinnitetyt kudokset soveltuват käytettäväksi ennen parafiiniin upottamista. Luukudokset tulee poistaa kalkki ennen kudosten käsitteilyä kudoksen leikkaamisen helpottamiseksi ja mikrotomin terien vaurioitumisen estämiseksi.<sup>1,2</sup>

Asianmukaisesti kiinnitetyt ja upotetut kudokset, jotka ilmentävät määritettyä antigeniin kohdetta, tulee säilyttää viileässä paikassa. Vuoden 1988 Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) -laki edellyttää 42 CFR:ssä §493.1259(b), jonka mukaan "Laboratorion on säilyttävä värvätty objektilasit vähintään kymmenen vuotta tutkia ja säilyttää näyttekappaleet vähintään kaksi vuotta tutkimuspäivästä".<sup>3</sup>

## Kudosten hoito ennen värväystä:

Suorita Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) alla suositellun protokollan mukaisesti. HIER:n rutiininomaisen käytön ennen IHC:tä on osoitettu minimoivan epäjohdonmukaisuuden ja standardoivan värväytymistä.<sup>4,5</sup>

## Varoitukset ja varotoimet:

1. DAB:n tiedetään olevan syöpää aiheuttava aine.
2. Älä altista DAB-komponentteja voimakkaalle valolle tai suoralle auringonvalolle.
3. DAB voi aiheuttaa ihmisen herkistyminen. Vältä kosketusta iholle ja silmiin.
4. Käytä käsineitä ja suojavaatetusta ja ryhdy kohtuullisiin varotoimiin käsitellessäsi, koska DAB on luokiteltu vaaralliseksi ja voi aiheuttaa syöpää ja sen epäillään aiheuttavan geneettisiä vikoja.
5. Käsittele ihmisen- tai eläinperäisiä materiaaleja mahdollisesti biologisesti vaarallisia ja hävitä tällaiset materiaalit asianmukaisin varotoimin. Noudata altistumistapauksessa vastaanvien viranomaisten antamia terveysmääryksiä.<sup>6,7</sup>
6. Näytteitä ennen kiinnitystä ja sen jälkeen sekä kaikkia niille altistettuja materiaaleja tulee käsitellä ikään kuin ne voisivat välittää infektiota, ja ne on hävitettävä asianmukaisin varotoimin. Älä koskaan pipetoi reagensseja suun kautta ja vältä koskettamasta ihoa ja limakalvoja reagenssien ja näytteiden kanssa. Jos reagenssi tai näytteet joutuvat kosketuksiin herkkien alueiden kanssa, pese runsaalla vedellä.<sup>8</sup>
7. Reagenssien mikrobikontaminaatio voi johtaa epäspesifisen värväytymisen lisääntymiseen.
8. Muut kuin ilmoitetut inkubointijat tai lämpötilat voivat antaa virheellisiä tuloksia. Käyttäjän on vahvistettava kaikki tällaiset muutokset.
9. Älä käytä reagenssia pulloon painetun viimeisen käyttöpäivämäärän jälkeen.
10. Mikropolymeerien tunnistussarjan reagenssi(t) on optimoitu ja valmis käytettäväksi Biocare-vasta-aineiden ja apureagenssien kanssa. Katso suositellut protokollat ja käyttöolosuhteet ensisijaisen vasta-aineen ja muiden apureagenssien käyttöohjeista.
11. Noudata paikallisten ja/tai valtion viranomaisten vaatimuksia hävitysmenetelmissä.
12. Käyttöturvallisuustiedote on saatavilla pyynnöstä, ja se sijaitsee osoitteessa <http://biocare.net>.
13. Ilmoita kaikista tähän laitteeseen liittyvistä vakavista tapahtumista ottamalla yhteyttä paikalliseen Biocaren edustajaan ja sen jäsenvaltion tai maan toimivaltaiseen viranomaiseen, jossa käyttäjä sijaitsee.

Tämä kromogeenisarja sisältää komponentteja, jotka on luokiteltu alla olevan taulukon mukaisesti asetuksen (EY) N:o 1272/2008 mukaisesti.

Vaara	Koodi	Vaaralauseke
	H314 H350	Epäillään aiheuttavan geneettisiä vikoja. Saattaa aiheuttaa syöpää

## Käyttöohjeet:

Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

40/18



Kromogeenisarjan reagenssit on optimoitu käytettäväksi Biocare-vasta-aineiden ja apureagenssien kanssa. Katso suositellut protokollat ja käyttöolosuhteet ensisijaisen vasta-aineen ja muiden apureagenssien käyttöohjeista. Inkubointijat ja lämpötilat vaihtelevat noudatetun spesifisen vasta-aineprotokollen mukaan.

Kun käytät automaattista värväysinstrumenttia, katso laitteen käyttöoppaasta ja käyttöohjeista käyttöparametreja.

## Yleiset menettelyvaiheet IHC:n suorittamiseksi:

1. Parafiini poisto: Poista paraffinoihtilasit Slide Britellä tai ksyleenillä. Hydratoi liukulevyt sarjassa luokiteltuja alkoholeja veteen.
2. Peroksidiblokkki: Lopeta 5 minuuttia Peroxidized 1:llä.
3. Esikäsittelyliuos/protokolla: Katso suositeltu esikäsittelyliuos ja -protokolla vastaavasta primäärvasta-ainetiedotteesta.
4. Proteiinilohko (valinnainen): Inkuboi 5-10 minuuttia huoneenlämpötilassa (RT) Background Punisherilla.
5. Primaarinen vasta-aine: Katso inkubaatioaika vastaavasta primäärvasta-aineesta.
6. Koitin (vain hiiren vasta-aineet): Inkuboi 5-15 minuuttia huoneenlämpötilassa MACH 4 Mouse Probe -koettimella.
7. Polymeeri: Inkuboi 10-20 minuuttia hiiren vasta-aineita tai 30 minuuttia kanin vasta-aineita huoneenlämpötilassa MACH 4 HRP -polymeerin kanssa.
8. Kromogeeni: Inkuboi 5 minuuttia huoneenlämpötilassa Biocaren DAB:n kanssa.
9. Vastavärjäys: Vastavärjäys hematoksiiliinillä. Huuhtele deionisoidulla vedellä. Levitä Tacha's Bluing -liuosta 1 minuutin ajan. Huuhtele deionisoidulla vedellä.

## Tekniset huomautukset:

1. Käytä pesuvaiheisiin TBS:ää.

## Laadunvalvonta:

Katso CLSI-laatustandardit immunohistokemiallisten määritysten suunnittelua ja toteutusta varten; Hyväksyty Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011.<sup>9</sup>

## Positiivinen kudoskontrolli:

Ulkoisten positiivisten kontrollimateriaalien tulee olla tuoreita näytteitä, jotka on kiinnitetty, käsitelty ja upotettava mahdollisimman pian samalla tavalla kuin potilasnäytteet. Positiiviset kudoskontrollit osoittavat oikein valmistettuja kudosia ja asianmukaisia värväystekniikoita. Yksi positiivinen ulkoinen kudoskontrolli jokaista testiolosuhteita kohden tulisi sisällyttää jokaiseen värväysajoon.

Ulkoisiin positiivisiin kontrollimateriaaleihin käytetysti kudokset tulee valita potilasnäytteistä, joissa on hyvin karakterisoitu alhainen positiivinen kohteaktiivisuus, joka antaa heikon positiivisen värväytymisen. Ulkoisten positiivisten kontrollien alhainen positiivisuustaso on suunniteltu varmistamaan pienestä muutosten havaitsemisen primaarisen vasta-aineen herkyydesä epästabilisudesta tai IHC-metodologian ongelmista. Kaupallisesti saatavilla olevat kudoskontrollilevyt tai näytteet, jotka on käsitelty eri tavalla kuin potilasnäyte(t), validoivat vain reagenssin suorituskyvyn, eivätkä ne varmista kudosten valmistelia.

Tunnettuja positiivisia kudoskontrolleja tulee käyttää vain prosessoitujen kudosten ja testireagenssien oikean suorituskyvyn seurantaan sen sijaan, että ne olisivat apuna potilasnäytteiden erityisen diagnoosin laatimisessa. Jos positiiviset kudoskontrollit eivät osoita positiivista värväytymistä, testimäytteiden tuloksia on pidettävä virheellisinä.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Finnish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Negatiivisten kudosten kontrolli:

Käytä negatiivista kudoskontrollia, joka on kiinnitetty, käsitledyt ja upotettu identisellä tavalla potilasnäytteiden kanssa joka värjäysajossa varmistaaksesi IHC:n primaarisen vasta-aineen spesifisyyden. Kohdeantigeenin osoittamiseen ja spesifisen taustavärjäytymisen osoittamiseen (vääärä positiivinen värjäys). Myös useimmat eri solutypit, joita esiintyy useimmissa kudosleikkkeissä, voivat laboratorio käyttää niitä sisäisinä negatiivisina kontrollipaikkoina IHC:n suorituskyvyn tarkistamiseen tekniset tiedot. Näytetyypit ja -lähteet, joita voidaan käyttää negatiiviseen kudokseen säätiimet on lueteltu Suorituskykyominaisuudet-osiossa.

Jos negatiivisessa kudoskontrollissa esiintyy spesifistä värjäytymistä (vääärä positiivinen värjäytyminen), potilasnäytteillä saatuja tuloksia on pidettävä virheellisinä.

## Epäspesifinen negatiivinen reagensikkontrolli:

Käytä epäspesifistä negatiivista reagensikkontrollia primaarisen vasta-aineen sijasta kunkin potilasnäytteen leikkeen kanssa arvioidaksesi epäspesifistä värjäytymistä ja

mahdollistaan spesifisen värjäytymisen paremman tulkinnan antigeenikohdassa. Ihannetapauksessa negatiivinen reagensikkontrolli sisältää vasta-aineen, joka on tuottettu ja valmistettu (eli laimennettu samaan pituuteen käyttäen samaa laimennusainetta) käytettäväksi samalla tavalla kuin primääriinen vasta-aine, mutta sillä ei ole spesifistä reaktiivisuutta ihmiskudosten kanssa samassa matriisissa/liuoksessa kuin primaarinen vasta-aine. Pelkkää laimennusainetta voidaan käyttää vähemmän toivottavana vaihtoehtona aiemmin kuvattuille negatiivisille reagensikkontolleille. Negatiivisen reagensikkontrollin inkubaation tulee vastata primaarisen vasta-aineen inkubaatioaikaan.

Kun sarjaleikkeissä käytetään useiden vasta-aineiden paneeleja, yhden objektilasin negatiivisesti värjätyneet alueet voivat toimia negatiivisena/epäspesifisena sitoutumisen taustakontrollina muille vasta-aineille. Endogeenien entsyymiaktiivisuuuden tai entsyyrien epäspesifisen sitoutumisen erottamiseksi spesifisestä immunoreaktiivisuudesta voidaan potilaan lisäkudoksia värjätä yksinomaan substratti-kromogeeni- tai entsyymikomplekseilla (PAP, avidiini-biotiini, streptavidiini) ja substratti-kromogeenilla, vastavastia.

## Määritynsä vahvistus:

Ennen vasta-aineen tai värjäysjärjestelmän ensimmäistä käyttöä diagnostisessa toimenpiteessä käyttäjän tulee varmistaa vasta-aineen spesifisyys testaamalla se sarjalla yrityksen sisäisiä kudoksia, joiden immunohistokemialliset suorituskykyominaisuudet tunnetaan ja jotka edustavat tunnettuja positivisia ja negatiivisia kudoksia. Tutustu laadunvalvontamenettelyihin, jotka on kuvattu aiemmin tässä tuoteselosteessa ja CAP-sertifiointihelman laadunvalvontasuosituksissa.<sup>10</sup> Immunohistokemiaa ja/tai NCCLS IHC -ohjetta varten<sup>11</sup>. Nämä laadunvalvontaoimenpiteet on toistettava jokaiselle uudelle vasta-aineerälle tai aina, kun määritysparametreissa tapahtuu muutoksia. Suorituskykyominaisuudet-osiossa luetellut kudokset soveltuват määritynsä todentamiseen.

## Ongelmien karttoittaminen:

Noudata vasta-ainekohtaisia protokollan suosituksia toimitetun tietolomakkeen mukaisesti. Jos epätyypillisä tuloksia ilmenee, ota yhteyttä Biocaren tekniseen tukeen numerossa 1-800-542-2002.

## Värjäyksen tulkinta:

Betazoid DAB Chromogen Kit tuottaa ruskean värireaktion primaarisen vasta-aineen paikantamissa antigeenikohdissa. Ennen potilastulosten tulkintaa pätevän patologin on arvioitava kontrollien värjäys. Negatiiviset kontrollit arvioidaan ja niitä verrataan värjättyihin objektilaseihin sen varmistamiseksi,

että havaittu värjäytyminen ei ole seurausta epäspesifisistä vuorovaikutuksista.

## Positiivinen kudoskontrolli:

Osoitettuilla vasta-aineilla värjätty positiivinen kudoskontrolli tulee ensin tutkia sen varmistamiseksi, että kaikki reagenssit toimivat oikein. Kohdesolujen asianmukainen värjäys (kuten edellä on osoitettu) osoittaa positiivista reaktiivisuutta. Jos positiiviset kudoskontrollit eivät osoita positiivista värjäytymistä, testinäytteillä saatuja tuloksia on pidettävä virheellisinä.

Reaktiotuoteen väri voi vaihdella riippuen käytettyistä substratti-kromogeenista. Katso odotetut värireaktiot alustan pakkaukseloseista. Lisäksi metakromiaa voidaan havaita värjäysmenetelmän muunnelmissa.<sup>12</sup>

Kun käytetään vastavärjäystä, riippuen käytetyn vastavärjäyksen inkubaation pituudesta ja tehokkuudesta, vastavärjäys johtaa soluytimen värjäämiseen. Liiallinen tai epätäydellinen vastavärjäys voi vaarantaa tulosten oikean tulkinnan. Katso suositellut vastavärjäyskäytännöt.

## Negatiivinen kudoskontrolli:

Negatiivinen kudoskontrolli tulee tutkia positiivisen kudoskontrollin jälkeen primaarisen vasta-aineen kohdeantigeenin leiman spesifisyyden varmistamiseksi. Spesifisen värjäytymisen puuttuminen negatiivisessa kudoskontrollissa vahvistaa vasta-aineen ristireaktiivisuuden puuttumisen soluja/solukomponentteja kohtaan. Jos negatiivisessa ulkoisessa kudoskontrollissa esiintyy erityistä värjäytymistä (vääärä positiivinen värjäytyminen), potilasnäytteen tuloksia on pidettävä virheellisinä.

Epäspesifinen värjäys, jos sitä esiintyy, on yleensä hajanainen. Sidekudoksen satunnaisista värjäytymistä voidaan havaita myös leikkeissä, jotka ovat peräisin liikaa formalinista kiinnitetyistä kudoksista. Käytä ehjää soluja värjäystulosten tulkitsemiseen. Nekroottiset tai rappeutuneet solut värjätyvät usein epäspesifisesti.

## Potilaan kudos:

Tutki potilasnäytteet, jotka on värjätty osoitetulla vasta-aineella kestää. Positiivinen värjäytymisintensiteetti tulee arvioida negatiivisen reagensikkontrollin epäspesifisen taustavärjäyksen yhteydessä. Kuten missä tahansa immunohistokemiallisessa testissä, negatiivinen tulos tarkoittaa, että antigeenia ei havaittu, ei sitä, että antigeeni puutui määritetyistä soluista/kudoksesta. Käytä tarvittaessa vasta-ainepaneelia tunnistaksesi vääriät negatiiviset reaktiot.

Katso Yhteenvetö ja selitys, Rajoitukset ja Suorituskykyominaisuudet saadaksesi erityisiä tietoja osoitetusta vasta-aineen immunoreaktiivisuudesta.

## Rajoitukset:

### Yleiset rajoitukset:

1. varten *in vitro* diagnostinen (IVD) käytö
2. Tämä tuote on tarkoitettu vain ammattikäyttöön: Immunohistokemia on monivaiheinen diagnostinen prosessi, joka koostuu erityiskoulutuksesta sopivien reagenssien valinnassa; kudosten valinta, kiinnitys ja käsittely; IHC-levyn valmistus; ja värjäystulosten tulkinta.
3. Vain lääkärin määräyksestä käytettäväksi. (vain Rx)
4. Kudosvärjäys riippuu kudoksen käsitteelystä ja prosessioinnista ennen värjäystä. Vääriä kiinnitys, jäädyytäminen, sulattaminen, pesu, kuivaus, kuumennus, leikkaus tai kontaminaatio muilla kudoksilla tai nesteillä voi aiheuttaa artefakteja, vasta-aineiden vangitsemista tai vääriä negatiivisia tuloksia. Epäjohdonmukaiset tulokset voivat johtua vaihtelista kiinnitys- ja upotusmenetelmissä tai kudoksen sisäisistä epäsäännöllisyyksistä.<sup>14</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Finnish

5. Liiallinen tai epätäydellinen vastavärjäys voi vaarantaa tulosten oikean tulkinnan.
6. Kaikkien positiivisten tai negatiivisten värjäytymien kliininen tulkinta on arvioitava kliinisen esityksen, morfologian ja muiden histopatologisten kriteerien yhteydessä. Positiivisen tai negatiivisen värjäytymisen kliinistä tulkintaa tulisi täydentää morfologisilla tutkimuksilla, joissa käytetään asianmukaisia positiivisia ja negatiivisia sisäisiä ja ulkoisia kontolleja sekä muita diagnostisia testejä. Pätevän patologin, joka tuntee IHC-vasta-aineiden, reagenssien ja menetelmien oikean käytön, vastuulla on tulkita kaikki vaiheet, joita käytetään lopullisen IHC-valmisteen valmistelussa ja tulkinnassa.
7. Optimaaliset protokollat tietylle soveltukselle voivat vaihdella. Näitä ovat muun muassa kiinnitys, lämmön talteenottomenetelmä, inkubaatioajat, vasta-ainelaimennus, kudosleikkeen paksuus ja käytetty havaitsemiskausi. Katso suositellut protokollat ja käyttöolosuhteet ensisijaisen vasta-aineen ja muiden apureagenssien käyttööhjeista. Käyttöturvallisuustiedotteen suositukset ja protokollat perustuvat Biocare-tuotteiden yksinomaiseen käyttöön. Viime käessä on tutkijan vastuulla määritää optimaaliset olosuhteet.
8. Tätä tuotetta ei ole tarkoitettu käytettäväksi virtaussytometriassa. Virtaussytometriin suorituskykyominaisuksia ei ole määritelty.
9. Hepatiitti B -viruksella infektoituneiden henkilöiden kudoksissa, jotka sisältävät hepatiitti B -pinta-antigeenia (HBsAg), voi esiintyä epäspesifisesti piparjuuriperoksidaasin värjäytymistä.<sup>14</sup>
10. Reagenssit voivat osoittaa odottamattomia reaktioita aiemmin testaamattomissa kudoksissa. Odottamattomien reaktioiden mahdollisuutta ei edes testatuissa kudosryhmissä voida täysin eliminoida antigeenin ilmentymisen biologisen vaihtelon vuoksi kasvaimissa tai muissa patologisissa kudoksissa.<sup>15</sup> Ota yhteyttä Biocaren tekniseen tukeen numerossa 1-800-542-2002 tai biocare.net-sivustossa olevien teknisen tuen tietojen kautta ja kerro dokumentoiduista odottamattomista reaktioista.
11. Normaalit/ei-immuuniseerumit samasta eläinlähteestä kuin estovaiheissa käytetyt sekundaariset antiseerumit voivat aiheuttaa väärää negatiivisia tai väärää positivisia tuloksia autovasta-aineista tai luonnollisista vasta-aineista johtuen.
12. Väärää positivisia tuloksia voidaan nähdä johtuen proteiinien tai substraattireaktiotuotteiden ei-immunologisesta sitoutumisesta. Ne voivat johtua myös pseudoperoksidaasiaktiivisuudesta (erytrosyytit), endogeenisesta peroksidaasiaktiivisuudesta (sytokromi C) tai endogeenisesta biotiinista (esim. maksa, rinta, aivot, munuaiset) riippuen käytetyn immunovärjäyksen typistä.<sup>13</sup>
13. Negatiivinen tulos tarkoittaa, että antigeeni ei havaittu, ei sitä, että antigeeni puuttui tutkituista soluista tai kudoksesta.

## Tuotekohtaiset rajoitukset:

Ei muita tuotekohtaisia rajoituksia

## Suorituskykyominaisuudet:

Värjäys suoritettiin käyttämällä vasta-ainekohtaisissa käyttöohjeissa annettuja tai määriteltyjä protokolia. Värjäytymisen herkkyys ja spesifisyys arvioitiin useissa normaleissa ja neoplastisissa kudostypeissä, jotka arvioitiin pramaaristen vasta-aineiden kehittymisen aikana.

## Toistettavuus:

Biocaren tunnistusjärjestelmien ja järjestelmäreagenssien toistettavuus varmistetaan keskimääräisellä tarkkuudella, jossa eri reagenssierät testattiin pitkän ajanjakson ajan käyttämällä erilaisia toimijoita, analytikoita, reagenssierää, kudosnäytteitä ja laitteita. Jokaiselle arvioidulle detektioreagenssille saatu värjäys oli johdonmukainen ja suoritettiin odotetulla tavalla.

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Ongelmien karttoittaminen:

1. Objektilasit ei värjätyneet – Tarkista, että on käytetty asianmukaista positiivista kontrollikudosta, vasta-ainetta ja havaitsemistuotteita. Tarkista, ettei vahanpoisto tai esikästetty ole täydellinen tai virheellinen.
2. Kaikkien objektilasien heikko värjäys – Tarkista, että on käytetty asianmukaista positiivista kontrollikudosta, vasta-ainetta ja havaitsemistuotteita.
3. Kaikkien objektilasien liiallinen tausta – Endogeenistä biotinia (jos käytät biotinipohjaisia havaitsemistuotteita), endogeenistä HRP-aktiivisuutta, joka muuttaa kromogeenin väriäksi lopputootteeksi (käytä peroksidaasisalpaan), tai ylimääräistä epäspesifistä proteiinivuorovaikutusta (käytä proteiinia) esto, kuten seerumi- tai kaseiniipohjainen estoliuus.
4. Kudososat pesevät objektilasit pois inkubaation aikana – Tarkista objektilasit varmistaaksesi, että ne ovat positiivisesti varautuneet.
5. Erityinen värjäys liian tumma – Tarkista protokolla määrittääksesi, onko objektilasien käytetty oikea vasta-ainetiitteri, sekä oikeat inkubaatioajat kaikille reagensseille. Varmista lisäksi, että protokollassa on riittävästi pesuvaiheita ylimääräisten reagenssien poistamiseksi inkubointivaiheiden jälkeen.

## Viitteet:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

42/18



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

French

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Utilisation prévue :

Pour *in vitro* Utilisation diagnostique

LeKit de chromogène Betazoid DABest destiné à être utilisé dans les protocoles de coloration d'immunohistochimie (IHC) manuels ou automatisés pour la détection d'antigènes cibles dans les tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) lorsqu'il est utilisé conjointement avec le système de détection approprié et les anticorps primaires. L'interprétation clinique de toute coloration ou de son absence doit être complétée par des études morphologiques et des contrôles appropriés et doit être évaluée dans le contexte des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques effectués par un pathologiste qualifié.

## Résumé et explication :

3,3' Diaminobenzidine (DAB) est un chromogène bien établi utilisé dans les protocoles de coloration IHC qui, en présence d'une enzyme peroxydase de raifort (HRP), produit un précipité brun insoluble dans les solvants organiques et peut être recouvert d'un support de montage permanent. Ce produit est présenté dans un système à deux composants composé d'un chromogène DAB liquide stable et d'un tampon de substrat DAB. La couleur du mélange tampon chromogène peut varier de l'incolore au brun pâle. Les propriétés colorantes ne sont pas affectées par la couleur du mélange tampon chromogène. Betazoid DAB est une formulation très stable. Betazoid DAB peut être utilisé manuellement et sur des colorants automatisés.

## Principe de procédure :

Ce chromogène DAB du kit Betazoid DAB Chromogen, lorsqu'il est utilisé dans les tests IHC de coupes de tissus FFPE, permet la visualisation des antigènes via l'application séquentielle d'un anticorps spécifique de l'antigène (anticorps primaire), un anticorps secondaire de l'anticorps primaire (lien optionnel anticorps/sonde), un complexe enzymatique et un substrat chromogénique avec étapes de lavage interposées. L'activation enzymatique du chromogène entraîne un produit de réaction visible au site de l'antigène. L'échantillon peut ensuite être contre-coloré et recouvert d'une lamelle. Les résultats sont interprétés à l'aide d'une lumière microscope et aide au diagnostic différentiel des processus physiopathologiques, qui peuvent ou peut ne pas être associé à un antigène particulier.

## Matériels et méthodes:

### Réactifs fournis :

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Reconstitution, Mélange, Dilution, Titrage :

Le kit Betazoid DAB Chromogen est optimisé pour une utilisation avec les anticorps Biocare et les réactifs auxiliaires et doit être dilué juste avant utilisation. Mélangez 1 goutte (32 µL) de DAB Chromogen pour 1,0 ml de tampon de substrat DAB. La solution de travail DAB est stable pendant 5 jours si elle est conservée entre 2 et 8°C.

## Applications connues :

Immunohistochimie (tissus inclus en paraffine fixés au formol)

## Fourni comme :

Chromogène bêtazoïde DAB

Solution DAB. Voir la fiche de données de sécurité pour plus de détails.

## Tampon de substrat Betazoid DAB

La solution tampon contient une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 %. Voir la fiche de données de sécurité pour plus de détails.

## Matériels et réactifs nécessaires mais non fournis :

Lames de microscope, chargées positivement

Contrôles tissulaires positifs et négatifs

Chambre du désert\* ou étuve de séchage similaire (en option)

Xylène ou substitut de xylène

Éthanol ou alcool réactif

Chambre de décloisonnement\* ou autocuiseur similaire (facultatif)

Eau désionisée ou distillée

Tampon de lavage\*

Réactifs de prétraitement\* (facultatif)

Digestion enzymatique\* (facultatif)

Blocage de la peroxydase\*

Bloc de protéines\* (facultatif)

Anticorps primaire\*

Réactifs de contrôle négatif\*

Kits de détection\*

Hématoxyline\* (contre-colorant)

Réactif de bleuissement\*

Support de montage\*

Lamelle de verre

Microscope optique (grossissement 40-400X)

\* Produits Biocare Medical : reportez-vous au site Web Biocare Medical situé à l'adresse <http://biocare.net> pour plus d'informations sur les numéros de catalogue et les commandes. Certains réactifs répertoriés ci-dessus sont basés sur une application spécifique et sur le système de détection utilisé.

## Stockage et stabilité :

Conserver entre 2 °C et 8 °C. Le produit est stable jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette du flacon lorsqu'il est conservé dans ces conditions. Ne pas utiliser après la date de péremption. Le stockage dans des conditions autres que celles spécifiées doit être vérifié. Les réactifs dilués doivent être utilisés rapidement selon les instructions. Le réactif dilué non utilisé est stable pendant 5 jours s'il est conservé entre 2 et 8°C. La stabilité du réactif dilué par l'utilisateur au-delà de 5 jours n'a pas été établie par Biocare.

Les contrôles positifs et négatifs doivent être effectués simultanément avec tous les échantillons de patients. Si une coloration inattendue est observée qui ne peut pas être expliquée par des variations dans les procédures de laboratoire et qu'un problème avec l'anticorps est suspecté, contactez le support technique de Biocare au 1-800-542-2002 ou via les informations d'assistance technique fournies sur [biocare.net](http://biocare.net).

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

French

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Préparation des échantillons :

Les tissus fixés dans du formol peuvent être utilisés avant l'inclusion en paraffine. Les tissus osseux doivent être décalcifiés avant le traitement des tissus pour faciliter la coupe des tissus et éviter d'endommager les lames du microtome.<sup>1,2</sup>

Les tissus correctement fixés et intégrés exprimant l'antigène cible spécifié doivent être conservés dans un endroit frais. La loi sur l'amélioration des laboratoires cliniques (CLIA) de 1988 exige dans 42 CFR§493.1259(b) que « Le laboratoire doit conserver les lames colorées au moins dix ans à compter de la date de examen et conserver les blocs d'échantillons au moins deux ans à compter de la date de l'examen.<sup>3</sup>

## Traitements des tissus avant coloration :

Effectuer la récupération d'épitopes induite par la chaleur (HIER) selon le protocole recommandé ci-dessous. Il a été démontré que l'utilisation systématique de HIER avant l'IHC minimise les incohérences et standardise la coloration.<sup>4,5</sup>

### Avertissement et précautions:

1. Le DAB est connu pour être un cancérogène présumé.
2. N'exposez pas les composants DAB à une lumière forte ou à la lumière directe du soleil
3. Le DAB peut provoquer une sensibilisation cutanée. Eviter le contact avec la peau et les yeux.
4. Portez des gants et des vêtements de protection et prenez des précautions raisonnables lors de la manipulation, car le DAB est classé comme dangereux et peut provoquer le cancer et est soupçonné de provoquer des anomalies génétiques.
5. Manipulez les matériaux d'origine humaine ou animale comme potentiellement dangereux et éliminez ces matériaux avec les précautions appropriées. En cas d'exposition, suivre les directives sanitaires des autorités responsables du lieu d'utilisation.<sup>6,7</sup>
6. Les échantillons, avant et après la fixation, ainsi que tous les matériaux qui y sont exposés doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et éliminés avec les précautions appropriées. Ne jamais pipeter les réactifs par la bouche et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses avec les réactifs et les échantillons. Si les réactifs ou les échantillons entrent en contact avec des zones sensibles, laver abondamment à l'eau.<sup>8</sup>
7. La contamination microbienne des réactifs peut entraîner une augmentation des colorations non spécifiques.
8. Des durées ou des températures d'incubation autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés. L'utilisateur doit valider une telle modification.
9. Ne pas utiliser de réactif après la date de péremption imprimée sur le flacon.
10. Le(s) réactif(s) du kit de détection de micropolymères sont optimisés et prêts à être utilisés avec les anticorps Biocare et les réactifs auxiliaires. Reportez-vous aux instructions d'utilisation des anticorps primaires et des autres réactifs auxiliaires pour connaître les protocoles et les conditions d'utilisation recommandés.
11. Suivez les exigences des autorités locales et/ou nationales concernant la méthode d'élimination.
12. La FDS est disponible sur demande et se trouve sur <http://biocare.net>.
13. Signalez tout incident grave lié à cet appareil en contactant le représentant Biocare local et l'autorité compétente applicable de l'État membre ou du pays où se trouve l'utilisateur.

Ce kit chromogène contient des composants classés comme indiqué dans le tableau ci-dessous conformément au Règlement (CE) n° 1272/2008

Danger	Code	Mention de danger
	H314 H350	Susceptible de provoquer des anomalies génétiques. Peut provoquer le cancer.

## Mode d'emploi:

Les réactifs du kit chromogène sont optimisés pour une utilisation avec les anticorps Biocare et les réactifs auxiliaires. Reportez-vous aux instructions d'utilisation des anticorps primaires et des autres réactifs auxiliaires pour connaître les protocoles et les conditions d'utilisation recommandés. Les temps et les températures d'incubation varient en fonction du protocole d'anticorps spécifique suivi.

Lorsque vous utilisez un instrument de coloration automatisé, consultez le manuel d'utilisation de l'instrument spécifique et les instructions d'utilisation pour les paramètres de fonctionnement.

### Étapes procédurales générales pour effectuer l'IHC :

1. Déparaffinisation : Déparafiniez les lames dans du Slide Brite ou du xylène. Hydratez les lames dans une série d'alcools classés pour arroser.
2. Blocage du peroxyde : Bloquer pendant 5 minutes avec Peroxidized 1.
3. Solution/Protocole de prétraitement : Veuillez vous référer à la fiche technique de l'anticorps primaire concerné pour connaître la solution et le protocole de prétraitement recommandés.
4. Bloc protéique (facultatif) : Incuber pendant 5 à 10 minutes à température ambiante (RT) avec Background Punisher.
5. Anticorps primaires : Veuillez vous référer à la fiche technique de l'anticorps primaire concerné pour connaître la durée d'incubation.
6. Sonde (anticorps de souris uniquement) : Incuber pendant 5 à 15 minutes à température ambiante avec la sonde de souris MACH 4.
7. Polymère : Incuber pendant 10 à 20 minutes pour les anticorps de souris ou 30 minutes pour les anticorps de lapin à température ambiante avec le polymère MACH 4 HRP.
8. Chromogène : Incuber pendant 5 minutes à température ambiante avec le DAB de Biocare.
9. Contre-coloration : Contre-coloration avec de l'hématoxiline. Rincer à l'eau déminéralisée. Appliquez la solution bleuissante de Tacha pendant 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée.

### Notes techniques :

1. Utilisez TBS pour les étapes de lavage.

### Contrôle de qualité:

Reportez-vous aux normes de qualité du CLSI pour la conception et la mise en œuvre de tests d'immunohistochimie ; Directives approuvées-Deuxième édition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

### Contrôle tissulaire positif :

Les matériaux de contrôle positif externe doivent être des échantillons frais fixés, traités et incorporés dès que possible de la même manière que les échantillons du patient. Les contrôles tissulaires positifs indiquent des tissus correctement préparés et des techniques de coloration appropriées. Un contrôle tissulaire externe positif pour chaque ensemble de conditions de test doit être inclus dans chaque série de coloration.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

French

**BIOCARE**  
MEDICAL

Les tissus utilisés pour les matériaux de contrôle positif externe doivent être sélectionnés à partir d'échantillons de patients présentant de faibles niveaux bien caractérisés d'activité cible positive qui donnent une faible coloration positive. Le faible niveau de positivité des contrôles positifs externes est conçu de manière à garantir la détection de changements subtils dans la sensibilité des anticorps primaires dus à une instabilité ou à des problèmes avec la méthodologie IHC. Les lames de contrôle tissulaire disponibles dans le commerce ou les échantillons traités différemment des échantillons du patient valident uniquement les performances du réactif et ne vérifient pas la préparation des tissus.

Les contrôles tissulaires positifs connus ne doivent être utilisés que pour surveiller les performances correctes des tissus traités et des réactifs de test, plutôt que pour aider à formuler un diagnostic spécifique à partir d'échantillons de patients. Si les contrôles tissulaires positifs ne parviennent pas à démontrer une coloration positive, les résultats des échantillons de test doivent être considérés comme invalides.

## Contrôle tissulaire négatif :

Utilisez un contrôle tissulaire négatif fixé, traité et incorporé d'une manière identique aux échantillons du patient à chaque cycle de coloration pour vérifier la spécificité de l'anticorps primaire IHC pour démonstration de l'antigène cible et fournir une indication de la coloration de fond spécifique (coloration faussement positive). En outre, la variété des différents types de cellules présents dans la plupart des coupes de tissus peut être utilisé par le laboratoire comme sites de contrôle négatif interne pour vérifier les performances de l'IHC Caractéristiques. Les types et sources d'échantillons pouvant être utilisés pour les tissus négatifs les contrôles sont répertoriés dans la section Caractéristiques de performance.

Si une coloration spécifique (fausse coloration positive) se produit dans le contrôle tissulaire négatif, les résultats obtenus avec les échantillons du patient doivent être considérés comme invalides.

## Contrôle réactif négatif non spécifique :

Utiliser un contrôle réactif négatif non spécifique à la place de l'anticorps primaire avec une section de chaque échantillon de patient pour évaluer la coloration non spécifique et permettre une meilleure interprétation de la coloration spécifique au site de l'antigène. Idéalement, un contrôle réactif négatif contient un anticorps produit et préparé (c'est-à-dire dilué à la même concentration en utilisant le même diluant) pour être utilisé de la même manière que l'anticorps primaire, mais ne présente aucune réactivité spécifique avec les tissus humains dans la même matrice/solution que l'anticorps primaire. L'anticorps primaire. Le diluant seul peut être utilisé comme alternative moins souhaitable aux contrôles réactifs négatifs décrits précédemment. La période d'incubation du contrôle réactif négatif doit correspondre à celle de l'anticorps primaire.

Lorsque des panels de plusieurs anticorps sont utilisés sur des coupes en série, les zones de coloration négative d'une lame peuvent servir de contrôle de fond de liaison négatif/non spécifique pour d'autres anticorps. Pour différencier l'activité enzymatique endogène ou la liaison non spécifique des enzymes de l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être colorés exclusivement avec des complexes substrat-chromogène ou enzymatiques (PAP, avidine-biotine, streptavidine) et substrat-chromogène, respectivement.

## Vérification des analyses :

Avant la première utilisation d'un anticorps ou d'un système de coloration dans une procédure de diagnostic, l'utilisateur doit vérifier la spécificité de l'anticorps en le testant sur une série de tissus internes présentant des caractéristiques de performance immunohistochimiques connues représentant des tissus positifs et négatifs connus. Référez-vous aux procédures de contrôle qualité précédemment décrites dans cette section de

la notice du produit et aux recommandations de contrôle qualité du programme de certification CAP<sup>®</sup> pour l'immunohistochimie et/ou la directive NCCLS IHC<sup>11</sup>. Ces procédures de contrôle qualité doivent être répétées pour chaque nouveau lot d'anticorps ou chaque fois qu'il y a un changement dans les paramètres du test. Les tissus répertoriés dans la section Caractéristiques de performance conviennent à la vérification du test.

## Dépannage:

Suivez les recommandations du protocole spécifique aux anticorps selon la fiche technique fournie. Si des résultats atypiques apparaissent, contactez le support technique de Biocare au 1-800-542-2002.

## Interprétation de la coloration :

Le kit Betazoid DAB Chromogen produit une réaction de couleur brune au niveau des sites antigéniques localisés par l'anticorps primaire. Avant l'interprétation des résultats des patients, la coloration des contrôles doit être évaluée par un pathologiste qualifié. Les contrôles négatifs sont évalués et comparés aux lames colorées pour garantir que toute coloration observée n'est pas le résultat d'interactions non spécifiques.

## Contrôle tissulaire positif :

Le contrôle tissulaire positif coloré avec l'anticorps indiqué doit être examiné en premier pour s'assurer que tous les réactifs fonctionnent correctement. La coloration appropriée des cellules cibles (comme indiqué ci-dessus) indique une réactivité positive. Si les contrôles tissulaires positifs ne parviennent pas à démontrer une coloration positive, tous les résultats obtenus avec les échantillons de test doivent être considérés comme invalides.

La couleur du produit de réaction peut varier en fonction des chromogènes du substrat utilisé. Reportez-vous aux notices du substrat pour connaître les réactions de couleur attendues. De plus, une métachromasie peut être observée dans les variations de la méthode de coloration.<sup>12</sup>

Lorsqu'une contre-coloration est utilisée, en fonction de la durée d'incubation et de la puissance de la contre-coloration utilisée, la contre-coloration entraînera une coloration des noyaux cellulaires. Une contre-coloration excessive ou incomplète peut compromettre la bonne interprétation des résultats. Reportez-vous au(x) protocole(s) pour connaître la contre-coloration recommandée.

## Contrôle tissulaire négatif :

Le contrôle tissulaire négatif doit être examiné après le contrôle tissulaire positif afin de vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire. L'absence de coloration spécifique dans le contrôle tissulaire négatif confirme l'absence de réactivité croisée des anticorps avec les cellules/composants cellulaires. Si une coloration spécifique (fausse coloration positive) se produit dans le contrôle tissulaire externe négatif, les résultats obtenus avec l'échantillon du patient doivent être considérés comme invalides.

La coloration non spécifique, si elle est présente, a généralement un aspect diffus. Des colorations sporadiques du tissu conjonctif peuvent également être observées dans des coupes de tissus excessivement fixés au formol. Utilisez des cellules intactes pour l'interprétation des résultats de coloration. Les cellules nécrotiques ou dégénérées se colorent souvent de manière non spécifique.

## Tissu du patient :

Examiner les échantillons de patients colorés avec l'anticorps indiqué dernier. L'intensité de la coloration positive doit être évaluée dans le contexte de toute coloration de fond non spécifique du contrôle réactif négatif. Comme pour tout test immunohistochimique, un résultat négatif signifie que l'antigène n'a pas été détecté, et non que l'antigène était absent dans les cellules/tissus

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

45/18



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

French

**BIOCARE**  
M E D I C A L

analysés. Si nécessaire, utilisez un panel d'anticorps pour identifier les réactions faussement négatives.

Reportez-vous au résumé et à l'explication, aux limites et aux caractéristiques de performance pour obtenir des informations spécifiques concernant l'immunoréactivité des anticorps indiquée.

## Limites:

### Limites générales :

1. Pour *in vitro* utilisation diagnostique (IVD)
2. Ce produit est destiné à un usage professionnel uniquement : L'immunohistochimie est un processus de diagnostic en plusieurs étapes qui consiste en une formation spécialisée dans la sélection des réactifs appropriés ; sélection, fixation et traitement des tissus ; préparation de la lame IHC ; et interprétation des résultats de coloration.
3. À utiliser uniquement sur prescription médicale. (Réception uniquement)
4. La coloration des tissus dépend de la manipulation et du traitement du tissu avant la coloration. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, lavage, séchage, chauffage, sectionnement ou contamination par d'autres tissus ou fluides peut produire des artefacts, un piégeage d'anticorps ou des résultats faussement négatifs. Des résultats incohérents peuvent être dus à des variations dans les méthodes de fixation et d'intégration, ou à des irrégularités inhérentes au tissu.<sup>14</sup>
5. Une contre-coloration excessive ou incomplète peut compromettre la bonne interprétation des résultats.
6. L'interprétation clinique de toute coloration positive ou négative doit être évaluée dans le contexte de la présentation clinique, de la morphologie et d'autres critères histopathologiques. L'interprétation clinique de toute coloration positive ou négative doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles internes et externes positifs et négatifs appropriés ainsi que d'autres tests de diagnostic. Il est de la responsabilité d'un pathologiste qualifié qui connaît l'utilisation appropriée des anticorps, des réactifs et des méthodes IHC d'interpréter toutes les étapes utilisées pour préparer et interpréter la préparation IHC finale.
7. Les protocoles optimaux pour une application spécifique peuvent varier. Ceux-ci incluent, sans s'y limiter, la fixation, la méthode de récupération de chaleur, les temps d'incubation, la dilution des anticorps, l'épaisseur des coupes de tissu et le kit de détection utilisé. Reportez-vous aux instructions d'utilisation des anticorps primaires et des autres réactifs auxiliaires pour connaître les protocoles et les conditions d'utilisation recommandés. Les recommandations et protocoles de la fiche technique sont basés sur l'utilisation exclusive des produits Biocare. En fin de compte, il incombe à l'enquêteur de déterminer les conditions optimales.
8. Ce produit n'est pas destiné à être utilisé en cytométrie en flux. Les caractéristiques de performance n'ont pas été déterminées pour la cytométrie en flux.
9. Les tissus provenant de personnes infectées par le virus de l'hépatite B et contenant l'antigène de surface de l'hépatite B (AgHBs) peuvent présenter une coloration non spécifique à la peroxydase de raifort.<sup>14</sup>
10. Les réactifs peuvent présenter des réactions inattendues dans des tissus non testés auparavant. La possibilité de réactions inattendues, même dans les groupes de tissus testés, ne peut être complètement éliminée en raison de la variabilité biologique de l'expression de l'antigène dans les néoplasmes ou dans d'autres tissus pathologiques.<sup>15</sup> Contactez le support technique de Biocare au 1-800-542-2002, ou via les informations de support technique fournies sur biocare.net, avec une ou plusieurs réactions inattendues documentées.
11. Les sérum normaux/non immuns provenant de la même source animale que les antisérum secondaires utilisés dans les étapes de blocage peuvent provoquer des résultats faussement négatifs ou faussement positifs en raison d'auto-anticorps ou d'anticorps naturels.

12. Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique des protéines ou des produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être causés par une activité pseudo-peroxydase (érythrocytes), une activité peroxydase endogène (cytochrome C) ou une biotine endogène (par exemple, foie, sein, cerveau, rein), selon le type d'immunocoloration utilisé.<sup>13</sup>
13. Un résultat négatif signifie que l'antigène n'a pas été détecté et non que l'antigène était absent dans les cellules ou les tissus examinés.

### Limites spécifiques au produit :

*Aucune limitation supplémentaire spécifique au produit*

### Caractéristiques de performance:

La coloration a été réalisée en utilisant les protocoles fournis dans les instructions d'utilisation spécifiques de l'anticorps ou comme spécifié. La sensibilité et la spécificité de la coloration ont été évaluées sur une gamme de types de tissus normaux et néoplasiques évalués au cours du développement d'anticorps primaires.

### Reproductibilité :

La reproductibilité des systèmes de détection et des réactifs du système Biocare est vérifiée par une mesure de précision intermédiaire dans laquelle divers lots de réactifs ont été testés sur une période prolongée en utilisant divers opérateurs, analystes, lots de réactifs, échantillons de tissus et équipements. La coloration obtenue pour chaque réactif de détection évalué était cohérente et réalisée comme prévu.

### Dépannage:

1. Aucune coloration des lames – Vérifiez que le tissu de contrôle positif, les anticorps et les produits de détection appropriés ont été utilisés. Vérifiez si le retrait ou le prétraitement de la cire est incomplet ou inappropriate.
2. Faible coloration de toutes les lames – Vérifiez que le tissu de contrôle positif, les anticorps et les produits de détection appropriés ont été utilisés.
3. Fond excessif de toutes les lames – Il peut y avoir des niveaux élevés de biotine endogène (si vous utilisez des produits de détection à base de biotine), une activité HRP endogène convertissant le chromogène en produit final coloré (utiliser un bloc de peroxydase) ou une interaction protéique non spécifique excessive (utiliser un bloc, comme une solution de blocage à base de sérum ou de caséine).
4. Les coupes de tissus sont lavées sur les lames pendant l'incubation. Vérifiez les lames pour vous assurer qu'elles sont chargées positivement.
5. Coloration spécifique trop foncée – Vérifiez le protocole pour déterminer si le titre d'anticorps approprié a été appliqué à la lame, ainsi que les temps d'incubation appropriés pour tous les réactifs. De plus, assurez-vous que le protocole comporte suffisamment d'étapes de lavage pour éliminer les réactifs en excès une fois les étapes d'incubation terminées.

### Les références:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

French

**BIOCARE**  
M E D I C A L

7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Lab Med* 1983; 14:767.
14. 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. *AmJ Clin Path* 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfent EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

German

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Verwendungszweck:

Für *in vitro* Diagnostische Verwendung

Der Betazoid DAB Chromogen Kit ist für den Einsatz in manuellen oder automatisierten immunhistochemischen (IHC)-Färbeprotokollen zum Nachweis von Zielantigenen in formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Geweben vorgesehen, wenn es in Verbindung mit dem entsprechenden Nachweissystem und Primärantikörpern verwendet wird. Die klinische Interpretation jeglicher Verfärbung oder ihres Fehlens sollte durch morphologische Studien und geeignete Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests durch einen qualifizierten Pathologen bewertet werden.

## Zusammenfassung und Erklärung:

3,3'-Diaminobenzidin (DAB) ist ein gut etabliertes Chromogen, das in IHC-Färbeprotokollen verwendet wird und in Gegenwart eines Meerrettich-Peroxidase-Enzyms (HRP) einen braunen Niederschlag erzeugt, der in organischen Lösungsmitteln unlöslich ist und mit einem permanenten Eindeckmedium abgedeckt werden kann. Dieses Produkt wird in einem Zweikomponentensystem geliefert, das aus einem flüssigen, stabilen DAB-Chromogen und einem DAB-Substratpuffer besteht. Die Farbe der Chromogenpuffermischung kann von farblos bis hellbraun variieren. Die Färbeeigenschaften werden durch die Farbe der Chromogenpuffermischung nicht beeinflusst. Betazoid DAB ist eine sehr stabile Formulierung. Betazoid DAB kann sowohl manuell als auch auf automatischen Färbegeräten verwendet werden.

## Verfahrensgrundsatz:

Dieses DAB-Chromogen im Betazoid DAB Chromogen Kit ermöglicht bei Verwendung in IHC-Tests von FFPE-Gewebeschneitten die Visualisierung von Antigenen durch die sequentielle Anwendung von einer spezifischer Antikörper gegen das Antigen (primärer Antikörper), ein sekundärer Antikörper gegen den primären Antikörper (optionaler Link-Antikörper/Sonde), ein Enzymkomplex und ein chromogenes Substrat mit zwischengeschalteten Waschschriften. Die enzymatische Aktivierung des Chromogens führt zu einem sichtbaren Reaktionsprodukt an der Antigenstelle. Anschließend kann die Probe gegengefärbt und abgedeckt werden. Die Ergebnisse werden mithilfe eines Lichts interpretiert Mikroskop und Hilfe bei der Differentialdiagnose pathophysiologischer Prozesse, die oder ist möglicherweise nicht mit einem bestimmten Antigen verbunden.

## Materialen und Methoden:

### Mitgelieferte Reagenzien:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration:

Das Betazoid DAB Chromogen Kit ist für die Verwendung mit Biocare-Antikörpern und Hilfsreagenzien optimiert und muss unmittelbar vor der Verwendung verdünnt werden. Mischen Sie 1 Tropfen (32 µl) DAB-Chromogen pro 1,0 ml DAB-Substratpuffer. Die DAB-Arbeitslösung ist bei Lagerung bei 2–8 °C 5 Tage lang stabil.

## Bekannte Anwendungen:

Immunhistochemie (formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebe)

## Geliefert als:

*Betazoid DAB Chromogen*

DAB-Lösung. Weitere Einzelheiten finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

## *Betazoid DAB Substratpuffer*

Die gepufferte Lösung enthält 3 % Wasserstoffperoxidlösung. Weitere Einzelheiten finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

## Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien und Reagenzien:

Objektträger, positiv geladen

Positive und negative Gewebekontrollen

Wüstenkammer\* oder ähnliches Trockenofen (optional)

Xylol oder Xyloolersatz

Ethanol oder Reagenzalkohol

Enttarnungskammer\* oder ähnlicher Schnellkochtopf (optional)

Entionisiertes oder destilliertes Wasser

Waschpuffer\*

Vorbehandlungsreagenzien\* (optional)

Enzymverdauung\* (optional)

Peroxidase-Block\*

Proteinblock\* (optional)

Primärantikörper\*

Negativkontrollreagenzien\*

Erkennungskits\*

Hämatoxylin\* (Gegenfärbung)

Bläuungsreagenz\*

Eindeckmedium\*

Schutzglas

Lichtmikroskop (40-400-fache Vergrößerung)

\* Produkte von Biocare Medical: Informationen zu Katalognummern und zur Bestellung finden Sie auf der Website von Biocare Medical unter <http://biocare.net>. Bestimmte oben aufgeführte Reagenzien basieren auf der spezifischen Anwendung und dem verwendeten Nachweissystem.

## Lagerung und Stabilität:

Bei 2 °C bis 8 °C lagern. Bei Lagerung unter diesen Bedingungen ist das Produkt bis zum auf dem Fläschchenetikett aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden. Die Lagerung unter anderen als den angegebenen Bedingungen muss überprüft werden. Verdünnte Reagenzien sollten umgehend gemäß den Anweisungen verwendet werden. Unbenutztes verdünntes Reagenz ist bei Lagerung bei 2–8 °C 5 Tage lang stabil. Die Stabilität des vom Benutzer verdünnten Reagenzes über 5 Tage hinaus wurde von Biocare nicht nachgewiesen.

Positiv- und Negativkontrollen sollten gleichzeitig mit allen Patientenproben durchgeführt werden. Wenn eine unerwartete Färbung beobachtet wird, die nicht durch Abweichungen in den Laborverfahren erklärt werden kann, und ein Problem mit dem Antikörper vermutet wird, wenden Sie sich an den technischen Support von Biocare unter 1-800-542-2002 oder über die technischen Supportinformationen auf biocare.net.



60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

48/18



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

German

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Probenvorbereitung:

Zur Verwendung vor der Paraffineinbettung eignen sich in Formalin fixierte Gewebe. Knochengewebe sollte vor der Gewebebearbeitung entkalkt werden, um das Gewebeschneiden zu erleichtern und Schäden an den Mikrotomklingen zu verhindern.<sup>1,2</sup>

Ordnungsgemäß fixierte und eingebettete Gewebe, die das angegebene Antigen-Ziel exprimieren, sollten an einem kühlen Ort gelagert werden. Der Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) von 1988 schreibt 42 CFR vor §493.1259(b) besagt: „Das Labor muss gefärbte Objekträger mindestens zehn Jahre ab dem Datum aufbewahren Prüfung durchführen und Probenblöcke mindestens zwei Jahre ab dem Datum der Prüfung aufzubewahren.“<sup>3</sup>

## Behandlung von Geweben vor der Färbung:

Führen Sie die hitzeinduzierte Epitopgewinnung (HIER) gemäß dem unten empfohlenen Protokoll durch. Es hat sich gezeigt, dass die routinemäßige Verwendung von HIER vor der IHC Inkonsistenzen minimiert und die Färbung standardisiert.<sup>4,5</sup>

## Warnung und Vorsichtsmaßnahmen:

1. DAB steht im Verdacht, krebsverursachend zu sein.
2. Setzen Sie DAB-Komponenten keinem starken Licht oder direkter Sonneninstrahlung aus.
3. DAB kann eine Sensibilisierung der Haut verursachen. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.
4. Tragen Sie Handschuhe und Schutzkleidung und treffen Sie bei der Handhabung angemessene Vorsichtsmaßnahmen, da DAB als gefährlich eingestuft ist und Krebs verursachen kann und im Verdacht steht, genetische Defekte zu verursachen.
5. Behandeln Sie Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs als potenziell biologisch gefährlich und entsorgen Sie diese Materialien mit den entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen. Befolgen Sie im Falle einer Exposition die Gesundheitsvorschriften der zuständigen Behörden am Einsatzort.<sup>6,7</sup>
6. Proben vor und nach der Fixierung sowie alle ihnen ausgesetzten Materialien sollten so behandelt werden, als ob sie Infektionen übertragen könnten, und mit den entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen entsorgt werden. Pipettieren Sie Reagenzien niemals mit dem Mund und vermeiden Sie den Kontakt der Reagenzien und Proben mit der Haut und den Schleimhäuten. Wenn Reagenzien oder Proben mit empfindlichen Bereichen in Kontakt kommen, waschen Sie diese mit reichlich Wasser ab.<sup>8</sup>
7. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien kann zu einer Zunahme unspezifischer Färbungen führen.
8. Andere als die angegebenen Inkubationszeiten oder Temperaturen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Der Benutzer muss jede solche Änderung validieren.
9. Verwenden Sie das Reagenz nach dem auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfallsdatum nicht mehr.
10. Die Reagenzien des Mikropolymer-Nachweiskits sind optimiert und können mit Biocare-Antikörpern und Hilfsreagenzien verwendet werden. Empfohlene Protokolle und Verwendungsbedingungen finden Sie in den Gebrauchsanweisungen für Primärantikörper und andere Hilfsreagenzien.
11. Befolgen Sie die Anforderungen der örtlichen und/oder staatlichen Behörden hinsichtlich der Entsorgungsmethode.
12. Das Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage erhältlich und unter <http://biocare.net> zu finden.
13. Melden Sie alle schwerwiegenden Vorfälle im Zusammenhang mit diesem Gerät, indem Sie sich an den örtlichen Biocare-Vertreter und die zuständige Behörde des Mitgliedstaats oder Landes wenden, in dem sich der Benutzer befindet.

Dieses Chromogen-Kit enthält Komponenten, die gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 wie in der folgenden Tabelle angegeben klassifiziert sind

Gefahr	Code	Gefahrenhinweis
	H314 H350	Verursacht vermutlich genetische Defekte. Kann Krebs verursachen

## Gebrauchsanweisung:

Die Reagenzien des Chromogen-Kits sind für die Verwendung mit Biocare-Antikörpern und Hilfsreagenzien optimiert. Empfohlene Protokolle und Verwendungsbedingungen finden Sie in den Gebrauchsanweisungen für Primärantikörper und andere Hilfsreagenzien. Die Inkubationszeiten und -temperaturen variieren je nach dem spezifischen Antikörperprotokoll.

Wenn Sie ein automatisiertes Färbegerät verwenden, konsultieren Sie die jeweilige Bedienungsanleitung und Gebrauchsanweisung des Geräts zu den Betriebsparametern.

## Allgemeine Verfahrensschritte zur Durchführung der IHC:

1. Entparaffinierung: Objekträger in Slide Brite oder Xylol entparaffinieren. Hydrat-Objekträger in einer Reihe abgestufter Alkohole zu Wasser geben.
2. Peroxidblock: 5 Minuten lang mit Peroxidized 1 blockieren.
3. Vorbehandlungslösung/Protokoll: Die empfohlene Vorbehandlungslösung und das empfohlene Protokoll finden Sie im Datenblatt des jeweiligen Primärantikörpers.
4. Proteinblock (optional): 5–10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) mit Background Punisher inkubieren.
5. Primärantikörper: Die Inkubationszeit entnehmen Sie bitte dem Datenblatt des jeweiligen Primärantikörpers.
6. Sonde (nur Mausantikörper): 5–15 Minuten bei RT mit der MACH 4-Maussonde inkubieren.
7. Polymer: 10–20 Minuten für Maus-Antikörper oder 30 Minuten für Kaninchen-Antikörper bei RT mit MACH 4 HRP-Polymer inkubieren.
8. Chromogen: 5 Minuten bei RT mit Biocare DAB inkubieren.
9. Gegenfärbung: Gegenfärbung mit Hämatoylin. Mit entionisiertem Wasser spülen. Tragen Sie Tachas Bläuungslösung 1 Minute lang auf. Mit entionisiertem Wasser spülen.

## Technische Hinweise:

1. Verwenden Sie TBS für die Waschschriften.

## Qualitätskontrolle:

Siehe CLSI-Qualitätsstandards für Design und Implementierung von Immunhistochemie-Assays; Genehmigte Richtlinie – Zweite Auflage (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

## Positive Gewebekontrolle:

Externe positive Kontrollmaterialien sollten frische Proben sein, die so schnell wie möglich auf die gleiche Weise wie die Patientenprobe(n) fixiert, verarbeitet und eingebettet werden. Positive Gewebekontrollen weisen auf korrekt vorbereitetes Gewebe und geeignete Färbetechniken hin. In jedem Färbedurchlauf sollte eine positive externe Gewebekontrolle für jeden Satz Testbedingungen enthalten sein.

Die für die externen Positivkontrollmaterialien verwendeten Gewebe sollten aus Patientenproben mit gut charakterisierten niedrigen Konzentrationen der positiven Zielaktivität ausgewählt werden, die eine schwach positive Färbung ergeben. Der niedrige Positivitätsgrad für externe Positivkontrollen soll die

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

German

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Erkennung geringfügiger Veränderungen der primären Antikörperempfindlichkeit aufgrund von Instabilität oder Problemen mit der IHC-Methodik gewährleisten. Im Handel erhältliche Gewebekontrollobjektträger oder Proben, die anders als die Patientenprobe(n) verarbeitet wurden, validieren nur die Leistung der Reagenzien und nicht die Gewebevorbereitung.

Bekannte positive Gewebekontrollen sollten nur zur Überwachung der korrekten Leistung verarbeiteter Gewebe und Testreagenzien verwendet werden und nicht als Hilfe bei der Formulierung einer spezifischen Diagnose von Patientenproben. Wenn die positiven Gewebekontrollen keine positive Färbung zeigen, sollten die Ergebnisse mit den Testproben als ungültig betrachtet werden.

## Negative Gewebekontrolle:

Verwenden Sie bei jedem Färbedurchlauf eine negative Gewebekontrolle, die auf die gleiche Weise wie die Patientenprobe(n) fixiert, verarbeitet und eingebettet ist, um die Spezifität des IHC-Primärantikörpers zu überprüfen. Nachweis des Zielantigens und um einen Hinweis auf eine spezifische Hintergrundfärbung zu liefern (falsch positive Färbung). Auch die Vielfalt der verschiedenen Zelltypen, die in den meisten Gewebeschnitten vorhanden sind, kann dazu beitragen können vom Laboratorium als interne Negativkontrollstellen zur Überprüfung der Leistung des IHC verwendet werden Spezifikationen. Die Arten und Quellen der Proben, die für negatives Gewebe verwendet werden können Die Steuerelemente sind im Abschnitt „Leistungsmerkmale“ aufgeführt.

Wenn in der negativen Gewebekontrolle eine spezifische Färbung (falsch positive Färbung) auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

## Unspezifische Negativreagenzkontrolle:

Verwenden Sie anstelle des Primärantikörpers eine unspezifische Negativreagenzkontrolle mit einem Abschnitt jeder Patientenprobe, um die unspezifische Färbung zu bewerten und ermöglichen eine bessere Interpretation der spezifischen Färbung an der Antigenstelle. Idealerweise enthält eine negative Reagenzkontrolle einen Antikörper, der auf die gleiche Weise wie der Primärantikörper hergestellt und vorbereitet (d. h. mit demselben Verdünnungsmittel auf die gleiche Konzentration verdünnt) wurde, aber keine spezifische Reaktivität mit menschlichen Geweben in derselben Matrix/Lösung wie der Primärantikörper zeigt primärer Antikörper. Die Verwendung von Verdünnungsmittel allein kann eine weniger wünschenswerte Alternative zu den zuvor beschriebenen negativen Reagenzienkontrollen sein. Die Inkubationszeit der Negativreagenzkontrolle sollte der des Primärantikörpers entsprechen.

Wenn Panels mit mehreren Antikörpern auf Serienschnitten verwendet werden, können die negativ gefärbten Bereiche eines Objektträgers als negative/unspezifische Bindungshintergrundkontrolle für andere Antikörper dienen. Um endogene Enzymaktivität oder unspezifische Bindung von Enzymen von spezifischer Immunreakтивität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substrat-Chromogen oder Enzymkomplexen (PAP, Avidin-Biotin, Streptavidin) bzw. Substrat-Chromogen gefärbt werden.

## Assay-Verifizierung:

Vor der erstmaligen Verwendung eines Antikörpers oder Färbesystems in einem diagnostischen Verfahren sollte der Benutzer die Spezifität des Antikörpers überprüfen, indem er ihn an einer Reihe interner Gewebe mit bekannten immunhistochemischen Leistungsmerkmalen testet, die bekanntermaßen positive und negative Gewebe darstellen. Beachten Sie die zuvor in diesem Abschnitt der Produktbeilage beschriebenen Qualitätskontrollverfahren und die Qualitätskontrollempfehlungen des CAP-Zertifizierungsprogramms<sup>10</sup> für Immunhistochemie und/oder die NCCLS IHC-

Leitlinie<sup>11</sup>. Diese Qualitätskontrollverfahren sollten für jede neue Antikörpercharge oder bei jeder Änderung der Testparameter wiederholt werden. Die im Abschnitt „Leistungsmerkmale“ aufgeführten Gewebe sind für die Testverifizierung geeignet.

## **Fehlerbehebung:**

Befolgen Sie die Antikörper-spezifischen Protokollempfehlungen gemäß dem bereitgestellten Datenblatt. Wenn atypische Ergebnisse auftreten, wenden Sie sich unter 1-800-542-2002 an den technischen Support von Biocare.

## **Interpretation der Färbung:**

Das Betazoid DAB Chromogen Kit erzeugt eine braune Farbreaktion an den durch den Primärantikörper lokalisierten Antigenstellen. Vor der Interpretation der Patientenergebnisse muss die Färbung der Kontrollen von einem qualifizierten Pathologen beurteilt werden. Negativkontrollen werden ausgewertet und mit gefärbten Objektträgern verglichen, um sicherzustellen, dass die beobachtete Färbung nicht auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

## **Positive Gewebekontrolle:**

Die mit dem angegebenen Antikörper gefärbte positive Gewebekontrolle sollte zunächst untersucht werden, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien ordnungsgemäß funktionieren. Die entsprechende Färbung der Zielzellen (wie oben angegeben) weist auf eine positive Reaktivität hin. Wenn die positiven Gewebekontrollen keine positive Färbung zeigen, sollten alle Ergebnisse mit den Testproben als ungültig betrachtet werden.

Die Farbe des Reaktionsprodukts kann abhängig von den verwendeten Substratchromogenen variieren. Informationen zu den erwarteten Farbreaktionen finden Sie in den Packungsbeilagen des Substrats. Darüber hinaus kann bei Variationen der Färbemethode Metachromasie beobachtet werden.<sup>12</sup>

Wenn eine Gegenfärbung verwendet wird, führt die Gegenfärbung je nach Inkubationsdauer und Wirksamkeit der verwendeten Gegenfärbung zu einer Färbung der Zellkerne. Übermäßiges oder unvollständiges Gegenfärben kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen. Die empfohlene Gegenfärbung finden Sie im/in den Protokollen.

## **Negative Gewebekontrolle:**

Die negative Gewebekontrolle sollte nach der positiven Gewebekontrolle untersucht werden, um die Spezifität der Markierung des Zielantigens durch den Primärantikörper zu überprüfen. Das Fehlen einer spezifischen Färbung in der negativen Gewebekontrolle bestätigt das Fehlen einer Antikörper-Kreuzreakтивität mit Zellen/Zellkomponenten. Wenn bei der negativen externen Gewebekontrolle eine spezifische Färbung (falsch positive Färbung) auftritt, sollten die Ergebnisse mit der Patientenprobe als ungültig betrachtet werden.

Wenn eine unspezifische Färbung vorliegt, wirkt sie normalerweise diffus. In Schnitten aus übermäßig formalinfixiertem Gewebe kann es auch zu sporadischen Verfärbungen des Bindegewebes kommen. Verwenden Sie intakte Zellen zur Interpretation der Färbeergebnisse. Nekrotische oder degenerierte Zellen verfärben sich häufig unspezifisch.

## **Patientengewebe:**

Untersuchen Sie Patientenproben, die mit dem angegebenen Antikörper gefärbt sind zuletzt. Die Intensität der positiven Färbung sollte im Zusammenhang mit einer unspezifischen Hintergrundfärbung der negativen Reagenzkontrolle beurteilt werden. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis, dass das Antigen nicht nachgewiesen wurde und nicht, dass das Antigen in den untersuchten Zellen/Geweben fehlte. Verwenden Sie bei Bedarf ein Antikörper-Panel, um falsch-negative Reaktionen zu identifizieren.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

German

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Spezifische Informationen zur angegebenen Antikörper-Immunreakтивität finden Sie unter „Zusammenfassung und Erläuterung, Einschränkungen und Leistungsmerkmale“.

## Einschränkungen:

### Allgemeine Einschränkungen:

1. Für *in vitro* diagnostische (IVD) Verwendung
2. Dieses Produkt ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt: Die Immunhistochemie ist ein mehrstufiger diagnostischer Prozess, der aus einer speziellen Schulung zur Auswahl der geeigneten Reagenzien besteht; Gewebeauswahl, -fixierung und -verarbeitung; Vorbereitung der IHC-Folie; und Interpretation der Färbeergebnisse.
3. Nur auf ärztliche Verschreibung anwenden. (Nur Rx)
4. Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor der Färbung ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schniden oder Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörpereinschlüssen oder falsch negativen Ergebnissen führen. Inkonsistente Ergebnisse können auf unterschiedliche Fixierungs- und Einbettungsmethoden oder auf inhärente Unregelmäßigkeiten im Gewebe zurückzuführen sein.<sup>14</sup>
5. Übermäßiges oder unvollständiges Gegenfärbeln kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.
6. Die klinische Interpretation jeder positiven oder negativen Färbung sollte im Kontext des klinischen Erscheinungsbilds, der Morphologie und anderer histopathologischer Kriterien bewertet werden. Die klinische Interpretation jeder positiven oder negativen Färbung sollte durch morphologische Studien unter Verwendung geeigneter positiver und negativer interner und externer Kontrollen sowie anderer diagnostischer Tests ergänzt werden. Es liegt in der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, der mit der ordnungsgemäßen Verwendung von IHC-Antikörpern, Reagenzien und Methoden vertraut ist, alle Schritte zur Vorbereitung und Interpretation der endgültigen IHC-Präparation zu interpretieren.
7. Die optimalen Protokolle für eine bestimmte Anwendung können variieren. Dazu gehören unter anderem Fixierung, Wärmerückgewinnungsmethode, Inkubationszeiten, Antikörperverdünnung, Gewebeschichtdicke und das verwendete Nachweiskit. Empfohlene Protokolle und Verwendungsbedingungen finden Sie in den Gebrauchsanweisungen für Primärantikörper und andere Hilfsreagenzien. Die Empfehlungen und Protokolle im Datenblatt basieren auf der ausschließlichen Verwendung von Biocare-Produkten. Letztendlich liegt es in der Verantwortung des Forschers, optimale Bedingungen zu ermitteln.
8. Dieses Produkt ist nicht für die Verwendung in der Durchflusszytometrie bestimmt. Für die Durchflusszytometrie wurden keine Leistungsmerkmale ermittelt.
9. Gewebe von Personen, die mit dem Hepatitis-B-Virus infiziert sind und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) enthalten, können eine unspezifische Färbung mit Meerrettichperoxidase aufweisen.<sup>14</sup>
10. Reagenzien können in zuvor nicht getesteten Geweben unerwartete Reaktionen hervorrufen. Die Möglichkeit unerwarteter Reaktionen selbst in getesteten Gewebegruppen kann aufgrund der biologischen Variabilität der Antigenexpression in Neoplasmen oder anderen pathologischen Geweben nicht vollständig ausgeschlossen werden.<sup>15</sup> Kontaktieren Sie den technischen Support von Biocare unter 1-800-542-2002 oder über die technischen Supportinformationen auf biocare.net mit dokumentierten unerwarteten Reaktionen.
11. Normale/nichtimmune Seren aus derselben tierischen Quelle wie sekundäre Antiseren, die in Blockierungsschritten verwendet werden, können aufgrund von Autoantikörpern oder natürlichen Antikörpern zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen führen.
12. Falsch positive Ergebnisse können aufgrund einer nicht immunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten auftreten. Abhängig von der Art der

verwendeten Immunfärbung können sie auch durch Pseudoperoxidaseaktivität (Erythrozyten), endogene Peroxidaseaktivität (Cytochrom C) oder endogenes Biotin (z. B. Leber, Brust, Gehirn, Niere) verursacht werden.<sup>13</sup>

13. Ein negatives Ergebnis bedeutet, dass das Antigen nicht nachgewiesen wurde und nicht, dass das Antigen in den untersuchten Zellen oder im untersuchten Gewebe fehlte.

### Produktspezifische Einschränkungen:

*Keine zusätzlichen produktspezifischen Einschränkungen*

### Leistungsmerkmale:

Die Färbung wurde unter Verwendung der Protokolle durchgeführt, die in der spezifischen Gebrauchsanweisung des Antikörpers enthalten sind oder wie angegeben. Die Sensitivität und Spezifität der Färbung wurde für eine Reihe normaler und neoplastischer Gewebetypen bewertet, die während der Entwicklung von Primärantikörpern untersucht wurden.

### Reproduzierbarkeit:

Die Reproduzierbarkeit der Nachweissysteme und Systemreagenzien von Biocare wird durch eine Messung mittlerer Präzision überprüft, bei der verschiedene Reagenzienchargen über einen längeren Zeitraum unter Verwendung verschiedener Bediener, Analysten, Reagenzienchargen, Gewebeproben und Geräte getestet wurden. Die für jedes ausgewertete Nachweisreagenz erhaltene Färbung war konsistent und verlief wie erwartet.

### Fehlerbehebung:

1. Keine Färbung der Objekträger – Überprüfen Sie, ob geeignetes positives Kontrollgewebe, Antikörper und Nachweisprodukte verwendet wurden. Überprüfen Sie, ob die Wachsentfernung oder Vorbehandlung unvollständig oder unsachgemäß erfolgt ist.
2. Schwache Färbung aller Objekträger – Überprüfen Sie, ob geeignetes positives Kontrollgewebe, Antikörper und Nachweisprodukte verwendet wurden.
3. Übermäßiger Hintergrund auf allen Objekträgern – Möglicherweise liegen hohe Mengen an endogenem Biotin vor (bei Verwendung biotinbasierter Nachweisprodukte), endogene HRP-Aktivität, die Chromogen in ein farbiges Endprodukt umwandelt (Peroxidase-Block verwenden), oder übermäßige unspezifische Proteininteraktion (Verwenden eines Proteins). (z. B. eine Serum- oder Casein-basierte Blockierungslösung).
4. Gewebeschnitte werden während der Inkubation von den Objekträgern abgewaschen – Überprüfen Sie die Objekträger, um sicherzustellen, dass sie positiv geladen sind.
5. Spezifische Färbung zu dunkel – Überprüfen Sie das Protokoll, um festzustellen, ob der richtige Antikörpertiter auf den Objekträger aufgetragen wurde und ob die Inkubationszeiten für alle Reagenzien korrekt sind. Stellen Sie außerdem sicher, dass das Protokoll genügend Waschschrifte enthält, um überschüssige Reagenzien nach Abschluss der Inkubationsschritte zu entfernen.

### Verweise:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

German

**BIOCARE**  
M E D I C A L

6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Lab Med* 1983; 14:767.
14. 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. *AmJ Clin Path* 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Greek

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Προβλεπόμενη χρήση:

Γιατίν *vitro* Διαγνωστική χρήση

Ο Betazoid DAB Chromogen Kit προορίζεται για χρήση σε πρωτόκολλα χρώσης είτε με χειροκίνητο είτε με αυτοματοποιημένο ανοσοϊστοχημείο (IHC) για την ανίχνευση αντιγόνων-στόχων σε ιστούς σταθεροποιημένους με φορμαλίνη, ενσωματωμένους σε παραφίνη (FFPE) όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης και τα πρωτεύοντα αντισώματα. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται από μορφολογικές μελέτες και κατάλληλους ελέγχους και θα πρέπει να αξιολογείται στο πλαίσιο του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και όλων διαγνωστικών εξετάσεων από έξιδικευμένο παθολόγο.

## Περιληφθη και Επεξήγηση:

3,3' Διαμινοβενζόνη (DAB) είναι ένα καλά καθιερωμένο χρωμογόνο που χρησιμοποιείται σε πρωτόκολλα χρώσης IHC, το οποίο παρουσία ενζύμου υπεροξειδάσης αγριοραπανίδας (HRP), παράγει ένα καφέ ίζημα που είναι αδιάλυτο σε οργανικούς διαλύτες και μπορεί να καλυφθεί με μόνιμο μέσο στερέωσης. Αυτό το προϊόν διατίθεται σε ένα σύστημα δύο συστατικών που αποτελείται από ένα υγρό σταθερό χρωμογόνο DAB και ένα ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος DAB. Το χρώμα του μίγματος ρυθμιστικού διάλυματος χρωμογόνου μπορεί να ποικίλλει από άχρωμο έως ανοιχτό καφέ. Οι ιδιότητες χρώσης δεν επηρεάζονται από το χρώμα του ρυθμιστικού μίγματος χρωμογόνου. Το Betazoid DAB είναι ένα σκεύεσμα που είναι πολύ σταθερό. Το Betazoid DAB μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο χειροκίνητα όσο και σε αυτοματοποιημένους χρωματιστές.

## Αρχή Διαδικασίας:

Αυτό το χρωμογόνο DAB στο κιτ χρωμογόνου Betazoid DAB, όταν χρησιμοποιείται στη δοκιμή IHC τμημάτων ιστού FFPE, επιτρέπει την οπτικού ήπιην ανίχνευση των αντιγόνων μέσω της διαδοχικής εφαρμογής ενός ειδικού αντισώματος στο αντιγόνο (πρωτεύον αντισώμα), ένα δευτερεύον αντισώμα στο πρωτεύον αντισώμα (προαιρετικό αντισώμα σύνδεσης/ανιχνευτής), ένα σύμπλεγμα ενζύμων και ένα χρωμογόνο υπόστρωμα με παρεμβαλλόμενα στάδια έκπλυσης. Η ενζυματική ενεργοποίηση του χρωμογόνου έχει ως αποτέλεσμα ένα ορατό προϊόν αντίδρασης στη θέση του αντιγόνου. Στη συνέχεια, το δείγμα μπορεί να αντιχρωματιστεί και να καλυφθεί. Τα αποτέλεσματα ερμηνεύονται από ένα φως μικροσκόπιο και βοήθεια στη διαφορική διάγνωση παθοφυσιολογικών διεργασιών, που μπορεί να μπορεί να μην σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

## Υλικά και μέθοδοι:

### Παρεχόμενα αντίδραστήρια:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Ανασύσταση, ανάμειξη, αραίωση, τιτλοδότηση:

Το κιτ χρωμογόνου Betazoid DAB είναι βελτιστοποιημένο για χρήση με αντισώματα Biocare και βιοθητικά αντιδραστήρια και πρέπει να αραίωνται ακριβώς πριν από τη χρήση. Αναμείξτε 1 σταγόνα (32 μL) χρωμογόνου DAB ανά 1,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος υποστρώματος DAB. Το διάλυμα εργασίας DAB είναι σταθερό για 5 ημέρες εάν φυλάσσεται στους 2-8°C.

## Γνωστές εφαρμογές:

Ανοσοϊστοχημεία (ιστοί ενσωματωμένοι σε παραφίνη σταθεροποιημένοι με φορμαλίνη)

## Παρέχεται ως:

Betazoid DAB Chromogen

Διάλυμα DAB. Δείτε το Φύλλο Δεδομένων Ασφαλείας για πρόσθετες λεπτομέρειες.

## Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος Betazoid DAB

Το ρυθμισμένο διάλυμα περιέχει 3% διάλυμα υπεροξειδείδιου του υδρογόνου. Δείτε το Φύλλο Δεδομένων Ασφαλείας για πρόσθετες λεπτομέρειες.

## Υλικά και αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται:

Διαφάνειες μικροσκοπίου, θετικά φορτισμένες

Θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι ιστών

Desert Chamber\* ή παρόμοιος φούρνος στεγνώματος (προαιρετικό)

Ξυλόλιο ή υποκατάστατο ξυλολίου

Αιθανόλη ή αλκοόλη αντιδραστηρίου

Θάλαμος αποκάλυψης\* ή παρόμοια χύτρα ταχύτητας (προαιρετικά)

Απονισμένο ή παρεσταμένο νερό

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης\*

Αντιδραστήρια προεπεξεργασίας\* (προαιρετικά)

Πέψη ενζύμων\* (προαιρετικό)

Μπλοκ υπεροξειδάσης\*

Μπλοκ πρωτεΐνης\* (προαιρετικό)

Πρωτογενές αντίσωμα\*

Αντιδραστήριο αρνητικού ελέγχου\*

Κιτ ανίχνευσης\*

Αιματοξύλινη\* (αντίχρηση)

Μπλε αντιδραστήριο\*

Μέσο τοποθέτησης\*

Κάλυμμα

Μικροσκόπιο φωτός (μεγέθυνση 40-400X)

\* Ιατρικά Προϊόντα Biocare: Ανατρέξτε στον ιστότοπο της Biocare Medical που βρίσκεται στη διεύθυνση <http://biocare.net> για πληροφορίες σχετικά με τους αριθμούς καταλόγου και τις παραγγελίες. Ορισμένα αντιδραστήρια που αναφέρονται παραπάνω βασίζονται σε συγκεκριμένη εφαρμογή και σύστημα ανίχνευσης που χρησιμοποιείται.

## Αποθήκευση και σταθερότητα:

Φυλάσσεται στους 2°C έως 8°C. Το προϊόν είναι σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλίδιου όταν φυλάσσεται υπό αυτές τις συνθήκες. Να μη χρησιμοποιείται μετά την ημερομηνία λήξης. Η αποθήκευση υπό οποιεσδήποτε συνθήκες εκτός από αυτές που καθορίζονται πρέπει να επαληθεύεται. Τα αραιωμένα αντιδραστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αμέσως σύμφωνα με τις οδηγίες. Το αχρησιμοποίητο αραιωμένο αντιδραστήριο είναι σταθερό για 5 ημέρες εάν φυλάσσεται στους 2-8°C. Η σταθερότητα του αντιδραστηρίου αραιωμένου χρήστη πέραν των 5 ημερών δεν έχει τεκμηριωθεί από τη Biocare.

Οι θετικοί και οι αρνητικοί μάρτυρες θα πρέπει να εκτελούνται ταυτόχρονα με όλα τα δείγματα ασθενών. Εάν παρατηρηθεί απροσδόκητη χρώση που δεν μπορεί να εξηγηθεί από διαφορές στις εργαστηριακές διαδικασίες και υπάρχει

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Greek

υποψία για πρόβλημα με το αντίσωμα, επικοινωνήστε με την Τεχνική Υποστήριξη της Biocare στο 1-800-542-2002 ή μέσω των πληροφοριών τεχνικής υποστήριξης που παρέχονται στο biocare.net.

## Προετοιμασία δείγματος:

Οι ιστοί στερεωμένοι σε φορμαλίνη είναι κατάλληλοι για χρήση πριν από την ενσωμάτωση παραφίνης. Οι οστικοί ιστοί θα πρέπει να απασθεστώνται πριν από την επεξεργασία του ιστού για να διευκολυνθεί η κοπή του ιστού και να αποφευχθεί η ζημιά στις λεπίδες του μικροτόμου.<sup>1,2</sup>

Οι σωστά στερεωμένοι και ενσωματωμένοι ιστοί που εκφράζουν τον καθορισμένο στόχο αντιγόνου θα πρέπει να φυλάσσονται σε δροσερό μέρος. Ο νόμος για τη βελτίωση του κλινικού εργαστηρίου (CLIA) του 1988 απαιτεί στο 42 CFR§493.1259(β) ότι «Το εργαστήριο πρέπει να διατηρεί λεκιασμένες αντικειμενοφόρους πλάκες τουλάχιστον δέκα χρόνια από την ημερομηνία εξέτασης και διατηρησης των τμημάτων δειγμάτων τουλάχιστον δύο χρόνια από την ημερομηνία εξέτασης.»<sup>3</sup>

## Θεραπεία ιστών πριν από τη χρώση:

Εκτελέστε Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο παρακάτω. Η τακτική χρήση του HIER πριν από την IHC έχει αποδειχθεί ότι ελαχιστοποιεί την ασυνέπεια και τυποποιεί τη χρώση.<sup>4,5</sup>

## Προειδοποίηση και προφυλάξεις:

1. Το DAB είναι γνωστό ότι είναι ύποπτο καρκινογόνο.
2. Μην εκθέτετε τα εξαρτήματα DAB σε έντονο φως ή άμεσο ηλιακό φως.
3. Το DAB μπορεί να προκαλέσει ευαισθητοποίηση του δέρματος. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα και τα μάτια.
4. Φοράτε γάντια και προστατευτικό ρουχισμό και λαμβάνετε εύλογες προφυλάξεις κατά τον χειρισμό καθώς το DAB ταξινομείται ως κίνδυνος και μπορεί να προκαλέσει καρκίνο και υπάρχει υποψία ότι προκαλεί γενετικά ελαττώματα.
5. Χειριστείτε υλικά ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης ως δυνητικά βιολογικά επικίνδυνα και πετάξτε αυτά τα υλικά με τις κατάλληλες προφυλάξεις. Σε περίπτωση έκθεσης, ακολουθήστε τις υγειονομικές οδηγίες των αρμόδιων αρχών όπου χρησιμοποιείται.<sup>6,7</sup>
6. Τα δείγματα, πριν και μετά τη στερέωση, και όλα τα υλικά που εκτίθενται σε αυτά πρέπει να αντιμετωπίζονται σαν να μπορούν να μεταδώσουν μόλυνση και να απορρίπτονται με τις κατάλληλες προφυλάξεις. Ποτέ μην μεταφέρετε τα αντιδραστήρια με πιπέτα από το στόμα και αποφύγετε την επαφή του δέρματος και των βλεννογόνων με αντιδραστήρια και δείγματα. Εάν τα αντιδραστήρια ή τα δείγματα έρθουν σε επαφή με ευαισθητές περιοχές, πλύνετε με άφθονη ποσότητα νερού.<sup>8</sup>
7. Η μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της μη ειδικής χρώσης.
8. Χρόνοι επώασης ή θερμοκρασίες διαφορετικές από αυτές που καθορίζονται μπορεί να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει οποιαδήποτε τέτοια αλλαγή.
9. Μη χρησιμοποιείτε το αντιδραστήριο μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στο φιαλίδιο.
10. Τα αντιδραστήρια του κιτ ανίχνευσης μικρο-πολυμερούς είναι βελτιστοποιημένα και έτοιμα για χρήση με αντισώματα Biocare και βοηθητικά αντιδραστήρια. Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του πρωτογενούς αντισώματος και άλλων βοηθητικών αντιδραστηρίων για συνιστώμενα πρωτόκολλα και συνθήκες χρήσης.
11. Ακολουθήστε τις απαιτήσεις των τοπικών ή/και κρατικών αρχών για τη μέθοδο απόρριψης.
12. Το SDS είναι διαθέσιμο κατόπιν αιτήματος και βρίσκεται στη διεύθυνση <http://biocare.net>.
13. Αναφέρετε τυχόν σοβαρά περιστατικά που σχετίζονται με αυτήν τη συσκευή επικοινωνώντας με τον τοπικό αντιπρόσωπο της Biocare και την αρμόδια αρμόδια αρχή του κράτους μέλους ή της χώρας όπου βρίσκεται ο χρήστης.

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Αυτό το κιτ χρωμογόνου περιέχει συστατικά ταξινομημένα όπως υποδεικνύεται στον παρακάτω πίνακα σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1272/2008

Κίνδυνος	Κώδικας	Δήλωση κινδύνου
	H314 H350	'Υποποτού προκαλεί γενετικά ελαττώματα Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο

## Οδηγίες χρήσης:

Τα αντιδραστήρια του κιτ χρωμογόνου είναι βελτιστοποιημένα για χρήση με αντισώματα Biocare και βοηθητικά αντιδραστήρια. Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του πρωτογενούς αντισώματος και άλλων βοηθητικών αντιδραστηρίων για συνιστώμενα πρωτόκολλα και συνθήκες χρήσης. Οι χρόνοι και οι θερμοκρασίες επώασης θα ποικίλουν ανάλογα με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αντισώμάτων που ακολουθείται.

Όταν χρησιμοποιείτε ένα αυτόματο όργανο χρώσης, συμβουλευτείτε το συγκεκριμένο εγχειρίδιο χειριστή του οργάνου και τις οδηγίες χρήσης για τις παραμέτρους λειτουργίας.

## Γενικά διαδικαστικά βήματα για την εκτέλεση IHC:

1. Αποπαραφίνηση: Αποπαραφίνηση διαφανειών σε Slide Brite ή ξυλόλιο. Η ενύδατωση ολισθαίνει σε μια σειρά από διαβαθμισμένες αλκοόλες σε νερό.
2. Μπλοκ υπεροξειδίου: Μπλοκάρετε για 5 λεπτά με Peroxidized 1.
3. Διάλυμα/Πρωτόκολλο προεπεξεργασίας: Ανατρέξτε στο αντίστοιχο φύλλο δεδομένων πρωτογενών αντισώμάτων για το προτεινόμενο διάλυμα και πρωτόκολλο προεπεξεργασίας.
4. Μπλοκ πρωτεΐνης (προαιρετικό): Επωάστε για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT) με Background Punisher.
5. Πρωτεύον αντίσωμα: Ανατρέξτε στο αντίστοιχο φύλλο δεδομένων πρωτογενούς αντισώματος για το χρόνο επώασης.
6. Ανιχνευτής (μόνο για αντισώματα ποντικού): Επωάστε για 5-15 λεπτά σε RT με MACH 4 Mouse Probe.
7. Πολυμερές: Επωάστε για 10-20 λεπτά για αντισώματα ποντικού ή 30 λεπτά για αντισώματα κουνελού σε RT με MACH 4 HRP Polymer.
8. Χρωμογόνο: Επωάστε για 5 λεπτά σε RT με το DAB της Biocare.
9. Αντίχρηση: Αντίχρηση με αιματοξύλινη. Ξεπλύνετε με αιπονισμένο νερό. Εφαρμόστε Tacha's Bluing Solution για 1 λεπτό. Ξεπλύνετε με αιπονισμένο νερό.

## Τεχνικές σημειώσεις:

1. Χρησιμοποιήστε TBS για τα βήματα πλυσίματος.

## Ελεγχος ποιότητας:

Ανατρέξτε στα πρότυπα ποιότητας του CLSI για τον σχεδιασμό και την εφαρμογή αναλύσεων ανοσοϊστοχημείας. Εγκεκριμένη Οδηγία-Δεύτερη έκδοση (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA ΗΠΑ ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

## Θετικός έλεγχος ιστού:

Τα υλικά εξωτερικού θετικού μάρτυρα θα πρέπει να είναι φρέσκα δείγματα που στερεώνονται, υποβάλλονται σε επεξεργασία και ενσωματώνονται το συντομότερο δυνατό με τον ίδιο τρόπο όπως το(α) δείγμα(α) ασθενούς. Οι θετικοί έλεγχοι ιστών είναι ενδεικτικοί των σωστά προετοιμασμένων ιστών και των κατάλληλων τεχνικών χρώσης. Ένας θετικός εξωτερικός μάρτυρας ιστού για κάθε σύνολο συνθηκών δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνεται σε κάθε δοκιμή χρώσης.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Greek

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Οι ιστοί που χρησιμοποιούνται για τα υλικά εξωτερικού θετικού ελέγχου θα πρέπει να επιλέγονται από δείγματα ασθενών με καλά χαρακτηρισμένα χαμηλά επίπεδα θετικής δραστηριότητας στόχου που δινει ασθενή θετική χρώση. Το χαμηλό επίπεδο θετικότητας για εξωτερικούς θετικούς ελέγχους έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να διασφαλίζει την ανίχνευση ανεπαίσθητων αλλαγών στην ευαισθησία του πρωτογενούς αντισώματος από αστάθεια ή προβλήματα με τη μεθοδολογία IHC. Οι πλάκες ελέγχου ιστού που διατίθενται στο εμπόριο θα δείγματα που έχουν υποστεί διαφορετική επεξεργασία από τα δείγματα ασθενούς επικυρώνουν μόνο την απόδοση του αντιδραστηρίου και δεν επαληθεύουν την προετοιμασία ιστού.

Οι γνωστοί θετικοί μάρτυρες ιστών θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο για την παρακολούθηση της σωστής απόδοσης των επεξεργασμένων ιστών και των δοκιμαστικών αντιδραστηρίων, παρά ως βοήθημα στη διαμόρφωση μιας συγκεκριμένης διάγνωσης δειγμάτων ασθενών. Εάν οι θετικοί μάρτυρες ιστού δεν καταφέρουν να επιδείξουν θετική χρώση, τα αποτελέσματα με τα δείγματα δοκιμής θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

## Αρνητικός έλεγχος ιστού:

Χρησιμοποιήστε ένα αρνητικό μάρτυρα ιστού, σταθεροποιημένο, επεξεργασμένο και ενσωματωμένο με τρόπο πανομοιότυπο με το(τα) δείγμα(α) ασθενούς με κάθε διαδικασία χρώστης για να επαληθεύσετε την ειδικότητα του πρωτογενούς αντισώματος IHC για επίδειξη του αντιγόνου στόχου και για παροχή ένδειξης ειδικής χρώσης υποβάθρου (ψευδώς θετική χρώση). Επίσης, η ποικιλία διαφορετικών τύπων κυττάρων που υπάρχουν στα περισσότερα τμήματα ιστού μπορεί να χρησιμοποιηθούν από τον εργαστήριο ως εσωτερικές θέσεις αρνητικού ελέγχου για την επαλήθευση της απόδοσης του IHC Προδιαγραφές. Οι τύποι και οι πηγές των δειγμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αρνητικό ιστό Τα στοιχεία ελέγχου παρατίθενται στην ενότητα Χαρακτηριστικά απόδοσης.

Εάν εμφανιστεί ειδική χρώση (ψευδώς θετική χρώση) στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

## Μη ειδικός αρνητικός έλεγχος αντιδραστηρίου:

Χρησιμοποιήστε έναν μη ειδικό μάρτυρα αρνητικού αντιδραστηρίου στη θέση του πρωτογενούς αντισώματος με μια τομή από κάθε δείγμα ασθενούς για να ξειλογήσετε τη μη ειδική χρώση και επιτρέπουν την καλύτερη ερμηνεία της ειδικής χρώσης στη θέση του αντιγόνου. Στην ίδιανη περίπτωση, ένας αρνητικός έλεγχος αντιδραστηρίου περιέχει ένα αντίσωμα που παράγεται και παρασκευάζεται (δηλαδή αραιώμενο στην ίδια συγκέντρωση χρησιμοποιώντας το ίδιο αραιωτικό) για χρήση με τον ίδιο τρόπο όπως το πρωτεύον αντίσωμα, αλλά δεν παρουσιάζει ειδική αντιδραστικότητα με ανθρώπινους ιστούς στην ίδια μήτρα/διάλυμα με το πρωτογενές αντίσωμα. Το αραιωτικό μόνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λιγότερο επιμυητή εναλλακτική λύση στα προηγουμένων περιγραφέντα αρνητικά αντιδραστηρία ελέγχου. Η περίοδος επώασης για τον αρνητικό μάρτυρα αντιδραστηρίου πρέπει να αντιστοιχεί σε αυτή του πρωτογενούς αντισώματος.

Όταν χρησιμοποιούνται πάνελ πολλών αντισωμάτων σε σειριακές τομές, οι αρνητικά χρωματισμένες περιοχές μιας αντικειμενοφόρου πλάκας μπορεί να χρησιμεύσουν ως έλεγχος υποβάθρου αρνητικής/μη ειδικής δέσμευσης για άλλα αντισώματα. Για να διαφοροποιηθεί η ενδογενής ενζύμικη δραστηριότητα ή η μη ειδική δέσμευση ενζύμων από την ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, επιπλέον ιστοί ασθενών μπορούν να χρωματιστούν αποκλειστικά με σύμπλοκα υποστρώματος-χρωμογόνου ή ενζύμου (PAP, αβιδίνη-βιοτίνη, στρεπταβιδίνη) και υπόστρωμα-χρωμογόνο, αντιστοιχα.

## Επαλήθευση δοκιμασίας:

Πριν από την αρχική χρήση ενός αντισώματος ή συστήματος χρώσης σε μια διαγνωστική διαδικασία, ο χρήστης θα πρέπει να επαληθεύσει την ειδικότητα του αντισώματος δοκιμάζοντας το σε μια σειρά εσωτερικών ιστών με γνωστά

ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά απόδοσης που αντιπροσωπεύουν γνωστούς θετικούς και αρνητικούς ιστούς. Ανατρέξτε στις διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου που περιγράφηκαν προηγουμένως σε αυτήν την ενότητα του ένθετου προϊόντος και στις συστάσεις ποιοτικού ελέγχου του προγράμματος πιστοποίησης CAP<sup>10</sup> για την ανοσοϊστοχημεία και/ή την κατευθυντήρια γραμμή NCCLS IHC<sup>11</sup>. Αυτές οι διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου θα πρέπει να επαναλαμβάνονται για κάθε νέα παρτίδα αντισωμάτων ή όποτε υπάρχει αλλαγή στις παραμέτρους της ανάλυσης. Οι ιστοί που αναφέρονται στην ενότητα Χαρακτηριστικά απόδοσης είναι κατάλληλοι για επαλήθευση της ανάλυσης.

## Αντιμετώπιση προβλημάτων:

Ακολουθήστε τις συστάσεις του ειδικού πρωτοκόλλου για τα αντισώματα σύμφωνα με το παρεχόμενο φύλλο δεδομένων. Εάν προκύψουν άτυπα αποτελέσματα, επικοινωνήστε με την Τεχνική Υποστήριξη της Biocare στο 1-800-542-2002.

## Ερμηνεία της χρώσης:

Το κιτ χρωμογόνου Betazoid DAB προκαλεί αντίδραση καφέ χρώματος στις θέσεις αντιγόνου που εντοπίζονται από το πρωτεύον αντίσωμα. Πριν από την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των ασθενών, η χρώση των μαρτύρων πρέπει να αξιολογηθεί από εξειδικευμένο παθολόγο. Οι αρνητικοί μάρτυρες αξιολογούνται και συγκρίνονται με βαρμένες αντικειμενοφόρες πλάκες για να διασφαλιστεί ότι τυχόν χρώση που παρατηρείται δεν είναι αποτέλεσμα μη ειδικών αλληλεπιδράσεων.

## Θετικός έλεγχος ιστού:

Ο θετικός μάρτυρας ιστού που έχει χρωματιστεί με ενδεικνυόμενο αντίσωμα θα πρέπει να εξεταστεί πρώτα για να διαπιστωθεί ότι όλα τα αντιδραστήρια λειτουργούν σωστά. Η κατάλληλη χρώση των κυττάρων-στόχων (όπως υποδεικνύεται παραπάνω) είναι ενδεικτική της θετικής αντιδραστικότητας. Εάν οι θετικοί μάρτυρες ιστού αποτύχουν να επιδείξουν θετική χρώση, τυχόν αποτελέσματα με τα δείγματα δοκιμής θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Το χρώμα του προϊόντος αντίδρασης μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τα χρωμογόνα του υποστρώματος που χρησιμοποιούνται. Ανατρέξτε στα ένθετα συσκευασίας του υποστρώματος για τις αναμενόμενες χρωματικές αντιδράσεις. Περαιτέρω, μεταχρωμασία μπορεί να παρατηρηθεί σε παραλλαγές της μεθόδου χρώσης.<sup>12</sup>

Όταν χρησιμοποιείται αντιχρώση, ανάλογα με το μήκος επώασης και την ισχύ της αντιχρώσης που χρησιμοποιείται, η αντιχρώση θα οδηγήσει σε χρωματισμό των κυτταρικών πυρήνων. Η υπερβολική ή ατελής αντιχρώση μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Ανατρέξτε στο(a) πρωτόκολλο(a) για προτεινόμενη αντιχρώση.

## Αρνητικός έλεγχος ιστού:

Ο αρνητικός μάρτυρας ιστού θα πρέπει να εξετάζεται μετά τον θετικό μάρτυρα ιστού για να επαληθευτεί η ειδικότητα της επισήμανσης του αντιγόνου στόχου από το πρωτεύον αντίσωμα. Η απουσία ειδικής χρώσης στον αρνητικό έλεγχο ιστού επιβεβαιώνει την έλλειψη διασταυρούμενης αντιδραστικότητας αντισώματος σε κύτταρα/κυτταρικά συστατικά. Εάν εμφανιστεί ειδική χρώση (ψευδώς θετική χρώση) στον αρνητικό εξωτερικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με το δείγμα ασθενούς θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Η μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, έχει συνήθως διάχυτη εμφάνιση. Σποραδική χρώση του συνδετικού ιστού μπορεί επίσης να παρατηρηθεί σε τομές από υπερβολική στερεωμένους με φορμαλίνη ιστούς. Χρησιμοποιήστε άθικτα κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρώσης. Τα νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα συχνά χρωματίζονται μη ειδικά.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Greek

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Ιστός ασθενούς:

Εξετάστε δείγματα ασθενών που έχουν χρωματιστεί με ενδεικυνόμενο αντίσωμα τελευταίος. Η θετική ένταση χρώστης θα πρέπει να αξιολογείται στο πλαίσιο οποιασδήποτε μη ειδικής χρώστης υποβάθμου του αρνητικού αντιδραστηρίου ελέγχου. Όπως με κάθε ανοσοϊστοχημική δοκιμή, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύθηκε, όχι ότι το αντιγόνο απουσίαζε στα κύτταρα/ιστό που προσδιορίστηκαν. Εάν είναι απαραίτητο, χρησιμοποιήστε μια ομάδα αντισωμάτων για τον εντοπισμό ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων.

Ανατρέξτε στην Περίληψη και Επεξήγηση, στους Περιορισμούς και στα Χαρακτηριστικά Απόδοσης για συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με την ενδεικυνόμενη ανοσοαντιδραστικότητα αντισωμάτων.

## Περιορισμοί:

### Γενικοί περιορισμοί:

1. **Για in vitro διαγνωστική (IVD) Χρήση:** Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια διαγνωστική διαδικασία πολλαπλών σταδίων που αποτελείται από εξειδικευμένη εκπαίδευση στην επιλογή των κατάλληλων αντιδραστηρίων. επιλογή, στερέωση και επεξεργασία ιστού. προετοιμασία της διαφάνειας IHC. και ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρώστης.
2. Αυτό το προϊόν προορίζεται μόνο για επαγγελματική χρήση: Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια διαγνωστική διαδικασία πολλαπλών σταδίων που αποτελείται από εξειδικευμένη εκπαίδευση στην επιλογή των κατάλληλων αντιδραστηρίων. επιλογή, στερέωση και επεξεργασία ιστού. προετοιμασία της διαφάνειας IHC. και ερμηνεία των αποτελεσμάτων χρώστης.
3. Για χρήση μόνο με συνταγή γιατρού. (Μόνο Rx)
4. Η χρώση του ιστού εξαρτάται από τον χειρισμό και την επεξεργασία του ιστού πριν από τη χρώση. Η ακατάλληλη στερέωση, κατάψυξη, απόψυξη, πλύσιμο, στέγνωμα, θέρμανση, κοπή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά μπορεί να προκαλέσει τεχνονυρήματα, παγίδευση αντισωμάτων ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τα ασυνεπή αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε παραλλαγές στις μεθόδους στερέωσης και ενσωμάτωσης ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.<sup>14</sup>
5. Η υπερβολική ή ατελής αντιχρώση μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων.
6. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε θετικής ή αρνητικής χρώστης θα πρέπει να αξιολογείται στο πλαίσιο της κλινικής εικόνας, της μορφολογίας και άλλων ιστοπαθολογικών κριτηρίων. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε θετικής ή αρνητικής χρώστης θα πρέπει να συμπληρώνεται από μορφολογικές μελέτες με χρήση κατάλληλων θετικών και αρνητικών εσωτερικών και εξωτερικών μαρτύρων καθώς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων. Η ερμηνεία όλων των βημάτων που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία και την ερμηνεία του τελικού παρασκευάσματος IHC είναι ευθύνη ενός ειδικευμένου παθολόγου που είναι εξοικειωμένος με τη σωστή χρήση των αντισωμάτων, των αντιδραστηρίων και των μεθόδων IHC.
7. Τα βέλτιστα πρωτόκολλα για μια συγκεκριμένη εφαρμογή μπορεί να διαφέρουν. Αυτά περιλαμβάνουν, ενδεικτικά τη σταθεροποίηση, τη μέθοδο ανάκτησης θερμότητας, τους χρόνους επώστησης, την αραίωση αντισωμάτων, το πάχος του τρήματος ιστού και το κιτ ανίχνευσης που χρησιμοποιείται. Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του πρωτογενούς αντισώματος και άλλων βοηθητικών αντιδραστηρίων για συνιστώμενα πρωτόκολλα και συνθήκες χρήσης. Οι συστάσεις και τα πρωτόκολλα του δελτίου δεδομένων βασίζονται στην αποκλειστική χρήση των προϊόντων Biocare. Τελικά, είναι ευθύνη του ερευνητή να καθορίσει τις βέλτιστες συνθήκες,
8. Αυτό το προϊόν δεν προορίζεται για χρήση στην κυτταρομετρία ροής. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης δεν έχουν προσδιοριστεί για την κυτταρομετρία ροής.
9. Οι ιστοί από άτομα μολυσμένα με τον ίο της ηπατίτιδας B και που περιέχουν επιφανειακό αντιγόνο ηπατίτιδας B (HBsAg) μπορεί να εμφανίσουν μη ειδική χρώση με υπεροξειδάση χρένου.<sup>14</sup>
10. Τα αντιδραστήρια μπορεί να παρουσιάσουν απροσδόκητες αντιδράσεις σε ιστούς που δεν είχαν δοκιμαστεί προηγουμένως. Η πιθανότητα απροσδόκητων αντιδράσεων ακόμη και σε δοκιμασμένες ομάδες ιστών δεν μπορεί να εξαλειφθεί πλήρως λόγω της βιολογικής μεταβλητότητας

της έκφρασης αντιγόνου σε νεοπλάσματα ή άλλους παθολογικούς ιστούς.<sup>15</sup> Επικοινωνήστε με την τεχνική υποστήριξη της Biocare στο 1-800-542-2002 ή μέσω των πληροφοριών τεχνικής υποστήριξης που παρέχονται στο biocare.net, με τεκμηριωμένες απροσδόκητες αντιδράσεις.

11. Φυσιολογικοί/μη-άνοσοι οροί από την ίδια ζωική πηγή με τους δευτερογενείς αντιορούς που χρησιμοποιούνται στα βήματα αποκλεισμού μπορεί να προκαλέσουν ψευδώς αρνητικά ή ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω αυτοαντισωμάτων ή φυσικών αντισωμάτων.
12. Εσφαλμένα θετικά αποτελέσματα μπορεί να παρατηρηθούν λόγω μη ανοσολογικής δέσμευσης πρωτεΐνων ή προϊόντων αντιδραστηρίων. Μπορεί επίσης να προκληθούν από δραστηριότητα ψευδο-υπεροξειδάσης (ερυθροκύππαρα), ενδογενή δραστηριότητα υπεροξειδάσης (κυτόχρωμα C) ή ενδογενή βιοτίνη (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός) ανάλογα με τον τύπο της ανοσοχρήσης που χρησιμοποιείται.<sup>13</sup>
13. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύτηκε, όχι ότι το αντιγόνο απουσίαζε στα κύτταρα ή στον ιστό που εξετάστηκαν.

### Ειδικοί περιορισμοί προϊόντος:

Δεν υπάρχουν πρόσθετοι περιορισμοί για το συγκεκριμένο προϊόν

### Χαρακτηριστικά απόδοσης:

Η χρώση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα που παρέχονται στις ειδικές οδηγίες χρήσης αντισώματος ή όπως ορίζεται. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της χρώσης αξιολογήθηκαν σε ένα εύρος τύπων φυσιολογικών και νεοπλασματικών ιστών που αξιολογήθηκαν κατά την ανάπτυξη πρωτογενών αντισωμάτων.

### Αναπαραγωγιμότητα:

Η επαναληπτική των συστημάτων ανίχνευσης και των αντιδραστηρίων συστήματος της Biocare επαληθύεται μέσω μιας μέτρησης ενδιάμεσης ακρίβειας στην οποία δοκιμάστηκαν διάφορες παρτίδες αντιδραστηρίων για εκτελεσμένη χρονική περίοδο χρησιμοποιώντας διάφορους χειριστές, αναλυτές, παρτίδες αντιδραστηρίων, δείγματα ιστών και εξοπλισμό. Η χρώση που λήφθηκε για κάθε αντιδραστήριο ανιχνεύστηκε ήταν συνεπής και εκτελέστηκε όπως αναμενόταν.

### Αντιμετώπιση προβλημάτων:

1. Δεν υπάρχει χρώση οποιωνδήποτε πλακών – Ελέγξτε για να προσδιορίσετε ότι έχουν χρησιμοποιηθεί κατάλληλος ιστός θετικού μάρτυρα, αντίσωμα και προϊόντα ανίχνευσης. Ελέγξτε για ελλιπή ή ακατάλληλη αφαίρεση ή προεπεξεργασία κεριού.
2. Ασθενής χρώση όλων των πλακών – Ελέγξτε για να προσδιορίσετε ότι έχουν χρησιμοποιηθεί κατάλληλοι ιστοί θετικού ελέγχου, αντισώματα και προϊόντα ανίχνευσης.
3. Υπερβολικό υπόβαθρο όλων των διαφανεών – Μπορεί να υπάρχουν υψηλή επίπεδα ενδογενούς βιοτίνης (εάν χρησιμοποιούνται προϊόντα ανίχνευσης με βάση τη βιοτίνη), ενδογενής δραστηριότητα HRP που μετατρέπει το χρωμογόνο σε έγχρωμο τελικό προϊόν (χρήση μπλοκ, υπεροξειδάσης) ή υπερβολική αλληλεπίδραση μη ειδικής πρωτεΐνης (χρησιμοποιήστε πρωτεΐνη μπλοκ, όπως αναστατικό διάλυμα με βάση τον ορό ή την καζεΐνη).
4. Τα τρήματα ιστού ξεπλένουν τις αντικείμενοφόρες πλάκες κατά τη διάρκεια της επώστησης – Ελέγξτε τις αντικείμενοφόρες πλάκες για να βεβαιωθείτε ότι είναι θετικά φορτισμένες.
5. Ειδική χρώση πολύ σκούρα – Ελέγξτε το πρωτόκολλο για να προσδιορίσετε εάν εφαρμόστηκε ο κατάλληλος τίτλος αντισωμάτων στην αντικείμενοφόρη πλάκα, καθώς και οι κατάλληλοι χρόνοι επώστησης για όλα τα αντιδραστήρια. Επιπλέον, βεβαιωθείτε ότι το πρωτόκολλο έχει αρκετά βήματα πλύσης για την αφαίρεση της περίσσειας αντιδραστηρίων μετά την ολοκλήρωση των βημάτων επώστησης.



60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

56/118



TP v1 (03/30/2022)

Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080



Westervoortsedijk 60

6827 AT Arnhem

The Netherlands

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Greek

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Βιβλιογραφικές αναφορές:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
  
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. AmJ Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Hungarian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Rendeltetésszerű használat:

Mert *in vitro* Diagnosztikai felhasználás

A Betazoid DAB Chromogen Kit manuális vagy automatizált immunhisztokémiai (IHC) festési protokollokban használható célantigének kímutatására formalinhoz rögzített, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetekben, ha a megfelelő kímutatási rendszerrel és elsődleges antitestekkel együtt használják. Bárminely festődés vagy annak hiánya klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollakkal kell kiegészíteni, és a beteg klinikai anamnézisének és egyéb diagnosztikai vizsgálatainak összefüggésében kell értékelnie egy szakképzett patológusnak.

## Összegzés és magyarázat:

3,3' diaminobenzidin (DAB) Az IHC festési protokollokban jól bevált kromogén, amely torma-peroxidáz (HRP) enzim jelenlétében barna csapadékot hoz létre, amely szerves oldószerben nem oldódik, és tartós rögzítőközzel fedhető le. Ez a termék kétkomponensű rendszerben érkezik, amely folyadékstabil DAB kromogénből és DAB szubsztrát pufferből áll. A kromogén pufferkeverék színe a színtelentől a halványbarnáig változhat. A festési tulajdonságokat nem befolyásolja a kromogén pufferkeverék színe. A Betazoid DAB egy nagyon stabil készítmény. A Betazoid DAB manuálisan és automata festőgépeken is használható.

## Eljárás elve:

Ez a Betazoid DAB kromogénkészletben található DAB kromogén, amikor az FFPE szövetmetszetek IHC-tesztjéhez használják, lehetővé teszi az antigének megjelenítését egy szekvenciális alkalmazással. Specifikus antitest az antigén ellen (elsődleges antitest), egy másodlagos antitest az elsődleges antitest ellen (opcionális link antitest/próba), egy enzimkomplex és egy kromogén szubsztrát, közbeiktatott mosási lépésekkel. A kromogén enzimatikus aktiválása az antigén helyén látható reakcióterméket eredményez. A minta ezután ellenfeszítő és fedőlemezzel borítható. Az eredményeket fény segítségével értelmezük mikroszkóppal és segítséget nyújt a körlegettani folyamatok differenciál-diagnosztikában, amely lehet, ill. nem kapcsolódhat egy adott antigénhez.

## Anyagok és metódusok:

### Mellékelt reagensek:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Feloldás, keverés, hígítás, titrálás:

A Betazoid DAB Chromogen Kit Biocare antitestekkel és kiegészítő reagensekkel való használatra optimalizált, és közvetlenül használat előtt fel

kell hígítani. Keverjen el 1 csepp (32 µL) DAB Chromogent 1,0 ml DAB szubsztrát pufferhez. A DAB munkaoldat 2-8°C-on tárolva 5 napig stabil.

## Ismert alkalmazások:

Immunhisztokémia (formalinnal rögzített paraffinba ágyazott szövetek)

## Így szállítva:

*Betazoid DAB kromogén*

DAB megoldás. További részletekért lásd a biztonsági adatlapot.

## *Betazoid DAB szubsztrát puffer*

A pufferolt oldat 3%-os hidrogén-peroxid oldatot tartalmaz. További részletekért lásd a biztonsági adatlapot.

## Szükséges, de nem mellékelt anyagok és reagensek:

Mikroszkóp tárgylemezek, pozitív töltésű

Pozitív és negatív szövetkontrollok

Desert Chamber\* vagy hasonló szárító sütő (opcionális)

Xilol vagy xilol helyettesítő

Etanol vagy reagens alkohol

Elzáró kamra\* vagy hasonló gyorsfűző (opcionális)

Ionmentesített vagy desztillált víz

Mosó puffer\*

Előkezelő reagensek\* (opcionális)

Enzimes emésztés\* (opcionális)

peroxidáz blokk\*

Protein blokk\* (opcionális)

Elsődleges antitest\*

Negatív kontroll reagensek\*

Érzékelő készletek\*

Hematoxillin\* (ellenfesték)

Kék reagens\*

Szerelési közeg\*

Fedőüveg

Fénymikroszkóp (40-400X nagyítás)

\* Biocare Medical Products: A katalógusszámokkal és a rendeléssel kapcsolatos információkért tekintse meg a Biocare Medical webhelyet a <http://biocare.net> címen. A fent felsorolt egyes reagensek az alkalmazott speciális alkalmazáson és észlelési rendszeren alapulnak.

## Tárolás és stabilitás:

2°C és 8°C között tárolandó. A termék az injekciós üveg címkéjén feltüntetett lejárat időig stabil, ha ilyen körfelmények között tárolják. Ne használja a lejárat idő után. A meghatározottaktól eltérő körfelmények közötti tárolást ellenőrizni kell. A hígított reagenseket az utasításoknak megfelelően azonnal fel kell használni. A fel nem használt hígított reagens 2-8°C-on tárolva 5 napig stabil. A felhasználó által hígított reagens 5 napon túli stabilitását a Biocare nem állapította meg.

A pozitív és negatív kontrollokat egyidejűleg kell lefuttatni az összes betegmintával. Ha váratlan festődést észlel, amely nem magyarázható a laboratóriumi eljárások eltéréseivel, és az antitesttel kapcsolatos probléma gyanúja merül fel, lépjön kapcsolatba a Biocare műszaki támogatásával az 1-800-542-2002 telefonszámon vagy a [biocare.net](http://biocare.net) oldalon található műszaki támogatási információkon keresztül.

## Minta előkészítés:

A formalinban rögzített szövetek alkalmásak a paraffin beágyazódás előtti használatra. A csontszöveteket a szövetfeldolgozás előtt vízköteleníténi kell a szövetvágás megkönnyítése és a mikrotom pengéi károsodásának elkerülése érdekében.<sup>1,2</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Hungarian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

A megfelelően rögzített és beágyazott, a meghatározott antigén célpontot expresszáló szöveteket hűvös helyen kell tárolni. Az 1988-as Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) 42 CFR-t ír elő§493.1259(b) pont, amely szerint „A laboratóriumnak legalább tiz évig meg kell őriznie a megfestett tárgylemezeket megvizsgálja és megőrzi a mintatömbököt a vizsgálat időpontjától számított legalább két évig.”<sup>3</sup>

## A szövetek kezelése festés előtt:

Hajtsa végre a hőinduktált epitóp-visszakeresést (HIER) az alábbi javasolt protokoll szerint. Kímattatták, hogy a HIER rutinszerű használata az IHC előtt minimálisra csökkenti az inkonisztenciát és szabványosítja a festődést.<sup>4,5</sup>

## Figyelemzések és óvintézkedések:

1. A DAB köztudottan rákkeltő anyag.
2. Ne tegye ki a DAB alkatrészeket erős fénynek vagy közvetlen napfénynek
3. A DAB a bőr túlerzékenységét okozhatja. Kerülje a bőrrel és szemmel való érintkezést.
4. Visejen kesztyűt és védőruházatot, és tegye meg az ésszerű óvintézkedésekkel a kezelés során, mivel a DAB veszélyesnek minősül, rákot okozhat, és feltételezhető, hogy genetikai hibákat okoz.
5. Az emberi vagy állati eredetű anyagokat potenciálisan biológiaiag veszélyesként kezelje, és megfelelő óvintézkedésekkel ártalmatlanítsa az ilyen anyagokat. Exponíció esetén kövesse az illetékes hatóságok egészségügyi irányelvét.<sup>6,7</sup>
6. A mintákat a rögzítés előtt és után, valamint az ezeknek kitett anyagokat úgy kell kezelní, mintha képesek lennének fertőzést továbbítani, és megfelelő óvintézkedésekkel kell ártalmatlanítani. Soha ne pipettázzon reagenseket szájon át, és kerülje a bőrrel és a nyálkahártyákkal való érintkezést a reagensekkel és a mintákkal. Ha a reagensek vagy a minták érzékeny területekkel érintkeznek, mosza le bő vízzel.<sup>8</sup>
7. A reagensek mikrobiális szennyeződése a nem specifikus festődés növekedését eredményezheti.
8. A megadotttól eltérő inkubációs idők vagy hőméréséletek hibás eredményeket adhatnak. A felhasználónak minden ilyen változtatást érvényesítenie kell.
9. Ne használja fel a reagenst az injektív üvegre nyomtatott lejáratú idő után.
10. A mikropolimer-detektáló készlet reagense(i) optimalizáltak, és használatra készek a Biocare antitestekkel és kiegészítő reagensekkel. Tekintse meg az elsődleges antitest és más kiegészítő reagens használáti útmutatóját az ajánlott protokollokhoz és használáti feltételekhez.
11. Kövesse a helyi és/vagy állami hatóságok előírásait az ártalmatlanítás módjára vonatkozóan.
12. Az SDS kérésre elérhető, és a <http://biocare.net> címen található.
13. Jelentse az eszközzel kapcsolatos minden súlyos eseményt a Biocare helyi képviselőjével és a felhasználó tartózkodási helye szerinti tagállam vagy ország illetékes hatóságával.

Ez a kromogénkészlet az 1272/2008/EK rendeletnek megfelelően az alábbi táblázat szerint besorolt összetevőket tartalmaz.

Veszély	Kód	Veszélyességi nyilatkozat
	H314 H350	Feltehetően genetikai hibákat okoz Rákot okozhat

## Használati útmutató:

A kromogénkészlet reagenseit Biocare antitestekkel és kiegészítő reagensekkel való használatra optimalizálták. Tekintse meg az elsődleges antitest és más kiegészítő reagens használáti útmutatóját az ajánlott protokollokhoz és használáti feltételekhez. Az inkubációs idők és hőméréséletek a követett specifikus antitest protokolltól függően változnak.

Ha automata festőműszert használ, olvassa el az adott műszer kezelési útmutatóját és a használati paramétereket.

## Az IHC elvégzésének általános eljárási lépései:

1. Paraffinmentesítés: Paraffinmentesítse a tárgylemezeket Slide Brite-ben vagy xilolban. A lemezeket osztályozott alkoholok sorozatában hidratálja vízzel.
2. Peroxid blokk: Blokkolja 5 percig Peroxidáz 1-gyel.
3. Előkezelési oldat/protokoll: Kérjük, olvassa el a megfelelő elsődleges antitest adatlapját az ajánlott előkezelési oldathoz és protokollhoz.
4. Protein Block (opcionális): Inkubálja 5-10 percig szobahőmérsékleten (RT) a Background Punisher segítségével.
5. Primer antitest: Kérjük, olvassa el a megfelelő elsődleges antitest adatlapját az inkubációs idővel kapcsolatban.
6. Próba (csak egér antitestek): Inkubálja 5-15 percig szobahőmérsékleten MACH 4 Mouse Probe segítségével.
7. Polimer: Inkubálja 10-20 percig egér antitestek vagy 30 percig nyúl antitestek esetén szobahőmérsékleten MACH 4 HRP polimerrel.
8. Kromogén: Inkubálja 5 percig szobahőmérsékleten Biocare DAB-jával.
9. Ellenfestés: Ellenfestés hematoxilinnel. Öblítse le ioncerélít vízzel. Alkalmazza a Tacha's Blueing Solution-t 1 percig. Öblítse le ioncerélít vízzel.

## Műszaki megjegyzések:

1. Használjon TBS-t a mosási lépésekhez.

## Minőség ellenőrzés:

Lásd: CLSI minőségi szabványok az immunhisztokémiai vizsgálatok tervezésére és végrehajtására vonatkozóan; Jóváhagyott útmutató – Második kiadás (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

## Pozitív szövetkontroll:

A külső pozitív kontroll anyagoknak friss mintáknak kell lenniük, rögzítve, feldolgozva és a lehető leghamarabb beágyazva, ugyanúgy, mint a betegmintá(ka)t. A pozitív szövetkontroll a megfelelően előkészített szöveteket és a megfelelő festési technikákat jelzi. minden egyes vizsgálati körülmenyhez egy pozitív külső szövetkontrollt kell bevonni minden festési futtatásba.

A külső pozitív kontrollanyagokhoz használt szöveteket olyan betegmintákhoz kell kiválasztani, amelyekben a pozitív célnakivitás jól jellemezhető alacsony szintje, ami gyenge pozitív festést eredményez. A külső pozitív kontrollok alacsony pozitivitási szintjét úgy terveztek, hogy biztosítsa az elsődleges antitest-érzékenységen belül az instabilitásból vagy az IHC-módszerrel kapcsolatos problémákból eredő finom változásokat. A kereskedelemben kapható szövetkontroll tárgylemezek vagy a páciens mintáitól eltérően feldolgozott minták csak a reagens teljesítményét érvényesítik, és nem igazolják a szövet előkészítését.

Az ismert pozitív szövetkontrollokat csak a feldolgozott szövetek és tesztreagensek megfelelő teljesítményének ellenőrzésére szabad használni, nem pedig a betegminták specifikus diagnózisának felállításához. Ha a pozitív szövetkontroll nem mutat pozitív festődést, a vizsgálati minták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

## Negatív szövetek kontrollja:

Használjon negatív szöveti kontrollt fixált, feldolgozott és beágyazott módon, a beteg mintáival azonos módon minden festési futtatásnál, hogy ellenőrizze az IHC elsődleges antitest specifitását a céltantigon kímutatására, valamint a specifikus háttérfestődés jelzése (téves pozitív festés). Ezenkívül a legtöbb szövetmetszetben jelenlévő különféle sejtípusok sokfélesége képes a laboratórium belső negatív kontrollhelyként használja az IHC teljesítményének ellenőrzésére specifikációk. A negatív szövetekhez

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Hungarian

használható minták típusai és forrásai A vezérlőelemek a Teljesítményjellemzők részben találhatók.

Ha specifikus festődés (álpozitív festődés) fordul elő a negatív szövetkontrollban, a betegminták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

## Nem specifikus negatív reagens kontroll:

Használjon nem specifikus negatív reagens kontrollt az elsőleges antitest helyett minden egyes betegminta egy metszetével, hogy értékelje a nem specifikus festődést és

lehetővé teszik a specifikus festődés jobb értelmezését az antigén helyén. Ideális esetben a negatív reagens kontroll egy olyan antitestet tartalmaz, amelyet előállítottak és előállítottak (azaz azonos koncentrációra hígítottak ugyanazzal a hígítószerrel) felhasználásra, ugyanúgy, mint az elsőleges antitest, de nem mutat specifikus reaktivitást az emberi szövetekkel ugyanabban a mátrixban/oldatban, mint a elsőleges antitest. A korábban leírt negatív reagens kontrollok kevésbé kívánatos alternatívájaként a hígító önmagában is használható. A negatív reagens kontroll inkubációs időszakával.

Ha több antitestből álló paneleket használnak a sorozatmetszeteken, akkor az egyik tárgylemez negatívan festő területei negatív/nem specifikus kötődési háttérkontrollként szolgálhatnak más antitestekhez. Az endogén enzimaktivitás vagy az enzimek nem specifikus kötődésének megkülönöztetésére a specifikus immunreaktivitástól további betegszövetek festhetők kizárolag szubsztrát-kromogén vagy enzimkomplexekkel (PAP, avidin-biotin, streptavidin), illetve szubsztrát-kromogénnel.

## A vizsgálat ellenőrzése:

Az antitest vagy festőrendszer diagnosztikai eljárásban történő első használata előtt a felhasználónak ellenőriznie kell az antitest specifitását úgy, hogy egy sor házon belüli szöveten teszteli, amelyek ismert immunhisztokémiai teljesítményjellemzői ismertek, amelyek ismert pozitív és negatív szövegetek képviselnek. Tekintse meg a termékismertő ezen részében korábban ismertetett minőség-ellenőrzési eljárásokat és a CAP tanúsítási program minőség-ellenőrzési ajánlásait.<sup>10</sup> az immunhisztokémiahoz és/vagy az NCCLS IHC-irányelvhez<sup>11</sup>. Ezeket a minőség-ellenőrzési eljárásokat meg kell ismételni minden új antitest-tételelnél, vagy amikor a vizsgálati paraméterek megváltoznak. A Teljesítményjellemzők részben felsorolt szövetek alkalmásak a teszt ellenőrzésére.

## Hibaelhárítás:

Kövesse az antitest-specifikus protokoll ajánlásait a mellékelt adatlapnak megfelelően. Ha atípusk eredményeket észlel, forduljon a Biocare műszaki támogatásához az 1-800-542-2002 telefonszámon.

## A festés értelmezése:

A Betazoid DAB Chromogen Kit barna színű reakciót vált ki az elsőleges antitest által lokalizált antigén helyeken. A betegek eredményeinek értelmezése előtt a kontrollok festését szakképzett patológusnak kell értékelnie. A negatív kontrollakat értékeljük és összehasonlítjuk a festett tárgylemezekkel, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a megfigyelt festődés nem nem specifikus kölcsönhatás eredménye.

## Pozitív szövetkontroll:

A jelzett antitesttel megfestett pozitív szöveti kontrollt először meg kell vizsgálni, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy minden reagens megfelelően működik. A célszövetek megfelelő festése (amint azt fentebb jelezük) pozitív reaktivitást jelez. Ha a pozitív szöveti kontollok nem mutatnak pozitív festést, a vizsgálati minták minden eredményét érvénytelennek kell tekinteni.

**BIOCARE**  
M E D I C A L

A reakciótermék színe az alkalmazott szubsztrát kromogénektől függően változhat. A várható színreakciókért lásd az aljzat csomagolását. Ezenkívül a festési módszer változataiban metakromázia figyelhető meg.<sup>12</sup>

Ha ellenfestést használunk, az alkalmazott ellenfestés inkubációs hosszától és hatásosságától függően az ellenfestés a sejtmagok elszíneződését eredményezi. A túlzott vagy hiányos ellenfestés veszélyeztetheti az eredmények megfelelő értelmezését. Az ajánlott ellenfestéshez lásd a protokoll(okat).

## Negatív szövetkontroll:

A negatív szöveti kontrollt a pozitív szöveti kontroll után meg kell vizsgálni, hogy ellenőrizzük a célantigén elsőleges antitest általi jelölésének specifitását. A specifikus festődés hiánya a negatív szöveti kontrollban megerősíti az antitest sejtekkel/sejtkomponensekkel szembeni keresztreaktivitásának hiányát. Ha specifikus festődés (álpozitív festődés) fordul elő a negatív külső szövetkontrollban, a betegminta eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

A nem specifikus festődés, ha van, általában diffúz megjelenésű. A túlzottan formalinban rögzített szövetekből származó metszeteken a kötőszövet szórányos festődése is megfigyelhető. Használjon ép sejteket a festési eredmények értelmezéséhez. A nekrotikus vagy degenerált sejtek gyakran nem specifikusan festődnak.

## Betegszövet:

Vizsgálja meg a jelzett antitesttel megfestett betegmintákat utolsó. A pozitív festődés intenzitását a negatív reagens kontroll bármely nem specifikus háttérfestésével összefüggésben kell értékelni. Mint minden immunhisztokémiai tesztnél, a negatív eredmény azt jelenti, hogy az antigén nem volt kimutatható, nem pedig azt, hogy az antigén hiányzik a vizsgált sejtekben/szövetekben. Ha szükséges, használja az antitestek paneljét az álnegatív reakciókazonosításához.

Tekintse meg az Összefoglalás és magyarázat, a Korlátozások és a Teljesítmény jellemzői című részt a jelzett antitest immunreaktivitással kapcsolatos konkrét információkért.

## Korlátozások:

### Általános korlátozások:

1. Mertin vitro diagnosztikai (IVD) Használata
2. Ez a termék kizárolag professzionális használatra készült: Az immunhisztokémia egy többletpcsös diagnosztikai folyamat, amely a megfelelő reagensek kiválasztására vonatkozó speciális képzésből áll; szövetek kiválasztása, rögzítése és feldolgozása; az IHC tárgylemez elkészítése; és a festési eredmények értelmezése.
3. Csak orvosi rendelvényre használható. (Csak Rx)
4. A szövetfestés a szövet festés előtti kezelésétől és feldolgozásától függ. A nem megfelelő rögzítés, fagyasztság, felolvastás, mosás, szárítás, melegítés, metszés vagy más szövetekkel vagy folyadékokkal való szennyeződés műtermékeket, antitest-befogást vagy hamis negatív eredményeket eredményezhet. Az ellentmondásos eredmények oka lehet a rögzítési és beágyazási módszerek eltérése, vagy a szöveten belüli inherens szabálytalanságok.<sup>14</sup>
5. A túlzott vagy hiányos ellenfestés veszélyeztetheti az eredmények megfelelő értelmezését.
6. Bárminely pozitív vagy negatív festődés klinikai értelmezését a klinikai megjelenés, a morfológia és egyéb kórszövettani kritériumok összefüggésében kell értékelni. A pozitív vagy negatív festődés klinikai értelmezését megfelelő pozitív és negatív belső és külső kontrollokat, valamint egyéb diagnosztikai tesztek alkalmazó morfológiai vizsgálatokkal kell kiegészíteni. Az IHC antitestek, reagensek és módszerek megfelelő használatát ismerő, szakképzett patológus

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Hungarian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

- feladata, hogy értelmezze a végső IHC-készítmény elkészítéséhez és értelmezéséhez használt összes lépést.
- 7. Egy adott alkalmazáshoz az optimális protokollok változhatnak. Ezek közé tartozik többek között a rögzítés, a hővisszanyerési módszer, az inkubációs idők, az antitesthígítás, a szövetmetszet vastagsága és a használt kimutatási készlet. Tekintse meg az elsődleges antitest és más kiegészítő reagens használati útmutatóját az ajánlott protokollohoz és használati feltételekhez. Az adatlap ajánlásai és protokolljai a Biocare termékek kizárolagos felhasználásán alapulnak. Végső soron a vizsgáló feladata az optimális feltételek meghatározása.
  - 8. Ezt a terméket nem áramlási citometriában való használatra terveztek. Az áramlási citometria teljesítményjellemzőit nem határozták meg.
  - 9. A hepatitis B vírussal fertőzött és hepatitis B felületi antigént (HBsAg) tartalmazó személyek szövetei torma-peroxidázzal nem specifikus festődést mutathatnak.<sup>14</sup>
  - 10. A reagensek váratlan reakciókat mutathatnak korábban nem tesztelt szövetekben. A nem várt reakciók lehetősége még a vizsgált szövetcsoportokban sem zárátható ki teljesen az antigénexpresszió biológiai variabilitása miatt daganatokban vagy más patológiás szövetekben.<sup>15</sup> Forduljon a Biocare műszaki támogatásához az 1-800-542-2002 telefonszámon vagy a biocare.net oldalon található műszaki támogatási információkon keresztül dokumentált váratlan reakciókkal.
  - 11. A blokkoló lépésekben használt másodlagos antisérumokkal azonos állati forrásból származó normál/nem immunszérumokkal álnegatív vagy álnegatív eredményeket okozhat az autoantitestek vagy természetes antitestek miatt.
  - 12. A fehérék vagy szubsztrát reakciótermékek nem immunológiai kötődése miatt álnegatív eredményeket lehet látni. A pszeudo-peroxidáz aktivitás (eritrociták), az endogén peroxidáz aktivitás (citokróm C) vagy az endogén biotin (például máj, emlő, agy, vese) is okozhatja a használt immunfestés típusától függően.<sup>13</sup>
  - 13. A negatív eredmény azt jelenti, hogy az antigén nem volt kimutatható, nem pedig azt, hogy az antigén hiányzott a vizsgált sejtekben vagy szövetekben.

## Termékspecifikus korlátozások:

Nincsenek további termékspecifikus korlátozások

## Teljesítmény jellemzők:

A festést az antitest-specifikus használati utasításban megadott protokollok szerint vagy a megadottak szerint végeztük. A festődés érzékenységét és specificitását számos normál és daganatos szövettípuson értékelték, amelyeket az elsődleges antitestek kialakulása során értékeltek.

## Reprodukálhatóság:

A Biocare érzékelőrendszerének és rendszerreagenseinek reprodukálhatóságát közepes pontosságú méréssel igazolják, amelynek során különböző reagenstételeket teszteltek hosszabb időn keresztül különböző kezelők, elemzők, reagenstételek, szövetminták és berendezések segítségével. Az egyes kiértékelt kimutatási reagenseknél kapott festődés konzisztenzs volt, és a várt módon történt.

## Hibaelhárítás:

- 1. A tárgylemezek nem festődnak – Ellenőrizze, hogy megfelelő pozitív kontrollsöveget, antitestet és kimutatási termékeket használt-e. Ellenőrizze a hiányos vagy nem megfelelő viaszeltávolítást vagy előkezelést.
- 2. Az összes tárgylemez gyengén festődött – Ellenőrizze, hogy megfelelő pozitív kontrollsöveget, antitestet és kimutatási termékeket használt-e.
- 3. Az összes tárgylemez túlzott háttere – Magas szintű endogén biotin (biotin alapú kimutatási termékek használata esetén), endogén HRP aktivitás, amely a kromogént színes végtermékké alakítja (használjon

peroxidáz blokkot), vagy túl sok nem specifikus fehérje kölcsönhatás (fehérje használata) blokkoló, például szérum- vagy kazein alapú blokkoló oldat.

- 4. A szövetmetszetek lemosák a tárgylemezeket az inkubáció során – Ellenőrizze a lemezeket, hogy megbizonyosodjon arról, hogy pozitív tültésűek.
- 5. A specifikus festés túl sötét – Ellenőrizze a protokolit, hogy megállapítsa, megfelelő antitesttitert alkalmaztak-e a tárgylemezen, valamint az összes reagens megfelelő inkubációs idejét. Ezenkívül győződjön meg arról, hogy a protokoll elegendő mosási lépést tartalmaz a felesleges reagensek eltávolításához az inkubációs lépések befejezése után.

## Referenciák:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Italian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Destinazione d'uso:

Per *in vitro* Uso diagnostico

ILKit cromogeno DAB betazoide è destinato all'uso nei protocolli di colorazione immunoistochimica (IHC) manuali o automatizzati per il rilevamento di antigeni bersaglio in tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) se utilizzato insieme al sistema di rilevamento appropriato e agli anticorpi primari. L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione o della sua assenza deve essere integrata da studi morfologici e controlli adeguati e deve essere valutata nel contesto dell'anamnesi clinica del paziente e di altri test diagnostici da un patologo qualificato.

## Riepilogo e spiegazione:

3,3' Diaminobenzidina (DAB) è un cromogeno consolidato utilizzato nei protocolli di colorazione IHC che, in presenza di un enzima perossidasi di rafano (HRP), produce un precipitato marrone insolubile in solventi organici e che può essere coperto con un mezzo di montaggio permanente. Questo prodotto è disponibile in un sistema a due componenti costituito da un cromogeno DAB liquido stabile e un tampone substrato DAB. Il colore della miscela tampone cromogena può variare da incolore a marrone chiaro. Le proprietà della colorazione non sono influenzate dal colore della miscela tampone cromogena. Betazoid DAB è una formulazione molto stabile. Betazoid DAB può essere utilizzato sia manualmente che su coloratori automatizzati.

## Principio della procedura:

Questo cromogeno DAB nel kit Betazoid DAB Chromogen, quando utilizzato nei test IHC di sezioni di tessuto FFPE, consente la visualizzazione degli antigeni tramite l'applicazione sequenziale di un anticorpo specifico verso l'antigene (anticorpo primario), un anticorpo secondario verso l'anticorpo primario (collegamento opzionale anticorpo/sonda), un complesso enzimatico ed un substrato cromogenico con interposte fasi di lavaggio. L'attività enzimatica del cromogeno determina un prodotto di reazione visibile nel sito dell'antigene. Il campione può quindi essere sottoposto a controcolorazione e coperto con vetrino coprioggetto. I risultati vengono interpretati utilizzando una luce microscopio e aiuto nella diagnosi differenziale dei processi patofisiologici, che possono o potrebbe non essere associato a un particolare antigene.

## Materiali e metodi:

### Reagenti forniti:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Ricostituzione, miscelazione, diluizione, titolazione:

Il kit Betazoid DAB Chromogen è ottimizzato per l'uso con anticorpi Biocare e reagenti ausiliari e deve essere diluito appena prima dell'uso. Miscelare 1 goccia (32µL) di cromogeno DAB per 1,0 mL di tampone substrato DAB. La soluzione di lavoro DAB è stabile per 5 giorni se conservata a 2-8°C.

## Applicazioni conosciute:

Immunoistochimica (tessuti inclusi in paraffina fissati in formalina)

## Fornito come:

*Cromogeno DAB betazoide*

Soluzione DAB. Consultare la scheda di sicurezza per ulteriori dettagli.

*Tampone substrato DAB betazoide*

La soluzione tamponata contiene una soluzione di perossido di idrogeno al 3%. Consultare la scheda di sicurezza per ulteriori dettagli.

## Materiali e reagenti necessari ma non forniti:

Vetrini per microscopio, caricati positivamente

Controlli tissutali positivi e negativi

Desert Chamber\* o simile Forno di essiccazione (opzionale)

Xilene o sostituto dello xilene

Etilene o alcool reagente

Camera di disoccupamento\* o pentola a pressione simile (opzionale)

Acqua deionizzata o distillata

Tampone di lavaggio\*

Reagenti di pretrattamento\* (opzionale)

Digestione enzimatica\* (opzionale)

Blocco della perossidasi\*

Blocco proteico\* (opzionale)

Anticorpo primario\*

Reagenti di controllo negativo\*

Kit di rilevamento\*

Ematossilina\* (colorazione di contrasto)

Reagente azzurrante\*

Mezzo di montaggio\*

Vetro di copertura

Microscopio ottico (ingrandimento 40-400X)

\* Prodotti medici Biocare: fare riferimento al sito Web Biocare Medical all'indirizzo <http://biocare.net> per informazioni relative ai numeri di catalogo e agli ordini. Alcuni reagenti sopra elencati si basano sull'applicazione specifica e sul sistema di rilevamento utilizzato.

## Conservazione e stabilità:

Conservare a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del flacone se conservato in queste condizioni. Non utilizzare dopo la data di scadenza. È necessario verificare la conservazione in condizioni diverse da quelle specificate. I reagenti diluiti devono essere utilizzati immediatamente secondo le istruzioni. Il reagente diluito non utilizzato è stabile per 5 giorni se conservato a 2-8°C. La stabilità del reagente diluito dall'utente oltre i 5 giorni non è stata stabilita da Biocare.

I controlli positivi e negativi devono essere analizzati contemporaneamente con tutti i campioni dei pazienti. Se si osserva una colorazione inaspettata che non può essere spiegata da variazioni nelle procedure di laboratorio e si sospetta un problema con l'anticorpo, contattare il supporto tecnico di Biocare al numero 1-800-542-2002 o tramite le informazioni del supporto tecnico fornite su [biocare.net](http://biocare.net).

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

62/18



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Italian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Preparazione del campione:

I tessuti fissati in formalina sono adatti per l'uso prima dell'inclusione in paraffina. I tessuti ossei devono essere decalcificati prima della lavorazione dei tessuti per facilitare il taglio dei tessuti e prevenire danni alle lame del microtomo.<sup>1,2</sup>

I tessuti adeguatamente fissati e incorporati che esprimono il target antigenico specificato devono essere conservati in un luogo fresco. Il Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) del 1988 richiede in 42 CFR§493.1259(b) che "Il laboratorio deve conservare i vetrini colorati per almeno dieci anni dalla data di esame e conservare i blocchi campione per almeno due anni dalla data dell'esame."<sup>3</sup>

## Trattamento dei tessuti prima della colorazione:

Eseguire il recupero degli epitopi indotti dal calore (HIER) secondo il protocollo consigliato di seguito. È stato dimostrato che l'uso di routine di HIER prima dell'IHC riduce al minimo l'incoerenza e standardizza la colorazione.<sup>4,5</sup>

## Avvertenze e precauzioni:

1. Il DAB è noto per essere un sospetto cancerogeno.
2. Non esporre i componenti DAB a luce forte o luce solare diretta
3. Il DAB può causare sensibilizzazione della pelle. Evitare il contatto con la pelle e gli occhi.
4. Indossare guanti e indumenti protettivi e adottare ragionevoli precauzioni durante la manipolazione poiché il DAB è classificato come pericoloso e può causare il cancro ed è sospettato di causare difetti genetici.
5. Maneggiare i materiali di origine umana o animale come potenzialmente a rischio biologico e smaltirli con le dovute precauzioni. In caso di esposizione seguire le direttive sanitarie delle autorità competenti ove utilizzato.<sup>6,7</sup>
6. I campioni, prima e dopo la fissazione, e tutti i materiali ad essi esposti devono essere maneggiati come se fossero in grado di trasmettere infezioni e smaltiti con le dovute precauzioni. Non pipettare mai i reagenti con la bocca ed evitare il contatto con la pelle e le mucose con reagenti e campioni. Se i reagenti o i campioni entrano in contatto con aree sensibili, lavare con abbondante acqua.<sup>8</sup>
7. La contaminazione micobica dei reagenti può provocare un aumento della colorazione aspecifica.
8. Tempi o temperature di incubazione diversi da quelli specificati potrebbero dare risultati errati. L'utente deve convalidare qualsiasi modifica di questo tipo.
9. Non utilizzare il reagente dopo la data di scadenza stampata sulla fiala.
10. I reagenti del kit di rilevamento dei micropolimeri sono ottimizzati e pronti per l'uso con anticorpi Biocare e reagenti ausiliari. Fare riferimento alle istruzioni per l'uso dell'anticorpo primario e degli altri reagenti ausiliari per i protocolli e le condizioni d'uso consigliati.
11. Seguire i requisiti delle autorità locali e/o statali per il metodo di smaltimento.
12. La SDS è disponibile su richiesta e si trova all'indirizzo <http://biocare.net>.
13. Segnalare eventuali incidenti gravi relativi a questo dispositivo contattando il rappresentante Biocare locale e l'autorità competente dello Stato membro o del paese in cui si trova l'utente.

Questo kit cromogeno contiene componenti classificati come indicato nella tabella sottostante in conformità al Regolamento (CE) N. 1272/2008

Rischio	Codice	Dichiarazione di pericolo
	H314 H350	Sospettato di provocare alterazioni genetiche. Può provocare il cancro

## Istruzioni per l'uso:

I reagenti del kit cromogeno sono ottimizzati per l'uso con anticorpi Biocare e reagenti ausiliari. Fare riferimento alle istruzioni per l'uso dell'anticorpo primario e degli altri reagenti ausiliari per i protocolli e le condizioni d'uso consigliati. I tempi e le temperature di incubazione varieranno a seconda dello specifico protocollo anticorpale seguito.

Quando si utilizza uno strumento di colorazione automatizzato, consultare il manuale dell'operatore dello strumento specifico e le istruzioni per l'uso per i parametri operativi.

### Passaggi procedurali generali per l'esecuzione dell'IHC:

1. Deparaffinazione: deparaffinare i vetrini in Slide Brite o xilene. Idratate i vetrini in una serie di alcoli graduati in acqua.
2. Blocco del perossido: bloccare per 5 minuti con Peroxidized 1.
3. Soluzione/protocollo di pretrattamento: fare riferimento alla rispettiva scheda tecnica dell'anticorpo primario per la soluzione di pretrattamento e il protocollo consigliati.
4. Blocco proteico (opzionale): incubare per 5-10 minuti a temperatura ambiente (RT) con Background Punisher.
5. Anticorpo primario: fare riferimento alla scheda tecnica del rispettivo anticorpo primario per il tempo di incubazione.
6. Sonda (solo anticorpi murini): incubare per 5-15 minuti a temperatura ambiente con la sonda murina MACH 4.
7. Polimero: incubare per 10-20 minuti per gli anticorpi di topo o 30 minuti per gli anticorpi di coniglio a temperatura ambiente con il polimero MACH 4 HRP.
8. Cromogeno: incubare per 5 minuti a temperatura ambiente con DAB di Biocare.
9. Controcolorazione: controcolorazione con ematossilina. Sciacquare con acqua deionizzata. Applicare la soluzione azzurrante di Tacha per 1 minuto. Sciacquare con acqua deionizzata.

## Note Tecniche:

1. Utilizzare TBS per le fasi di lavaggio.

## Controllo di qualità:

Fare riferimento agli standard di qualità CLSI per la progettazione e l'implementazione dei test immunoistochimici; Linea guida approvata - Seconda edizione (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

## Controllo positivo del tessuto:

I materiali di controllo positivo esterno devono essere campioni freschi fissati, processati e incorporati il prima possibile allo stesso modo dei campioni dei pazienti. I controlli positivi dei tessuti sono indicativi di tessuti preparati correttamente e di tecniche di colorazione adeguate. In ogni ciclo di colorazione deve essere incluso un controllo positivo del tessuto esterno per ciascuna serie di condizioni di test.

I tessuti utilizzati per i materiali di controllo positivo esterno devono essere selezionati da campioni di pazienti con bassi livelli ben caratterizzati dell'attività target positiva che dà una colorazione positiva debole. Il basso livello di positività per i controlli positivi esterni è progettato in modo da garantire il rilevamento di sottili cambiamenti nella sensibilità dell'anticorpo primario dovuti a instabilità o problemi con la metodologia IHC. I vetrini di controllo dei tessuti disponibili in commercio o i campioni trattati in modo diverso dai campioni dei pazienti convalidano solo le prestazioni del reagente e non verificano la preparazione dei tessuti.

I controlli tissutali positivi noti devono essere utilizzati solo per monitorare la corretta prestazione dei tessuti trattati e dei reagenti del test, piuttosto che come ausilio nella formulazione di una diagnosi specifica dei campioni dei

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Italian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

pazienti. Se i controlli positivi del tessuto non mostrano una colorazione positiva, i risultati con i campioni di test devono essere considerati non validi.

## Controllo tissutale negativo:

Utilizzare un controllo tissutale negativo fissato, processato e incorporato in modo identico ai campioni del paziente con ogni ciclo di colorazione per verificare la specificità dell'anticorpo primario IHC per dimostrazione dell'antigene bersaglio e fornire un'indicazione della specifica colorazione di fondo (colorazione falsa positiva). Inoltre, la varietà di diversi tipi di cellule presenti nella maggior parte delle sezioni di tessuto può farlo essere utilizzati dal laboratorista come siti di controllo negativo interno per verificare le prestazioni dell'IHC specifiche. I tipi e le fonti dei campioni che possono essere utilizzati per il tessuto negativo i controlli sono elencati nella sezione Caratteristiche prestazionali.

Se si verifica una colorazione specifica (colorazione falsa positiva) nel controllo negativo del tessuto, i risultati con i campioni dei pazienti devono essere considerati non validi.

## Controllo del reagente negativo non specifico:

Utilizzare un controllo reagente negativo non specifico al posto dell'anticorpo primario con una sezione di ciascun campione del paziente per valutare la colorazione non specifica e consentire una migliore interpretazione della colorazione specifica nel sito dell'antigene. Idealmente, un controllo reagente negativo contiene un anticorpo prodotto e preparato (ovvero diluito alla stessa concentrazione utilizzando lo stesso diluente) per l'uso allo stesso modo dell'anticorpo primario ma non mostra alcuna reattività specifica con i tessuti umani nella stessa matrice/soluzione dell'anticorpo primario. Il diluente da solo può essere utilizzato come alternativa meno desiderabile ai controlli dei reagenti negativi precedentemente descritti. Il periodo di incubazione del controllo del reagente negativo deve corrispondere a quello dell'anticorpo primario.

Quando si utilizzano pannelli di diversi anticorpi su sezioni seriali, le aree a colorazione negativa di un vetrino possono fungere da controllo di fondo di legame negativo/non specifico per altri anticorpi. Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame non specifico degli enzimi dall'immunoreattività specifica, ulteriori tessuti dei pazienti possono essere colorati esclusivamente rispettivamente con substrato-cromogeno o complessi enzimatici (PAP, avidina-biotina, streptavidina) e substrato-cromogeno.

## Verifica del test:

Prima dell'uso iniziale di un anticorpo o di un sistema di colorazione in una procedura diagnostica, l'utente deve verificare la specificità dell'anticorpo testandolo su una serie di tessuti interni con caratteristiche di prestazione immunoistochimica note che rappresentano tessuti positivi e negativi noti. Fare riferimento alle procedure di controllo qualità precedentemente delineate in questa sezione del foglietto illustrativo e alle raccomandazioni sul controllo qualità del Programma di Certificazione CAP<sup>10</sup> per immunoistochimica e/o la linea guida NCCLS IHC<sup>11</sup>. Queste procedure di controllo qualità devono essere ripetute per ogni nuovo lotto di anticorpi o ogni volta che si verifica una modifica nei parametri del test. I tessuti elencati nella sezione Caratteristiche prestazionali sono idonei per la verifica del test.

## Risoluzione dei problemi:

Seguire le raccomandazioni del protocollo specifico per l'anticorpo secondo la scheda tecnica fornita. Se si verificano risultati atipici, contattare il supporto tecnico di Biocare al numero 1-800-542-2002.

## Interpretazione della colorazione:

Il kit Betazoid DAB Chromogen produce una reazione di colore marrone nei siti antigenici localizzati dall'anticorpo primario. Prima dell'interpretazione dei risultati dei pazienti, la colorazione dei controlli deve essere valutata da un patologo qualificato. I controlli negativi vengono valutati e confrontati con i vetrini colorati per garantire che qualsiasi colorazione osservata non sia il risultato di interazioni non specifiche.

## Controllo positivo del tessuto:

Il controllo positivo del tessuto colorato con l'anticorpo indicato deve essere esaminato innanzitutto per accertarsi che tutti i reagenti funzionino correttamente. La colorazione appropriata delle cellule bersaglio (come indicato sopra) è indicativa di reattività positiva. Se i controlli positivi del tessuto non mostrano una colorazione positiva, qualsiasi risultato con i campioni di test deve essere considerato non valido.

Il colore del prodotto di reazione può variare a seconda dei cromogeni del substrato utilizzati. Fare riferimento ai foglietti illustrativi del substrato per le reazioni cromatiche previste. Inoltre, la metacromasia può essere osservata in variazioni del metodo di colorazione.<sup>12</sup>

Quando si utilizza una colorazione di contrasto, a seconda della durata di incubazione e della potenza della colorazione di contrasto utilizzata, la colorazione di contrasto risulterà in una colorazione dei nuclei cellulari. Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati. Fare riferimento ai protocolli per la colorazione di contrasto consigliata.

## Controllo tissutale negativo:

Il controllo tissutale negativo deve essere esaminato dopo il controllo tissutale positivo per verificare la specificità della marcatura dell'antigene bersaglio da parte dell'anticorpo primario. L'assenza di colorazione specifica nel controllo negativo del tessuto conferma l'assenza di reattività crociata dell'anticorpo verso cellule/componenti cellulari. Se si verifica una colorazione specifica (colorazione falsa positiva) nel controllo negativo del tessuto esterno, i risultati con il campione del paziente devono essere considerati non validi.

La colorazione aspecifica, se presente, ha solitamente un aspetto diffuso. Colorazioni sporadiche del tessuto connettivo possono essere osservate anche in sezioni di tessuti fissati eccessivamente in formalina. Utilizzare cellule intatte per l'interpretazione dei risultati della colorazione. Le cellule necrotiche o degenerate spesso si colorano in modo aspecifico.

## Tessuto del paziente:

Esaminare i campioni dei pazienti colorati con l'anticorpo indicato scorso. L'intensità della colorazione positiva deve essere valutata nel contesto di qualsiasi colorazione di fondo non specifica del controllo del reagente negativo. Come con qualsiasi test immunoistochimico, un risultato negativo significa che l'antigene non è stato rilevato e non che l'antigene era assente nelle cellule/tessuti analizzati. Se necessario, utilizzare un pannello di anticorpi per identificare le reazioni false negative.

Fare riferimento a Riepilogo e spiegazione, limitazioni e caratteristiche prestazionali per informazioni specifiche sull'immunoreattività dell'anticorpo indicata.

## Limitazioni:

### Limitazioni generali:

1. Per *in vitro* uso diagnostico (IVD).
2. Questo prodotto è solo per uso professionale: l'immunoistochimica è un processo diagnostico in più fasi che consiste in una formazione specializzata nella selezione dei reagenti appropriati; selezione,

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Italian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

fissazione ed elaborazione dei tessuti; preparazione del vetrino IHC; e interpretazione dei risultati della colorazione.

3. Da utilizzare solo su prescrizione medica. (Solo Rx)
4. La colorazione dei tessuti dipende dalla manipolazione e dalla lavorazione del tessuto prima della colorazione. Fissazione, congelamento, scongelamento, lavaggio, asciugatura, riscaldamento, sezionamento o contaminazione impropri con altri tessuti o fluidi possono produrre artefatti, intrappolamento di anticorpi o risultati falsi negativi. Risultati incoerenti possono essere dovuti a variazioni nei metodi di fissazione e inclusione o a irregolarità intrinseche all'interno del tessuto.<sup>14</sup>
5. Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati.
6. L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione positiva o negativa deve essere valutata nel contesto della presentazione clinica, della morfologia e di altri criteri istopatologici. L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione positiva o negativa deve essere integrata da studi morfologici utilizzando adeguati controlli interni ed esterni positivi e negativi, nonché altri test diagnostici. È responsabilità di un patologo qualificato che abbia familiarità con l'uso corretto degli anticorpi, dei reagenti e dei metodi IHC interpretare tutti i passaggi utilizzati per preparare e interpretare la preparazione IHC finale.
7. I protocolli ottimali per un'applicazione specifica possono variare. Questi includono, ma non sono limitati a, fissazione, metodo di recupero del calore, tempi di incubazione, diluizione degli anticorpi, spessore della sezione di tessuto e kit di rilevamento utilizzato. Fare riferimento alle istruzioni per l'uso dell'anticorpo primario e degli altri reagenti ausiliari per i protocolli e le condizioni d'uso consigliati. Le raccomandazioni e i protocolli della scheda tecnica si basano sull'uso esclusivo di prodotti Biocare. In definitiva, è responsabilità del ricercatore determinare le condizioni ottimali.
8. Questo prodotto non è destinato all'uso nella citometria a flusso. Le caratteristiche prestazionali non sono state determinate per la citometria a flusso.
9. I tessuti di persone infette dal virus dell'epatite B e contenenti l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) possono presentare una colorazione aspecifica con la perossidasi di rafano.<sup>14</sup>
10. I reagenti possono manifestare reazioni inaspettate in tessuti precedentemente non testati. La possibilità di reazioni inaspettate anche nei gruppi di tessuti testati non può essere completamente eliminata a causa della variabilità biologica dell'espressione dell'antigene nelle neoplasie o in altri tessuti patologici.<sup>15</sup> Contattare il supporto tecnico di Biocare al numero 1-800-542-2002 o tramite le informazioni di supporto tecnico fornite su biocare.net, con reazioni impreviste documentate.
11. I sieri normali/non immuni provenienti dalla stessa fonte animale degli antisieri secondari utilizzati nelle fasi di blocco possono causare risultati falsi negativi o falsi positivi a causa di autoanticorpi o anticorpi naturali.
12. Si possono osservare risultati falsi positivi a causa del legame non immunologico delle proteine o dei prodotti della reazione del substrato. Possono anche essere causati dall'attività della pseudo perossidasi (eritrociti), dall'attività della perossidasi endogena (citocromo C) o dalla biotina endogena (ad esempio fegato, mammella, cervello, rene) a seconda del tipo di immunocolorazione utilizzata.<sup>13</sup>
13. Un risultato negativo significa che l'antigene non è stato rilevato, non che l'antigene era assente nelle cellule o nei tessuti esaminati.

## Limitazioni specifiche del prodotto:

Nessuna limitazione aggiuntiva specifica del prodotto

specificità della colorazione sono state valutate su una gamma di tipi di tessuto normale e neoplastico valutati durante lo sviluppo di anticorpi primari.

## Riproducibilità:

La riproducibilità dei sistemi di rilevamento e dei reagenti del sistema Biocare viene verificata attraverso una misurazione di precisione intermedia in cui vari lotti di reagenti sono stati testati per un lungo periodo di tempo utilizzando vari operatori, analisti, lotti di reagenti, campioni di tessuto e apparecchiature. La colorazione ottenuta per ciascun reagente di rilevamento valutato era coerente ed eseguita come previsto.

## Risoluzione dei problemi:

1. Nessuna colorazione dei vetrini – Verificare che siano stati utilizzati tessuto di controllo positivo, anticorpi e prodotti di rilevamento appropriati. Verificare la rimozione o il pretrattamento della cera incompleto o improprio.
2. Colorazione debole di tutti i vetrini – Controllare per determinare se sono stati utilizzati tessuti di controllo positivo, anticorpi e prodotti di rilevamento adeguati.
3. Sfondo eccessivo di tutti i vetrini – Potrebbero essere presenti livelli elevati di biotina endogena (se si utilizzano prodotti di rilevamento a base di biotina), attività endogena dell'HRP che converte il cromogeno nel prodotto finale colorato (utilizzare il blocco della perossidasi) o un eccesso di interazione proteica non specifica (utilizzare una proteina blocco, come una soluzione bloccante a base di siero o caseina).
4. Le sezioni di tessuto vengono rimosse dai vetrini durante l'incubazione – Controllare i vetrini per assicurarsi che siano caricati positivamente.
5. Colorazione specifica troppo scura – Controllare il protocollo per determinare se al vetrino è stato applicato il titolo anticorpale corretto, nonché i tempi di incubazione corretti per tutti i reagenti. Inoltre, assicurarsi che il protocollo contenga fasi di lavaggio sufficienti per rimuovere i reagenti in eccesso una volta completate le fasi di incubazione.

## Riferimenti:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.

## Caratteristiche di performance:

La colorazione è stata eseguita utilizzando i protocolli forniti nelle istruzioni per l'uso specifiche dell'anticorpo o come specificato. La sensibilità e la

## Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Italian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Lab Med* 1983; 14:767.
14. 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. *Am J Clin Path* 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Korean

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## 사용 목적:

을 위한 시험관 내에서 진단용

그만큼 Betazoid DAB 염색체 키트이 제품은 적절한 검출 시스템 및 1 차 항체와 함께 사용할 경우 포르말린 고정 파라핀 포매(FFPE) 조직에서 표적 항원을 검출하기 위한 수동 또는 자동 면역조직화학(IHC) 염색 프로토콜에 사용하기 위한 것입니다. 염색 또는 염색 부재에 대한 임상적 해석은 형태학적 연구와 적절한 대조를 통해 보완되어야 하며 자격을 갖춘 병리학자가 환자의 임상 병력 및 기타 진단 테스트의 맥락에서 평가해야 합니다.

## 요약 및 설명:

3,3' 디아미노벤자린(DAB) HRP(양고추냉이 과산화효소) 효소가 있는 경우 유기 용매에 불용성인 갈색 침전물을 생성하고 영구 장착 매체로 커버슬립할 수 있는 IHC 염색 프로토콜에 사용되는 잘 확립된 발색체입니다. 이 제품은 액체 안정 DAB 발색체와 DAB 기질 완충액으로 구성된 2 성분 시스템으로 제공됩니다. 발색체 완충 혼합물의 색상은 무색에서 옅은 갈색까지 다양할 수 있습니다. 염색 특성은 발색체 완충액 혼합물의 색상에 영향을 받지 않습니다. Betazoid DAB는 매우 안정적인 제제입니다. Betazoid DAB는 수동 염색기와 자동 염색기 모두에서 사용할 수 있습니다.

## 절차 원칙:

Betazoid DAB 염색체 키트의 이 DAB 염색체는 FFPE 조직 색션의 IHC 테스트에 사용될 때 순차적 적용을 통해 항원의 시각화를 허용합니다. 항원에 대한 특정 항체(1 차 항체), 1 차 항체에 대한 2 차 항체(선택적 링크 항체/프로브), 효소 복합체 및 중간 세척 단계가 있는 발색 기질. 발색체의 효소적 활성화로 인해 항원 부위에서 눈에 보이는 반응 생성물이 생성됩니다. 그런 다음 표본을 대조염색하고 커버슬립할 수 있습니다. 결과는 빛을 사용하여 해석됩니다. 현미경을 사용하여 병리생리학적 과정을 감별 진단하는 데 도움을 줄 수 있습니다. 특정 항원과 연관되지 않을 수도 있습니다.

## 재료 및 방법:

### 제공되는 시약:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## 재구성, 혼합, 희석, 적정:

Betazoid DAB 염색체 키트는 Biocare 항체 및 보조 시약과 함께 사용하도록 최적화되어 있으며 사용 직전에 희석해야 합니다. DAB 기질 완충액 1.0mL 당 DAB 발색제 1 방울(32μL)을 혼합합니다. DAB 작업 용액은 2~8°C에서 보관할 경우 5 일 동안 안정적입니다.

## 알려진 응용 프로그램:

면역조직화학(포르말린 고정 파라핀 조직)

## 다음과 같이 제공됩니다:

### Betazoid DAB 발색체

DAB 솔루션. 자세한 내용은 안전 보건 자료를 참조하십시오.

### Betazoid DAB 기판 버퍼

완충 용액에는 3% 과산화수소 용액이 포함되어 있습니다. 자세한 내용은 안전 보건 자료를 참조하십시오.

## 필요하지만 제공되지 않는 재료 및 시약:

현미경 슬라이드, 양전하

양성 및 음성 조직 대조군

Desert Chamber\* 또는 이와 유사한 건조 오븐(옵션)

자일렌 또는 자일렌 대체물

에탄올 또는 시약 알코올

디클로킹 챔버\* 또는 이와 유사한 압력솥(선택 사항)

탈이온수 또는 증류수

세척 버퍼\*

전처리 시약\*(선택 사항)

효소 소화\*(선택 사항)

퍼옥시다제 블록\*

단백질 블록\*(선택 사항)

1 차 항체\*

음성 대조 시약\*

감지 키트\*

헤마톡실린\*(대조염색)

블루잉 시약\*

장착 매체\*

커버글래스

광학현미경(40-400X 배율)

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Korean

**BIOCARE**  
M E D I C A L

\* Biocare Medical 제품: 카탈로그 번호 및 주문에 관한 정보는 <http://biocare.net>에 있는 Biocare Medical 웹사이트를 참조하십시오. 위에 나열된 특정 시약은 사용되는 특정 응용 프로그램 및 감지 시스템을 기반으로 합니다.

## 보관 및 안정성:

2°C~8°C에서 보관하세요. 제품은 이러한 조건에서 보관할 때 바이알 라벨에 인쇄된 유효 기간까지 안정적입니다. 유효기간 이후에는 사용하지 마세요. 지정된 조건 이외의 조건에서의 보관을 확인해야 합니다. 희석된 시약은 지시에 따라 즉시 사용해야 합니다. 사용하지 않은 희석 시약은 2~8°C에서 보관하면 5일 동안 안정적입니다. 5일이 넘는 사용자 희석 시약의 안정성은 Biocare에 의해 확립되지 않았습니다.

모든 환자 검체에 대해 양성 및 음성 대조를 동시에 실행해야 합니다. 실험실 절차의 변화로 설명할 수 없는 예상치 못한 염색이 관찰되고 항체 문제가 의심되는 경우 1-800-542-2002로 전화하거나 [biocare.net](http://biocare.net)에서 제공하는 기술 지원 정보를 통해 Biocare 기술 지원에 문의하십시오.

## 표본 준비:

포르말린으로 고정된 조직은 파라핀 포매 전에 사용하기에 적합합니다. 골조직은 조직 절단을 용이하게 하고 마이크로톰 블레이드의 손상을 방지하기 위해 조직 처리 전에 석회질을 제거해야 합니다.<sup>1,2</sup>

특정 항원 표적을 발현하는 적절하게 고정되고 매립된 조직은 서늘한 곳에 보관해야 합니다. 1988년 임상검사실 개선법(CLIA)에서는 42 CFR을 요구합니다.<sup>3</sup> §493.1259(b) "실험실은 염색된 슬라이드를 날짜로부터 최소 10년 동안 보관해야 합니다. 검사를 실시하고 검사일로부터 최소 2년 동안 표본 블록을 보관해야 합니다."<sup>4</sup>

## 염색 전 조직 처리:

아래 권장 프로토콜에 따라 열 유도 항원결정부 검색(HIER)을 수행하십시오. IHC 이전에 HIER을 일상적으로 사용하면 불일치를 최소화하고 염색을 표준화하는 것으로 나타났습니다.<sup>4,5</sup>

## 경고 및 주의 사항:

1. DAB는 발암물질로 의심되는 물질로 알려져 있습니다.
2. DAB 컴포넌트를 강한 빛이나 직사광선에 노출시키지 마십시오.
3. DAB는 피부 민감성을 유발할 수 있습니다. 피부와 눈에 닿지 않도록 하세요.
4. DAB는 위험물질로 분류되어 암을 유발할 수 있고 유전적 결함을 일으킬 것으로 의심되므로 장갑과 보호복을 착용하고 취급 시 해당한 예방 조치를 취하십시오.
5. 잠재적으로 생물학적 위험이 있는 인간 또는 동물 유래 물질을 취급하고 적절한 예방조치를 통해 이러한 물질을 폐기하십시오. 노출된 경우 해당 기관의 보건 지침을 따르십시오.<sup>6,7</sup>
6. 고정 전후의 검체와 이에 노출된 모든 물질은 감염을 전파할 수 있는 것처럼 취급하고 적절한 예방 조치에 따라 폐기해야 합니다. 시약을 입으로

피펫팅하지 말고 시약 및 검체가 피부와 점막에 닿지 않도록 하십시오. 시약이나 검체가 민감한 부위에 닿은 경우 다량의 물로 씻어내십시오.<sup>8</sup>

7. 시약의 미생물 오염으로 인해 비특이적 염색이 증가할 수 있습니다.
8. 지정된 것 이외의 배양 시간이나 온도는 잘못된 결과를 초래할 수 있습니다. 사용자는 그러한 변경 사항을 확인해야 합니다.
9. 바이알에 표기된 사용기한이 지난 시약은 사용하지 마십시오.
10. 마이크로폴리머 검출 키트 시약은 최적화되었으며 Biocare 항체 및 보조 시약과 함께 사용할 수 있습니다. 권장 프로토콜 및 사용 조건은 1차 항체 및 기타 보조 시약 사용 지침을 참조하세요.
11. 폐기 방법은 지역 및/또는 주 당국의 요구 사항을 따르십시오.
12. SDS는 요청 시 제공되며 <http://biocare.net>에 있습니다.
13. 현지 Biocare 담당자 및 사용자가 위치한 회원국 또는 국가의 해당 관할 당국에 연락하여 이 장치와 관련된 심각한 사고를 보고하십시오.

이 염색체 키트에는 규정(EC) 번호 1272/2008에 따라 아래 표에 표시된대로 분류된 구성 요소가 포함되어 있습니다.

위험	암호	위험 설명
	H314 H350	유전적 결함을 일으키는 것으로 의심됨 암을 유발할 수 있음

## 사용 지침:

염색체 키트 시약은 Biocare 항체 및 보조 시약과 함께 사용하도록 최적화되었습니다. 권장 프로토콜 및 사용 조건은 1차 항체 및 기타 보조 시약 사용 지침을 참조하세요. 배양 시간과 온도는 따르는 특정 항체 프로토콜에 따라 달라집니다.

자동 염색 기기를 사용하는 경우 특정 기기 사용자 매뉴얼과 작동 매개변수 사용 지침을 참조하세요.

## IHC 수행을 위한 일반적인 절차 단계:

1. 탈파라핀화: Slide Brite 또는 자일렌에서 슬라이드를 탈파라핀화합니다. 일련의 등급 알코올에서 수화물이 물로 미끄러집니다.
2. 과산화물 블록: Peroxidized 1로 5분간 블록합니다.
3. 전처리 용액/프로토콜: 권장되는 전처리 용액 및 프로토콜은 해당 1차 항체 데이터 시트를 참조하십시오.
4. 단백질 차단(선택 사항): Background Punisher를 사용하여 실온(RT)에서 5~10분 동안 배양합니다.
5. 1차 항체: 배양 시간은 해당 1차 항체 데이터 시트를 참조하세요.
6. 프로브(마우스 항체만 해당): MACH 4 마우스 프로브를 사용하여 실온에서 5~15분 동안 배양합니다.
7. 폴리머: MACH 4 HRP 폴리머를 사용하여 RT에서 마우스 항체의 경우 10~20분 동안, 토끼 항체의 경우 30분 동안 배양합니다.
8. 발색체: Biocare의 DAB와 함께 RT에서 5분간 배양합니다.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Korean

**BIOCARE**  
M E D I C A L

9. 대조염색: 헤마톡실린을 이용한 대조염색. 탈이온수로 헹굽니다. 타차 블루잉 솔루션을 1분간 도포합니다. 탈이온수로 헹굽니다.

## 기술 노트:

1. 세척 단계에는 TBS를 사용합니다.

## 품질 관리:

면역조직화학 분석의 설계 및 구현에 대한 CLSI 품질 표준을 참조하십시오. 승인된 지침-제 2판(I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011년.

## 양성 조직 대조:

외부 양성 대조 물질은 환자 검체와 동일한 방식으로 가능한 한 빨리 고정, 처리 및 삽입된 새로운 검체여야 합니다. 양성 조직 대조군은 올바르게 준비된 조직과 적절한 염색 기술을 나타냅니다. 각 염색 실행에는 각 테스트 조건 세트에 대한 하나의 양성 외부 조직 대조가 포함되어야 합니다.

외부 양성 대조 물질로 사용되는 조직은 약한 양성 염색을 제공하는 낮은 수준의 양성 표적 활성이 잘 특성화되어 있는 환자 검체에서 선택해야 합니다. 외부 양성 대조군에 대한 낮은 양성 수준은 IHC 방법론의 불안정성 또는 문제로 인한 1 차 항체 민감도의 미묘한 변화를 감지할 수 있도록 설계되었습니다. 시중에서 판매되는 조직 대조 슬라이드 또는 환자 샘플과 다르게 처리된 표본은 시약 성능만 검증하고 조직 준비는 검증하지 않습니다.

알려진 양성 조직 대조군은 환자 샘플의 특정 진단을 공식화하는 데 도움이 되기보다는 처리된 조직 및 테스트 시약의 올바른 성능을 모니터링하는데에만 활용되어야 합니다. 양성 조직 대조군이 양성 염색을 나타내지 못하는 경우, 테스트 검체의 결과는 유효하지 않은 것으로 간주되어야 합니다.

## 음성 조직 제어:

각 염색 실행 시 환자 샘플과 동일한 방식으로 고정, 처리 및 내장된 음성 조직 대조를 사용하여 IHC 1 차 항체의 특이성을 확인합니다. 표적 항원을 입증하고 특정 배경 염색의 지표를 제공합니다. (거짓 양성 염색). 또한 대부분의 조직 절편에 존재하는 다양한 세포 유형이 IHC의 성능을 확인하기 위해 실험실 직원이 내부 음성 대조 사이트로 사용할 수 있습니다. 명세서. 음성조직에 사용될 수 있는 검체의 종류와 출처 컨트롤은 성능 특성 섹션에 나열되어 있습니다.

음성 조직 대조에서 특정 염색(위양성 염색)이 발생하는 경우, 환자 검체의 결과는 유효하지 않은 것으로 간주되어야 합니다.

## 비특이적 음성 시약 대조:

### 비특이적 염색 및

항원 부위의 특정 염색을 더 잘 해석할 수 있습니다. 이상적으로 음성 시약 대조군에는 1 차 항체와 동일한 방식으로 사용하기 위해 생산 및 제조된(즉, 동일한 희석제를 사용하여 동일한 농도로 희석) 항체가 포함되어 있지만 동일한 매트릭스/용액에서 인간 조직과 특이적인 반응성을 나타내지

않습니다. 1 차 항체. 희석제 단독은 이전에 설명한 음성 시약 대조에 대한 덜 바람직한 대안으로 사용될 수 있습니다. 음성 시약 대조군의 배양 기간은 1 차 항체의 배양 기간과 일치해야 합니다.

여러 항체 패널이 연속 섹션에 사용되는 경우 한 슬라이드의 음성 염색 영역은 다른 항체에 대한 음성/비특이적 결합 배경 제어 역할을 할 수 있습니다. 내인성 효소 활성 또는 효소의 비특이적 결합을 특정 면역반응성과 구별하기 위해 추가 환자 조직을 기질-발색체 또는 효소 복합체(PAP, 아비딘-비오틴, 스트렙타비딘) 및 기질-발색체로만 염색할 수 있습니다.

## 분석 검증:

진단 절차에서 항체 또는 염색 시스템을 처음 사용하기 전에 사용자는 알려진 양성 및 음성 조직을 대표하는 면역조직화학적 성능 특성이 알려진 일련의 내부 조직에서 항체를 테스트하여 항체의 특이성을 확인해야 합니다. 제품 삽입물의 이 섹션에 이전에 설명된 품질 관리 절차와 CAP 인증 프로그램의 품질 관리 권장 사항을 참조하십시오.<sup>10</sup> 면역조직화학 및/또는 NCCLS IHC 지침<sup>11</sup>. 이러한 품질 관리 절차는 새로운 항체 로트마다 또는 분석 매개변수에 변경이 있을 때마다 반복되어야 합니다. 성능 특성 섹션에 나열된 조직은 분석 검증에 적합합니다.

## 문제 해결:

제공된 데이터 시트에 따라 항체 특정 프로토콜 권장 사항을 따르십시오. 비정형 결과가 발생하면 1-800-542-2002 번으로 Biocare 기술 지원부에 문의하십시오.

## 염색의 해석:

Betazoid DAB 염색체 키트는 1 차 항체에 의해 국한된 항원 부위에서 갈색 반응을 생성합니다. 환자 결과를 해석하기 전에 자격을 갖춘 병리학자가 대조군 염색을 평가해야 합니다. 음성 대조군을 평가하고 염색된 슬라이드와 비교하여 관찰된 염색이 비특이적 상호작용의 결과가 아닌지 확인합니다.

## 양성 조직 대조:

표시된 항체로 염색된 양성 조직 대조군을 먼저 검사하여 모든 시약이 제대로 기능하는지 확인해야 합니다. (위에 표시된 대로) 표적 세포의 적절한 염색은 양성 반응성을 나타냅니다. 양성 조직 대조군이 양성 염색을 나타내지 못하는 경우, 테스트 검체의 모든 결과는 유효하지 않은 것으로 간주되어야 합니다.

반응 생성물의 색상은 사용된 기질 발색체에 따라 달라질 수 있습니다. 예상되는 색상 반응은 인쇄물 패키지 삽입물을 참조하십시오. 또한, 염색 방법에 따라 변색증이 관찰될 수도 있습니다.<sup>12</sup>

대조염색을 사용하는 경우, 배양 기간과 사용된 대조염색의 효능에 따라 대조염색으로 인해 세포핵이 착색됩니다. 과도하거나 불완전한 대조염색은 결과의 올바른 해석을 손상시킬 수 있습니다. 권장되는 대조염색에 대해서는 프로토콜을 참조하십시오.



60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

69/18



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Korean

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## 음성 조직 제어:

양성 조직 대조 후에는 음성 조직 대조를 검사하여 1 차 항체에 의한 표적 항원 표지의 특이성을 확인해야 합니다. 음성 조직 대조군에서 특정 염색이 없다는 것은 세포/세포 구성요소에 대한 항체 교차 반응성이 없음을 확인합니다. 음성 외부 조직 대조에서 특정 염색(위양성 염색)이 발생하는 경우, 환자 검체의 결과는 유효하지 않은 것으로 간주되어야 합니다.

비특이적 염색이 있는 경우 일반적으로 확산된 모습을 보입니다. 포르말린이 과도하게 고정된 조직의 절편에서도 결합 조직의 산발적인 염색이 관찰될 수도 있습니다. 염색 결과를 해석하려면 손상되지 않은 세포를 사용하십시오. 괴사성 또는 퇴행성 세포는 종종 비특이적으로 염색됩니다.

## 환자 조직:

표시된 항체로 염색된 환자 검체를 검사합니다. 마지막. 양성 염색 강도는 음성 시약 대조의 비특이적 배경 염색 맥락 내에서 평가되어야 합니다. 모든 면역조직화학적 검사와 마찬가지로, 음성 결과는 항원이 검출되지 않았음을 의미하며 분석된 세포/조직에 항원이 없다는 것을 의미하지는 않습니다. 필요한 경우 항체 패널을 사용하여 위음성 반응을 식별합니다.

표시된 항체 면역반응성에 관한 특정 정보는 요약 및 설명, 제한사항 및 성능 특성을 참조하십시오.

## 제한사항:

### 일반 제한사항:

- 을 위한 시험관 내에서 진단(IVD) 용도
- 이 제품은 전문가용입니다. 면역조직화학은 적절한 시약 선택에 대한 전문 교육으로 구성된 단계 진단 과정입니다. 조직 선택, 고정 및 처리, IHC 슬라이드 준비; 염색 결과의 해석.
- 의사의 처방에 의해서만 사용하십시오. (수신 전용)
- 조직 염색은 염색 전 조직의 취급 및 처리에 따라 달라집니다. 부적절한 고정, 냉동, 해동, 세척, 건조, 가열, 절개 또는 다른 조직이나 체액으로의 오염으로 인해 인공물, 항체 트래핑 또는 위음성 결과가 발생할 수 있습니다. 일관되지 않은 결과는 고정 및 삽입 방법의 차이 또는 조직 내의 고유한 불규칙성으로 인해 발생할 수 있습니다.<sup>14</sup>
- 과도하거나 불완전한 대조염색은 결과의 올바른 해석을 손상시킬 수 있습니다.
- 양성 또는 음성 염색에 대한 임상적 해석은 임상적 표현, 형태, 기타 조직병리학적 기준을 고려하여 평가해야 합니다. 양성 또는 음성 염색에 대한 임상적 해석은 적절한 양성 및 음성 내부 및 외부 대조와 기타 진단 테스트를 사용한 형태학적 연구를 통해 보완되어야 합니다. 최종 IHC 준비를 준비하고 해석하는 데 사용되는 모든 단계를 해석하는 것은 IHC 항체, 시약 및 방법의 적절한 사용에 익숙한 자격을 갖춘 병리학자의 책임입니다.
- 특정 애플리케이션에 대한 최적의 프로토콜은 다양할 수 있습니다. 여기에는 고정, 열 회수 방법, 배양 시간, 항체 희석, 조직 단면 두께 및

사용된 검출 키트가 포함되지만 이에 국한되지는 않습니다. 권장 프로토콜 및 사용 조건은 1 차 항체 및 기타 보조 시약 사용 지침을 참조하세요. 데이터 시트 권장 사항 및 프로토콜은 Biocare 제품의 독점적인 사용을 기반으로 합니다. 궁극적으로 최적의 조건을 결정하는 것은 조사자의 책임입니다.

- 이 제품은 유세포 분석에 사용하기 위한 것이 아닙니다. 유세포분석에 대한 성능 특성은 결정되지 않았습니다.
- B 형 간염 바이러스에 감염되고 B 형 간염 표면 항원(HBsAg)을 함유한 사람의 조직은 양 고추 냉이 퍼옥시다제에 의한 비특이적 염색을 나타낼 수 있습니다.<sup>14</sup>
- 시약은 이전에 테스트되지 않은 조직에서 예상치 못한 반응을 나타낼 수 있습니다. 신생물이나 기타 병리학적 조직에서 항원 발현의 생물학적 다양성으로 인해 테스트된 조직 그룹에서도 예상치 못한 반응이 발생할 가능성을 완전히 제거할 수는 없습니다.<sup>15</sup> 예상치 못한 반응이 기록되어 있으면 1-800-542-2002 번으로 전화하거나 biocare.net에서 제공하는 기술 지원 정보를 통해 Biocare 기술 지원부에 문의하십시오.
- 차단 단계에 사용되는 2 차 항체와 동일한 동물 유래의 정상/비면역 항체는 자가항체 또는 천연항체로 인해 위음성 또는 위양성 결과를 초래할 수 있습니다.
- 단백질이나 기질 반응 생성물의 비면역학적 결합으로 인해 위양성 결과가 나타날 수 있습니다. 또한 사용된 면역염색제의 유형에 따라 가성 과산화효소 활성(적혈구), 내인성 과산화효소 활성(시토크롬 C) 또는 내인성 비오틴(예: 간, 유방, 뇌, 신장)으로 인해 발생할 수도 있습니다.<sup>13</sup>
- 음성 결과는 항원이 검출되지 않았음을 의미하며, 검사된 세포나 조직에 항원이 없다는 의미는 아닙니다.

### 제품별 제한사항:

추가 제품별 제한 없음

## 성능 특성:

염색은 항체 특이적 사용 지침에 제공된 프로토콜을 사용하거나 지정된 대로 수행되었습니다. 염색의 민감도와 특이성은 1 차 항체 개발 중에 평가된 다양한 정상 및 신생물 조직 유형에 걸쳐 평가되었습니다.

## 재현성:

바이오케어의 검출 시스템과 시스템 시약의 재현성은 다양한 작업자, 분석가, 시약 로트, 조직 샘플 및 장비를 사용하여 다양한 시약 로트를 장기간에 걸쳐 테스트하는 중간 정밀도 측정을 통해 검증됩니다. 평가된 각 검출 시약에 대해 얻은 염색은 일관되었으며 예상대로 수행되었습니다.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

70/118



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Korean

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## 문제 해결:

1. 슬라이드에 염색이 되지 않음 - 적절한 양성 대조 조직, 항체 및 검출 제품이 사용되었는지 확인하십시오. 불완전하거나 부적절한 액스 제거 또는 전처리를 확인하십시오.
2. 모든 슬라이드의 약한 염색 - 적절한 양성 대조 조직, 항체 및 검출 제품이 사용되었는지 확인하십시오.
3. 모든 슬라이드의 과도한 배경 - 높은 수준의 내인성 비오틴(비오틴 기반 검출 제품을 사용하는 경우), 발색체를 유색 최종 생성물로 전환하는 내인성 HRP 활성(과산화효소 블록 사용) 또는 과도한 비특이적 단백질 상호작용(단백질 사용)이 있을 수 있습니다. 혈청 또는 카제인 기반 차단 용액과 같은 차단).
4. 배양 중에 조직 섹션이 슬라이드를 씻어냅니다. 슬라이드가 양전하를 띠고 있는지 확인하십시오.
5. 특정 염색이 너무 어두움 - 프로토콜을 확인하여 적절한 항체 역가가 슬라이드에 적용되었는지 확인하고 모든 시약에 대한 적절한 배양 시간을 확인하십시오. 또한 프로토콜에 인큐베이션 단계가 완료된 후 과잉 시약을 제거하기에 충분한 세척 단계가 있는지 확인하십시오.

## 참고자료:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. AmJ Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfent EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Latvian

**BIOCARE**  
MEDICAL

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Paredzētais lietojums:

Priekš/in vitro Diagnostikas lietošana

The Betazoid DAB hromogēna komplekts ir paredzēts lietošanai manuālās vai automātētās imūnhistokīmijas (IHC) krāsošanas protokolos mērķa antigēnu noteikšanai formalinā fiksētos, parafinā iestrādātos (FFPE) audos, ja to lieto kopā ar atbilstošu noteikšanas sistēmu un primārajām antivielām. Jebkuras iekrāsošanās vai tās neesamības kliniskā interpretācija ir jāpapildina ar morfoloģiskiem pētījumiem un atbilstošām kontrolēm, un tā jānovērtē pacienta kliniskās vēstures un citu diagnostisko testu kontekstā, ko veic kvalificēts patologs.

## Kopsavilkums un skaidrojums:

3,3' diaminobenzidīns (DAB) ir vispāratzīts hromogēns, ko izmanto IHC krāsošanas protokolos, kas mārrutku peroksidāzes (HRP) enzīma klātbūtnē rada brūnas nogulsnes, kas nešķīst organiskajos šķīdinātājos un kurus var pārkāpt ar pastāvīgu montāžas materiālu. Šis produkts ir pieejams divkomponentu sistēmā, kas sastāv no šķidrumā stabila DAB hromogēna un DAB substrāta buferšķiduma. Hromogēna bufera maišījuma krāsa var būt no bezkrāsaina līdz gaiši brūnai. Krāsošanas īpašības neietekmē hromogēna bufera maišījuma krāsa. Betazoid DAB ir loti stabila formula. Betazoid DAB var izmantot gan manuāli, gan uz automatizētiem krāsotājiem.

## Procedūras princips:

Šis DAB hromogēns Betazoid DAB hromogēna komplektā, kad to izmanto FFPE audu sekciju IHC testēšanā, lauj vizualizēt antigenus, secīgi pielietojot specifiska antivielu pret antigenu (primāru antivielu), sekundāru antivielu pret primāru antivielu (neobligāta saite antivielu/zonde), enzīmu kompleksu un hromogēns substrāts ar starplikām mazgāšanas soļiem. Hromogēna fermentatīvā aktivizēšana rada redzamu reakcijas produktu antigena vietā. Pēc tam paraugu var iekrāsot un pārkāpt ar vāku. Rezultāti tiek interpretēti, izmantojot gaismu mikroskopu un paliņķiezķeli patofizioloģisko procesu diferenciāldiagnozē, kas var vai var nebūt saistīts ar noteiktu antigenu.

## Materiāli un metodes:

### Piedāvātie reaģenti:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Atšķaidīšana, sajaukšana, atšķaidīšana, titrēšana:

Betazoid DAB Chromogen Kit ir optimizēts lietošanai ar Biocare antivielām un paliņķiezķeliem, un tas ir jāatšķaida tieši pirms lietošanas. Sajauc 1 pilienu (32 µL) DAB hromogēnu uz 1,0 ml DAB substrāta buferšķiduma. DAB darba šķidums ir stabils 5 dienas, ja to uzglabā 2-8°C.

## Zināmās lietojumprogrammas:

Imūnhistokīmija (formalinā fiksēti parafinā iestrādāti audi)

## Piegādāts kā:

*Betazoid DAB hromogēns*

DAB risinājums. Papildinformāciju skatiet drošības datu lapā.

## *Betazoid DAB substrāta buferis*

Buferšķidums satur 3% ūdenraža peroksīda šķidumu. Papildinformāciju skatiet drošības datu lapā.

## Nepieciešamie materiāli un reaģenti, kas nav nodrošināti:

Mikroskopa priekšmetstiklini, pozitīvi uzlādēti

Pozitīvs un negatīvs audu kontroles

Desert Chamber\* vai līdzīga žāvēšanas krāsns (pēc izvēles)

Ksilols vai ksilola aizstājējs

Etanols vai reaģenta spirits

Atslājošās kamera\* vai līdzīga spiediena katls (pēc izvēles)

Dejonēts vai destilēts ūdens

Mazgāšanas buferis\*

Priekšapstrādes reaģenti\* (pēc izvēles)

Fermentu gremošana\* (pēc izvēles)

peroksidāzes blokāde\*

Olbaltumvielu bloks\* (pēc izvēles)

Primārā antivieļa\*

Negatīvie kontroles reaģenti\*

Atklāšanas kompleksi\*

Hematoksilīns\* (pretkrāsa)

Bluing reaģents\*

Montāžas līdzeklis\*

Vāka stikls

Gaismas mikroskops (40-400X palielinājums)

\* Biocare Medical Products: informāciju par kataloga numuriem un pasūtīšanu skatiet Biocare Medical tīmekļa vietnē <http://biocare.net>. Daži iepriekš uzskaitītie reaģenti ir balstīti uz īpašu pielietojumu un izmantoto noteikšanas sistēmu.

## Uzglabāšana un stabilitāte:

Uzglabāt temperatūrā no 2°C līdz 8°C. Uzglabājot šādos apstākļos, produkts ir stabils līdz derīguma termiņam, kas uzdrukāts uz flakona etiketes. Nelietot pēc derīguma termiņa beigām. Uzglabāšana citos apstākļos, izņemot norādītos, ir jāpārbauda. Atšķaidītie reaģenti jāizlieto nekavējoties, kā norādīts. Neizlietotais atšķaidītais reaģents ir stabils 5 dienas, ja uzglabā 2-8°C. Biocare nav noteikusi lietotāja atšķaidīta reaģenta stabilitāti ilgāk par 5 dienām.

Positīvs un negatīvs kontroles jāveic vienlaikus ar visiem pacienta paraugiem. Ja tiek novērota neparedzēta iekrāsošanās, ko nevar izskaidrot ar atšķirībām laboratorijas procedūrās, un ir aizdomas par problēmu ar antivielu, sazinieties ar Biocare tehnisko atbalstu pa tālruni 1-800-542-2002 vai izmantojot tehniskā atbalsta informāciju, kas sniegtā vietnē [biocare.net](http://biocare.net).

## Parauga sagatavošana:

Formalinā fiksēti audi ir piemēroti lietošanai pirms parafina iestrādāšanas. Kaulu audi pirms audu apstrādes ir jāatkalpo, lai atvieglotu audu griešanu un novērstu mikrotomu asmeņu bojājumus.<sup>1,2</sup>

Pareizi fiksēti un iestrādāti audi, kas ekspresē norādito antigena mēri, jāuzglabā vēsā vietā. 1988. gada Klīniskās laboratorijas uzlabošanas likums (CLIA) pieprasī 42 CFR. §493.1259(b), ka "Laboratorijai ir jāsaglabā iekrāsotie priekšmetstiklini vismaz desmit gadus no datuma, kad pārbaudi un saglabā paraugu blokus vismaz divus gadus no pārbaudes datuma."<sup>3</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Latvian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Audu apstrāde pirms krāsošanas:

Veiciet siltuma izraisītu epitopu izgūšanu (HIER) saskaņā ar tālāk ieteikto protokolu. Ir pierādīts, ka regulāra HIER lietošana pirms IHC samazina nekonsekvenči un standartizē krāsošanu.<sup>4,5</sup>

## Brīdinājumi un piesardzības pasākumi:

1. Ir zināms, ka DAB ir kancerogēns.
2. Nepakļaujiet DAB komponentus spēcīgas gaismas vai tiešas saules gaismas iedarbībai.
3. DAB var izraisīt ādas sensibilizāciju. Izvairieties no saskares ar ādu un acīm.
4. Valkājet cimdus un aizsargtēru un veiciet saprātīgus piesardzības pasākumus, rīkojoties, jo DAB ir klasificēts kā bīstams un var izraisīt vēzi un ir aizdomas, ka tas izraisa ģenētiskus defektus.
5. Rīkojieties ar cilvēku vai dzīvnieku izcelsmes materiāliem kā potenciāli bioloģiski bīstamiem un atbrivojieties no šādiem materiāliem, ievērojot atbilstošus piesardzības pasākumus. Iedarbības gadījumā ievērojiet atbildīgo iestāžu norādījumus par veselību, ja tas tiek lietots.<sup>6,7</sup>
6. Paraugi pirms un pēc fiksācijas un visi tiem pakļautie materiāli ir jārīkojas tā, it kā tie varētu pārnēsāt infekciju, un tie jāiznīcina, ievērojot atbilstošus piesardzības pasākumus. Nekad nepipeejiet reāgentus iekšķīgi un izvairieties no saskares ar ādu un glotādām ar reāgentiem un paraugiem. Ja reāgenti vai paraugi nonāk saskarē ar jutīgām zonām, nomazgājiet ar lielu ūdens daudzumu.<sup>8</sup>
7. Reāgentu piesārnojums ar mikrobiem var izraisīt nespecifiskas iekrāsošanās palielināšanos.
8. Inkubācijas laiki vai temperatūra, kas nav norādīta, var sniegt klūdainus rezultātus. Lietotājam ir jāapstiprina visas šādas izmaiņas.
9. Nelietot reāgentu pēc derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz flakona.
10. Mikropolimēru noteikšanas komplekta reāgents(-i) ir optimizēti un gatavi lietošanai ar Biocare antivelām un palīgreaģentiem. Ieteiktos lietošanas protokolus un nosacījumus skatiet primāro antivielu un citu palīgreaģentu lietošanas instrukcijās.
11. Ievērojiet vietējo un/vai valsts iestāžu prasības attiecībā uz iznīcināšanas metodi.
12. SDS ir pieejams pēc pieprasījuma un atrodas <http://biocare.net>.
13. Zinojiet par visiem nopiētniem incidentiem, kas saistīti ar šo ierīci, sazinieties ar vietējo Biocare pārstāvi un attiecīgās daļībalstis vai valsts, kurā atrodas lietotājs, kompetento iestādi.

Šis hromogēna komplekts satur sastāvdalas, kas klasificētas, kā norādīts tālāk esošajā tabulā saskaņā ar Regulu (EK) Nr. 1272/2008

Apdraudējums	Kods	Bīstamības pazinojums
	H314 H350	Ir aizdomas, ka var izraisīt ģenētiskus defektus Var izraisīt vēzi

## Lietošanas instrukcija:

Hrogēna komplekta reāgenti ir optimizēti lietošanai ar Biocare antivelām un palīgreaģentiem. Ieteiktos lietošanas protokolus un nosacījumus skatiet primāro antivielu un citu palīgreaģentu lietošanas instrukcijās. Inkubācijas laiki un temperatūras mainīšies atkarībā no konkrētā antivielu protokola.

Izmantojot automatizētu krāsošanas instrumentu, skatiet konkrētā instrumenta lietotāja rokasgrāmatu un lietošanas instrukcijas darbības parametriem.

## Vispārējās procedūras darbības IHC veikšanai:

1. Deparafinācija: deparafinējiet priekšmetstiklinus Slide Brite vai ksilolā. Hidrējiet priekšmetstiklinus vairākos šķirotos spirtošos līdz ūdenim.
2. Peroksīda bloks: 5 minūtes bloķējiet ar peroksidētu 1.

3. Priekšapstrādes šķidums/protokols: lūdzu, skatiet attiecīgo primāro antivielu datu lapu, lai uzzinātu ieteicamo pirmapstrādes šķidumu un protokolu.

4. Proteīna bloks (pēc izvēles): inkubējiet 5–10 minūtes istabas temperatūrā (RT) ar Background Punisher.

5. Primārā antivielas: lūdzu, skatiet attiecīgo primāro antivielu datu lapu, lai uzzinātu inkubācijas laiku.

6. Zonde (tikai peles antivielām): Inkubējiet 5–15 minūtes RT ar MACH 4 Mouse Probe.

7. Polimērs: inkubējiet 10–20 minūtes peles antivielām vai 30 minūtes trušu antivielām istabas temperatūrā ar MACH 4 HRP polimēru.

8. Hrogēns: inkubējiet 5 minūtes RT ar Biocare DAB.

9. Pretkrāsojums: pretkrāsojums ar hematoksilīnu. Noskalo ar dejonizētu ūdeni. Uzkļājet Tacha's Bluing Solution 1 minūti. Noskalo ar dejonizētu ūdeni.

## Tehniskas piezīmes:

1. Mazgāšanas solīem izmantojiet TBS.

## Kvalitātes kontrole:

Skatiet CLSI kvalitātes standartus imūnhistokīmijas testu izstrādei un ieviešanai; Apstiprināts vadlīniju otrs izdevums (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011. gads.

## Pozitīvā audu kontrole:

Ārējiem pozitīvās kontroles materiāliem jābūt svaigiem paraugiem, kas fiksēti, apstrādāti un pēc iespējas ātrāk jāievieto tādā pašā veidā kā pacienta paraugs(-i). Pozitīva audu kontrole liecina par pareizi sagatavotiem audiem un pareizām krāsošanas metodēm. Katrā krāsošanas ciklā jāiekļauj viena pozitīva ārējā audu kontrole katrai testa apstākļu kopai.

Ārējiem pozitīvās kontroles materiāliem izmantotie audi jāizvēlas no pacientu paraugiem ar labi raksturotu zemu pozitīvās mērķa aktivitātes līmeni, kas rada vāju pozitīvu krāsojumu. Zemais pozitīvāties līmenis ārējām pozitīvajām kontrolēm ir izstrādāts tā, lai nodrošinātu smalku primāro antivielu jutības izmaiņu noteikšanu no nestabilitātes vai problēmām ar IHC metodoloģiju. Tirdzniecībā pieejamie audu kontroles priekšmetstiklini vai paraugi, kas apstrādāti atšķirīgi no pacienta parauga(-iem), apstiprina tikai reāgenta darbību un nepārbauda audu sagatavošanu.

Zināmas pozitīvās audu kontroles ir jāizmanto tikai apstrādāto audu un testa reāgentu pareizas darbības uzraudzībai, nevis kā palīglīdzeklis konkrētas pacienta paraugu diagnozes formulēšanā. Ja pozitīvās audu kontroles neizdodas uzrādīt pozitīvu iekrāsošanos, testa paraugu rezultāti jāuzskata par nederīgiem.

## Negatīvo audu kontrole:

Katrā krāsošanas ciklā izmantojiet negatīvu audu kontroli, kas fiksēta, apstrādāta un iegulta identiski pacienta paraugam(-iem), lai pārbaudītu IHC primārās antivielas specifiskumu. mērķa antigēna demonstrēšana un sniegt norādi par specifisku fona krāsojumu (viltus pozitīva krāsošana). Arī dažādu šūnu tipu dažādību, kas atrodas lielākajā dalā audu sekciju, var Laboratorija izmantos kā iekšējās negatīvās kontroles vietas, lai pārbaudītu IHC darbību specifikācijas. Paraugu veidi un avoti, ko var izmantot negatīviem audiem vadīkļas ir uzskaņitas sadaļā Veikspējas raksturlielumi.

Ja negatīvajā audu kontrolē notiek specifiska iekrāsošanās (viltus pozitīva iekrāsošanās), pacienta paraugu rezultāti jāuzskata par nederīgiem.

## Nespecifiskā negatīvā reāgenta kontrole:

Primārās antivielas vietā izmantojiet nespecifisku negatīvu reāgenta kontroli ar katra pacienta parauga daļu, lai novērtētu nespecifisko krāsošanos un ļauj labāk interpretēt specifisko krāsojumu antigena vietā. Ideālā gadījumā negatīvā reāgenta kontrole satur antivielu, kas ražota un sagatavota (t.i.,

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Latvian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

atšķaidīta līdz tādai pašai koncentrācijai, izmantojot to pašu šķidinātāju) lietošanai tādā pašā veidā kā primārā antiviela, bet tai nav specifiskas reaktivitātes ar cilvēka audiem tajā pašā matricā/šķidumā kā primārā antiviela. Atšķaidītā vienu pašu var izmantot kā mazāk vēlamo alternatīvu iepriekš aprakstītajām negatīvajām reāgentu kontrolēm. Negatīvā reāgenta kontroles inkubācijas periodam jāatbilst primārās antivielas inkubācijas periodam.

Ja sērijei daudzākām tiek izmantoti vairāku antivielu paneli, viena priekšmetstikliniņa negatīvi iekrāsotie apgabali var kalpot kā negatīva/nespecifiska saistišanas fona kontrole citām antivielām. Lai atšķirtu endogēno enzīmu aktivitāti vai nespecifisku enzīmu saistišanos no specifiskās imūnreaktivitātes, papildu pacienta audus var iekrāsot tikai ar substrāta-hromogēnu vai enzīmu kompleksiem (PAP, avidīns-biotins, streptavidins) un substrāta-hromogēnu, attiecīgi.

## Testa pārbaude:

Pirms antivielas vai krāsošanas sistēmas sākotnējās izmantošanas diagnostikas procedūrā, lietotājam jāpārbauda antivielas specifika, pārbaudot to uz vairākiem iekšējiem audiem ar zināmiem imūnhistokīmiskās veikspējas raksturlielumiem, kas atspogulo zināmus pozitīvus un negatīvus audus. Skatiet kvalitātes kontroles procedūras, kas iepriekš aprakstītas šajā produkta ievietojuma sadaļā, un KLP sertifikācijas programmas kvalitātes kontroles ieteikumus.<sup>10</sup> imūnhistokīmijai un/vai NCCLS IHC vadlīnijām<sup>11</sup>. Šīs kvalitātes kontroles procedūras jāatkarto katrai jaunai antivielu partijai vai ikreiz, kad notiek izmaiņas testa parametros. Testa pārbaudei ir piemēroti audi, kas norādīti sadaļā Veikspējas raksturojums.

## Problēmu novēršana:

Ievērojiet antivielu specifiskā protokola ieteikumus saskaņā ar sniegto datu lapu. Ja rodas netipiski rezultāti, sazinieties ar Biocare tehnisko atbalstu pa tālruni 1-800-542-2002.

## Krāsošanas interpretācija:

Betazoid DAB hromogēna komplekts rada brūnas krāsas reakciju antigēna vietās, ko lokalizē primārā antiviela. Pirms pacienta rezultātu interpretācijas kvalificētam patologam ir jānovērtē kontroles iekrāsošanās. Negatīvās kontroles tiek novērtētas un salīdzinātas ar iekrāsotajiem priekšmetstikliniemiem, lai nodrošinātu, ka novērotā iekrāsošanās nav nespecifiskas mijiedarbības rezultāts.

## Pozitīvā audu kontrole:

Vispirms ir jāpārbauda pozitīvā audu kontrole, kas iekrāsota ar norādīto antivielu, lai pārliecinātos, ka visi reāgenti darbojas pareizi. Atbilstoša mērķa šūnu krāsošana (kā norādīts iepriekš) liecina par pozitīvu reaktivitāti. Ja pozitīvās audu kontroles neizdodas uzrādīt pozitīvu iekrāsošanos, visi testa paraugu rezultāti jāuzskata par nederīgiem.

Reakcijas produkta krāsa var atšķirties atkarībā no izmantotajiem substrāta hromogēniem. Paredzamās krāsu reakcijas skatiet substrāta iepakojuma lappusēs. Turklat metahromāziju var novērot krāsošanas metodes variācijās.<sup>12</sup>

Ja tiek izmantots pretkrāsojums, atkarībā no inkubācijas ilguma un izmantotā pretkrāsojuma stipruma, pretkrāsošana izraisīs šūnu kodolu krāsojumu. Pārmērīga vai nepilnīga pretkrāsošana var apdraudēt pareizu rezultātu interpretāciju. Skatiet protokolu(-s), lai uzzinātu par ieteicamo pretkrāsošanu.

## Negatīvo audu kontrole:

Negatīvā audu kontrole jāpārbauda pēc pozitīvās audu kontroles, lai pārbaudītu primārās antivielas mērķa antigēna markēšanas specifiku. Specifiskas iekrāsošanās trūkums negatīvajā audu kontrolē apstiprina antivielu krusteniskās reaktivitātes trūkumu pret šūnam/šūnu komponentiem.

Ja negatīvā ārējā audu kontrolē notiek specifiska iekrāsošanās (viltus pozitīva iekrāsošanās), pacienta parauga rezultāti jāuzskata par nederīgiem.

Nespecifiska krāsošana, ja tāda ir, parasti ir izkliedēta. Sporadisku saistaudu iekrāsošanos var novērot arī sekcijas no pārmērīgi formalīna fiksētiem audiem. Krāsošanas rezultātu interpretācijai izmantojiet neskartas šūnas. Nekrotiskas vai degenerētas šūnas bieži krāsojas nespecifiski.

## Pacienta audi:

Pārbaudiet pacientu paraugus, kas iekrāsoti ar norādītajām antivielām Pēdējais. Pozitīvā krāsošanas intensitāte jānovērtē saistībā ar jebkuru nespecifisku negatīvu reāgenta kontroles fona krāsojumu. Tāpat kā ar jebkuru imūnhistokīmisko testu, negatīvs rezultāts nozīmē, ka antigēns nav konstatēts, nevis antigēna nebija pārbaudītajās šūnās/audiem. Ja nepieciešams, izmantojiet antivielu paneli, lai identificētu viltus negatīvas reakcijas.

Lai iegūtu specifisku informāciju par norādīto antivielu imūnreaktivitāti, skatiet kopsavilkumu un skaidrojumu, ierobežojumus un veikspējas raksturlielumus.

## Ierobežojumi:

### Vispārīgi ierobežojumi:

1. Priekš/īn vitro diagnostikas (IVD) lietošana
2. Šis produkts ir paredzēts tikai profesionālai lietošanai: Imūnhistokīmija ir daudzpakāpju diagnostikas process, kas sastāv no specializētas apmācības atbilstošu reāgentu izvēlē; audu atlase, fiksācija un apstrāde; IHC priekšmetstikliniņa sagatavošana; un krāsošanas rezultātu interpretācija.
3. Lietošanai tikai pēc ārsta receptes. (tikai Rx)
4. Audu krāsošana ir atkarīga no audu apstrādes un apstrādes pirms krāsošanas. Nepareiza fiksācija, sasaldēšana, atkausēšana, mazgāšana, žāvēšana, karsēšana, sadalīšana vai piesārnošana ar citiem audiem vai šķidrumiem var radīt artefaktus, antivielu slazdošanu vai viltus negatīvus rezultātus. Nekonsekventi rezultāti var būt fiksācijas un iegulšanas metožu atšķirību dēļ vai audos raksturīgu nelīdzenu mu dēļ.<sup>13</sup>
5. Pārmērīga vai nepilnīga pretkrāsošana var apdraudēt pareizu rezultātu interpretāciju.
6. Jebkuras pozitīvas vai negatīvas iekrāsošanās kliniskā interpretācija jānovērtē kliniskā attēla, morfoloģijas un citu histopatoloģisku kritēriju kontekstā. Jebkuras pozitīvas vai negatīvas iekrāsošanās kliniskā interpretācija jāpapildina ar morfoloģiskiem pētījumiem, izmantojot atbilstošus pozitīvos un negatīvos iekšējos un ārējos kontroles testus, kā arī citus diagnostikas testus. Kvalificēts patologs, kurš ir iepazīnies ar pareizu IHC antivielu, reāgentu un metožu lietošanu, ir atbildīgs, lai interpretētu visas darbības, kas izmantotas, lai sagatavotu un interpretētu galigo IHC preparātu.
7. Optimālie protokoli konkrētai lietojumprogrammai var atšķirties. Tie ietver (bet ne tikai) fiksāciju, siltuma iegūšanas metodi, inkubācijas laikus, antivielu atšķaidīšanu, audu sekcijas biezumu un izmantoto noteikšanas komplektu. Ieteiktos lietošanas protokolus un nosacījumus skatiet primārā antivielu un citu palīgreaģēntu lietošanas instrukcijas. Datu lapas ieteikumi un protokoli ir balstīti uz ekskluzīvu Biocare produktu izmantošanu. Galu galā pētnieka pienākums ir noteikt optimālos apstākļus.
8. Šis produkts nav paredzēts izmantošanai plūsmas citometrijā. Plūsmas citometrijas veikspējas raksturlielumi nav noteikti.
9. Audos no personām, kas inficētas ar B hepatīta vīrusu un satur B hepatīta virsmas antigēnu (HBsAg), var būt nespecifiska iekrāsošanās ar mārrutku peroksidāzi.<sup>14</sup>
10. Reāgenti var parādīt negaidītas reakcijas iepriekš nepārbaudītos audos. Negaidītu reakciju iespējamību pat pārbaudītajās audu grupās nevar pilnībā novērst antigēnu ekspresijas bioloģiskās variabilitātes dēļ.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Latvian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

jaunveidojumos vai citos patoloģiskos audos.<sup>15</sup> Sazinieties ar Biocare tehnisko atbalstu pa tālruni 1-800-542-2002 vai izmantojot tehniskā atbalsta informāciju, kas sniegtā vietnē biocare.net, norādot dokumentētu neparedzētu reakciju.

11. Normāli/neimūnie serumi no tā paša dzīvnieku izceļsmes avota kā sekundārie antiserumi, ko izmanto bloķešanas posmos, var izraisīt klūdaini negatīvus vai klūdaini pozitīvus rezultātus autoantivielu vai dabisko antivielu dēļ.
12. Klūdaini pozitīvus rezultātus var redzēt proteīnu vai substrāta reakcijas produktu neimunoloģiskas saistīšanās dēļ. Tos var izraisīt arī pseudoperoksidāzes aktivitāte (eritročīti), endogēna peroksidāzes aktivitāte (citohroms C) vai endogēns biotīns (piemēram, aknas, krūts, smadzenes, nieres) attkarībā no izmantotā imūnkrāsojuma veida.<sup>13</sup>
13. Negatīvs rezultāts nozīmē, ka antigēns netika atklāts, nevis to, ka pārbaudītajās šūnās vai audos antigēna nebija.

#### Produkta specifiskie ierobežojumi:

Nav papildu produktu specifisku ierobežojumu

#### Veikspējas raksturojums:

Krāsošana tika veikta, izmantojot protokolus, kas sniegti antivielu specifiskajās lietošanas instrukcijās vai kā norādīts. Krāsošanas jutīgums un specifiskums tika novērtēts dažādos normālos un neoplastiskos audu veidos, kas tika novērtēti primāro antivielu veidošanās laikā.

#### Reproducējamība:

Biocare noteikšanas sistēmu un sistēmu reāgentu reproducējamība tiek pārbaudīta, veicot vidējas precizitātes mēriju, kurā dažādas reāgentu partijas tika pārbaudītas ilgākā laika periodā, izmantojot dažādus operatorus, analītikus, reāgentu partijas, audu paraugus un aprīkojumu. Katram novērtētajam noteikšanas reāgentam iegūtā krāsošana bija konsekventa un tika veikta, kā paredzēts.

#### Problēmu novēršana:

1. Priekšmetstiklini nav iekrāsoti – pārbaudiet, lai noteiktu, vai ir izmantoti atbilstoši pozitīvās kontroles audi, antivielas un noteikšanas produkti. Pārbaudiet, vai vaska noņemšana vai pirmaprāde nav veikta pilnībā vai nepareizi.
2. Vāja visu priekšmetstiklinu krāsošana – pārbaudiet, lai noteiktu, vai ir izmantoti atbilstoši pozitīvās kontroles audi, antivielas un noteikšanas produkti.
3. Pārmērigs visu priekšmetstiklinu fons — var būt augsts endogēnā biotīna līmenis (ja izmanto noteikšanas produktus uz biotīna bāzes), endogēna HRP aktivitāte, kas pārvērš hromogēnu krāsainā galaproduktā (izmantojiet peroksidāzes bloku) vai pārmēriga nespecifiskā proteīna mijiedarbība (izmantojiet proteīnu). blokādi, piemēram, bloķējošs šķidums uz seruma vai kazeīna bāzes).
4. Audu sekcijas nomazgā priekšmetstiklinus inkubācijas laikā – pārbaudiet priekšmetstiklinus, lai pārliecinātos, ka tie ir pozitīvi uzlādēti.
5. Īpaša krāsošanās ir pārāk tumša – pārbaudiet protokolu, lai noteiktu, vai priekšmetstikliniem ir piemērots pareizs antivielu titrs, kā arī pareizu visu reāgentu inkubācijas laiku. Turklat pārliecinieties, ka protokolā ir pietiekami daudz mazgāšanas soļu, lai pēc inkubācijas darbību pabeigšanas noņemtu liekos reāgentus.

#### Atsauces:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.

3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Lithuanian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Paskirtis:

Dél/in vitro Diagnostinis naudojimas

The Betazoid DAB chromogen rinkinysskirtas naudoti rankiniu arba automatiniu imunohistocheminiu (IHC) dažymo protokoluose, skirtuose tiksliniams antigenams aptikti formalinu fiksuojuose, į parafiną įterptuose (FFPE) audiniuose, kai naudojamas kartu su atitinkama aptikimo sistema ir pirminiais antikūnais. Klinikinį bet kokio dažymo ar jo nebuvo aiškinimą turėtų papildyti morfologiniai tyrimai ir tinkama kontrolė, o kvalifikuotas patologas turi ivertinti paciento klinikinę istoriją ir kitus diagnostinius tyrimus.

## Santrauka ir paaiškinimas:

3,3 colio diaminobenzidinas (DAB) yra gerai žinomas chromogenas, naudojamas IHC dažymo protokoluose, kuris, esant krienų peroksidažės (HRP) fermentui, išskiria rudas nuosėdas, netirpias organiniuose tirpikliuose ir gali būti padengtas nuolatine tvirtinimo medžiaga. Šis produktas yra dviejų komponentų sistemoje, kurią sudaro skystis stabilus DAB chromogenas ir DAB substrato buferis. Chromogeno buferinio mišinio spalva gali skirtis nuo bespalvės iki šviesiai rudos. Chromogeno buferio mišinio spalva neturi įtakos dažymo savybėms. Betazoid DAB yra labai stabili formulė. Betazoid DAB galima naudoti tiek rankiniu būdu, tiek ant automatinių dažų.

## Procedūros principas:

Šis Betazoid DAB chromogenų rinkinyje esantis DAB chromogenas, naudojamas IHC tiriant FFPE audinių dalis, leidžia vizualizuoti antigenus nuosekliai naudojant specifinius antikūnas prieš antigeną (pirminis antikūnas), antrinius antikūnas prieš pirmajį antikūną (neprivalomas antikūnas/zondas), fermentų kompleksas ir chromogeninis substratas su tarpinėmis plovimo etapais. Dėl fermentinio chromogeno aktyvavimo antigeno vietoje susidaro matomas reakcijos produktas. Tada mėginys gali būti nudažytas ir padengtas dangteliu. Rezultatai interpretuojami naudojant lemputę mikroskopu ir pagalba diferencinei patofiziologinių procesų diagnostikai, kurie gali arba gali būti nesusiję su konkrečiu antigenu.

## Medžiagos ir metodai:

### Pateikiame reagentai:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Atskiedimas, maišymas, skiedimas, titravimas:

Betazoid DAB Chromogen Kit yra optimizuotas naudoti su Biocare antikūnais ir pagalbiniais reagentais ir turi būti atskiestas prieš pat naudojimą. Sumaišykite 1 lašą (32 µL) DAB chromogeno 1,0 ml DAB substrato buferio. DAB darbinis tirpalas yra stabilus 5 dienas, jei laikomas 2-8°C temperatūroje.

## Žinomos programos:

Imunohistochemija (formalinu fiksuooti audiniai, įterpti į parafiną)

## Tiekiamą kaip:

*Betazoid DAB chromogenas*

DAB sprendimas. Daugiau informacijos rasite saugos duomenų lape.

## Betazoid DAB substrato buferis

Buferiniame tirpale yra 3% vandenilio peroksido tirpalo. Daugiau informacijos rasite saugos duomenų lape.

## Reikalingos, bet nepateiktos medžiagos ir reagentai:

Mikroskopo stikliai, teigiamai įkrauti

Teigiamo ir neigiamo audinių kontrolė

Desert Chamber\* arba panaši džiovinimo krosnelė (neprivaloma)

Ksilenas arba ksileno pakaitalas

Etanolis arba alkoholio reagentas

Užsikimšimo kamera\* arba panašus greitpuodis (pasirinktinai)

Dejonizuotas arba distiliuotas vanduo

plovimo buferis\*

Pirminio apdorojimo reagentai\* (neprivaloma)

Virškinimas fermentais\* (neprivaloma)

peroksidažės blokada\*

Balymų blokas\* (neprivaloma)

Pirminis antikūnas\*

Neigiami kontroliniai reagentai\*

aptikimo rinkiniai\*

Hematoksilinas\* (priežastis)

mėlynumo reagentas\*

Montavimo terpė\*

Dengiamasis stiklas

Šviesos mikroskopas (40-400X padidinimas)

\* Biocare medicinos produktai: informacijos apie katalogų numerius ir užsakymus rasite Biocare Medical svetainėje <http://biocare.net>. Tam tikri aukščiau išvardyti reagentai yra pagrįsti specifine panaudojimo ir aptikimo sistema.

## Sandėliavimas ir stabilumas:

Laikyti 2°C – 8°C temperatūroje. Laikant tokiomis sąlygomis, produktas yra stabilus iki galiojimo datos, nurodytos ant buteliuko etiketės. Nenaudoti pasibaigus tinkamumo laikui. Turi būti patikrintas saugojimas bet kokiomis kitokiomis sąlygomis nei nurodytos. Praskiesti reagentai turi būti naudojami nedelsiant, kaip nurodyta. Nepanaudotas atskiestas reagentas išlieka stabilus 5 dienas, jei laikomas 2-8°C temperatūroje. Biocare nenustatė vartotojo praskiesto reagento stabilumo ilgiu nei 5 dienas.

Teigiamas ir neigiamas kontrolė turi būti atliekama vienu metu su visais paciento mėginiu. Jei pastebimas netikėtas dažymas, kurio negalima paaškinti laboratorinių procedūrų skirtumais, ir įtariate antikūnų problemą, susisiekite su Biocare techninės pagalbos tarnyba telefonu 1-800-542-2002 arba per techninės pagalbos informaciją, pateiktą biocare.net.

## Mėginio paruošimas:

Formalinu fiksuooti audiniai tinkami naudoti prieš įterpiant į parafiną. Kauliniai audiniai turi būti nukalkinti prieš audinių apdorojimą, kad būtų lengviau nupjauti audinių ir nepažeisti mikrotomo ašmenų.<sup>1,2</sup>

Tinkamai fiksuooti ir įterpti audiniai, išreiškiantys nurodytą antigeno taikini, turi būti laikomi vėsioje vietoje. 1988 m. Klinikinių laboratorijų tobulinimo

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Lithuanian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

įstatymas (CLIA) reikalauja 42 CFR§493.1259(b), kad „Laboratorija turi saugoti beicuotus stiklelius mažiausiai dešimt metų nuo ištirti ir saugoti mėginių blokus mažiausiai dvejus metus nuo tyrimo datos.<sup>3</sup>

## Audinių gydymas prieš dažymą:

Alikite šilumos sukeltą epitopų paiešką (HIER) pagal toliau pateiktą rekomenduojamą protokolą. Irodyta, kad įprastas HIER naudojimas prieš IHC sumažina nenuoseklumą ir standartizuoją dažymą.<sup>4,5</sup>

## Įspėjimas ir atsargumo priemonės:

1. Žinoma, kad DAB yra įtariamas kancerogenas.
2. Saugokite DAB komponentus nuo stiprios šviesos ar tiesioginių Saulės spindulių.
3. DAB gali sukelti odos jautrinimą. Vengti patekimo ant odos ir į akis.
4. Dėvėkite pirštines ir apsauginius drabužius bei imkitės pagrįstų atsargumo priemonių tvarkydami, nes DAB yra klasifikuojama kaip pavojinga ir gali sukelti vėžį bei, kaip įtarima, sukelia genetinius defektus.
5. Žmonių arba gyvūninių kilmės medžiagas tvarkykite kaip potencialiai biologiškai pavojingas ir šalinkite tokias medžiagas laikydami tiekamų atsargumo priemonių. Poveikio atveju laikykiteatsakingu institucijų, kuriose naudojamas, sveikatos nurodymų.<sup>6,7</sup>
6. Mėginių prieš ir po fiksavimo bei visos su jais paveiktos medžiagos turi būti tvarkomos taip, lyg galėtų perduoti infekciją, ir sunaikintos laikantis tiekamų atsargumo priemonių. Niekada nepilkite reagentų pipete per burną ir venkite reagentų bei mėginių sąlyčio su oda ir gleivinėmis. Jei reagentai ar mėginių pateko į jautrijas vietas, nuplaukite dideliu kiekiu vandens.<sup>8</sup>
7. Dėl reagentų užteršimo mikrobiologiniu būdu gali padidėti nespecifinis dažymas.
8. Kitos nei nurodytos inkubacijos trukmės arba temperatūros rezultatai gali duoti klaidingus rezultatus. Vartotojas turi patvirtinti visus tokius pakeitimus.
9. Nenaudokite reagento pasibaigus tiekamumo laikui, nurodytam ant buteliuko.
10. Mikropolimero aptikimo rinkinio reagentas (-ai) yra optimizuotas (-i) ir paruoštas naudoti su Biocare antikūnais ir pagalbiniais reagentais. Rekomenduojamus protokolus ir naudojimo sąlygas žr. pirminio antikūno ir kitų pagalbinų reagentų naudojimo instrukcijose.
11. Laikykite vietos ir (arba) valstybinių institucijų reikalavimų dėl šalinimo būdų.
12. SDS galima gauti paprašius ir jis yra adresu <http://biocare.net>.
13. Praneškite apie bet kokius rimtus incidentus, susijusius su šiuo prietaisu, susisiekę su vietiniu Biocare atstovu ir atitinkama valstybės narės arba šalies, kurioje yra naudotojas, kompetentinga institucija.

Šiame chromogeno rinkinyje yra komponentų, klasifikuotų kaip nurodyta toliau esančioje lentelėje pagal Reglamentą (EB) Nr. 1272/2008

Pavojus	Kodas	Pareiškimas apie pavoju
	H314 H350	Įtarima, kad sukelia genetinius defektus Gali sukelti vėžį

## Naudojimo instrukcijos:

Chromogeno rinkinio reagentai yra optimizuoti naudoti su Biocare antikūnais ir pagalbiniais reagentais. Rekomenduojamus protokolus ir naudojimo sąlygas žr. pirminio antikūno ir kitų pagalbinų reagentų naudojimo instrukcijose. Inkubavimo laikas ir temperatūra skirsis priklausomai nuo konkretaus antikūnų protokolo, kurio laikomasi.

Naudodami automatizuotą dažymo instrumentą, skaitykite konkretaus prietaiso naudotojo vadovą ir naudojimo parametrus.

## Bendrieji IHC atlikimo procedūrinių veiksmų:

1. Deparafinizavimas: deparafinuokite stiklelius „Slide Brite“ arba ksilenu. Hidratuokite stiklelius rūšiuotų alkoholių serijoje iki vandens.
2. Peroksido blokas: blokuokite 5 minutes peroksidiutu 1.
3. Pirminio apdorojimo tirpalas/protokolas: rekomenduojamą pirminio apdorojimo tirpalą ir protokolą rasite atitinkamame pirminio antikūno duomenų lape.
4. Baltymyų blokas (nebūtina): inkubuokite 5-10 minučių kambario temperatūroje (RT) su Background Punisher.
5. Pirminis antikūnas: Inkubacijos laiką žr. atitinkamo pirminio antikūno duomenų lape.
6. Zondas (tik pelių antikūnams): inkubuokite 5-15 minučių kambario temperatūroje su MACH 4 Mouse Probe.
7. Polimeras: inkubuokite 10-20 minučių pelių antikūnams arba 30 minučių triūsių antikūnams kambario temperatūroje su MACH 4 HRP polimeru.
8. Chromogenas: inkubuokite 5 minutes kambario temperatūroje su Biocare DAB.
9. Priešdažas: Priešdažas su hematoksilinu. Nuplaukite dejonizuotu vandeniu. 1 minutę užtepkite Tacha's Bluing tirpalu. Nuplaukite dejonizuotu vandeniu.

## Techninės pastabos:

1. Skalbimo etapams naudokite TBS.

## Kokybės kontrolė:

Žr. CLSI Imunohistocheminių tyrimų projektavimo ir įgyvendinimo kokybės standartus; Patvirtintas gairių antrasis leidimas (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA JAV ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011 m.

## Teigiamų audinių kontrolė:

Išorinės teigiamos kontrolės medžiagos turi būti kuo greičiau užfiksuoti, apdoroti ir įterpti švieži mėginių tokiu pat būdu kaip ir paciento mėginys (-iai). Teigiamas audinių kontrolė rodo tiekamai paruoštus audinius ir tiekamus dažymo būdus. I kiekvieną dažymo eigą turėtų būti įtraukta viena teigiamai išorinio audinio kontrolė kiekvienam tyrimo sąlygų rinkiniui.

Audiniai, naudojami išorinėms teigiamoms kontrolinėms medžiagoms, turėtų būti parenkami iš pacientų mėginiių, kurių teigiamas tikslinis aktyvumas yra žemas, o tai suteikia silpną teigiamą dažymą. Žemas teigiamumo lygis išorinėms teigiamoms kontrolėms yra sukurtas taip, kad būtų galima aptiki subtilius pirminio antikūno jautrumo pokyčius dėl nestabilumo ar problemų, susijusių su IHC metodika. Parduodamos audinių kontrolinės skaidrės arba mėginiai, apdoroti kitaip nei paciento mėginys (-iai), patvirtinta tik reagento veikimą ir netikrina audinių paruošimo.

Žinomas teigiamos audinių kontrolės priemonės turėtų būti naudojamos tik norint stebėti tiekamą apdorotų audinių ir tiriamujų reagentų veikimą, o ne kaip pagalbinė priemonė nustatant konkrečią paciento mėginių diagnostiką. Jei teigiamai audinių kontroliniai mėginiai neparodo teigiamo dažymosi, bandinių rezultatai turėtų būti laikomi negaliojančiais.

## Neigiamų audinių kontrolė:

Kiekvieną dažymo ciklą naudokite neigiamą audinių kontrolę, fiksuoat, apdorotą ir įterptą identiškai paciento mėginiui (-iams), kad patikrintumėte IHC pirminio antikūno specifiskumą. tikslinio antigeno demonstravimas ir specifinio fono dažymo požymis (klaudingai teigiamas dažymas). Be to, daugumoje audinių sekcių gali būti jvairių tipų ląstelių Laboratorijs gali naudoti kaip vidines neigiamos kontrolės vietas, kad patikrintų IHC veikimą specifikacijas. Mėginiai, kurie gali būti naudojami neigiamieji audiniams, tipai ir šaltiniai valdikliai išvardyti skyriuje Veikimo charakteristikos.

Jei neigiamų audinių kontrolėje atsiranda specifinis dažymas (klaudingai teigiamas dažymas), paciento mėginių rezultatai turėtų būti laikomi negaliojančiais.

Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

77/18



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Lithuanian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Nespecifinė neigiamo reagento kontrolė:

Vietoj pirmio antikūno naudokite nespecifinio neigiamo reagento kontrolę su kiekvieno paciento mėginio dalimi, kad įvertintumėte nespecifinį dažymą ir leidžia geriau interpretuoti specifinį dažymą antigeno vietoje. Idealiu atveju neigiamą reagento kontrolę sudaro antikūnas, pagamintas ir paruoštas (t. y. atskiestas iki tos pačios koncentracijos naudojant tą patį skiediklį), kad būtų galima naudoti taip pat, kaip ir pirmasis antikūnas, bet neturi specifinio reaktyvumo su žmogaus audiniais toje pačioje matricose / tirpale kaip ir pirminis antikūnas. Vien tik skiediklis gali būti naudojamas kaip mažiau pageidautina ankščiau aprašytu neigiamu reagentu kontrolės alternatyva. Neigiamo reagento kontrolės inkubacinis laikotarpis turi atitinkti pirmilio antikūno inkubacinį laikotarpį.

Kai serijiniuose pjūviuose naudojamos kelių antikūnų plokštės, vieno stiklelio neigiamai nusidažiusios sritys gali būti neigiamos / nespecifinės kitų antikūnų surišimo fono kontrolė. Norint atskirti endogeninį fermentų aktyvumą arba nespecifinį fermentų prisijungimą nuo specifinio imunoreaktyvumo, papildomi paciento audiniai gali būti nudažyti tik atitinkamai substrato-chromogeno arba fermentų kompleksais (PAP, avidino-biotino, streptavidino) ir substrato-chromogenu.

## Tyrimo patvirtinimas:

Prieš pradėdamas naudoti antikūnų arba dažymo sistemą diagnostikos procedūroje, vartotojas turėtų patikrinti antikūno specifiškumą, išbandydamas jį su keletu vidinių audinių su žinomomis imunohistocheminėmis charakteristikomis, atitinkančiomis žinomus teigiamus ir neigiamus audinius. Žr. kokybės kontrolės procedūras, ankščiau aprašytas šiame gaminio informacinio lapelio skyriuje, ir BŽŪP sertifikavimo programos kokybės kontrolės rekomendacijas.<sup>10</sup> imunohistochemijai ir (arba) NCCLS IHC gairėms<sup>11</sup>. Šios kokybės kontrolės procedūros turi būti kartojamos kiekvienai naujai antikūnų partijai arba kiekvieną kartą, kai pasikeičia tyrimo parametrai. Audiniai, išvardyti skyriuje Veikimo charakteristikos, yra tinkami tyrimo patikrinimui.

## Problemu sprendimas:

Laikykite specifinių antikūnų protokolo rekomendacijų pagal pateiktą duomenų lapa. Jei atsiranda netipiniai rezultatai, susisiekite su Biocare technine pagalba telefonu 1-800-542-2002.

## Dažymo aiškinimas:

Betazoid DAB chromogeno rinkinys sukelia rudos spalvos reakciją antigeno vietose, kurias lokalizuojama pirmasis antikūnas. Prieš interpretuodamas paciento rezultatus, kontrolinių mėginų dažymą turi įvertinti kvalifikuotas patologas. Neigiamos kontrolinės medžiagos įvertinamos ir palyginamos su nudažytomis stiklėlėmis, siekiant užtikrinti, kad pastebėtas dažymas nėra nespecifinės sąveikos rezultatas.

## Teigiamą audinių kontrolę:

Pirmausiai reikia ištirti teigiamą audinių kontrolę, nudažytą nurodytu antikūnu, siekiant išsiktinti, kad visi reagentai veikia tinkamai. Tinkamas tikslinių lastelių dažymas (kaip nurodyta užkšciau) rodo teigiamą reaktyvumą. Jei teigiami audinių kontroliniai mėginiai neparodo teigiamo dažymosi, visi bandinių rezultatai turėtų būti laikomi negaliojančiais.

Reakcijos produkto spalva gali skirtis priklausomai nuo naudojamų substrato chromogenų. Numatyta spalvų reakcijas žr. pagrindo pakuočių lapeliuose. Be to, metachromazija gali būti stebima dažymo metodo variantuose.<sup>12</sup> Kai naudojamas kontrastinis dažymas, priklausomai nuo inkubacijos trukmės ir naudojamo priešnio dažymo stiprumo, priešdažymas sukelia lastelių branduolių spalvą. Pernelyg didelis arba neišsamus dažymas gali pakenkti tinkamam rezultatui interpretavimui. Žr. protokolą (-us) dėl rekomenduojamo priešdažo.

## Neigiamu audinių kontrolė:

Neigama audinių kontrolė turėtų būti ištirta po teigiamos audinių kontrolės, siekiant patikrinti tikslinio antigeno žymėjimo pirmilio antikūno specifiškumą. Specifinio dažymo nebuvinės neigiamojo audinių kontrolėje patvirtinta antikūnų kryžminio reaktyvumo su lastelių / lastelių komponentais nebuvinė. Jei neigiamo išorinio audinio kontrolėje atsiranda specifinis dažymas (klaudingai teigiamas dažymas), paciento mėginio rezultatai turėtų būti laikomi negaliojančiais.

Nespecifinis dažymas, jei yra, paprastai turi difuzinį vaizdą. Sporadinis jungiamojo audinio dažymas taip pat gali būti stebimas pjūviuose iš pernelyg formalino fiksuočių audinių. Dažymo rezultatams interpretuoti naudokite nepažeistas lasteles. Nekrotinės arba išsigimusios lastelės dažnai nusidažo nespecifiškai.

## Paciento audiniai:

Ištirkite paciento mėginius, nudažytus nurodytais antikūnais paskutinis. Teigiamas dažymo intensyvumas turėtų būti vertinamas atsižvelgiant į bet kokį nespecifinį neigiamojo reagento kontrolės foninį dažymą. Kaip ir bet kurio imunohistocheminio tyrimo atveju, neigiamas rezultatas reiškia, kad antigenas nebuvo aptiktas, o ne tai, kad antigeno nebuvo tiriamose lastelėse / audiniuose. Jei reikia, naudokite antikūnų grupę, kad nustatyti, kada klaudingai neigiamas reakcijas.

Konkrečios informacijos apie nurodytą antikūnų imunoreaktyvumą žr. Santrauka ir paaškinimas, Apribojimai ir Veikimo charakteristikos.

## Apribojimai:

### Bendrieji apribojimai:

1. Dėl *in vitro* diagnostikos (IVD) naudojimas
2. Šis gaminys skirtas tik profesionaliam naudojimui: Imunohistochemija yra daugiaupakopis diagnostikos procesas, kurį sudaro specializuoti mokymai parinkti tinkamus reagentus; audinių parinkimas, fiksavimas ir apdorojimas; IHC stiklelio paruošimas; ir dažymo rezultatų interpretavimas.
3. Vartoti tik pagal gydytojo receptą. (tik Rx)
4. Audinių dažymas priklauso nuo audinio tvarkymo ir apdorojimo prieš dažymą. Netinkamas fiksavimas, užsaldymas, atsildymas, plovimas, džiovinimas, kaitinimas, pjaustymas arba užteršimas kitais audiniais ar skysčiais gali sukelti artefaktus, antikūnų ištrigimą arba klaudingą neigiamus rezultatus. Nenuoseklūs rezultatai gali atsirasti dėl fiksavimo ir įterpimo metodų skirtumų arba dėl į吉mtų audinių nelygumų.<sup>14</sup>
5. Pernelyg didelis arba neišsamus dažymas gali pakenkti tinkamam rezultatui interpretavimui.
6. Klinikinis bet kokio teigiamo ar neigiamo dažymo aiškinimas turi būti įvertintas atsižvelgiant į klinikinį vaizdą, morfologiją ir kitus histopatologinius kriterijus. Klinikinis bet kokio teigiamo ar neigiamo dažymo aiškinimas turėtų būti papildytas morfologinių tyrimais, naudojant tinkamą teigiamą ir neigiamą vidinę ir išorinę kontrolę, taip pat kitus diagnostinius tyrimus. Kvalifikuotas patologas, susipažinęs su tinkamu IHC antikūnu, reagentu ir metodu naudojimu, yra atsakingas už visus veiksmus, naudojamus ruošiant ir interpretuojant galutinį IHC preparatą.
7. Optimalūs konkretūs programos protokolai gali skirtis. Tai apima, bet tuo neapsiribojant, fiksavimą, šilumos atgavimo metodą, inkubacijos laiką, antikūnų skiedimą, audinio pjūvio storį ir naudojamą aptikimo rinkinį. Rekomenduojamus protokolus ir naudojimo sąlygas žr. pirmilio antikūno ir kitų pagalbiniių reagentų naudojimo instrukcijose. Duomenų lapa rekomendacijos ir protokolai yra pagristi išskirtiniu Biocare produktų naudojimu. Galiausiai tyréjas turi nustatyti optimalias sąlygas.
8. Šis produktas nėra skirtas naudoti srauto citometrijoje. Srauto citometrijos veikimo charakteristikos nenustatytos.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Lithuanian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

9. Asmenų, užsikrėtusių hepatito B virusu ir turinčių hepatito B paviršiaus antigeno (HBsAg), audiniai gali būti nespecifiniai krienų peroksidaze.<sup>14</sup>
10. Reagentai gali parodyti netiketas reakcijas anksčiau nepatikrintuose audiniuose. Netikėtų reakcijų galimybės net tirtose audinių grupėse negali būti visiškai pašalintos dėl biologinio antigeno ekspresijos neoplazmų ar kitų patologinių audinių kintamumo.<sup>15</sup> Susisiekite su Biocare technine pagalba telefonu 1-800-542-2002 arba per techninės pagalbos informaciją, pateiktą biocare.net, ir pateikite dokumentuotą (-as) netiketą (-as) reakciją.
11. Normalūs/neimuniniai serumai iš to paties gyvūninio šaltinio kaip ir antriniai antiserumai, naudojami blokovimo etapuose, dėl autoantikūnų arba natūralių antikūnų gali sukelti klaidingai neigiamus arba klaidingai teigiamus rezultatus.
12. Klaidingai teigiami rezultatai gali būti matomi dėl neimunologinio balytymo ar substrato reakcijos produkty prisijungimo. Juos taip pat gali sukelti pseudoperoksidazės aktyvumas (eritrocitai), endogeninis peroksidazės aktyvumas (citochromas C) arba endogeninis biotinas (pvz., kepenys, krūtys, smegenys, inkstai), priklausomai nuo naudojamos imuninės dažų rūšies.<sup>13</sup>
13. Neigiamas rezultatas reiškia, kad antigenas nebuvu aptiktas, o ne tai, kad antigeno nebuvu tiriamose ląstelėse ar audiniuose.

## Specifiniai qaminio apribojimai:

Jokių papildomų specifinių qaminio apribojimų

## Veikimo charakteristikos:

Dažymas buvo atliktas naudojant protokolus, pateiktus specifinėse antikūnų naudojimo instrukcijose arba kaip nurodyta. Dažymo jautrumas ir specifišumas buvo įvertintas įvairiuose normalių ir neoplastinių audinių tipuose, įvertintuose pirminiu antikūnų susidarymo metu.

## Atkuriamaus:

Biocare aptikimo sistemų ir sistemos reagentų atkuriamaus patikrinamas išmatuojant vidutinį tikslumą, kai įvairios reagentų partijos buvo tiriamos ilgą laiką, naudojant įvairius operatorius, analitikus, reagentų partijas, audinių mėginius ir įrangą. Kiekvieno įvertinto aptikimo reagento dažymas buvo nuoseklus ir atliktas taip, kaip tikėtasi.

## Problemų sprendimas:

1. Jokių stiklelių nesidažyta – Patikrinkite, ar buvo naudojami tinkami teigiami kontroliniai audiniai, antikūnai ir aptikimo produktai. Patikrinkite, ar vaškas pašalintas arba apdorotas neviškai arba netinkamai.
2. Silpnas visų stiklelių dažymas – Patikrinkite, ar buvo naudojami tinkami teigiami kontroliniai audiniai, antikūnai ir aptikimo produktai.
3. Per didelis visų skaidrių fonas – gali būti didelis endogeninio biotino kiekis (jei naudojami biotino pagrindu pagaminti aptikimo produktai), endogeninis HRP aktyvumas, paverčiantis chromogeną spalvotu galutiniu produkту (naudokite peroksidazės bloką) arba perteklinė nespecifinė balytymų sąveika (naudokite balytymą), blokuoti, pvz., serumo arba kazeino pagrindu pagamintą blokuojantį tirpalą).
4. Inkubacijos metu audinių sekcijos nuplaunamos nuo stiklelių – Patikrinkite stiklelius, kad įsitikintumėte, jog jie yra teigiamai įkrauti.
5. Specifinis dažymas per tamsus – Patikrinkite protokolą, kad nustatytaumėte, ar ant stiklelio buvo pritaikytas tinkamas antikūnų titras, taip pat tinkamas visų reagentų inkubacijos laikas. Be to, įsitikinkite, kad protokole yra pakankamai plovimo etapų, kad pašalintumėte reagentų perteklių po inkubacijos etapų.

## Nuorodos:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Norwegian

**BIOCARE**  
MEDICAL

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Tiltenkt bruk:

Til *in vitro* Diagnostisk bruk

DeBetazoid DAB Chromogen Kiter beregnet for bruk i enten manuelle eller automatiserte immunhistokjemi (IHC)-fargeprotokoller for påvisning av målantigener i formalinfixerte, parafininnstøpte (FFPE) vev når det brukes sammen med det aktuelle deteksjonssystemet og primære antistoffer. Den kliniske tolkningen av enhver farging eller dens fravær bør kompletteres med morfologiske studier og riktige kontroller og bør evalueres i sammenheng med pasientens kliniske historie og andre diagnostiske tester av en kvalifisert patolog.

## Sammendrag og forklaring:

3,3' Diaminobenzidin (DAB) er et veletablert kromogen som brukes i IHC-fageprotokoller som i nærvær av et pepperrotperoxidase (HRP)-enzym produserer et brunt bunnfall som er uløselig i organiske løsemidler og kan dekkes med et permanent monteringsmedium. Dette produktet kommer i et to-komponent system bestående av et væskestabilt DAB-kromogen og en DAB-substratbuffer. Fargen på kromogenbufferblandinga kan variere fra fargeløs til blekbrun. Fargegenskapene påvirkes ikke av fargen på kromogenbufferblandinga. Betazoid DAB er en formulering som er svært stabil. Betazoid DAB kan brukes både manuelt og på automatiske fargemaskiner.

## Prosedyreprinsipp:

Dette DAB-kromogenet i Betazoid DAB Chromogen Kit, når det brukes i IHC-testing av FFPE-vevssekksjoner, muliggjør visualisering av antigener via sekvensiell påføring av en spesifikt antistoff mot antigenet (primært antistoff), et sekundært antistoff mot det primære antistoffet (valgfritt koblingsantistoff/probe), et enzymkompleks og et kromogent substrat med mellomliggende vasketrinn. Den enzymatiske aktiveringen av kromogenet resulterer i et synlig reaksjonsprodukt på antigenstedet. Prøven kan deretter motfanges og dekkes. Resultatene tolkes ved hjelp av et lys mikroskop og hjelp i differensialdiagnose av patofisiologiske prosesser, som kan eller kan ikke være assosiert med et bestemt antigen.

## Materialer og metoder:

### Reagenser som følger med:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Rekonstituering, blanding, fortynning, titrering:

Betazoid DAB Chromogen Kit er optimalisert for bruk med Biocare-antistoffer og hjelpeagenser og må fortynnes rett før bruk. Bland 1 dråpe (32µL) DAB

Chromogen per 1,0mL DAB Substrate Buffer. DAB-arbeidsløsningen er stabil i 5 dager hvis den oppbevares ved 2-8°C.

## Kjente applikasjoner:

Immunhistokjemi (formalinfixert parafininnstøpt vev)

## Leverses som:

Betazoid DAB kromogen

DAB-løsning. Se sikkerhetsdatabladet for ytterligere detaljer.

## Betazoid DAB Substrate Buffer

Bufret løsning inneholder 3 % hydrogenperoksidløsning. Se sikkerhetsdatabladet for ytterligere detaljer.

## Materiale og reagenser som trengs, men følger ikke med:

Mikroskopobjektglass, positivt ladet

Positive og negative vevskontroller

Desert Chamber\* eller lignende Tørkeovn (valgfritt)

Xylen eller xylenerstatning

Etanol eller reagens alkohol

Decloaking Chamber\* eller lignende trykkoker (valgfritt)

Avionisert eller destillert vann

Vaskebuffer\*

Forbehandlingsreagenser\* (valgfritt)

Enzymfordøyelse\* (valgfritt)

Peroksidaseblokk\*

Proteinblokk\* (valgfritt)

Primært antistoff\*

Negative kontrollreagenser\*

Deteksjonssett\*

Hematoxylin\* (motfarging)

Blånende reagens\*

Monteringsmedium\*

Dekkglass

Lysmikroskop (40-400X forstørrelse)

\* Biocare Medical Products: Se Biocare Medical-nettstedet på <http://biocare.net> for informasjon om katalognummer og bestilling. Enkelte reagenser oppført ovenfor er basert på spesifikk bruk og deteksjonssystem som brukes.

## Lagring og stabilitet:

Oppbevares ved 2°C til 8°C. Produktet er stabilt til utløpsdatoen som er trykt på hetteglassetiketten når det oppbevares under disse forholdene. Må ikke brukes etter utløpsdato. Oppbevaring under andre forhold enn de som er spesifisert, må verifiseres. Fortynnede reagenser skal brukes umiddelbart som instruert. Ubrukt fortynnet reagens er stabilt i 5 dager hvis det oppbevares ved 2-8°C. Stabiliteten til brukerfortynnet reagens utover 5 dager er ikke fastslått av Biocare.

Positive og negative kontroller bør kjøres samtidig med alle pasientprøver. Hvis det observeres uventet farging som ikke kan forklares av variasjoner i laboratorieprosedyrer og det er mistanke om et problem med antistoffet, kontakt Biocares tekniske støtte på 1-800-542-2002 eller via den tekniske støtteinformasjonen på biocare.net.

## Prøveforberedelse:

Vev fikset i formalin er egnet for bruk før parafininnstøping. Ossøst vev bør avkalkes før vevsbehandling for å lette skjæring av vev og forhindre skade på mikrotombladene.<sup>1,2</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Norwegian

**BIOCARE**  
MEDICAL

Riktig fiksert og innebygd vev som uttrykker det spesifiserte antigenmålet, bør oppbevares på et kjølig sted. The Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) av 1988 krever i 42 CFR§493.1259(b) at "Laboratoriet må beholde fargede objektglass i minst ti år fra datoene for undersøkelse og oppbevar prøveblokker i minst to år fra eksamsdatoen."<sup>3</sup>

## Behandling av vev før farging:

Utfør Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) i henhold til anbefalt protokoll nedenfor. Rutinemessig bruk av HIER før IHC har vist seg å minimere inkonsekvens og standardisere farging.<sup>4,5</sup>

## Advarsel og forholdsregler:

1. DAB er kjent for å være et mistenkt kreftfremkallende stoff.
2. Ikke utsett DAB-komponenter for sterkt lys eller direkte sollys.
3. DAB kan forårsake sensibilisering av huden. Unngå kontakt med hud og øyne.
4. Bruk hanskter og vernekjærer og ta rimelige forholdsregler ved håndtering da DAB er klassifisert som en fare og kan forårsake kreft og er mistenkt for å forårsake genetiske defekter.
5. Håndter materialer av menneskelig eller animalsk opprinnelse som potensielt biologisk farlig og kast slike materialer med riktige forholdsregler. I tilfelle eksponering, følg helsedirektivene til de ansvarlige myndighetene der det brukes.<sup>6,7</sup>
6. Prøver, før og etter fiksering, og alt materiale som eksponeres for dem, skal håndteres som om de er i stand til å overføre infeksjon og kastes med riktige forholdsregler. Pipetter aldri reagenser gjennom munnen og unngå kontakt med hud og slimhinner med reagenser og prøver. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med sensitive områder, vask med rikelige mengder vann.<sup>8</sup>
7. Mikrobiell kontaminering av reagenser kan føre til en økning i uspesifik farging.
8. Andre inkubasjonstider eller temperaturer enn de spesifiserte kan gi feilaktige resultater. Brukeren må validere enhver slik endring.
9. Ikke bruk reagens etter utløpsdatoen som er trykt på hetteglasset.
10. Mikropolymerdeteksjonsreagens(e) er optimalisert og klar til bruk med Biocare-antistoffer og hjelpeagenser. Se bruksanvisningen for det primære antistoffet og andre hjelpeagenser for anbefalte protokoller og bruksbettinger.
11. Følg lokale og/eller statlige myndigheters krav for avhendingsmetode.
12. SDS er tilgjengelig på forespørsel og ligger på <http://biocare.net>.
13. Rapporter alle alvorlige hendelser knyttet til denne enheten ved å kontakte den lokale Biocare-representanten og gjeldende kompetente myndighet i medlemsstaten eller landet der brukeren befinner seg.

Dette kromogensemmettet inneholder komponenter klassifisert som angitt i tabellen nedenfor i samsvar med forordning (EC) nr. 1272/2008

Fare	Kode	Fareerklæring
	H314 H350	Mistenkes for å forårsake genetiske defekter Kan forårsake kreft

## Instruksjoner for bruk:

Kromogensemmetts reagenser er optimalisert for bruk med Biocare-antistoffer og hjelpeagenser. Se bruksanvisningen for det primære antistoffet og andre hjelpeagenser for anbefalte protokoller og bruksbettinger. Inkubasjonstider og temperaturer vil variere avhengig av den spesifikke antistoffprotokollen som følges.

Når du bruker et automatisert fargeinstrument, se den spesifikke instrumentets brukerhåndbok og bruksanvisning for driftsparametere.

## Generelle prosedyretrinn for å utføre IHC:

1. Avparafinising: Avparafiniser objektglassene i Slide Brite eller xylen. Hydrat objektglass i en serie graderte alkoholer til vann.
2. Peroxide Block: Blokker i 5 minutter med Peroxidized 1.
3. Forbehandlingsløsning/-protokoll: Se det respektive databladet for primær antistoff for anbefalt forbehandlingsløsning og protokoll.
4. Proteinblokk (valgfritt): Inkuber i 5-10 minutter ved romtemperatur (RT) med Background Punisher.
5. Primær antistoff: Se det respektive databladet for primær antistoff for inkubasjonstid.
6. Probe (kun museantistoffer): Inkuber i 5-15 minutter ved romtemperatur med MACH 4 museprobe.
7. Polymer: Inkuber i 10-20 minutter for museantistoffer eller 30 minutter for kaninantistoffer ved RT med MACH 4 HRP-polymer.
8. Kromogen: Inkuber i 5 minutter ved RT med Biocares DAB.
9. Motfarging: Motfarging med hematoksylin. Skyll med avionisert vann. Påfør Tacha's Blueing Solution i 1 minutt. Skyll med avionisert vann.

## Tekniske merknader:

1. Bruk TBS til vasketrinn.

## Kvalitetskontroll:

Se CLSI kvalitetsstandarder for design og implementering av immunhistokjemianalyser; Godkjent guideline-andre utgave (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

### Positiv vevskontroll:

Eksternt positivt kontrollmaterialer bør være ferske prøver fiksert, behandlet og innebygd så snart som mulig på samme måte som pasientprøven(e). Positive vevskontroller er en indikasjon på korrett forberedt vev og riktige farge teknikker. Én positiv ekstern vevskontroll for hvert sett med testbetingelser bør inkluderes i hver farging.

Vene som brukes til de eksterne positive kontrollmaterialene bør velges fra pasientprøver med godt karakteriserte lave nivåer av den positive målaktiviteten som gir svak positiv farging. Det lave nivået av positivitet for eksterne positive kontroller er designet for å sikre påvisning av subtile endringer i det primære antistoffsensitiviteten fra ustabilitet eller problemer med IHC-metodikken. Kommersielt tilgjengelige vevskontrollobjektglass eller prøver behandlet annerledes enn pasientprøven(e) validerer bare reagensytelsen og verifiserer ikke vefsforberedelse.

Kjente positive vevskontroller bør kun brukes for å overvåke korrekt ytelse av behandlet vev og testreagenser, i stedet for som en hjelp til å formulere en spesifik diagnose av pasientprøver. Hvis de positive vevskontrollene ikke viser positiv farging, bør resultatene med testprøvene anses som ugyldige.

### Negativ vevskontroll:

Bruk en negativ vevskontroll fiksert, behandlet og innebygd på en måte som er identisk med pasientprøven(e) med hver fargekjøring for å verifisere spesifisiteten til det primære IHC-antistoffet for demonstrasjon av målantigenet, og for å gi en indikasjon på spesifik bakgrunnsfarging (falsk positiv farging). Også mangfoldet av forskjellige celletyper som finnes i de fleste vevsnitt kan brukes av laboratoriet som interne negative kontrollsteder for å verifisere IHCs ytelse spesifikasjoner. Typer og kilder til prøver som kan brukes for negativt vev kontrollene er oppført i delen Ytelseskarakteristikk.

Hvis spesifik farging (falsk positiv farging) oppstår i den negative vevskontrollen, bør resultatene med pasientprøvene anses som ugyldige.

### Uspesifik negativ reagenskontroll:

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Norwegian

**BIOCARE**  
MEDICAL

Bruk en uspesifikk negativ reagenskontroll i stedet for det primære antistoffet med en del av hver pasientprøve for å evaluere uspesifikk farging og tillate bedre tolkning av spesifikk farging på antigenstedet. Ideelt sett inneholder en negativ reagenskontroll et antistoff produsert og forberedt (dvs. fortynnet til samme konsentrasjon ved bruk av samme fortynningsmiddel) for bruk på samme måte som det primære antistoffet, men viser ingen spesifikk reaktivitet med humant vev i samme matrise/løsning som primært antistoff. Fortynningsmiddel alene kan brukes som et mindre ønskelig alternativ til de tidligere beskrevne negative reagenskontrollene. Inkubasjonsperioden for den negative reagenskontrollen skal tilsvare inkubasjonsperioden for det primære antistoffet.

Når paneler med flere antistoffer brukes på seriesnitt, kan de negativt fargede områdene på ett objektglass tjene som en negativ/uspesifikk bindingsbakgrunnskontroll for andre antistoffer. For å skille endogen enzymaktivitet eller uspesifikk binding av enzymer fra spesifikk immunreakтивitet, kan ytterligere pasientvev farges utelukkende med henholdsvis substrat-kromogen eller enzymkompleks (PAP, avidin-biotin, streptavidin) og substrat-kromogen.

#### Assaybekrefteelse:

Før den første bruken av et antistoff eller fagesystem i en diagnostisk prosedyre, bør brukeren verifisere antistoffets spesifisitet ved å teste det på en serie internt vev med kjente immunhistokjemiske ytelsesegenskaper som representerer kjente positive og negative vev. Se kvalitetskontrollprosedyrene som er skissert tidligere i denne delen av produktvedlegget og til kvalitetskontrollanbefalingene til CAP-sertifiseringsprogrammet<sup>10</sup> for immunhistokemi og/eller NCCLS IHC-retningslinjen<sup>11</sup>. Disse kvalitetskontrollprosedyrene bør gjentas for hvert nytt antistofflot, eller når det er en endring i analyseparametere. Vev som er oppført i delen Ytelseskarakteristikk er egnet for analyseverifikasiing.

#### **Feilsøking:**

Følg de antistoffspesifikke protokollanbefalingene i henhold til databladet som følger med. Hvis det oppstår atypiske resultater, kontakt Biocares tekniske støtte på 1-800-542-2002.

#### **Tolkning av farging:**

Betazoid DAB Chromogen Kit produserer en brunfargereaksjon på antigenestedene lokalisert av det primære antistoffet. Før tolkning av pasientresultater, må farging av kontroller evalueres av en kvalifisert patolog. Negative kontroller blir evaluert og sammenlignet med fargede objektglass for å sikre at eventuell observert farging ikke er et resultat av uspesifikke interaksjoner.

#### Positiv vevskontroll:

Den positive vevskontrolle farget med indikert antistoff bør undersøkes først for å sikre at alle reagenser fungerer som de skal. Den passende fargingen av målceller (som angitt ovenfor) indikerer positiv reaktivitet. Hvis de positive vevskontrollene ikke viser positiv farging, bør alle resultater med testprøvene anses som ugyldige.

Fargen på reaksjonsproduktet kan variere avhengig av substratkromogener som brukes. Se pakningsvedlegget til substratet for forventede fargereaksjoner. Videre kan metakromasi observeres i variasjoner av metoden for farging.<sup>12</sup>

Når en motfarging brukes, avhengig av inkubasjonslengden og styrken til motfargen som brukes, vil motfarging resultere i en farging av cellekjernene. Overdreven eller ufullstendig motfarging kan kompromittere riktig tolkning av resultatene. Se protokoll(er) for anbefalt motveis.

#### Negativ vevskontroll:

Den negative vevskontrolle bør undersøkes etter den positive vevskontrolle for å verifisere spesifisiteten til merkingen av målantigenet med det primære antistoffet. Fraværet av spesifikk farging i den negative vevskontrolle bekrefter mangelen på antistoffkrysreakтивitet til celler/cellekomponenter. Hvis spesifikk farging (falsk positiv farging) oppstår i den negative eksterne vevskontrolle, bør resultatene med pasientprøven anses som ugyldige.

Uspesifikk farging, hvis tilstede, har vanligvis et diffust utseende. Sporadisk farging av bindevev kan også observeres i snitt fra formalinfiksert vev. Bruk intakte celler for tolkning av fargeresultater. Nekrotiske eller degenererte celler farger ofte uspesifikt.

#### Pasientvev:

Undersøk pasientprøver farget med indikert antistoff siste. Positiv fargingsintensitet bør vurderes i sammenheng med enhver uspesifikk bakgrunnsfarging av den negative reagenskontrollen. Som med enhver immunhistokjemisk test betyr et negativt resultat at antigenet ikke ble påvist, ikke at antigenet var fraværende i cellene/vevet som ble analysert. Om nødvendig, bruk et panel med antistoffer for å identifisere falske negative reaksjoner.

Se sammendrag og forklaring, begrensninger og ytelsesegenskaper for spesifikk informasjon om indikert antistoffimmunreakтивitet.

#### **Begrensninger:**

##### Generelle begrensninger:

1. Til *in vitro* diagnostisk (IVD) bruk
2. Dette produktet er kun for profesjonell bruk: Immunhistokjemi er en flertrinns diagnostisk prosess som består av spesialisert opplæring i valg av passende reagenser; vevseleksjon, fiksering og prosessering; klargjøring av IHC-glasset; og tolkning av fargeresultatene.
3. Kun til bruk etter resept fra lege. (Kun Rx)
4. Vefsfarging er avhengig av håndtering og bearbeiding av vevet før farging. Feil fiksering, frysing, tining, vasking, tørking, oppvarming, seksjonering eller kontaminering med andre vev eller væsker kan produsere artefakter, antistofffanger eller falske negative resultater. Innkonsekvente resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpingsmetoder, eller iboende uregelmessigheter i vevet.<sup>14</sup>
5. Overdreven eller ufullstendig motfarging kan kompromittere riktig tolkning av resultatene.
6. Den kliniske tolkningen av enhver positiv eller negativ farging bør evalueres i sammenheng med klinisk presentasjon, morfologi og andre histopatologiske kriterier. Den kliniske tolkningen av enhver positiv eller negativ farging bør kompletteres med morfologiske studier som bruker riktige positive og negative interne og eksterne kontroller samt andre diagnostiske tester. Det er ansvaret til en kvalifisert patolog som er kjent med riktig bruk av IHC-antistoffer, reagenser og metoder for å tolke alle trinnene som brukes til å forberede og tolke det endelige IHC-praparatet.
7. De optimale protokollene for en spesifikk applikasjon kan variere. Disse inkluderer, men er ikke begrenset til, fiksering, varmehettingsmetode, inkubasjonstider, antistofffortynning, vevssnitttykkelse og deteksjonssetts som brukes. Se bruksanvisningen for det primære antistoffet og andre hjelpe reagenser for anbefalte protokoller og bruksbetingelser. Databladanbefalingene og protokollene er basert på eksklusiv bruk av Biocare-produkter. Til syvende og sist er det etterforskerens ansvar å bestemme optimale forhold.
8. Dette produktet er ikke beregnet for bruk i flowcytometri. Ytelseskarakteristikker er ikke bestemt for flowcytometri.
9. Vev fra personer infisert med hepatitt B-virus og som inneholder hepatitt B-overflateantigen (HBsAg) kan vise uspesifikk farging med pepperrotperoksidase.<sup>14</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Norwegian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

10. Reagenser kan vise uventede reaksjoner i tidligere ikke-testet vev. Muligheten for uventede reaksjoner selv i testede vevsgrupper kan ikke elimineres fullstendig på grunn av biologisk variasjon av antigenekspresjon i neoplasmer eller annet patologisk vev.<sup>15</sup> Kontakt Biocares tekniske støtte på 1-800-542-2002, eller via den tekniske støtteinformasjonen gitt på biocare.net, med dokumenterte uventede reaksjoner.
11. Normale/ikke-immune sera fra samme dyrekilde som sekundære antisera brukt i blokkeringstrinn kan forårsake falskt negativt eller falskt positivt resultater på grunn av autoantistoffer eller naturlige antistoffer.
12. Falsk-positive resultater kan sees på grunn av ikke-immunologisk binding av proteiner eller substratreaksjonsprodukter. De kan også være forårsaket av pseudoperoksidaseaktivitet (erytrocytter), endogen peroksidaseaktivitet (cytokrom C) eller endogent biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre) avhengig av typen immunfarging som brukes.<sup>1,3</sup>
13. Et negativt resultat betyr at antigenet ikke ble påvist, ikke at antigenet var fraværende i cellene eller vevet som ble undersøkt.

#### Produktspesifikke begrensninger:

Ingen ytterligere produktspesifikke begrensninger

#### Ytelsesegenskaper:

Farging ble utført ved bruk av protokoller gitt i de antistoffspesifikke bruksanvisningene eller som spesifisert. Sensitiviteten og spesifiteten til farging ble evaluert på tvers av en rekke normale og neoplastiske vevstyper evaluert under utvikling av primære antistoffer.

#### Reproduserbarhet:

Reproduserbarheten til Biocares deteksjonssystemer og systemreagenser verifiseres gjennom en måling av middels presisjon der ulike reagenspartier ble testet over en lengre tidsperiode ved bruk av ulike operatører, analytikere, reagenslots, vevsprøver og utstyr. Fargingen oppnådd for hver deteksjonsreagens som ble evaluert var konsistent og utført som forventet.

#### Feilsøking:

1. Ingen farging av noen objektglass – Kontroller for å fastslå at det er brukt passende positivt kontrollvev, antistoff og deteksjonsprodukter. Se etter ufullstendig eller feil fjerning av voks eller forbehandling.
2. Svak farging av alle objektglass – Kontroller for å fastslå at det er brukt passende positivt kontrollvev, antistoff og deteksjonsprodukter.
3. Overdreven bakgrunn av alle lysbildene - Det kan være høye nivåer av endogent biotin (hvis du bruker biotinbaserte deteksjonsprodukter), endogen HRP-aktivitet som konverterer kromogen til farget sluttprodukt (bruk peroksidaseblokk), eller overflødig ikke-spesifikk proteininteraksjon (bruk et protein blokk, for eksempel serum- eller kaseinbasert blokkering løsning).
4. Vevsseksjoner vasker av objektglass under inkubering – Sjekk objektglassene for å sikre at de er positivt ladet.
5. Spesifikk farging for mørk – Sjekk protokollen for å finne ut om riktig antistofftiter ble brukt på objektglasset, samt riktige inkubasjonstider for alle reagenser. Sørg i tillegg for at protokollen har nok vasketrinn til å fjerne overflødig reagens etter at inkubasjonstrinnene er fullført.

#### Referanser:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.

5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.



60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

83/118



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Polish

**BIOCARE**  
MEDICAL

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Przeznaczenie:

Dla *in vitro* Zastosowanie diagnostyczne

The Zestaw chromogenu Betazoid DAB jest przeznaczony do stosowania w ręcznych lub automatycznych protokołach barwienia immunohistochemicznego (IHC) w celu wykrywania抗原ów docelowych w tkankach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE), gdy jest używany w połączeniu z odpowiednim systemem detekcji i przeciwciałami pierwotnymi. Kliniczną interpretację jakiegokolwiek zabarwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi i właściwymi kontrolami oraz ocenić w kontekście historii klinicznej pacjenta i innych badań diagnostycznych przez wykwalifikowanego patologa.

## Podsumowanie i wyjaśnienie:

3,3' Diaminobenzydyna (DAB) to chromogen o ugruntowanej pozycji stosowany w protokołach barwienia IHC, który w obecności enzymu peroksydazy chrzanowej (HRP) tworzy brązowy osad nierozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych i można go przykryć trwałym środkiem do mocowania. Ten produkt jest dostępny w systemie dwuskładnikowym składającym się z ciekłego, stabilnego chromogenu DAB i buforu substratu DAB. Kolor mieszaniny buforów chromogenu może zmieniać się od bezbarwnego do jasnobrązowego. Barwa mieszaniny buforów chromogenowych nie ma wpływu na właściwości barwiące. Betazoid DAB to preparat, który jest bardzo stabilny. Betazoid DAB można stosować zarówno ręcznie, jak i na automatach do barwienia.

## Zasada postępowania:

Ten chromogen DAB w zestawie Betazoid DAB Chromogen Kit, gdy jest używany w badaniu IHC skrawków tkanek FFPE, umożliwia wizualizację抗原ów poprzez sekwencyjne nakładanie swoiste przeciwciąża przeciwko抗igenowi (przeciwiąża pierwotne), przeciwciąża wtórne przeciwko przeciwciąża pierwotnemu (opcjonalnie przeciwciąża łączące/sonda), kompleks enzymatyczny i substrat chromogenowy z nałożonymi na siebie etapami przemywania. Enzymatyczna aktywacja chromogenu powoduje powstanie widocznego produktu reakcji w miejscu抗igenu. Następnie próbki można wybarwić kontrastowo i przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Wyniki interpretuje się za pomocą światła mikroskopu i pomoc w diagnostyce różnicowej procesów patofizjologicznych, które mogą lub mogą nie być powiązane z konkretnym抗igenem.

## Materiały i metody:

### Dostarczone odczynniki:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Rekonstrukcja, mieszanie, rozcieńczanie, miareczkowanie:

Zestaw Betazoid DAB Chromogen Kit jest zoptymalizowany do stosowania z przeciwiążami Biocare i odczynnikami pomocniczymi i należy go rozcieńczyć tuż przed użyciem. Zmieszaj 1 kroplę (32 µl) chromogenu DAB z 1,0 ml buforu substratowego DAB. Roztwór roboczy DAB jest stabilny przez 5 dni, jeśli jest przechowywany w temperaturze 2–8°C.

## Znane zastosowania:

Immunohistochemia (tkanki utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie)

## Dostarczane jako:

*Chromogen betazoidowy DAB*

Roztwór buforowy zawiera 3% roztwór nadtlenku wodoru. Dodatkowe szczegóły znajdują się w Karcie Charakterystyki.

## Bufer substratowy Betazoid DAB

Roztwór buforowy zawiera 3% roztwór nadtlenku wodoru. Dodatkowe szczegóły znajdują się w Karcie Charakterystyki.

## Materiały i odczynniki potrzebne, ale niedostarczane:

Szkiełka mikroskopowe, naładowane dodatnio

Pozatywne i negatywne kontrole tkanek

Komora pustynna\* lub podobna Suszarka (opcjonalnie)

Ksylen lub substytut ksylenu

Etanol lub alkohol odczynnikowy

Komora usuwania maskowania\* lub podobna szybkowar (opcjonalnie)

Woda dejonizowana lub destylowana

Bufer płuczący\*

Odczynniki do obróbki wstępnej\* (opcjonalnie)

Trawienie enzymatyczne\* (opcjonalnie)

Blok peroksydazy\*

Blok proteinowy\* (opcjonalnie)

Przeciwiąża pierwotne\*

Odczynniki do kontroli negatywnej\*

Zestawy detekcyjne\*

Hematoksyлина\* (barwnik kontrastowy)

Odczynnik niebieszczący\*

Środek montażowy\*

Szkłana pokrywa

Mikroskop świetlny (powiększenie 40-400X)

\* Produkty medyczne Biocare: Informacje dotyczące numerów katalogowych i sposobu zamawiania znajdują się na stronie internetowej Biocare Medical pod adresem <http://biocare.net>. Niektóre odczynniki wymienione powyżej zależą od konkretnego zastosowania i zastosowanego systemu detekcji.

## Przechowywanie i stabilność:

Przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C. Produkt jest stabilny do daty ważności podanej na etykiecie folki, jeśli jest przechowywany w tych warunkach. Nie stosować po upływie terminu ważności. Należy zweryfikować przechowywanie w warunkach innych niż określone. Rozcieńczony odczynnik należy natychmiast zużyć zgodnie z instrukcją. Niezużyty rozcieńczony odczynnik jest stabilny przez 5 dni, jeśli jest przechowywany w temperaturze 2-8°C. Firma Biocare nie ustaliła stabilności odczynnika rozcieńczonego przez użytkownika powyżej 5 dni.

Kontrole dodatnie i ujemne należy oznaczyć jednocześnie ze wszystkimi próbami od pacjentów. W przypadku zaobserwowania nieoczekiwanych zabarwień, których nie można wytlumaczyć różnicami w procedurach laboratoryjnych i jeśli podejrzewa się problem z przeciwciążem, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Biocare pod numerem

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

84/18



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Polish

1-800-542-2002 lub za pośrednictwem informacji pomocy technicznej dostępnych na stronie biocare.net.

## Przygotowanie próbki:

Chusteczki utrwalone w formalinie nadają się do użycia przed zatapianiem w parafinie. Tkanki kostne należy odwapnić przed obróbką tkanki, aby ułatwić przecięcie tkanki i zapobiec uszkodzeniu ostrzy mikrotomu.<sup>1,2</sup>

Prawidłowo utrwalone i zatopione tkanki wyrażające określony docelowy antygen należy przechowywać w chłodnym miejscu. Ustawa o doskonaleniu laboratoriów klinicznych (CLIA) z 1988 r. wymaga 42 CFR§493.1259(b), że „Laboratorium musi przechowywać wybarwione preparaty przez co najmniej dziesięć lat od daty badania i przechowuje bloki próbek przez co najmniej dwa lata od daty badania.”<sup>3</sup>

## Obróbka tkanek przed barwieniem:

Wykonaj indukowane ciepłem pobieranie epitopów (HIER) zgodnie z zalecanyim protokołem poniżej. Wykazano, że rutynowe stosowanie HIER przed IHC minimalizuje niespójności i standaryzuje barwienie.<sup>4,5</sup>

### Ostrzeżenia i środki ostrożności:

1. Wiadomo, że DAB jest substancją rakotwórczą.
2. Nie wystawiaj komponentów DAB na działanie silnego światła lub bezpośredniego światła słonecznego
3. DAB może powodować uczulenie skóry. Unikać kontaktu ze skórą i oczami.
4. Podczas obchodzenia się z produktem należy nosić rękawice i odzież ochronną oraz zachować odpowiednie środki ostrożności, ponieważ DAB jest klasyfikowany jako niebezpieczny i może powodować raka oraz podejrzewać się, że powoduje wady genetyczne.
5. Postępuj z materiałami pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego jako potencjalnie niebezpiecznymi biologicznie i utylizuj je, zachowując odpowiednie środki ostrożności. W przypadku narażenia należy postępować zgodnie z wytycznymi zdrowotnymi właściwych władz w miejscu stosowania.<sup>6</sup>
6. Z próbami przed i po utrwalaniu oraz ze wszystkimi materiałami, które miały z nimi kontakt, należy postępować tak, jakby mogły przenosić infekcję, i usuwać je z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności. Nigdy nie pipetować odczynników ustami i unikać kontaktu odczynników i próbek ze skórą i błonami śluzowymi. Jeżeli odczynnik lub próbki wejdą w kontakt z wrażliwymi miejscami, należy je przemyć dużą ilością wody.<sup>8</sup>
7. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne odczynników może skutkować zwiększeniem nieswoistego barwienia.
8. Czasы inkubacji lub temperatury inne niż podane mogą dawać błędne wyniki. Użytkownik musi zatwierdzić każdą taką zmianę.
9. Nie używać odczynnika po upływie daty ważności wydrukowanej na fiole.
10. Odczynniki zestawu do wykrywania mikropolimerów są zoptymalizowane i gotowe do użycia z przeciwciążami Biocare i odczynnikami pomocniczymi. Aby zapoznać się z zalecanymi protokołami i warunkami stosowania, należy zapoznać się z instrukcją przeciwciąża głównego i innych odczynników pomocniczych.
11. Postępuj zgodnie z wymogami władz lokalnych i/lub stanowych dotyczącymi metody utylizacji.
12. Karta charakterystyki jest dostępna na żądanie i znajduje się pod adresem <http://biocare.net>.
13. Zgłaszać wszelkie poważne zdarzenia związane z tym urządzeniem, kontaktując się z lokalnym przedstawicielem Biocare i właściwymi organami państwa członkowskiego lub kraju, w którym przebywa użytkownik.

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Ten zestaw chromogenu zawiera komponenty sklasyfikowane zgodnie z poniższą tabelą, zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008

Zaryzykowac	Kod	Oświadczenie o zagrożeniu
	H314 H350	Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne. Może powodować raka

## Instrukcja użycia:

Odczynniki zestawu chromogenu są zoptymalizowane do stosowania z przeciwciążami Biocare i odczynnikami pomocniczymi. Aby zapoznać się z zalecanymi protokołami i warunkami stosowania, należy zapoznać się z instrukcją użycia przeciwciąża głównego i innych odczynników pomocniczych. Czasы i temperatury inkubacji będą się różnić w zależności od stosowanego protokołu konkretnego przeciwciąża.

W przypadku korzystania z automatycznego urządzenia do barwienia należy zapoznać się z instrukcją obsługi konkretnego urządzenia i instrukcją obsługi dotyczącą parametrów operacyjnych.

### Ogólne kroki proceduralne dotyczące wykonywania IHC:

1. Odparafinowanie: Odparafinuj szkiełka w Slide Brite lub ksylenie. Uwodnij szkiełka szeregiem stopniowanych alkoholi do wody.
2. Blok nadtlenkowy: Blokuj na 5 minut środkiem Peroksydowanym 1.
3. Roztwór/protokół do leczenia wstępnego: Proszę zapoznać się z odpowiednią kartą charakterystyki przeciwciąż pierwotnych, aby zapoznać się z zalecanyim roztworem do leczenia wstępnego i protokołem.
4. Blok białkowy (opcjonalnie): Inkubować przez 5-10 minut w temperaturze pokojowej (RT) za pomocą programu Tło Punisher.
5. Przeciwiąco pierwotne: Czas inkubacji znajduje się w odpowiedniej karcie danych przeciwciąża pierwotnego.
6. Sonda (tylko przeciwciąża mysie): Inkubować przez 5-15 minut w temperaturze pokojowej z sondą MACH 4 Mouse Probe.
7. Polimer: Inkubować przez 10-20 minut w przypadku przeciwciąż mysich lub 30 minut w przypadku przeciwciąż króliczych w temperaturze pokojowej z polimerem MACH 4 HRP.
8. Chromogen: Inkubować przez 5 minut w temperaturze pokojowej z DAB firmy Biocare.
9. Barwienie kontrastowe: Barwienie kontrastowe hematoksyliną. Spłucz wodą dejonizowaną. Zastosuj roztwór Bluing Solution firmy Tacha na 1 minutę. Spłucz wodą dejonizowaną.

## Uwagi techniczne:

1. Do mycia użyj TBS.

## Kontrola jakości:

Patrz Standardy jakości CLSI dotyczące projektowania i wdrażania testów immunohistochemicznych; Zatwierdzone wytyczne – wydanie drugie (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA, USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

## Pozytywna kontrola tkanek:

Materiałami zewnętrzną kontroli pozytywnej powinny być świeże próbki utrwalone, przetworzone i zatopione tak szybko, jak to możliwe, w taki sam sposób, jak próbki pacjenta. Pozytywne kontrole tkanek wskazują na prawidłowo przygotowane tkanki i odpowiednie techniki barwienia. Do każdego cyklu barwienia należy włączyć jedną pozytywną zewnętrzną kontrolę tkanek dla każdego zestawu warunków testowych.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Polish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Tkanki stosowane w materiałach zewnętrznej kontroli pozytywnej należy wybierać spośród próbek pacjentów o dobrze scharakteryzowanym niskim poziomie dodatniej aktywności docelowej, która powoduje słabe dodatnie barwienie. Niski poziom dodatniości zewnętrznych kontroli pozytywnych zaprojektowano tak, aby zapewnić wykrycie subtelnego zmian we wrażliwości przeciwcała pierwotnego wynikających z niestabilności lub problemów z metodologią IHC. Dostępne w handlu szkiełka do kontroli tkanek lub próbki przetworzone inaczej niż próbki pacjenta potwierdzają jedynie działanie odczynnika i nie weryfikują przygotowania tkanki.

Znane pozytywne kontrole tkankowe należy wykorzystywać wyłącznie do monitorowania prawidłowego działania przetworzonych tkanek i odczynników testowych, a nie jako pomoc w formułowaniu konkretnej diagnozy próbek od pacjentów. Jeżeli dodatnie kontrole tkankowe nie wykażą dodatniego barwienia, wyniki uzyskane dla próbek testowych należy uznać za nieważne.

## Negatywna kontrola tkankowa:

Użyj negatywnej kontroli tkankowej utrwalonej, przetworzonej i zatopionej w sposób identyczny z próbką(-ami) pacjenta przy każdym barwieniu, aby zweryfikować specyficzność przeciwcała pierwotnego IHC dla demonstracji docelowego antygenu i dostarczenie wskazania specyficznego barwienia tła (barwienie fałszywie dodatnie). Również różnorodność różnych typów komórek obecnych w większości skrawków tkanek może to powodować być wykorzystywane przez laboratorium jako wewnętrzne miejsca kontroli negatywnej w celu sprawdzenia działania IHC specyfikacji. Rodzaje i źródła próbek, które można wykorzystać do badania tkanek ujemnych elementy sterujące są wymienione w sekcji Charakterystyka wydajności.

Jeżeli w negatywnej kontroli tkankowej wystąpi specyficzne zabarwienie (fałszywie dodatnie zabarwienie), wyniki uzyskane na próbках pacjentów należy uznać za nieważne.

## Nieswoista kontrola ujemna odczynnika:

Do wycinka każdej próbki pacjenta należy zastosować nieswoistą kontrolę ujemną z odczynnikami zamiast przeciwcała pierwotnego w celu oceny nieswoistego barwienia i pozwalającą na lepszą interpretację specyficznego barwienia w miejscu antygenu. W idealnym przypadku kontrola ujemna odczynnika zawiera przeciwcało wytworzone i przygotowane (tj. rozcierczone do tego samego stężenia przy użyciu tego samego rozcierczalnika) do użycia w taki sam sposób jak przeciwcało pierwszorzędowe, ale nie wykazuje specyficznej reaktywności z tkankami ludzkimi w tej samej matrycy/roztwórce co kontrola przeciwcała pierwotne. Można zastosować sam rozcierczalnik jako mniej pożądaną alternatywę dla opisanych wcześniej kontroli ujemnych z odczynnikami. Okres inkubacji kontroli ujemnej odczynnika powinien odpowiadać okresowi inkubacji przeciwcała pierwszorzędowego.

Jeżeli w skrawkach seryjnych stosuje się panele kilku przeciwcała, obszary jednego szkiełka barwiące się negatywnie mogą służyć jako ujemna/nieswoistość wiążąca kontrola tła dla innych przeciwcała. Aby odróżnić endogenną aktywność enzymatyczną lub niespecyficzne wiązanie enzymów od swoistej immunoreaktywności, dodatkowe tkanki pacjenta można wybarwić wyłącznie odpowiednio substratem-chromogenem lub kompleksami enzymatycznymi (PAP, avidyna-biotyna, streptavidyna) i substratem-chromogenem.

## Weryfikacja testu:

Przed pierwszym użyciem przeciwcała lub systemu barwienia w procedurze diagnostycznej użytkownik powinien zweryfikować specyficzność przeciwcała, testując je na szeregu własnych tkanek o znanej charakterystyce działania immunohistochemicznego, reprezentujących znane tkanki dodatnie i ujemne. Należy zapoznać się z procedurami kontroli jakości opisanymi wcześniej w tej części ulotki produktu oraz z zaleceniami

dotyczącymi kontroli jakości Programu certyfikacji CAP<sup>10</sup> do immunohistochemii i/lub wytyczne NCCLS IHC<sup>11</sup>. Te procedury kontroli jakości należy powtarzać dla każdej nowej partii przeciwcała lub za każdym razem, gdy nastąpi zmiana parametrów testu. Tkanki wymienione w sekcji Charakterystyka działania nadają się do weryfikacji testu.

## Rozwiązywanie problemów:

Postępuj zgodnie z zaleceniami dotyczącymi protokołu dotyczącymi specyficznych przeciwcała, zgodnie z dostarczoną kartą katalogową. W przypadku wystąpienia nietypowych wyników należy skontaktować się z pomocą techniczną firmy Biocare pod numerem 1-800-542-2002.

## Interpretacja barwienia:

Zestaw Betazoid DAB Chromogen Kit powoduje brązową reakcję w miejscach antygenu zlokalizowanych przez przeciwcało pierwszorzędowe. Przed interpretacją wyników pacjenta barwienie kontroli musi zostać ocenione przez wykwalifikowanego patologa. Kontrole negatywne są oceniane i porównywane z wybarwionymi szkiełkami, aby upewnić się, że zaobserwowane zabarwienie nie jest wynikiem nieswoistych interakcji.

## Pozytywna kontrola tkanek:

Najpierw należy zbadać pozytywną kontrolę tkankową barwioną wskazanym przeciwcałem, aby upewnić się, że wszystkie odczynniki działają prawidłowo. Odpowiednie barwienie komórek docelowych (jak wskazano powyżej) wskazuje na dodatnią reaktywność. Jeżeli dodatnie kontrole tkanek nie wykażą dodatniego barwienia, wszelkie wyniki uzyskane dla próbek testowych należy uznać za nieważne.

Kolor produktu reakcji może się różnić w zależności od użytego chromogenu substratu. Informacje na temat oczekiwanych reakcji kolorystycznych można znaleźć w ulotkach dołączonych do podłoża. Ponadto metachromazję można zaobserwować w odmianach metody barwienia.<sup>12</sup>

W przypadku stosowania barwnika kontrastowego, w zależności od długości inkubacji i siły użytego barwnika kontrastowego, barwienie kontrastowe spowoduje zabarwienie jader komórkowych. Nadmiernie lub niepełne barwienie kontrastowe może zakłócić prawidłową interpretację wyników. Zalecane barwienie kontrastowe znajduje się w protokołach.

## Negatywna kontrola tkanek:

Negatywną kontrolę tkankową należy zbadać po pozytywnej kontroli tkankowej, aby zweryfikować specyficzność znakowania docelowego antygenu przez przeciwcało pierwszorzędowe. Brak swoistego barwienia w negatywnej kontroli tkankowej potwierdza brak reaktywności krzyżowej przeciwcała w stosunku do komórek/ składników komórkowych. Jeżeli w ujemnej zewnętrznej kontroli tkanek wystąpi specyficzne zabarwienie (fałszywie dodatnie zabarwienie), wyniki uzyskane dla próbki pacjenta należy uznać za nieważne.

Niespecyficzne zabarwienie, jeśli występuje, zwykle ma rozproszony wygląd. Sporadyczne zabarwienie tkanki łącznej można również zaobserwować w skrawkach tkanek nadmiernie utrwalonych w formalinie. Do interpretacji wyników barwienia należy używać nienaruszonych komórek. Komórki martwicze lub zdegenerowane często barwią się nieswoistości.

## Tkanka pacjenta:

Zbadaj próbki pacjentów wybarwione wskazanymi przeciwcałami ostatni. Intensywność barwienia dodatniego należy oceniać w kontekście wszelkich nieswoistych barwień tła kontroli negatywnej z odczynikiem. Podobnie jak w przypadku każdego testu immunohistochemicznego, wynik ujemny oznacza, że antygen nie został wykryty, a nie, że antygen był nieobecny w testowanych komórkach/tkance. Jeżeli to konieczne, użyj panelu przeciwcała w celu zidentyfikowania reakcji fałszywie ujemnych.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Polish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Aby uzyskać szczegółowe informacje dotyczące wskazanej immunoreaktywności przeciwcał, patrz Podsumowanie i wyjaśnienia, ograniczenia i charakterystyka działania.

## Ograniczenia:

### Ogólne ograniczenia:

1. Dla *in vitro* zastosowanie diagnostyczne (IVD).
2. Ten produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego: Immunohistochemia to wieloetapowy proces diagnostyczny, który obejmuje specjalistyczne szkolenie w zakresie doboru odpowiednich odczynników; wybór tkanki, utrwalanie i przetwarzanie; przygotowanie szkiełka IHC; i interpretację wyników barwienia.
3. Do stosowania wyłącznie na receptę lekarza. (Tylko odbiór)
4. Barwienie tkanek zależy od sposobu postępowania z tkanką i jej obróbką przed barwieniem. Niewłaściwe utrwalanie, zamrażanie, rozmrzanie, mycie, suszenie, podgrzewanie, dzielenie na skrawki lub zanieczyszczenie innymi tkankami lub płynami może spowodować artefakty, uwieńczenie przeciwcał lub wyniki fałszywie ujemne. Niespójne wyniki mogą wynikać z różnic w metodach utrwalania i osadzania lub z nieodłącznych nieprawidłowości w tkance.<sup>14</sup>
5. Nadmierne lub niepełne barwienie kontrastowe może zakłócić prawidłową interpretację wyników.
6. Kliniczną interpretację każdego dodatniego lub ujemnego zabarwienia należy ocenić w kontekście obrazu klinicznego, morfologii i innych kryteriów histopatologicznych. Kliniczną interpretację każdego dodatniego lub ujemnego zabarwienia należy uzupełnić badaniami morfologicznymi z zastosowaniem odpowiednich dodatniczych i ujemnych kontroli wewnętrznych i zewnętrznych, a także innych testów diagnostycznych. Za interpretację wszystkich etapów przygotowania i interpretacji końcowego preparatu IHC odpowiada wykwalifikowany patolog, który jest zaznajomiony z właściwym użyciem przeciwcał IHC, odczynników i metod.
7. Optymalne protokoły dla konkretnego zastosowania mogą się różnić. Należą do nich między innymi utrwalanie, metoda odzyskiwania ciepła, czas inkubacji, rozcieranie przeciwcał, grubość skrawków tkanki i zastosowany zestaw do wykrywania. Aby zapoznać się z zalecanymi protokołami i warunkami stosowania, należy zapoznać się z instrukcją użycia przeciwcała głównego i innych odczynników pomocniczych. Zalecenia i protokoły zawarte w arkuszach danych opierają się na wyłącznym stosowaniu produktów Biocare. Ostatecznie zadaniem badacza jest określenie optymalnych warunków.
8. Ten produkt nie jest przeznaczony do stosowania w cytometrii przepływowej. Charakterystyki działania nie zostały określone dla cytometrii przepłybowej.
9. Tkanki osób zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu B i zawierające antigen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) mogą wykazywać niespecyficzne barwienie peroksydazą chrzanową.<sup>14</sup>
10. Odczynniki mogą wykazywać nieoczekiwane reakcje w wcześniej nietestowanych tkankach. Nie można całkowicie wyeliminować możliwości wystąpienia nieoczekiwanych reakcji nawet w badanych grupach tkanek ze względu na biologiczną zmienność ekspresji antigenów w nowotworach lub innych tkankach patologicznych.<sup>15</sup> Skontaktuj się z pomocą techniczną firmy Biocare pod numerem 1-800-542-2002 lub za pośrednictwem informacji pomocy technicznej dostępnych na stronie biocare.net, podając udokumentowane nieoczekiwane reakcje.
11. Surowice normalne/nieimmunologiczne pochodzące z tego samego źródła zwierzęcego, co surowice wtórne stosowane na etapach blokowania, mogą dawać wyniki fałszywie ujemne lub fałszywie dodatnie ze względu na obecność autoprzeciwciał lub przeciwcał naturalnych.
12. Wyniki fałszywie dodatnie mogą wystąpić w wyniku nieimmunologicznego wiązania białek lub produktów reakcji substratu. Mogą być również spowodowane aktywnością pseudoperoksydazy

(erytrocyty), endogenna aktywnością peroksydazy (cytochrom C) lub endogenną biotyną (np. wątroba, pierś, mózg, nerki), w zależności od rodzaju użytego barwnika immunologicznego.<sup>13</sup>

13. Wynik ujemny oznacza, że抗原 nie został wykryty, a nie, że抗原u nie było w badanych komórkach lub tkankach.

### Ograniczenia specyficzne dla produktu:

Brak dodatkowych ograniczeń specyficznych dla produktu

### Charakterystyka wydajności:

Barwienie przeprowadzono przy użyciu protokołów dostarczonych w instrukcjach użycia specyficznych dla przeciwcał lub zgodnie z wyszczególnieniem. Czułość i swoistość barwienia oceniano w szeregu typów tkanek prawidłowych i nowotworowych ocenianych podczas opracowywania przeciwcał pierwotnych.

### Powtarzalność:

Powtarzalność systemów detekcyjnych i odczynników systemowych Biocare jest weryfikowana poprzez pomiar o średniej precyzyji, podczas którego testowano różne partie odczynników przez dłuższy okres czasu przy użyciu różnych operatorów, analityków, parti odczynników, próbek tkanek i sprzętu. Barwienie uzyskane dla każdego ocenianego odczynnika wykrywającego było spójne i przeprowadzone zgodnie z oczekiwaniemi.

### Rozwiązywanie problemów:

1. Brak barwienia jakichkolwiek szkiełek – sprawdzić, czy użyto odpowiedniej tkanki kontroli pozytywnej, przeciwcał i produktów do wykrywania. Sprawdź, czy wosk nie został całkowicie lub nieprawidłowo usunięty lub nie został poddany obróbce wstępnej.
2. Słabe barwienie wszystkich preparatów – sprawdzić, czy użyto odpowiedniej tkanki kontroli pozytywnej, przeciwcał i produktów do wykrywania.
3. Nadmierne tło wszystkich preparatów – Może występować wysoki poziom endogennej biotyny (w przypadku stosowania produktów do wykrywania na bazie biotyny), endogenna aktywność HRP przekształcająca chromogen w kolorowy produkt końcowy (użyj bloku peroksydazy) lub nadmierne niespecyficzne interakcje białek (użyj białka bloker, taki jak roztwór blokujący na bazie surowicy lub kazeiny).
4. Skrawki tkanek zmywają szkiełka podczas inkubacji – Sprawdź szkiełka, aby upewnić się, że są nałożone dodatnio.
5. Specyficzne barwienie jest zbyt ciemne – Sprawdź protokół, aby ustalić, czy do szkiełka nałożono właściwe miano przeciwcała, a także czy określono właściwy czas inkubacji dla wszystkich odczynników. Ponadto należy upewnić się, że protokół zawiera wystarczającą liczbę etapów płukania, aby usunąć nadmiar odczynników po zakończeniu etapów inkubacji.

### Bibliografia:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Polish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Lab Med* 1983; 14:767.
14. 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. *AmJ Clin Path* 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfent EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Portuguese

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Uso pretendido:

Para *em vitro* Uso de diagnóstico

O Kit de cromogênio Betazoid DAB destina-se ao uso em protocolos de coloração imuno-histoquímica (IHC) manuais ou automatizados para a detecção de抗ígenos alvo em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE), quando usado em conjunto com o sistema de detecção apropriado e anticorpos primários. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos e controlos adequados e deve ser avaliada no contexto da história clínica do doente e de outros testes de diagnóstico por um patologista qualificado.

## Resumo e explicação:

3,3'diaminobenzidina (DAB) é um cromógeno bem estabelecido usado em protocolos de coloração IHC que, na presença de uma enzima peroxidase de rábano (HRP), produz um precipitado marrom que é insolúvel em solventes orgânicos e pode ser coberto com uma lamínula com um meio de montagem permanente. Este produto vem em um sistema de dois componentes que consiste em um cromógeno DAB líquido estável e um tampão de substrato DAB. A cor da mistura tampão de cromogênio pode variar de incolor a marrom claro. As propriedades de coloração não são afetadas pela cor da mistura tampão de cromogênio. Betazoid DAB é uma formulação muito estável. Betazoid DAB pode ser usado manualmente e em coloradores automatizados.

## Princípio do Procedimento:

Este cromógeno DAB no kit Betazoid DAB Chromogen, quando usado em testes IHC de seções de tecido FFPE, permite a visualização de抗ígenos por meio da aplicação sequencial de um anticorpo específico para o抗ígeno (anticorpo primário), um anticorpo secundário para o anticorpo primário (ligação anticorpo/sonda opcional), um complexo enzimático e um substrato cromogênico com etapas de lavagem interpostas. A ativação enzimática do cromogênio resulta em um produto de reação visível no local do抗ígeno. A amostra pode então ser contrastada e coberta com lamínula. Os resultados são interpretados usando uma luz microscópica e auxiliar no diagnóstico diferencial de processos fisiopatológicos, que podem ou pode não estar associado a um抗ígeno específico.

## Materiais e métodos:

### Reagentes fornecidos:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Reconstituição, mistura, diluição, titulação:

O kit Betazoid DAB Chromogen é otimizado para uso com anticorpos Biocare e reagentes auxiliares e deve ser diluído imediatamente antes do uso. Misture 1 gota (32μL) de cromogênio DAB por 1,0mL de tampão de substrato DAB. A solução de trabalho DAB é estável durante 5 dias se armazenada entre 2-8°C.

## Aplicações conhecidas:

Imunohistoquímica (tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina)

## Fornecido como:

*Cromógeno Betazóide DAB*

Solução DAB. Consulte a Ficha de Dados de Segurança para obter detalhes adicionais.

## Tampão de substrato Betazoid DAB

A solução tamponada contém solução de peróxido de hidrogênio a 3%. Consulte a Ficha de Dados de Segurança para obter detalhes adicionais.

## Materiais e reagentes necessários, mas não fornecidos:

Lâminas de microscópio, carregadas positivamente

Controles de tecido positivos e negativos

Câmara do Deserto\* ou forno de secagem similar (opcional)

Xileno ou substituto de xileno

Etanol ou álcool reagente

Câmara de Descamuflagem\* ou panela de pressão semelhante (opcional)

Água deionizada ou destilada

Tampão de lavagem\*

Reagentes de pré-tratamento\* (opcional)

Digestão enzimática\* (opcional)

Blockeo de peroxidase\*

Bloco de proteínas\* (opcional)

Anticorpo primário\*

Reagentes de controle negativo\*

Kits de detecção\*

Hematoxilina\* (contracorante)

Reagente azul\*

Meio de montagem\*

Tampa de vidro

Microscópio óptico (ampliação de 40-400X)

\* Produtos médicos da Biocare: Consulte o site da Biocare Medical localizado em <http://biocare.net> para obter informações sobre números de catálogo e pedidos. Certos reagentes listados acima baseiam-se na aplicação específica e no sistema de detecção utilizado.

## Armazenamento e estabilidade:

Conservar entre 2°C a 8°C. O produto é estável até a data de validade impressa no rótulo do frasco quando armazenado nessas condições. Não use após a data de validade. O armazenamento sob qualquer condição diferente das especificadas deve ser verificado. Os reagentes diluídos devem ser usados imediatamente conforme as instruções. O reagente diluído não utilizado é estável durante 5 dias se armazenado entre 2-8°C. A estabilidade do reagente diluído pelo utilizador para além de 5 dias não foi estabelecida pela Biocare.

Os controlos positivos e negativos devem ser analisados simultaneamente com todas as amostras dos pacientes. Se for observada coloração inesperada que não pode ser explicada por variações nos procedimentos laboratoriais e houver suspeita de um problema com o anticorpo, entre em contato com o Suporte Técnico da Biocare pelo telefone 1-800-542-2002 ou através das informações de suporte técnico fornecidas em [biocare.net](http://biocare.net).

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Portuguese

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Preparação de amostras:

Os tecidos fixados em formalina são adequados para utilização antes da inclusão em parafina. Os tecidos ósseos devem ser descalcificados antes do processamento do tecido para facilitar o corte do tecido e evitar danos às lâminas do micrótomo.<sup>1,2</sup>

Os tecidos devidamente fixados e esmbebidos que expressam o antígeno alvo especificado devem ser armazenados em local fresco. A Lei de Melhoria de Laboratórios Clínicos (CLIA) de 1988 exige em 42 CFR§493.1259(b) que "O laboratório deve reter as lâminas coradas por pelo menos dez anos a partir da data de exame e reter blocos de amostras por pelo menos dois anos a partir da data do exame."<sup>3</sup>

## Tratamento de tecidos antes da coloração:

Execute a recuperação de epítotos induzida por calor (HIER) de acordo com o protocolo recomendado abaixo. Foi demonstrado que o uso rotineiro de HIER antes da IHC minimiza a inconsistência e padroniza a coloração.<sup>4,5</sup>

### Aviso e Precauções:

1. Sabe-se que o DAB é suspeito de ser cancerígeno.
2. Não exponha os componentes DAB à luz forte ou à luz solar direta
3. DAB pode causar sensibilização da pele. Evitar o contato com a pele e os olhos.
4. Use luvas e roupas de proteção e tome precauções razoáveis ao manusear, pois o DAB é classificado como perigoso e pode causar câncer e é suspeito de causar defeitos genéticos.
5. Manuseie materiais de origem humana ou animal como potencialmente perigosos e descarte-os com as devidas precauções. Em caso de exposição, siga as diretrizes de saúde das autoridades responsáveis onde for utilizado.<sup>6,7</sup>
6. As amostras, antes e depois da fixação, e todos os materiais a elas expostos devem ser manuseados como se fossem capazes de transmitir infecções e eliminados com as devidas precauções. Nunca pipete reagentes com a boca e evite o contacto da pele e das membranas mucosas com reagentes e amostras. Se os reagentes ou as amostras entrarem em contacto com áreas sensíveis, lave com água em abundância.<sup>8</sup>
7. A contaminação microbiana dos reagentes pode resultar num aumento de coloração inespecífica.
8. Tempos de incubação ou temperaturas diferentes dos especificados podem dar resultados errados. O usuário deve validar qualquer alteração desse tipo.
9. Não utilize o reagente após o prazo de validade impresso no frasco.
10. O(s) reagente(s) do kit de detecção de micropolímeros são otimizados e prontos para uso com anticorpos Biocare e reagentes auxiliares. Consulte as instruções de utilização do anticorpo primário e de outros reagentes auxiliares para conhecer os protocolos e condições de utilização recomendados.
11. Siga os requisitos das autoridades locais e/ou estaduais quanto ao método de descarte.
12. A FDS está disponível mediante solicitação e está localizada em <http://biocare.net>.
13. Relate quaisquer incidentes graves relacionados com este dispositivo contactando o representante local da Biocare e a autoridade competente aplicável do Estado-Membro ou país onde o utilizador está localizado.

Este kit de cromogénio contém componentes classificados conforme indicado na tabela abaixo de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1272/2008

Perigo	Código	Declaração de perigo
	H314 H350	Suspeito de causar defeitos genéticos Pode causar câncer

## Instruções de uso:

Os reagentes do kit cromogênio são otimizados para uso com anticorpos Biocare e reagentes auxiliares. Consulte as instruções de utilização do anticorpo primário e de outros reagentes auxiliares para conhecer os protocolos e condições de utilização recomendados. Os tempos e temperaturas de incubação irão variar dependendo do protocolo de anticorpos específico seguido.

Ao usar um instrumento de coloração automatizado, consulte o manual do operador do instrumento específico e as instruções de uso para obter os parâmetros operacionais.

### Etapas processuais gerais para realizar a IHC:

1. Desparafinização: Desparafinar as lâminas em Slide Brite ou xileno. Hidrate as lâminas em uma série de álcoois graduados em água.
2. Bloqueio de Peróxido: Bloqueie por 5 minutos com Peroxidazed 1.
3. Solução/protocolo de pré-tratamento: Consulte a respectiva folha de dados do anticorpo primário para obter a solução e o protocolo de pré-tratamento recomendados.
4. Bloco de Proteína (Opcional): Incubar por 5 a 10 minutos em temperatura ambiente (TA) com Punisher de Fundo.
5. Anticorpo Primário: Consulte a ficha técnica do respectivo anticorpo primário para obter informações sobre o tempo de incubação.
6. Sonda (somente anticorpos de camundongo): Incubar por 5-15 minutos em temperatura ambiente com sonda de camundongo MACH 4.
7. Polímero: Incubar durante 10-20 minutos para anticorpos de rato ou 30 minutos para anticorpos de coelho à temperatura ambiente com polímero MACH 4 HRP.
8. Cromógeno: Incubar por 5 minutos em temperatura ambiente com DAB da Biocare.
9. Contracoloração: Contracoloração com hematoxilina. Enxágüe com água deionizada. Aplique a solução Bluing da Tacha por 1 minuto. Enxágüe com água deionizada.

### Notas Técnicas:

1. Use TBS para etapas de lavagem.

### Controle de qualidade:

Consulte os Padrões de Qualidade CLSI para Projeto e Implementação de Ensaios Imunohistoquímicos; Diretriz Aprovada – Segunda edição (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA EUA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

### Controle Positivo de Tecidos:

Os materiais de controlo positivo externo devem ser amostras frescas fixadas, processadas e incorporadas o mais rapidamente possível, da mesma forma que a(s) amostra(s) do paciente. Os controlos teciduais positivos são indicativos de tecidos correctamente preparados e de técnicas de coloração adequadas. Deve ser incluído em cada execução de coloração um controlo tecidual externo positivo para cada conjunto de condições de teste.

Os tecidos utilizados para os materiais de controlo positivo externo devem ser seleccionados a partir de amostras de pacientes com baixos níveis bem caracterizados de actividade alvo positiva que originam uma coloração positiva fraca. O baixo nível de positividade para controlos positivos externos foi projetado para garantir a detecção de alterações sutis na sensibilidade do anticorpo primário devido à instabilidade ou problemas com a metodologia IHC. As lâminas de controlo de tecidos disponíveis comercialmente ou as amostras processadas de forma diferente da(s) amostra(s) do paciente validam apenas o desempenho dos reagentes e não verificam a preparação do tecido.

90/18



 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

6827 AT Arnhem

The Netherlands

TP v1 (03/30/2022)

Tel: 800-799-9499 | [www.biocare.net](http://www.biocare.net) | Fax: 925-603-8080

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Portuguese

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Os controlos teciduais positivos conhecidos só devem ser utilizados para monitorizar o desempenho correcto dos tecidos processados e dos reagentes de teste, e não como auxílio na formulação de um diagnóstico específico de amostras de pacientes. Se os controlos teciduais positivos não demonstrarem coloração positiva, os resultados com as amostras de teste deverão ser considerados inválidos.

## Controle Negativo de Tecidos:

Use um controle tecidual negativo fixado, processado e incorporado de maneira idêntica à(s) amostra(s) do paciente em cada execução de coloração para verificar a especificidade do anticorpo primário IHC para demonstração do antígeno alvo e para fornecer uma indicação de coloração de fundo específica (coloração falso positivo). Além disso, a variedade de diferentes tipos de células presentes na maioria das secções de tecido pode ser usadas pelo laboratório como locais de controle negativo interno para verificar o desempenho do IHC especificações. Os tipos e fontes de amostras que podem ser usadas para tecido negativo os controlos estão listados na seção Características de desempenho.

Se ocorrer coloração específica (coloração falsa positiva) no controlo negativo do tecido, os resultados com as amostras do paciente deverão ser considerados inválidos.

## Controle de reagente negativo inespecífico:

Use um controle de reagente negativo inespecífico no lugar do anticorpo primário com uma seção de cada amostra do paciente para avaliar coloração inespecífica e permitem uma melhor interpretação da coloração específica no local do antígeno. Idealmente, um controle de reagente negativo contém um anticorpo produzido e preparado (ou seja, diluído na mesma concentração usando o mesmo diluente) para uso da mesma forma que o anticorpo primário, mas não exibe reatividade específica com tecidos humanos na mesma matriz/solução que o anticorpo primário. anticorpo primário. O diluente sozinho pode ser utilizado como uma alternativa menos desejável aos controlos de reagentes negativos descritos anteriormente. O período de incubação do reagente de controlo negativo deve corresponder ao do anticorpo primário.

Quando são utilizados painéis de vários anticorpos em secções em série, as áreas de coloração negativa de uma lâmina podem servir como controle de fundo de ligação negativo/inespecífico para outros anticorpos. Para diferenciar a atividade enzimática endógena ou a ligação inespecífica de enzimas da imunoreatividade específica, tecidos adicionais do paciente podem ser corados exclusivamente com substrato-cromógeno ou complexos enzimáticos (PAP, avidina-biotina, estreptavidina) e substrato-cromógeno, respectivamente.

## Verificação do ensaio:

Antes da utilização inicial de um anticorpo ou sistema de coloração num procedimento de diagnóstico, o utilizador deve verificar a especificidade do anticorpo testando-o numa série de tecidos internos com características de desempenho imuno-histoquímica conhecidas, representando tecidos positivos e negativos conhecidos. Consulte os procedimentos de controle de qualidade descritos anteriormente nesta seção da bula do produto e as recomendações de controle de qualidade do Programa de Certificação CAP<sup>10</sup> para imunohistoquímica e/ou a diretriz NCCLS IHC<sup>11</sup>. Estes procedimentos de controle de qualidade devem ser repetidos para cada novo lote de anticorpos ou sempre que houver alteração nos parâmetros do ensaio. Os tecidos listados na seção Características de Desempenho são adequados para verificação de ensaio.

## **Solução de problemas:**

Siga as recomendações do protocolo específico do anticorpo de acordo com a ficha técnica fornecida. Se ocorrerem resultados atípicos, entre em contato com o Suporte Técnico da Biocare pelo telefone 1-800-542-2002.

## Interpretação da coloração:

O Betazoid DAB Chromogen Kit produz uma reação de cor marrom nos locais do antígeno localizados pelo anticorpo primário. Antes da interpretação dos resultados dos pacientes, a coloração dos controlos deve ser avaliada por um patologista qualificado. Os controlos negativos são avaliados e comparados com lâminas coradas para garantir que qualquer coloração observada não seja resultado de interações inespecíficas.

## Controle Positivo de Tecidos:

O controlo tecidual positivo corado com o anticorpo indicado deve ser examinado primeiro para verificar se todos os reagentes estão a funcionar correctamente. A coloração apropriada das células alvo (como indicado acima) é indicativa de reatividade positiva. Se os controlos teciduais positivos não demonstrarem coloração positiva, quaisquer resultados com as amostras de teste deverão ser considerados inválidos.

A cor do produto da reação pode variar dependendo dos cromógenos do substrato utilizados. Consulte as bulas do substrato para obter as reações de cor esperadas. Além disso, a metacromasia pode ser observada em variações do método de coloração.<sup>12</sup>

Quando é utilizado um contracorante, dependendo da duração da incubação e da potência do contracorante utilizado, o contracorante resultará numa coloração dos núcleos das células. A contrastação excessiva ou incompleta pode comprometer a interpretação adequada dos resultados. Consulte o(s) protocolo(s) para obter a contracoloração recomendada.

## Controle Negativo de Tecidos:

O controle tecidual negativo deve ser examinado após o controle tecidual positivo para verificar a especificidade da marcação do antígeno alvo pelo anticorpo primário. A ausência de coloração específica no controlo negativo de tecido confirma a falta de reatividade cruzada do anticorpo com células/componentes celulares. Se ocorrer coloração específica (coloração falsa positiva) no controlo tecidual externo negativo, os resultados com a amostra do paciente deverão ser considerados inválidos.

A coloração inespecífica, se presente, geralmente tem aparência difusa. A coloração esporádica do tecido conjunto também pode ser observada em secções de tecidos excessivamente fixados em formalina. Use células intactas para interpretação dos resultados de coloração. Células necróticas ou degeneradas geralmente apresentam coloração inespecífica.

## Tecido do Paciente:

Examinar amostras de pacientes coradas com o anticorpo indicado durar. A intensidade da coloração positiva deve ser avaliada no contexto de qualquer coloração de fundo inespecífica do controlo de reagente negativo. Tal como acontece com qualquer teste imuno-histoquímico, um resultado negativo significa que o antígeno não foi detectado, e não que o antígeno estava ausente nas células/tecidos analisados. Se necessário, utilize um painel de anticorpos para identificar reações falso-negativas.

Consulte Resumo e Explicação, Limitações e Características de Desempenho para obter informações específicas sobre a imunoreatividade de anticorpos indicada.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Portuguese

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Limitações:

### Limitações Gerais:

1. Paraem *vitro* Diagnóstico (IVD) Uso
2. Este produto é apenas para uso profissional: A imunohistoquímica é um processo de diagnóstico em múltiplas etapas que consiste em treinamento especializado na seleção dos reagentes adequados; seleção, fixação e processamento de tecidos; preparação da lâmina IHC; e interpretação dos resultados da coloração.
3. Para uso somente mediante prescrição médica. (Somente Rx)
4. A coloração do tecido depende do manuseio e processamento do tecido antes da coloração. Fixação, congelamento, descongelamento, lavagem, secagem, aquecimento, seccionamento ou contaminação inadequados com outros tecidos ou fluidos podem produzir artefatos, aprisionamento de anticorpos ou resultados falsos negativos. Resultados inconsistentes podem ser devidos a variações nos métodos de fixação e inclusão, ou a irregularidades inerentes ao tecido.<sup>14</sup>
5. A contrastação excessiva ou incompleta pode comprometer a interpretação adequada dos resultados.
6. A interpretação clínica de qualquer coloração positiva ou negativa deve ser avaliada dentro do contexto da apresentação clínica, morfologia e outros critérios histopatológicos. A interpretação clínica de qualquer coloração positiva ou negativa deve ser complementada por estudos morfológicos utilizando controles internos e externos positivos e negativos adequados, bem como outros testes de diagnóstico. É responsabilidade de um patologista qualificado que esteja familiarizado com o uso adequado de anticorpos, reagentes e métodos de IHC interpretar todas as etapas usadas para preparar e interpretar a preparação final de IHC.
7. Os protocolos ideais para uma aplicação específica podem variar. Estes incluem, mas não estão limitados a fixação, método de recuperação de calor, tempos de incubação, diluição de anticorpos, espessura da secção de tecido e kit de detecção utilizado. Consulte as instruções de utilização do anticorpo primário e de outros reagentes auxiliares para conhecer os protocolos e condições de utilização recomendados. As recomendações e protocolos da ficha técnica são baseados no uso exclusivo de produtos Biocare. Em última análise, é responsabilidade do investigador determinar as condições ideais.
8. Este produto não se destina ao uso em citometria de fluxo. As características de desempenho não foram determinadas para citometria de fluxo.
9. Os tecidos de pessoas infectadas com o vírus da hepatite B e contendo antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) podem apresentar coloração inespecífica com peroxidase de rábano.<sup>14</sup>
10. Os reagentes podem demonstrar reações inesperadas em tecidos não testados anteriormente. A possibilidade de reações inesperadas mesmo em grupos de tecidos testados não pode ser completamente eliminada devido à variabilidade biológica da expressão do antígeno em neoplasias ou outros tecidos patológicos.<sup>15</sup> Entre em contato com o suporte técnico da Biocare pelo telefone 1-800-542-2002 ou por meio das informações de suporte técnico fornecidas em biocare.net, com reações inesperadas documentadas.
11. Os soros normais/não imunes da mesma origem animal que os anti-soros secundários utilizados nas etapas de bloqueio podem causar resultados falso-negativos ou falso-positivos devido a autoanticorpos ou anticorpos naturais.
12. Resultados falso-positivos podem ser observados devido à ligação não imunológica de proteínas ou produtos de reação de substrato. Eles também podem ser causados por atividade de pseudo peroxidase (eritrócitos), atividade de peroxidase endógena (citocromo C) ou biotina endógena (por exemplo, fígado, mama, cérebro, rim), dependendo do tipo de imunocoloração utilizada.<sup>13</sup>
13. Um resultado negativo significa que o antígeno não foi detectado e não que o antígeno estava ausente nas células ou tecidos examinados.

### Limitações Específicas do Produto:

*Sem limitações adicionais específicas do produto*

### Características de desempenho:

A coloração foi realizada utilizando protocolos fornecidos nas instruções de utilização específicas do anticorpo ou conforme especificado. A sensibilidade e a especificidade da coloração foram avaliadas em vários tipos de tecidos normais e neoplásicos avaliados durante o desenvolvimento de anticorpos primários.

### Reprodutibilidade:

A reprodutibilidade dos sistemas de detecção e reagentes do sistema da Biocare é verificada através de uma medição de precisão intermediária na qual vários lotes de reagentes foram testados durante um longo período de tempo usando vários operadores, analistas, lotes de reagentes, amostras de tecidos e equipamentos. A coloração obtida para cada reagente de detecção avaliado foi consistente e realizada conforme esperado.

### Solução de problemas:

1. Nenhuma coloração em nenhuma lâmina – Verifique para determinar se foram utilizados tecidos de controle positivo, anticorpos e produtos de detecção apropriados. Verifique se há remoção ou pré-tratamento de cera incompleto ou inadequado.
2. Coloração fraca de todas as lâminas – Verifique para determinar se foram utilizados tecidos de controlo positivo apropriados, anticorpos e produtos de detecção.
3. Fundo excessivo de todas as lâminas – Pode haver altos níveis de biotina endógena (se estiver usando produtos de detecção à base de biotina), atividade endógena de HRP convertendo cromogênio em produto final colorido (use bloco de peroxidase) ou excesso de interação proteica não específica (use uma proteína bloqueio, como solução de bloqueio à base de soro ou caseína).
4. As secções de tecido são removidas das lâminas durante a incubação – Verifique as lâminas para garantir que estão carregadas positivamente.
5. Coloração específica demasiado escura – Verifique o protocolo para determinar se o título de anticorpos adequado foi aplicado à lâmina, bem como os tempos de incubação adequados para todos os reagentes. Além disso, certifique-se de que o protocolo tenha etapas de lavagem suficientes para remover o excesso de reagentes após a conclusão das etapas de incubação.

### Referências:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.

## Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Portuguese

**BIOCARE**  
M E D I C A L

11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. AmJ Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Romanian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Utilizarea prevăzută:

Pentru *in vitro* Utilizare pentru diagnosticare

TheKit cromogen DAB betazoid este destinat utilizării fie în protocolele de colorare cu imunohistochimie (IHC) manuale sau automate pentru detectarea antigenelor întâia în țesuturi fixate în formol, încorporate în parafină (FFPE) atunci când este utilizat împreună cu sistemul de detectare adecvat și anticorpii primari. Interpretarea clinică a oricarei colorări sau absența acesteia ar trebui completată de studii morfologice și controale adecvate și ar trebui evaluată în contextul istoricului clinic al pacientului și al altor teste de diagnostic de către un patolog calificat.

## Rezumat și explicație:

3,3' Diaminobenzidină (DAB) este un cromogen bine stabilit utilizat în protocolele de colorare IHC care, în prezența unei enzime peroxidază de hrean (HRP), produce un precipitat maro care este insolubil în solventi organici și poate fi acoperit cu un mediu de montare permanent. Acest produs vine într-un sistem cu două componente constând dintr-un cromogen DAB stabil lichid și un tampon de substrat DAB. Culoarea amestecului tampon de cromogen poate varia de la incolor la maro pal. Proprietățile de colorare nu sunt afectate de culoarea amestecului tampon de cromogen. Betazoid DAB este o formulare foarte stabilă. Betazoid DAB poate fi utilizat atât manual, cât și pe coloranții automate.

## Principiul procedurii:

Acest cromogen DAB din kit-ul Betazoid DAB Chromogen, atunci când este utilizat în testarea IHC a secțiunilor de țesut FFPE, permite vizualizarea antigenelor prin aplicarea secvențială a unui anticorp specific la antigen (anticorp primar), un anticorp secundar la anticorpul primar (anticorp/sondă optional link), un complex enzimatic și un substrat cromogen cu etape de spălare interpuze. Activarea enzimatice a cromogenului are ca rezultat un produs de reacție vizibil la locul antigenului. Eșantionul poate fi apoi contricolorat și acoperit cu lamela. Rezultatele sunt interpretate folosind o lumină microscop și ajută la diagnosticul diferențial al proceselor fiziopatologice, care pot sau poate să nu fie asociat cu un anumit antigen.

## Materiale și metode:

### Reactivi furnizați:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Reconstituire, amestecare, diluare, titrare:

Kitul Betazoid DAB Chromogen este optimizat pentru utilizare cu anticorpi Biocare și reactivi auxiliari și trebuie diluat chiar înainte de utilizare. Se amestecă 1 picătură (32µL) de cromogen DAB per 1,0 ml de tampon de

substrat DAB. Soluția de lucru DAB este stabilă timp de 5 zile dacă este păstrată la 2-8°C.

## Aplicații cunoscute:

Imunohistochimie (țesuturi încorporate în parafină fixate în formol)

## Furnizat ca:

Cromogenul betazoid DAB

Soluție DAB. Consultați Fișa cu date de securitate pentru detalii suplimentare.

## Tampon de substrat DAB betazoid

Soluția tamponată conține soluție de peroxid de hidrogen 3%. Consultați Fișa cu date de securitate pentru detalii suplimentare.

## Materiale și reactivi necesari, dar nefurnizați:

Lame de microscop, încărcate pozitiv

Controale tisulare pozitive și negative

Camera de deschis\* sau cupor de uscare similar (optional)

Xilen sau înlocuitor de xilen

Etilal sau alcool reactiv

Camera de decloaking\* sau oala sub presiune similară (optional)

Apă deionizată sau distilată

tampon de spălare\*

Reactivi de pretratare\* (optional)

Digestie enzimatică\* (optional)

bloc de peroxidaza\*

Bloc de proteine\* (optional)

Anticorp primar\*

Reactivi de control negativ\*

Truse de detectare\*

Hematoxilină\* (contracolor)

Reactiv de albastru\*

Mediu de montare\*

Sticlă de acoperire

Microscop cu lumină (mărire 40-400X)

\* Produse medicale Biocare: Consultați site-ul web Biocare Medical aflat la <http://biocare.net> pentru informații privind numerele de catalog și comenzi. Anumiți reactivi enumerate mai sus se bazează pe aplicații specifice și pe sistemul de detectare utilizat.

## Depozitare și stabilitate:

A se păstra la 2-8°C până la 8°C. Produsul este stabil până la data de expirare imprimată pe eticheta flaconului atunci când este păstrat în aceste condiții. Nu utilizați după data de expirare. Depozitarea în orice alte condiții decât cele specificate trebuie verificată. Reactivii diluați trebuie utilizati prompt conform instrucțiunilor. Reactivul diluat neutilitat este stabil timp de 5 zile dacă este păstrat la 2-8°C. Stabilitatea reactivului diluat de utilizator peste 5 zile nu a fost stabilită de Biocare.

Controalele pozitive și negative trebuie efectuate simultan cu toate probele pacientului. Dacă se observă o colorare neașteptată care nu poate fi explicată prin variații ale procedurilor de laborator și se suspectează o problemă cu anticorpul, contactați Asistența Tehnică Biocare la 1-800-542-2002 sau prin intermediul informațiilor de asistență tehnică furnizate pe [biocare.net](http://biocare.net).

## Pregătirea probei:

Tesuturile fixate în formol sunt adecvate pentru utilizare înainte de încorporarea parafinei. Tesuturile osoase trebuie decalcificate înainte de prelucrarea țesuturilor pentru a facilita tăierea țesuturilor și pentru a preveni deteriorarea lamelor microtomului.<sup>1,2</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Romanian

**BIOCARE**  
MEDICAL

Tesuturile fixate și încorporate în mod corespunzător care exprimă antigenul sănătății specificat trebuie păstrate într-un loc răcoros. Actul Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) din 1988 impune în 42 CFR§493.1259(b) că „laboratorul trebuie să rețină lamele colorate cel puțin zece ani de la data examinarea și păstrarea blocurilor de specimene cel puțin doi ani de la data examinării.”<sup>5</sup>

## Tratamentul tesuturilor înainte de colorare:

Efectuați recuperarea epitopului indușă de căldură (HIER) conform protocolului recomandat de mai jos. S-a demonstrat că utilizarea de rutină a HIER înainte de IHC reduce la minimum inconsistența și standardizează colorarea.<sup>4,5</sup>

### Avertisment și precauții:

1. DAB este cunoscut ca fiind un cancerigen suspectat.
2. Nu expuneti componentele DAB la lumină puternică sau la lumina directă a soarelui
3. DAB poate provoca sensibilizarea pielii. Evitați contactul cu pielea și ochii.
4. Purtăți mănuși și îmbrăcăminte de protecție și luați măsuri de precauție rezonabile la manipulare, deoarece DAB este clasificat ca un pericol și poate provoca cancer și este suspectat că provoacă defecte genetice.
5. Manipulați materialele de origine umană sau animală ca potential periculoase biologice și eliminați astfel de materiale cu măsurile de precauție corespunzătoare. În cazul expunerii, respectați directivele de sănătate ale autorităților responsabile acolo unde este utilizat.<sup>6,7</sup>
6. Specimenele, înainte și după fixare, și toate materialele expuse acestora trebuie manipulate ca și cum ar fi capabile să transmită infecția și eliminate cu măsurile de precauție corespunzătoare. Nu pipetați niciodată reactivii pe gură și evitați contactul pielii și mucoaselor cu reactivii și mostrele. Dacă reactivii sau mostrele vin în contact cu zone sensibile, spălați-vă cu cantități mari de apă.<sup>8</sup>
7. Contaminarea microbiană a reactivilor poate duce la o creștere a colorației nespecifice.
8. Timpii de incubare sau alte temperaturi decât cele specificate pot da rezultate eronate. Utilizatorul trebuie să valideze orice astfel de modificare.
9. Nu utilizați reactiv după data de expirare imprimată pe flacon.
10. Reactivul (reactivii) kit-ului de detectare a micropolimerului este optimizat(i) și gata de utilizare cu anticorpi Biocare și reactivi auxiliari. Consultați instrucțiunile de utilizare a anticorpului primar și a altor reactivi auxiliari pentru protoalele și condițiile recomandate de utilizare.
11. Respectați cerințele autorităților locale și/sau de stat pentru metoda de eliminare.
12. FDS este disponibilă la cerere și se află la <http://biocare.net>.
13. Raportați orice incidente grave legate de acest dispozitiv contactând reprezentantul local Biocare și autoritatea competență aplicabilă a statului membru sau a țării în care se află utilizatorul.

Acest kit de cromogen conține componente clasificate așa cum este indicat în tabelul de mai jos, în conformitate cu Regulamentul (CE) nr. 1272/2008

pericol	Cod	Declarație de pericol
	H314 H350	Suspectat de a provoca defecte genetice Poate provoca cancer

## Instructiuni de folosire:

Reactivii kit-ului de cromogen sunt optimizați pentru utilizare cu anticorpi Biocare și reactivi auxiliari. Consultați instrucțiunile de utilizare a anticorpului primar și a altor reactivi auxiliari pentru protoalele și condițiile recomandate de utilizare. Timpii și temperaturile de incubare vor varia în funcție de protocolul specific de anticorpi urmat.

Când utilizați un instrument automat de colorare, consultați manualul de utilizare al instrumentului specific și instrucțiunile de utilizare pentru parametrii de funcționare.

### Etape procedurale generale pentru efectuarea IHC:

1. Deparafinizare: Deparafiniză lamele în Slide Brite sau xilen. Hidratează lamele într-o serie de alcoolii clasificați până la apă.
2. Bloc de peroxid: Blocați timp de 5 minute cu Peroxidized 1.
3. Soluție/Protocol de pretratare: Vă rugăm să consultați fișa de date a anticorpului primar respectiv pentru soluția și protocolul de pretratare recomandate.
4. Bloc de proteine (Optional): Incubați timp de 5-10 minute la temperatura camerei (RT) cu Background Punisher.
5. Anticorp primar: Vă rugăm să consultați fișa de date a anticorpului primar respectiv pentru timpul de incubație.
6. Sondă (numai anticorpi de șoarece): Incubați timp de 5-15 minute la temperatura camerei cu Sonda de șoarece MACH 4.
7. Polimer: Se incubează timp de 10-20 de minute pentru anticorpi de șoarece sau 30 de minute pentru anticorpi de iepure la RT cu polimer MACH 4 HRP.
8. Cromogen: Incubați timp de 5 minute la temperatura camerei cu DAB Biocare.
9. Contracolorare: Contracolorare cu hematoxilină. Clătiți cu apă deionizată. Aplicați soluția de albastru Tacha timp de 1 minut. Clătiți cu apă deionizată.

### Note tehnice:

1. Folosiți TBS pentru etapele de spălare.

### Control de calitate:

Consultați Standardele de calitate CLSI pentru proiectarea și implementarea testelor imunohistochimice; Ghid aprobat-A două ediție (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA SUA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

### Control pozitiv al tesuturilor:

Materialele de control pozitiv extern trebuie să fie probe proaspete fixate, procesate și încorporate cât mai curând posibil, în același mod ca probele pacientului. Controalele pozitive ale țesuturilor indică țesuturile pregătite corect și tehnicele adecvate de colorare. Un control de țesut extern pozitiv pentru fiecare set de condiții de testare ar trebui să fie inclus în fiecare cursă de colorare.

Tesuturile utilizate pentru materialele de control pozitiv extern trebuie selectate din mostre de pacient cu niveluri scăzute bine caracterizate ale activității sănătății pozitive care dă colorare pozitivă slabă. Nivelul scăzut de pozitivitate pentru controalele pozitive externe este conceput astfel încât să asigure detectarea modificărilor subtile ale sensibilității anticorpilor primari din instabilitate sau probleme cu metodologia IHC. Lamelele de control al țesuturilor disponibile comercial sau mostrele procesate diferă de eșantioanele pacientului validează doar performanța reactivului și nu verifică pregătirea țesuturilor.

Controalele de țesut pozitive cunoscute ar trebui utilizate numai pentru monitorizarea performanței corecte a țesuturilor procesate și a reactivilor de testare, mai degrabă decât ca ajutor în formularea unui diagnostic specific al probelor de pacient. Dacă controalele pozitive ale țesuturilor nu reușesc să demonstreze o colorare pozitivă, rezultatele cu probele de testat trebuie considerate nevalide.

### Controlul negativ al țesuturilor:

Utilizați un control de țesut negativ fixat, procesat și încorporat într-o manieră identică cu esantionul(e) pacientului la fiecare cursă de colorare pentru a verifica specificitatea anticorpului primar IHC pentru demonstrarea antigenului sănătății și pentru a oferi o indicație a colorării specifice de fond

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Romanian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

(colorare fals pozitivă). De asemenea, varietatea diferitelor tipuri de celule prezente în majoritatea secțiunilor de țesut poate să fie utilizate de către laborator ca locuri de control negativ intern pentru a verifica performanța IHC specificații. Tipurile și sursele de specimene care pot fi utilizate pentru țesutul negativ controalele sunt listate în secțiunea Caracteristici de performanță.

Dacă apare o colorare specifică (colorare fals pozitivă) în controlul negativ al țesutului, rezultatele cu mostrele pacientului trebuie considerate nevalide.

#### Controlul reactiv negativ nespecific:

Utilizați un control reactiv negativ nespecific în locul anticorpului primar cu o secțiune din fiecare specimen de pacient pentru a evalua colorarea nespecifică și permit o mai bună interpretare a colorării specifice la locul antigenului. În mod ideal, un control reactiv negativ conține un anticorp produs și preparat (adică diluat la aceeași concentrație folosind același diluant) pentru a fi utilizat în același mod ca anticorpul primar, dar nu prezintă reactivitate specifică cu țesuturile umane în aceeași matrice/soluție ca și soluția anticorp primar. Numai diluantul poate fi utilizat ca o alternativă mai puțin dorită față de controalele negative descrise anterior. Perioada de incubație pentru controlul reactiv negativ trebuie să corespundă cu cea a anticorpului primar.

Când sunt utilizate panouri de mai mulți anticorpi pe secțiuni în serie, zonele cu colorare negativă ale unei lame pot servi ca un control de fond negativ/nespecific de legare pentru alți anticorpi. Pentru a diferenția activitatea enzimatică endogene sau legarea nespecifică a enzimelor de imunoreactivitatea specifică, țesuturile suplimentare ale pacientului pot fi colorate exclusiv cu substrat-cromogen sau complexe enzimatic (PAP, avidină-biotină, streptavidină) și respectiv substrat-cromogen.

#### Verificarea testului:

Înainte de utilizarea inițială a unui anticorp sau a unui sistem de colorare într-o procedură de diagnosticare, utilizatorul trebuie să verifice specificitatea anticorpului testându-l pe o serie de țesuturi interne cu caracteristici de performanță imunohistochimice cunoscute reprezentând țesuturi pozitive și negative cunoscute. Consultați procedurile de control al calității prezentate anterior în această secțiune a prospectului produsului și recomandările de control al calității din Programul de certificare CAP.<sup>10</sup> pentru imunohistochimie și/sau ghidul NCCLS IHC<sup>11</sup>. Aceste proceduri de control al calității trebuie repetate pentru fiecare lot nou de anticorpi sau ori de câte ori există o modificare a parametrilor de analiză. Țesuturile enumerate în secțiunea Caracteristici de performanță sunt potrivite pentru verificarea testului.

#### Depanare:

Urmați recomandările protocolului specific anticorpilor conform fișei de date furnizate. Dacă apar rezultate atipice, contactați asistența tehnică Biocare la 1-800-542-2002.

#### Interpretarea colorării:

Kit-ul Betazoid DAB Chromogen produce o reacție de culoare maro la locurile antigenului localizate de anticorpul primar. Înainte de interpretarea rezultatelor pacientului, colorarea controalelor trebuie evaluată de un patolog calificat. Martori negativi sunt evaluati și comparați cu lamele colorate pentru a se asigura că orice colorare observată nu este rezultatul interacțiunilor nespecifice.

#### Control pozitiv al țesuturilor:

Controlul pozitiv al țesutului colorat cu anticorpul indicat trebuie examinat mai întâi pentru a se asigura că toți reactivii funcționează corect. Colorarea adecvată a celulelor tintă (așa cum s-a indicat mai sus) indică reactivitate pozitivă. Dacă controalele pozitive ale țesuturilor nu reușesc să demonstreze

o colorare pozitivă, orice rezultat cu probele de testat trebuie considerat nevalid.

Culoarea produsului de reacție poate varia în funcție de cromogenii substratului utilizat. Consultați prospecțele de ambalaj pentru substrat pentru reacțiile de culoare așteptate. Mai mult, metacromazia poate fi observată în variatiile metodei de colorare.<sup>12</sup>

Când se folosește o contracolorare, în funcție de durata de incubare și de potență contracolorului utilizat, contracolorarea va avea ca rezultat o colorare a nucleilor celulare. Contracolorarea excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea corectă a rezultatelor. Consultați protocoalele pentru contracolorarea recomandată.

#### Controlul negativ al țesuturilor:

Controlul negativ al țesuturilor trebuie examinat după controlul pozitiv al țesutului pentru a verifica specificitatea etichetării antigenului tintă de către anticorpul primar. Absenta colorației specifice în controlul negativ al țesutului confirmă lipsa reactivității încrucisate a anticorpilor la celule/componentele celulare. Dacă apare o colorare specifică (colorare fals pozitivă) în controlul extern negativ al țesutului, rezultatele cu specimenul pacientului trebuie considerate nevalide.

Colorația nespecifică, dacă este prezentă, are de obicei un aspect difuz. Colorarea sporadică a țesutului conjunctiv poate fi observată și în secțiuni din țesuturi fixate în exces de formol. Utilizați celule intace pentru interpretarea rezultatelor colorării. Celulele necrotice sau degenerate se colorează adesea nespecific.

#### Tesutul pacientului:

Examinați mostrele pacientului colorate cu anticorpul indicat ultimul. Intensitatea colorării pozitive trebuie evaluată în contextul oricărei colorări de fond nespecifice a controlului reactiv negativ. Ca și în cazul oricărui test imunohistochimic, un rezultat negativ înseamnă că antigenul nu a fost detectat, nu că antigenul a fost absent în celulele/tesutul testat. Dacă este necesar, utilizați un panou de anticorpi pentru a identifica reacțiile false-negative.

Consultați Rezumatul și Explicația, Limitările și Caracteristicile de performanță pentru informații specifice privind imunoreactivitatea indicată a anticorpilor.

#### Limitări:

##### Limitări generale:

1. Pentru *in vitro* Utilizarea diagnosticului (IVD).
2. Acest produs este doar pentru uz profesional: Imunohistochimia este un proces de diagnosticare în mai multe etape care constă în pregătire specializată în selectarea reactivilor corespunzătoare; selecția, fixarea și prelucrarea țesuturilor; prepararea lamei IHC; și interpretarea rezultatelor colorării.
3. Pentru utilizare numai pe bază de prescripție medicală. (Numai Rx)
4. Colorarea țesuturilor depinde de manipularea și prelucrarea țesutului înainte de colorare. Fixarea necorespunzătoare, înghețarea, dezgehețarea, spălarea, uscarea, încălzirea, secționarea sau contaminarea cu alte țesuturi sau fluide pot produce artefacte, captarea anticorpilor sau rezultate false negative. Rezultatele inconveniente se pot datora variațiilor în metodele de fixare și încorporare sau neregularităților inerente în țesut.<sup>14</sup>
5. Contracolorarea excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea corectă a rezultatelor.
6. Interpretarea clinică a oricărei colorări pozitive sau negative trebuie evaluată în contextul prezentării clinice, al morfologiei și al altor criterii histopatologice. Interpretarea clinică a oricărei colorări pozitive sau negative ar trebui să fie completată de studii morfologice care utilizează

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Romanian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

- controale interne și externe pozitive și negative adecvate, precum și alte teste de diagnosticare. Este responsabilitatea unui patolog calificat care este familiarizat cu utilizarea corectă a anticorpilor, reactivilor și metodelor IHC să interpreteze toți pasii utilizati pentru pregătirea și interpretarea preparatului final IHC.
7. Protocolele optime pentru o anumită aplicație pot varia. Acestea includ, dar nu se limitează la fixare, metoda de recuperare a căldurii, timpii de incubare, diluarea anticorpilor, grosimea secțiunii de țesut și trusa de detectare utilizată. Consultați instrucțiunile de utilizare a anticorpului primar și a altor reactivi auxiliari pentru protocolele și condițiile recomandate de utilizare. Recomandările și protocolele din fișa de date se bazează pe utilizarea exclusivă a produselor Biocare. În cele din urmă, este responsabilitatea investigatorului să determine condițiile optime.
  8. Acest produs nu este destinat utilizării în citometria în flux. Caracteristicile de performanță nu au fost determinate pentru citometria în flux.
  9. Țesuturile de la persoane infectate cu virusul hepatitei B și care conțin antigenul de suprafață al hepatitei B (HBsAg) pot prezenta colorare nespecifică cu peroxidază de hrean.<sup>14</sup>
  10. Reaktivii pot demonstra reacții neașteptate în țesuturile netestate anterior. Posibilitatea unor reacții neașteptate chiar și în grupurile de țesuturi testate nu poate fi eliminată complet din cauza variabilității biologice a exprimării antigenului în neoplasmă sau în alte țesuturi patologice.<sup>15</sup> Contactați asistența tehnică Biocare la 1-800-542-2002 sau prin intermediul informațiilor de asistență tehnică furnizate pe biocare.net, cu reacții neașteptate documentate.
  11. Serurile normale/neimune din aceeași sursă animală ca și antiserurile secundare utilizate în etapele de blocare pot provoca rezultate fals negative sau fals pozitive din cauza autoanticorpilor sau a anticorpilor naturali.
  12. Rezultate fals pozitive pot fi observate din cauza legării neimunologice a proteinelor sau a produselor de reacție substrat. Ele pot fi, de asemenea, cauzate de activitatea pseudo-peroxidazei (eritrocite), activitatea peroxidazei endogene (citocromul C) sau biotina endogenă (de exemplu, ficat, sân, creier, rinichi), în funcție de tipul de imunocolor utilizat.<sup>13</sup>
  13. Un rezultat negativ înseamnă că antigenul nu a fost detectat, nu că antigenul a fost absent în celulele sau țesutul examinat.

#### Limitări specifice produsului:

Fără limitări suplimentare specifice produsului

#### Caracteristici de performanță:

Colorarea a fost efectuată utilizând protocolele furnizate în instrucțiunile specifice de utilizare a anticorpilor sau conform specificațiilor. Sensibilitatea și specificitatea colorării au fost evaluate într-o serie de tipuri de țesut normal și neoplazic evaluate în timpul dezvoltării anticorpilor primari.

#### Reproductibilitate:

Reproductibilitatea sistemelor de detectare și a reactivilor de sistem Biocare este verificată printr-o măsurare a preciziei intermediare în care au fost testate diferite loturi de reactivi pe o perioadă lungă de timp folosind diversi operatori, analiști, loturi de reactivi, probe de țesut și echipamente. Colorația obținută pentru fiecare reactiv de detectie evaluat a fost consecventă și a fost efectuată conform așteptărilor.

#### Depanare:

1. Nicio colorare a niciunei lame – Verificați pentru a determina că au fost utilizate țesuturi de control pozitiv adecvate, anticorpi și produse de detectare. Verificați dacă există îndepărțarea sau pretratarea ceară incompletă sau necorespunzătoare.

2. Colorare slabă a tuturor lamelor – Verificați pentru a determina că au fost utilizate țesuturi de control pozitiv adecvate, anticorpi și produse de detectare.
3. Fundal excesiv al tuturor diapositivelor – Pot exista niveluri ridicate de biotină endogenă (dacă se utilizează produse de detectie pe bază de biotină), activitate HRP endogenă de conversie a cromogenului în produs final colorat (utilizați bloc de peroxidază) sau interacțiune proteică nespecifică în exces (utilizați o proteină bloc, cum ar fi soluția de blocare pe bază de ser sau cazeină).
4. Secțiunile de țesut spăla lamelele în timpul incubației – Verificați lamele pentru a vă asigura că sunt încărcate pozitiv.
5. Colorare specifică prea întunecată – Verificați protocolul pentru a determina dacă pe lame a fost aplicat titrul adecvat de anticorpi, precum și timpii de incubare corespunzători pentru toți reactivii. În plus, asigurați-vă că protocolul are suficienți pași de spălare pentru a elimina excesul de reactivi după finalizarea etapelor de incubare.

#### Referinte:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

97/18



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Slovak

**BIOCARE**  
MEDICAL

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Zamýšľané použitie:

Pre *in vitro* Diagnostické použitie

The Betazoid DAB Chromogen Kit je určený na použitie v manuálnych alebo automatických imunohistochemických (IHC) protokoloch farbenia na detekciu cielových antigenov v tkanivách fixovaných vo formalíne, zaliatých v parafíne (FFPE), ak sa používa v spojení s príslušným detekčným systémom a primárnymi protilátkami. Klinická interpretácia akéhokoľvek zafarbenia alebo jeho absencie by mala byť doplnená morfologickými štúdiami a nálezitými kontrolami a mala by byť hodnotená v kontexte pacientovej klinickej anamnézy a iných diagnostických testov kvalifikovaným patológom.

## Zhrnutie a vysvetlenie:

3,3' diaminobenzidín (DAB) je dobre zavedený chromogén používaný v protokoloch farbenia IHC, ktorý v prítomnosti enzýmu chrenovej peroxidázy (HRP) vytvára hnedú zrazeninu, ktorá je neropustná v organických rozpúšťadlach a môže byť prekrytá permanentným montážnym médium. Tento produkt sa dodáva v dvojzložkovom systéme pozostávajúcim z tekutého stabilného DAB chromogénu a DAB substrátového pufra. Farba zmesi chromogénového pufra sa môže meniť od bezfarebnej po svetlohnedú. Farbiace vlastnosti nie sú ovplyvnené farbou zmesi chromogénnego pufra. Betazoid DAB je prípravok, ktorý je veľmi stabilný. Betazoid DAB je možné použiť manuálne aj na automatických farbiacich strojoch.

## Princíp postupu:

Tento DAB chromogén v súprave Betazoid DAB Chromogen Kit, keď sa používa pri testovaní IHC tkanivových rezov FFPE, umožňuje vizualizáciu antigenov prostredníctvom sekvenčnej aplikácie špecifická protilátku k antigenu (primárna protilátku), sekundárna protilátku k primárnej protilátkе (voliteľná väzba protilátku/sonda), enzymový komplex a chromogénny substrát s vloženými krokmi premývania. Enzymatická aktivácia chromogénu viedie k viditeľnému reakčnému produktu v mieste antigenu. Vzorka sa potom môže kontrastne zafarbiť a zakryť krycím skličkom. Výsledky sa interpretujú pomocou svetla mikroskop a pomôcka pri diferenciálnej diagnostike patofiziologických procesov, ktoré môžu resp nemusia byť spojené s konkrétnym antigenom.

## Materiály a metódy:

### Dodávané činidlá:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Rekonštitúcia, miešanie, riedenie, titrácia:

Súprava Betazoid DAB Chromogen Kit je optimalizovaná na použitie s protilátkami Biocare a pomocnými činidlami a musí sa zriediť tesne pred

použitím. Zmiešajte 1 kvapku (32 µl) DAB Chromogen na 1,0 ml DAB substrátového pufra. Pracovný roztok DAB je stabilný 5 dní, ak sa skladuje pri teplote 2 – 8 °C.

## Známe aplikácie:

Imunohistochémia (tkanivá fixované v parafíne fixované vo formalíne)

## Dodávané ako:

*Betazoid DAB Chromogen*

DAB riešenie. Ďalšie podrobnosti nájdete v karte bezpečnostných údajov.

## *Betazoidový DAB substrátový buffer*

Pufovaný roztok obsahuje 3% roztok peroxidu vodíka. Ďalšie podrobnosti nájdete v karte bezpečnostných údajov.

## Potrebné materiály a činidlá, ktoré nie sú súčasťou dodávky:

Mikroskopické sklička, kladne nabité

Pozitívne a negatívne kontroly tkaniva

Púštna komora\* alebo podobná Sušiaca pec (voliteľné)

Xylén alebo náhrada xylénu

Etanol alebo reagencný alkohol

Odmast'ovacia komora\* alebo podobný tlakový hrniec (voliteľné)

Deionizovaná alebo destilovaná voda

Premývací pufor\*

Činidlá na predúpravu\* (voliteľné)

Enzymové trávenie\* (voliteľné)

Peroxidázový blok\*

Proteinový blok\* (voliteľné)

Primárna protilátka\*

Negatívne kontrolné činidlá\*

Detekčné súpravy\*

Hematoxylín\* (kontrafarba)

Blueingovo činidlo\*

Montážne médium\*

Krycie sklo

Svetelný mikroskop (40-400x zväčšenie)

\* Biocare Medical Products: Informácie o katalógových číslach a objednávaní nájdete na webovej stránke Biocare Medical na adrese <http://biocare.net>. Niektoré činidlá uvedené vyššie sú založené na špecifickej aplikácii a použitom detekčnom systéme.

## **Skladovanie a stabilita:**

Skladujte pri teplote 2°C až 8°C. Ak sa liek uchováva za týchto podmienok, je stabilný do dátumu expirácie vytlačeného na štítku injekčnej liekovky. Nepoužívajte po dátume expirácie. Skladovanie za akýchkoľvek iných podmienok, ako sú uvedené, musí byť overené. Zriadené činidlá by sa mali použiť okamžite podľa pokynov. Nepoužité zriadené činidlo je stabilné 5 dní, ak sa uchováva pri teplote 2-8°C. Spoločnosť Biocare nestanovila stabilitu činidla naradeného používateľom dlhšie ako 5 dní.

Positívne a negatívne kontroly by sa mali vykonávať súčasne so všetkými vzorkami pacienta. Ak spozorujete neočakávané zafarbenie, ktoré nemožno vysvetliť odchylkami v laboratórnych postupoch a máte podezrenie na problém s protilátkou, kontaktujte technickú podporu spoločnosti Biocare na čísle 1-800-542-2002 alebo prostredníctvom informácií o technickej podpore poskytovaných na biocare.net.

## **Príprava vzorky:**

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

98/18



 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

6827 AT Arnhem

The Netherlands

TP v1 (03/30/2022)

Tel: 800-799-9499 | [www.biocare.net](http://www.biocare.net) | Fax: 925-603-8080

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Slovak

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Tkanivá fixované vo formalíne sú vhodné na použitie pred zlatiatím do parafínu. Kostrné tkanivá by sa mali pred spracovaním tkaniva odvápníť, aby sa uľahčilo rezanie tkaniva a zabránilo sa poškodeniu čepiel'ok mikrotómu.<sup>1,2</sup>

Správne fixované a zlatiate tkanivá exprimujúce špecifikovaný cielový antigen by sa mali skladovať na chladnom mieste. Zákon o zlepšovaní klinických laboratórií (CLIA) z roku 1988 vyžaduje v 42 CFR§493.1259(b), že „Laboratórium musí uchovávať zafarbené sklíčka najmenej desať rokov od dátumu vyšetrenia a uchovávať bloky vzoriek najmenej dva roky od dátumu vyšetrenia.<sup>3</sup>

## **Ošetrenie tkanív pred farbením:**

Vykonalajte teplom indukované vyhládávanie epitopu (HIER) podľa odporúčaného protokolu uvedeného nižšie. Ukázalo sa, že rutinné používanie HIER pred IHC minimalizuje nekonistentnosť a štandardizuje farbenie.<sup>4,5</sup>

## **Varovanie a bezpečnostná opatrenia:**

1. Je známe, že DAB je podozrivý karcinogén.
2. Nevystavujte komponenty DAB silnému svetu ani priamemu slnečnému žiareniu
3. DAB môže spôsobiť senzibilizáciu pokožky. Zabráňte kontaktu s pokožkou a očami.
4. Pri manipulácii používajte rukavice a ochranný odev a prijmite primerané opatrenia, pretože DAB je klasifikovaný ako nebezpečný a môže spôsobiť rakovinu a je podozrenie, že spôsobuje genetické defekty.
5. Zaobchádzajte s materiálmi ľudského alebo živočíšneho pôvodu ako s potenciálne biologicky nebezpečnými a likvidujte ich s náležitými opatreniami. V prípade expozície postupujte podľa zdravotníckych smerníc zodpovedných orgánov, kde sa používa.<sup>6,7</sup>
6. So vzorkami pred a po fixáciu a so všetkými materiálmi, ktoré sú im vystavené, by sa malo zaobchádzať tak, ako keby boli schopné prenášať infekciu, a mali by sa likvidovať s náležitými opatreniami. Nikdy nepipetujte reagencie ústami a vyhýbajte sa kontaktu kože a sliznic s činidlami a vzorkami. Ak sa reagencie alebo vzorky dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, umyte ich veľkým množstvom vody.<sup>8</sup>
7. Mikrobiálna kontaminácia činidel môže viesť k zvýšeniu nešpecifického zafarbenia.
8. Iné inkubačné časy alebo teploty, ako sú uvedené, môžu viesť k chybným výsledkom. Používateľ musí každú takúto zmenu potvrdiť.
9. Nepoužívajte činidlo po dátume expirácie vytláčenom na injekčnej liekovke.
10. Činidlá súpravy na detekciu mikropolymerov sú optimalizované a pripravené na použitie s protílatkami Biocare a pomocnými činidlami. Odporúčané protokoly a podmienky použitia nájdete v pokynoch na použitie primárnej protílatty a ďalších pomocných reagencií.
11. Dodržiavajte požiadavky miestnych a/alebo štátnych orgánov na spôsob likvidácie.
12. KBÚ je k dispozícii na požiadanie a nachádza sa na <http://biocare.net>.
13. Nahláste akékoľvek väzne incidenty súvisiace s týmto zariadením kontaktovaním miestneho zástupcu spoločnosti Biocare a príslušným orgánom členského štátu alebo krajiny, kde sa používateľ nachádza.

Táto chromogénová súprava obsahuje komponenty klasifikované ako je uvedené v tabuľke nižšie v súlade s Nariadením (ES) č. 1272/2008

Nebezpečenstvo	kód	Vyhľásenie o nebezpečnosti
	H314 H350	Podozrenie, že spôsobuje genetické defekty Môže spôsobiť rakovinu

## **Inštrukcie na používanie:**

Činidlá súpravy chromogen sú optimalizované na použitie s protílatkami Biocare a pomocnými činidlami. Odporúčané protokoly a podmienky použitia nájdete v pokynoch na použitie primárnej protílatty a ďalších pomocných reagencií. Inkubačné časy a teploty sa budú lísiť v závislosti od špecifického protokolu protílatty, ktorý sa použije.

Pri používaní automatického farbiaceho prístroja si preštudujte prevádzkové parametre v návode na obsluhu konkrétnego prístroja a v návode na použitie.

## **Všeobecné procesné kroky na vykonávanie IHC:**

1. Deparafinizácia: Deparafinujte sklíčka pomocou Slide Brite alebo xylénu. Hydratujte sklíčka v sérii odstupňovaných alkoholov do vody.
2. Peroxidový blok: Blokujte 5 minút peroxidom 1.
3. Roztok/protokol na predúpravu: Odporúčaný roztok a protokol na predúpravu nájdete v príslušnom údajovom liste primárnych protílátok.
4. Proteínový blok (voliteľný): Inkubujte 5-10 minút pri izbovej teplote (RT) s Background Punisher.
5. Primárna protílátka: Inkubačný čas nájdete v príslušnom údajovom liste primárnej protílatty.
6. Sonda (iba myšacie protílatty): Inkubujte 5-15 minút pri teplote miestnosti so sondou MACH 4 Mouse Probe.
7. Polymér: Inkubujte 10-20 minút pre myšie protílatty alebo 30 minút pre králičie protílatty pri teplote miestnosti s MACH 4 HRP polymérom.
8. Chromogén: Inkubujte 5 minút pri teplote miestnosti s Biocare's DAB.
9. Kontrafarbivo: Kontrafarbivo hematoxylinom. Opláchnite deionizovanou vodou. Aplikujte Tacha's Blueing Solution na 1 minútu. Opláchnite deionizovanou vodou.

## **Technické poznámky:**

1. Na premývanie použite TBS.

## **Kontrola kvality:**

Pozrite si štandardy kvality CLSI pre návrh a implementáciu imunohistochemických testov; Schválená smernica – druhé vydanie (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011.

## **Pozitívna kontrola tkaniva:**

Externé pozitívne kontrolné materiály by mali byť čerstvý vzorky fixované, spracované a zlatiate čo najskôr rovnakým spôsobom ako vzorka (vzorky) pacienta. Pozitívne kontroly tkaniva naznačujú správne pripravené tkanivá a správne techniky farbenia. Do každého cyklu farbenia by mala byť zahrnutá jedna pozitívna externá tkanivová kontrola pre každý súbor testovacích podmienok.

Tkanivá použité pre externé materiály pre pozitívnu kontrolu by sa mali vyberať zo vzoriek pacientov s dobre charakterizovanými nízkymi hladinami pozitívnej cielovej aktivity, ktorá poskytuje slabé pozitívne zafarbenie. Nízka úroveň pozitívity pre externé pozitívne kontroly je navrhnutá tak, aby zabezpečila detekciu jemných zmien citlivosti primárnej protílatty z nestabilitou alebo problémov s metodikou IHC. Komerčne dostupné tkanivové kontrolné sklíčka alebo vzorky spracované inak ako vzorka (vzorky) pacienta iba overujú účinnosť činidla a neoverujú prípravu tkaniva.

Známe pozitívne kontroly tkaniva by sa mali používať len na monitorovanie správneho výkonu spracovaných tkanív a testovacích činidel, a nie ako pomôcka pri formulovaní špecifickej diagnózy vzoriek pacientov. Ak pozitívne kontroly tkaniva neprekážu pozitívne zafarbenie, výsledky s testovanými vzorkami by sa mali považovať za neplatné.

## **Negatívna kontrola tkaniva:**

Na overenie špecifítivity primárnej protílatty IHC použite negatívnu tkanivovú kontrolu fixovanú, spracovanú a zapustenú rovnakým spôsobom ako vzorka (vzorky) pacienta pri každom cykle farbenia. preukázanie cielového antigénu

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Slovak

**BIOCARE**  
M E D I C A L

a poskytnutie indikácie špecifického zafarbenia pozadia (falošne pozitívne farbenie). Môže to byť aj množstvo rôznych typov buniek prítomných vo väčšine tkanivových rezov byť použité laboratóriom ako interné negatívne kontrolné miesta na overenie výkonu IHC technické údaje. Typy a zdroje vzoriek, ktoré možno použiť na negatívne tkanivo ovládacie prvky sú uvedené v časti Výkonnostné charakteristiky.

Ak sa v negatívnej kontrole tkaniva vyskytne špecifické zafarbenie (falošne pozitívne zafarbenie), výsledky so vzorkami pacienta by sa mali považovať za neplatné.

## Nešpecifická negatívna kontrola reagencií:

Použite nešpecifickú negatívnu kontrolu činidla namiesto primárnej protilátky s rezom každej vzorky pacienta na vyhodnotenie nešpecifického zafarbenia a umožňujú lepšiu interpretáciu špecifického zafarbenia v mieste antigénu. V ideálnom prípade obsahuje negatívna reagenčná kontrola protilátku vyrobenú a pripravenú (t. j. zriadenú na rovnakú koncentráciu použitím rovnakého riedidla) na použitie rovnakým spôsobom ako primárna protilátku, ale nevykazuje žiadnu špecifickú reaktivitu s ľudskými tkanivami v rovnakej matrici/roztoku ako primárna protilátku. Samotné riedidlo sa môže použiť ako menší žiaducia alternatíva k predtým opísaným negatívnym kontrolám činidlá. Inkubačná doba pre negatívnu reagenčnú kontrolu by mala zdôvodniť dobu primárnej protilátky.

Ked' sa na sériových rezoch použijú panely niekoľkých protilátkov, negatívne zafarbené oblasti jedného sklička môžu slúžiť ako negatívna/nešpecifická väzbová kontrola pozadia pre iné protilátky. Na odlišenie endogénnej enzymovej aktivity alebo nešpecifickej väzby enzymov od špecifickej imunoreaktivity môžu byť ďalšie tkanivá pacienta zafarbené výlučne substrát-chromogén alebo enzymovými komplexmi (PAP, avidín-biotín, streptavidín) a substrát-chromogén.

## Overenie testu:

Pred prvým použitím protilátky alebo farbiaceho systému v diagnostickom postupe by si mal používateľ overiť špecifickosť protilátky testovaním na sérii vlastných tkanív so známymi imunohistochemickými charakteristikami, ktoré predstavujú známe pozitívne a negatívne tkanivá. Pozrite si postupy kontroly kvality predtým uvedené v tejto časti príbalového letáku k produktu a odporúčania kontroly kvality certifikačného programu CAP<sup>10</sup> pre imunohistochémiu a/alebo usmernenie NCCLS IHC<sup>11</sup>. Tieto postupy kontroly kvality by sa mali opakovať pre každú novú šaržu protilátkov alebo vždy, keď dôjde k zmene parametrov testu. Na overenie testu sú vhodné tkanivá uvedené v časti Výkonnostné charakteristiky.

## Riešenie problémov:

Postupujte podľa odporúčaní protokolu špecifického pre protilátky podľa poskytnutého údajového listu. Ak sa vyskytnú atypické výsledky, kontaktujte technickú podporu spoločnosti Biocare na čísle 1-800-542-2002.

## Interpretácia farbenia:

Súprava Betazoid DAB Chromogen Kit vytvára hnedú farebnú reakciu na miestach antigénu lokalizovaných primárnu protilátkou. Pred interpretáciou výsledkov pacienta musí zafarbenie kontrol vyhodnotiť kvalifikovaný patológ. Negatívne kontroly sa vyhodnotia a porovnajú so zafarbenými skličkami, aby sa zabezpečilo, že akékoľvek pozorované zafarbenie nie je výsledkom nešpecifických interakcií.

## Pozitívna kontrola tkaniva:

Pozitívna tkanivová kontrola zafarbená indikovanou protilátkou by sa mala najskôr vyšetriť, aby sa zistilo, že všetky činidlá fungujú správne. Príslušné farbenie cielových buniek (ako je uvedené vyššie) svedčí o pozitívnej reaktivite. Ak pozitívne kontroly tkaniva neprekážu pozitívne zafarbenie, akékoľvek výsledky s testovanými vzorkami by sa mali považovať za neplatné.

Farba reakčného produktu sa môže meniť v závislosti od použitých substrátových chromogénov. Očakávané farebné reakcie nájdete v príbalových letákoch substrátu. Ďalej je možné pozorovať metachromáziu vo variantoch spôsobu farbenia.<sup>12</sup>

Ked' sa použije kontrastné farbenie, v závislosti od dĺžky inkubácie a účinnosti použitého kontrastného farbenia, kontrastné farbenie povedie k zafarbeniu bunkových jadier. Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže ohroziť správnu interpretáciu výsledkov. Odporúčané kontrastné farbenie nájdete v protokole(och).

## Negatívna kontrola tkaniva:

Negatívna tkanivová kontrola by sa mala vyšetriť po pozitívnej kontrole tkaniva, aby sa overila špecifickosť označenia cielového antigénu primárnu protilátkou. Nepričnosť špecifického zafarbenia v negatívnej kontrole tkaniva potvrzuje nedostatok krízovej reaktivity protilátky s bunkami/bunkovými zložkami. Ak sa v negatívnej vonkajšej kontrole tkaniva vyskytne špecifické zafarbenie (falošne pozitívne zafarbenie), výsledky so vzorkou pacienta by sa mali považovať za neplatné.

Nešpecifické sfarbenie, ak je prítomné, má zvyčajne difúzny vzhľad. Sporadicke zafarbenie spojivového tkaniva možno pozorovať aj na rezoch z tkanív nadmerne fixovaných formalínom. Na interpretáciu výsledkov farbenia použite neporušené bunky. Nekrotické alebo degenerované bunky sa často farbia nešpecificky.

## Tkanivo pacienta:

Preskúmajte vzorky pacientov zafarbené indikovanou protilátkou posledný. Intenzita pozitívneho zafarbenia by sa mala posúdiť v kontexte akéhokoľvek nešpecifického zafarbenia pozadia negatívnej kontroly s činidlom. Ako pri akomkoľvek imunohistochemickom teste, negatívny výsledok znamená, že antigén neboli detegovaný, nie že antigén chýbal v testovaných bunkách/tkanive. V prípade potreby použite panel protilátok na identifikáciu falošne negatívnych reakcií.

Špecifické informácie týkajúce sa indikovanej imunoreaktivity protilátkov nájdete v časti Súhrn a vysvetlenie, obmedzenia a výkonnostné charakteristiky.

## Obmedzenia:

### Všeobecné obmedzenia:

1. Pre *in vitro* diagnostické (IVD) použitie
2. Tento produkt je určený len na profesionálne použitie: Imunohistochémia je viackrokový diagnostický proces, ktorý pozostáva zo špecializovaného školenia vo výbere vhodných činidiel; výber tkaniva, fixácia a spracovanie; príprava podložného sklička IHC; a interpretácia výsledkov farbenia.
3. Na použitie len na lekársky predpis. (Len Rx)
4. Farbenie tkaniva závisí od manipulácie a spracovania tkaniva pred farbením. Nesprávna fixácia, zmrazovanie, rozmrázovanie, umývanie, sušenie, zahrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými tkanivami alebo tekutinami môže spôsobiť artefakty, zachytávanie protilátok alebo falošne negatívne výsledky. Nekonzistentné výsledky môžu byť spôsobené odchýlkami v metódach fixácie a zapustenia alebo prirodzenými nepravidelnosťami v tkanive.<sup>14</sup>
5. Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže ohroziť správnu interpretáciu výsledkov.
6. Klinická interpretácia akéhokoľvek pozitívneho alebo negatívneho zafarbenia by sa mala hodnotiť v kontexte klinického obrazu, morfológie a iných histopatologických kritérií. Klinická interpretácia akéhokoľvek pozitívneho alebo negatívneho zafarbenia by mala byť doplnená morfológickými štúdiami s použitím správnych pozitívnych a negatívnych vnútorných a vonkajších kontrol, ako aj iných diagnostických testov. Je zodpovednosťou kvalifikovaného patológova,

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Slovak

**BIOCARE**  
M E D I C A L

- ktorý je oboznámený so správnym používaním IHC protílátok, činidel a metód, interpretovať všetky kroky použité na prípravu a interpretáciu konečného IHC preparátu.
7. Optimálne protokoly pre konkrétnu aplikáciu sa môžu lísiť. Tieto zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na fixáciu, metódu získania tepla, inkubačné časy, riedenie protílátky, hrúbku tkanivového rezu a použitú detekčnú súpravu. Odporúčané protokoly a podmienky použitia nájdete v pokynoch na použitie primárnej protílátky a ďalších pomocných reagencií. Odporúčania a protokoly údajových listov sú založené na výhradnom používaní produktov Biocare. V konečnom dôsledku je zodpovednosťou výšetrovateľa určiť optimálne podmienky.
  8. Tento produkt nie je určený na použitie v prietokovej cytometrii. Výkonnostné charakteristiky neboli stanovené pre prietokovú cytometriu.
  9. Tkaniá od osôb infikovaných vírusom hepatitídy B a obsahujúce povrchový antigen hepatitídy B (HBsAg) môžu vykazovať nešpecifické zafarbenie chrenovou peroxidázou.<sup>14</sup>
  10. Reagencie môžu vykazovať neočakávané reakcie v predtým netestovaných tkaniach. Možnosť neočakávaných reakcií ani v testovaných skupinách tkaniov nie je možné úplne eliminovať z dôvodu biologickej variability expresie antigénu v novotvaroch alebo iných patologických tkaniach.<sup>15</sup> Kontaktujte technickú podporu spoločnosti Biocare na čísle 1-800-542-2002 alebo prostredníctvom informácií technickej podpory poskytnutých na biocare.net so zdokumentovanými neočakávanými reakciami.
  11. Normálne/neimunitné séra z rovnakého zvieracieho zdroja ako sekundárne antiséra použité v blokovacích krokoch môžu spôsobiť falóšne negatívne alebo falóšne pozitívne výsledky v dôsledku autoprotilátok alebo prirodzených protílátok.
  12. Falóšne pozitívne výsledky môžu byť pozorované v dôsledku neimunologickej väzby proteinov alebo produktov reakcie substrátu. Môžu byť spôsobené aj pseudoperoxidázovou aktivitou (erytrocyty), endogénou peroxidázovou aktivitou (cytochróm C) alebo endogénym biotínom (napr. pečeň, prsia, mozog, obličky) v závislosti od typu použitého imunočerivá.<sup>13</sup>
  13. Negatívny výsledok znamená, že antigen neboli detegovaný, nie že antigen chýbal v skúmaných bunkách alebo tkanive.

## Špecifické obmedzenia produktu:

Žiadne ďalšie špecifické obmedzenia produktu

## Výkonnostné charakteristiky:

Farbenie sa uskutočňovalo s použitím protokolov poskytnutých v návode na použitie špecifických pre protílátku alebo podľa špecifikácie. Citlivosť a špecifita farbenia sa hodnotila v celom rozsahu normálnych a neoplastickej typov tkaniov hodnotených počas vývoja primárnych protílátok.

## Reprodukcia:

Reprodukcia: Reprodukcia detekčných systémov Biocare a systémových činidel sa overuje meraním strednej presnosti, pri ktorom boli rôzne šarže činidel testované počas dlhého časového obdobia pomocou rôznych operátorov, analytikov, šarží činidel, vzoriek tkaniov a zariadení. Farbenie získané pre každé hodnotené detekčné činidlo bolo konzistentné a uskutočnilo sa podľa očakávania.

## Riešenie problémov:

1. Žiadne zafarbenie na skličkach – Skontrolujte, či sa použilo vhodné tkanivo pozitívnej kontroly, protílátka a detekčné produkty. Skontrolujte neúplné alebo nesprávne odstránenie vosku alebo predbežnú úpravu.
2. Slabé zafarbenie všetkých skličok – Skontrolujte, či sa použilo vhodné tkanivo pozitívnej kontroly, protílátka a detekčné produkty.

3. Nadmerné pozadie všetkých skličok – Môžu existovať vysoké hladiny endogénneho biotínu (ak používate detekčné produkty na báze biotínu), endogénna aktívita HRP premieňajúca chromogén na farebný konečný produkt (použite peroxidázový blok) alebo nadmerná nešpecifická proteínová interakcia (použite proteín blok, ako je blokovač roztok na báze séra alebo kazeínu).
4. Tkanivové rezy zmyjú sklička počas inkubácie – Skontrolujte sklička, aby ste sa uistili, že sú pozitívne nabité.
5. Špecifické zafarbenie je príliš tmavé – Skontrolujte protokol a zistite, či bol na skličko aplikovaný správny titier protílátok, ako aj správne inkubačné časy pre všetky činidlá. Okrem toho sa uistite, že protokol obsahuje dostatočný počet premývacích krovok na odstránenie nadbytočných činidel po dokončení inkubačných krovok.

## Referencie:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

101/118



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Slovenian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Predvidena uporaba:

Zain vitro Diagnostična uporaba

The Kromogen komplet Betazoid DAB je namenjen za uporabo v protokolih za ročno ali avtomatizirano imunohistokemijo (IHC) obarvanja za odkrivanje ciljnih antigenov v tkivih, fiksiranih s formalinom, v parafin (FFPE), kadar se uporablja v povezavi z ustreznim sistemom za odkrivanje in primarnimi protitelesi. Klinično interpretacijo kakršnega koli obarvanja ali njegove odsotnosti je treba dopolniti z morfološkimi študijami in ustreznimi kontrolami ter jo mora oceniti usposobljen patolog v kontekstu bolnikove klinične anamneze in drugih diagnostičnih testov.

## Povzetek in razlaganje:

3,3' diaminobenzidin (DAB) je dobro uveljavljen kromogen, ki se uporablja v protokolih barvanja IHC, ki v prisotnosti encima hrenove peroksidaze (HRP) proizvede rjavo oborino, ki je netopna v organskih topilih in jo je mogoče prekriti s trajnim medijem za pritrivitev. Ta izdelek je na voljo v dvokomponentnem sistemu, sestavljenem iz tekočega stabilnega DAB kromogena in substratnega pufera DAB. Barva mešanice kromogenega pufera se lahko spreminja od brezbarve do bledo rjave. Barva mešanice kromogenega pufera ne vpliva na lastnosti obarvanja. Betazoid DAB je formulacija, ki je zelo stabilna. Betazoid DAB se lahko uporablja tako ročno kot na avtomatskih barvalnikih.

## Načelo postopka:

Ta kromogen DAB v kompletu Betazoid DAB Chromogen Kit, kadar se uporablja pri IHC testiranju tkivnih odsekov FFPE, omogoča vizualizacijo antigenov z zaporedno uporabo specifično protitela proti antigenu (primarno protitelo), sekundarno protitela proti primarnemu protitelesu (neobvezno povezovalno protitelo/sonda), encimske kompleks in kromogeni substrat z vmesnimi koraki pranja. Posledica encimske aktivacije kromogena je viden reakcijski produkt na mestu antigena. Vzorec lahko nato obarvamo in prekrijemo. Rezultati se interpretirajo z uporabo luč mikroskopom in pomoč pri diferencialni diagnostiki patofizioloških procesov, ki lahko oz morda ni povezan z določenim antigenom.

## Materiali in metode:

Priloženi reagenti:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Rekonstitucija, mešanje, redčenje, titracija:

Betazoid DAB Chromogen Kit je optimiziran za uporabo s protitelesi Biocare in pomožnimi reagenti in ga je treba razredčiti tik pred uporabo. Zmešajte 1

kapljico (32 µl) DAB Chromogena na 1,0 ml substratnega pufera DAB. Delovna raztopina DAB je stabilna 5 dni, če je shranjena pri 2-8°C.

## Znane aplikacije:

Imunohistokemija (tkiva, fiksirana s formalinom in parafinom)

## Dobavljeno kot:

*Betazoid DAB kromogen*

DAB rešitev. Za dodatne podrobnosti glejte varnostni list.

## Substratni pufer Betazoid DAB

Puferska raztopina vsebuje 3 % raztopino vodikovega peroksida. Za dodatne podrobnosti glejte varnostni list.

## Potrebni materiali in reagenti, ki niso priloženi:

Mikroskopska stekelca, pozitivno nabita

Pozitivne in negativne kontrole tkiva

Puščavska komora\* ali podobna sušilna pečica (izbirno)

Ksilén ali nadomestek ksiléna

Etilanol ali reagentni alkohol

Komora za razkrivanje\* ali podoben lonec na pritisk (neobvezno)

Deionizirana ali destilirana voda

Pralni pufer\*

Reagent za predhodno obdelavo\* (neobvezno)

Encimska prebava\* (neobvezno)

Blok peroksidaze\*

Beljakovinski blok\* (neobvezno)

Primarno protitelo\*

Reagenti negativne kontrole\*

Kompleti za odkrivanje\*

Hematoksilin\* (protibarvanje)

Reagent za pomodrelo\*

Montažni medij\*

Pokrivo steklo

Svetlobni mikroskop (40-400-kratna povečava)

\* Biocare Medical Products: Za informacije o kataloških številkah in naročjanju obiščite spletno mesto Biocare Medical na naslovu <http://biocare.net>. Nekateri zgoraj navedeni reagenti temeljijo na specifični uporabi in uporabljenem sistemu odkrivanja.

## Shranjevanje in stabilnost:

Shranjujte pri 2°C do 8°C. Pri shranjevanju pod temi pogoji je izdelek stabilen do datuma izteka roka uporabnosti, ki je natisnjen na nalepki viale. Ne uporabljajte po preteku roka uporabnosti. Preveriti je treba shranjevanje pod kakršnimi koli pogoji, razen navedenih. Razredčene reagente je treba uporabiti takoj po navodilih. Neuporabljen razredčeni reagent je stabilen 5 dni, če ga shranjujete pri 2-8 °C. Biocare ni ugotovil stabilnosti uporabniško razredčenega reagenta več kot 5 dni.

Pozitivne in negativne kontrole je treba opraviti hkrati z vsemi vzorci bolnikov. Če opazite nepričakovano obarvanje, ki ga ni mogoče razložiti z variacijami v laboratorijskih postopkih, in obstaja sum na težavo s protitelesi, se obrnite na tehnično podporo Biocare na 1-800-542-2002 ali prek informacij o tehnični podpori na biocare.net.

## Priprava vzorca:

Robčki, fiksirani v formalinu, so primerni za uporabo pred vgradnjo v parafin. Kostna tkiva je treba pred obdelavo tkiva dekalcificirati, da olajšamo rezanje tkiva in preprečimo poškodbe rezil mikrotoma.<sup>1,2</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Slovenian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Pravilno fiksirana in vdelana tkiva, ki izražajo določeno tarčo antigena, morajo biti shranjena na hladnem. Zakon o izboljšanju kliničnega laboratorija (CLIA) iz leta 1988 zahteva v 42 CFR§493.1259(b), da mora laboratorij hrani obarvana stekelca najmanj deset let od datuma pregledati in hrani bloke vzorcev vsaj dve leti od datuma pregleda.<sup>5</sup>

## Obdelava tkiv pred barvanjem:

Izvedite toplotno povzročeno pridobivanje epitopov (HIER) po priporočenem protokolu spodaj. Pokazalo se je, da rutinska uporaba HIER pred IHC zmanjša nedoslednost in standardizira barvanje.<sup>4,5</sup>

## Opozorilo in previdnostni ukrepi:

1. Znano je, da je DAB raktovarna snov.
2. Komponent DAB ne izpostavljajte močni svetlobi ali neposredni sončni svetlobi
3. DAB lahko povzroči preobčutljivost kože. Preprečiti stik s kožo in očmi.
4. Nosite rokavice in zaščitno obleko ter upoštevajte razumne varnostne ukrepe pri rokovovanju, saj je DAB razvrščen kot nevaren in lahko povzroči raka ter obstaja sum, da povzroča genetske okvare.
5. S snovmi človeškega ali živalskega izvora ravnjajte kot s potencialno biološko nevarnimi snovmi in jih odstranite z ustreznimi varnostnimi ukrepi. V primeru izpostavljenosti upoštevajte zdravstvene smernice pristojnih organov, kjer jih uporabljate.<sup>6,7</sup>
6. Z vzorci pred in po fiksaciji ter v vsemi materiali, ki so jim izpostavljeni, je treba ravnavati, kot da bi lahko prenašali okužbo, in jih odstraniti z ustreznimi varnostnimi ukrepi. Reagentov nikoli ne pipetirajte z ustimi in se izogibajte stiku reagentov in vzorcev s kožo in sluznicami. Če pridejo reagenti ali vzorci v stik z občutljivimi območji, jih sperite z veliko vodo.<sup>8</sup>
7. Mikrobna kontaminacija reagentov lahko povzroči povečanje nespecifičnega obarvanja.
8. Časi inkubacije ali temperature, ki niso navedene, lahko dajo napačne rezultate. Uporabnik mora vsako takšno spremembo potrditi.
9. Reagenta ne uporabljajte po datumu izteka roka uporabnosti, ki je natisnjen na viali.
10. Reagenti kompleta za odkrivanje mikropolimerov so optimizirani in pripravljeni za uporabo s protitelesi Biocare in pomožnimi reagenti. Za priporočene protokole in pogoje uporabe glejte navodila za uporabo primarnega protitelesa in drugega pomožnega reagenta.
11. Upoštevajte zahteve lokalnih in/ali državnih oblasti glede načina odstranjevanja.
12. Varnostni list je na voljo na zahtevo in se nahaja na <http://biocare.net>.
13. Prijavite vse resne incidente, povezane s to napravo, tako da se obrnete na lokalnega predstavnika družbe Biocare in ustrezone pristojne organe države članice ali države, kjer se uporabnik nahaja.

Ta komplet za kromogen vsebuje komponente, razvrščene kot je navedeno v spodnji tabeli v skladu z Uredbo (ES) št. 1272/2008

Nevarnost	Koda	Izjava o nevarnosti
	H314 H350	Domnevno povzroča genetske okvare Lahko povzroči raka

## Navodila za uporabo:

Reagenti kompleta za kromogene so optimizirani za uporabo s protitelesi Biocare in pomožnimi reagenti. Za priporočene protokole in pogoje uporabe glejte navodila za uporabo primarnega protitelesa in drugega pomožnega reagenta. Časi in temperature inkubacije se bodo razlikovali glede na določen protokol protiteles, ki se uporablja.

Pri uporabi avtomatiziranega instrumenta za obarvanje si o operativnih parametrih oglejte priročnik za uporabo posebnega instrumenta in navodila za uporabo.

## Slošni postopkovni koraki za izvajanje IHC:

1. Deparafinacija: stekelca deparafinizirajte v Slide Brite ali ksilenu. Hidrat drsi v nizu razvrščenih alkoholov v vodo.
2. Peroxide Block: Blokirajte 5 minut s Peroxidized 1.
3. Raztopina/protokol za predhodno obdelavo: Za priporočeno raztopino in protokol za predhodno obdelavo si oglejte podatkovni list ustreznega primarnega protitelesa.
4. Beljakovinski blok (neobvezno): Inkubirajte 5-10 minut pri sobni temperaturi (RT) z Background Punisher.
5. Primarno protitel: Za čas inkubacije glejte ustrejni list s podatki o primarnih protitelesih.
6. Sonda (samo mišja protitelesa): Inkubirajte 5-15 minut pri sobni temperaturi z mišjo sondijo MACH 4.
7. Polimer: Inkubirajte 10-20 minut za mišja protitelesa ali 30 minut za kunčja protitelesa pri RT s polimerom MACH 4 HRP.
8. Kromogen: Inkubirajte 5 minut pri RT z Biocare DAB.
9. Protibarvanje: Protibarvanje s hematoksilinom. Izperite z deionizirano vodo. Nanesite raztopino Tacha's Bluing Solution za 1 minutno. Izperite z deionizirano vodo.

## Tehnične opombe:

1. Uporabite TBS za korake pranja.

## Nadzor kakovosti:

Glejte standarde kakovosti CLSI za načrtovanje in izvajanje imunohistokemijskih testov; Odobrene smernice – druga izdaja (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA ZDA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011.<sup>9</sup>

## Pozitivna kontrola tkiva:

Materiali za zunanjeno pozitivno kontrolo morajo biti sveži vzorci, fiksirani, obdelani in vdelani čim prej na enak način kot vzorci bolnikov. Pozitivne kontrole tkiva kažejo na pravilno pripravljena tkiva in pravilne tehnike barvanja. V vsak postopek barvanja je treba vključiti eno pozitivno zunanjeno kontrolo tkiva za vsak niz testnih pogojev.

Tkiva, uporabljena za materiale za zunanjeno pozitivno kontrolo, je treba izbrati iz bolnikovih vzorcev z dobro označenimi nizkimi ravnnimi pozitivne ciljne aktivnosti, ki daje šibko pozitivno obarvanje. Nizka raven pozitivnosti za zunanje pozitivne kontrole je zasnovana tako, da zagotavlja odkrivanje subtlnih sprememb v občutljivosti primarnega protitelesa zaradi nestabilnosti ali težav z metodologijo IHC. Komercialno dostopno stekelce za kontrolno tkivo ali vzorci, obdelani drugače kot vzorec(-i) bolnika, potrebujejo samo učinkovitost reagenta in ne preverjajo priprave tkiva.

Znane pozitivne kontrole tkiv je treba uporabiti samo za spremljanje pravilnega delovanja obdelanih tkiv in testnih reagentov, ne pa kot pomoč pri oblikovanju specifične diagnoze bolnikovih vzorcev. Če pozitivne kontrole tkiva ne pokažejo pozitivnega obarvanja, je treba rezultate s preskusnimi vzorci štetni za neveljavne.

## Negativna kontrola tkiva:

Za preverjanje specifičnosti primarnega protitelesa IHC za prikaz tarčnega antigena in podatek o specifičnem obarvanju ozadja (lažno pozitivno obarvanje). Tudi različne vrste celic, ki so prisotne v večini delov tkiva, lahko laboratorij uporablja kot mesta notranje negativne kontrole za preverjanje delovanja IHC specifikacije. Vrste in viri vzorcev, ki se lahko uporabijo za negativno tkivo kontrolniki so navedeni v razdelku Performance Characterists.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Slovenian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Če se pri negativni kontroli tkiva pojavi specifično obarvanje (lažno pozitivno obarvanje), je treba rezultate bolnikovih vzorcev obravnavati kot neveljavne.

## Nespecifična negativna kontrola reagenta:

Uporabite nespecifično negativno kontrolo reagenta namesto primarnega protitelesa z odsekom vsakega bolnikovega vzorca, da ocenite nespecifično obarvanje in omogočajo boljšo interpretacijo specifičnega obarvanja na mestu antiga. V idealnem primeru negativna kontrola reagenta vsebuje proizvedeno in pripravljeno protitelo (tj. razredčeno na enako koncentracijo z istim razredčilom) za uporabo na enak način kot primarno protitelo, vendar ne kaže specifične reaktivnosti s človeškimi tkivi v istem matriksu/raztopini kot primarno protitelo. Samo razredčilo se lahko uporabi kot manj zaželena alternativa prej opisanim negativnim kontrolam reagenta. Inkubacijsko obdobje za negativno kontrolo reagenta mora ustrezati obdobju primarnega protitelesa.

Kadar se plošče z več protitelesi uporabljajo na serijskih odsekih, lahko negativno obarvana področja enega preparata služijo kot negativna/nespecifična vezavna kontrola ozadja za druga protitelesa. Za razlikovanje endogene encimske aktivnosti ali nespecifične vezave encimov od specifične imunoreaktivnosti se lahko dodatna bolnikova tkiva obarvajo izključno s substrat-kromogenom ali encimskimi kompleksi (PAP, avidin-biotin, streptavidin) oziroma substrat-kromogen.

## Preverjanje testa:

Pred prvo uporabo protitelesa ali sistema obarvanja v diagnostičnem postopku mora uporabnik preveriti specifičnost protitelesa tako, da ga testira na nizu lastnih tkiv z znanimi lastnostmi imunohistokemičnega delovanja, ki predstavljajo znana pozitivna in negativna tkiva. Glejte postopke nadzora kakovosti, ki so bili predhodno opisani v tem razdelku vložka izdelka, in priporočila za nadzor kakovosti certifikacijskega programa CAP<sup>10</sup> za imunohistokemijo in/ali smernico NCCLS IHC<sup>11</sup>. Te postopke nadzora kakovosti je treba ponoviti za vsako novo serijo protiteles ali vsakič, ko pride do spremembe parametrov testa. Tkiva, navedena v razdelku z značilnostmi delovanja, so primerna za preverjanje testa.

## Odpravljanje težav:

Sledite priporočilom protokola za specifična protitelesa v skladu s priloženim podatkovnim listom. Če pride do netipičnih rezultatov, se obrnite na tehnično podporo Biocare na 1-800-542-2002.

## Razlaga obarvanja:

Betazoid DAB Chromogen Kit povzroči rjavo barvno reakcijo na mestih antiga, ki jih lokalizira primarno protitelo. Pred interpretacijo bolnikovih rezultatov mora obarvanje kontrol oceniti usposobljen patolog. Negativne kontrole se ovrednotijo in primerjajo z obarvanimi preparati, da se zagotovi, da morebitno opaženo obarvanje ni posledica nespecifičnih interakcij.

## Pozitivna kontrola tkiva:

Najprej je treba pregledati pozitivno kontrolo tkiva, obarvano z navedenim protitelesom, da se prepričamo, ali vsi reagenti delujejo pravilno. Ustrezno obarvanje ciljnih celic (kot je navedeno zgoraj) kaže na pozitivno reaktivnost. Če pozitivne kontrole tkiva ne pokažejo pozitivnega obarvanja, je treba vse rezultate s preskusnimi vzorci obravnavati kot neveljavne.

Barva reakcijskega produkta se lahko razlikuje glede na uporabljeni substratne kromogene. Za pričakovane barvne reakcije glejte navodila za embalažo substrata. Poleg tega lahko opazimo metakromazijo pri različnih metodah obarvanja.<sup>12</sup>

Ko se uporabi nasprotno barvanje, bo odvisno od dolžine inkubacije in moči uporabljenega nasprotnega barvanja povzročilo obarvanje celičnih jдер. Prekomerno ali nepopolno kontrastno barvanje lahko ogrozi pravilno

interpretacijo rezultatov. Glejte protokol(e) za priporočeno kontrastno barvanje.

## Negativna kontrola tkiva:

Negativno tkivno kontrolo je treba pregledati po pozitivni tkivni kontroli, da se preveri specifičnost označevanja tarčnega antiga s primarnim protitelesom. Odsotnost specifičnega barvanja v negativni tkivni kontroli potrjuje pomanjkanje navzkrižne reaktivnosti protiteles na celice/celične komponente. Če pride do specifičnega obarvanja (lažno pozitivno obarvanje) pri negativni zunanjji kontroli tkiva, je treba rezultate bolnikovega vzorca štetiti za neveljavne.

Nespecifično obarvanje, če je prisotno, ima običajno razpršen videz. Občasno obarvanje vezivnega tkiva je mogoče opaziti tudi v odsekih tkiv, ki so preveč fiksirana s formalinom. Za razlago rezultatov obarvanja uporabite nedotaknjene celice. Nekrotične ali degenerirane celice se pogosto obarvajo nespecifično.

## Bolnikovo tkivo:

Preglejte bolnikove vzorce, obarvane z navedenim protitelesom zadnji. Intenzivnost pozitivnega obarvanja je treba oceniti v kontekstu morebitnega nespecifičnega obarvanja ozadja negativne reagentne kontrole. Kot pri vsakem imunohistokemičnem testu negativen rezultat pomeni, da antigen ni bil odkrit, ne pa, da antigena ni bilo v testiranih celicah/tkivu. Po potrebi uporabite ploščo protiteles za identifikacijo lažno negativnih reakcij.

Glejte povzetek in razlago, omejitve in značilnosti delovanja za posebne informacije glede indicirane imunoreaktivnosti protiteles.

## Omejitve:

### Splošne omejitve:

1. *Zain vitro* diagnostična (IVD) uporaba
2. Ta izdelek je samo za profesionalno uporabo: Imunohistokemija je večstopenjski diagnostični proces, ki je sestavljen iz specializiranega usposabljanja za izbiro ustreznih reagentov; izbiro, fiksacija in obdelava tkiv; priprava preparata IHC; in interpretacijo rezultatov barvanja.
3. Samo za uporabo po zdravniškem receptu. (Samo Rx)
4. Obarvanje tkiva je odvisno od ravnanja in obdelave tkiva pred barvanjem. Nepravilna fiksacija, zamrzovanje, odmrzovanje, pranje, sušenje, segrevanje, rezanje ali kontaminacija z drugimi tkivi ali tekočinami lahko povzroči artefakte, ujetost protiteles ali lažno negativne rezultate. Neskladni rezultati so lahko posledica razlik v metodah fiksacije in vdelave ali inherentnih nepravilnosti v tkivu.<sup>14</sup>
5. Prekomerno ali nepopolno kontrastno barvanje lahko ogrozi pravilno interpretacijo rezultatov.
6. Klinično interpretacijo kakršnega koli pozitivnega ali negativnega obarvanja je treba ovrednotiti v okviru klinične slike, morfologije in drugih histopatoloških meril. Klinično interpretacijo kakršnega koli pozitivnega ali negativnega obarvanja je treba dopolniti z morfološkimi študijami z uporabo ustreznih pozitivnih in negativnih notranjih in zunanjih kontrol ter drugih diagnostičnih testov. Odgovornost kvalificiranega patologa, ki je seznanjen s pravilno uporabo protiteles, reagentov in metod IHC, je za razlago vseh korakov, uporabljenih za pripravo in razlago končnega pripravka IHC.
7. Optimalni protokoli za določeno aplikacijo se lahko razlikujejo. Ti vključujejo, vendar niso omejeni na fiksacijo, metodo odvzema toploste, čas inkubacije, razredčitev protiteles, debelino odseka tkiva in uporabljen komplet za odkrivanje. Za priporočene protokole in pogoje uporabe glejte navodila za uporabo primarnega protitelesa in drugega pomožnega reagenta. Priporočila in protokoli podatkovnega lista temeljijo na izključni uporabi izdelkov Biocare. Navsezadnje je odgovornost raziskovalca, da določi optimalne pogoje.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Slovenian

**BIOCARE**  
M E D I C A L

8. Ta izdelek ni namenjen uporabi v pretočni citometriji. Značilnosti delovanja za pretočno citometrijo niso bile določene.
9. Tkiva oseb, okuženih z virusom hepatitis B in vsebujejo površinski antigen hepatitis B (HBsAg), so lahko nespecifično obarvana s hrenovo peroksidazo.<sup>14</sup>
10. Reagenti lahko pokažejo nepričakovane reakcije v predhodno netestiranih tkivih. Možnosti nepričakovanih reakcij tudi v testiranih skupinah tkiv ni mogoče popolnoma odpraviti zaradi biološke variabilnosti izražanja antigenov in novotvorbah ali drugih patoloških tkivih.<sup>15</sup> Obrnite se na tehnično podporo podjetja Biocare na 1-800-542-2002 ali prek informacij o tehnični podpori na biocare.net z dokumentiranimi nepričakovanimi reakcijami.
11. Normalni/neimunski serumi iz istega živalskega izvora kot sekundarni antiserumi, uporabljeni v korakih blokiranja, lahko povzročijo lažno negativne ali lažno pozitivne rezultate zaradi avtoproteles ali naravnih protiteles.
12. Lažno pozitivne rezultate lahko opazimo zaradi neimunološke vezave beljakovin ali reakcijskih produktov substrata. Lahko jih povzroči tudi aktivnost psevdo peroksidaze (eritrociti), aktivnost endogene peroksidaze (citokrom C) ali endogeni biotin (npr. jetra, dojke, možgani, ledvice), odvisno od vrste uporabljenega imunskega barvanja.<sup>13</sup>
13. Negativen rezultat pomeni, da antigen ni bil odkrit, ne pa, da antigena ni bilo v pregledanih celicah ali tkivu.

## Posebne omejitve izdelka:

Ni dodatnih posebnih omejitev za izdelek

## Značilnosti delovanja:

Barvanje je bilo izvedeno z uporabo protokolov, navedenih v navodilih za uporabo za protitelesa ali kot je določeno. Občutljivost in specifičnost obarvanja sta bili ovrednoteni za vrsto normalnih in neoplastičnih vrst tkiv, ocenjenih med razvojem primarnih protiteles.

## Ponovljivost:

Ponovljivost sistemov za odkrivanje in sistemskih reagentov Biocare je preverjena z meritvijo vmesne natančnosti, pri kateri so bile različne serije reagentov testirane v daljšem časovnem obdobju z uporabo različnih operaterjev, analitikov, serij reagentov, vzorcev tkiv in opreme. Dobljeno barvanje za vsak ovrednoten detekcijski reagent je bilo dosledno in izvedeno po pričakovanjih.

## Odpravljanje težav:

1. Nobeno steklec ni obaran – Preverite, da ugotovite, ali so bila uporabljena ustrezna pozitivna kontrola, tkivo, protitelesa in izdelki za odkrivanje. Preverite nepopolno ali nepravilno odstranjevanje ali predobdelavo voska.
2. Sibko obaranje vseh stekelcev – Preverite, da ugotovite, ali so bila uporabljena ustrezna pozitivna kontrola, tkivo, protitelesa in izdelki za odkrivanje.
3. Prekomerno ozadje vseh stekelcev – morda so visoke ravni endogenega biotina (če uporabljate izdelke za odkrivanje na osnovi biotina), endogen aktiven HRP, ki pretvarja kromogen v obarvani končni produkt (uporabite blok peroksidaze) ali presežek nespecifične interakcije z beljakovinami (uporabite beljakovino blok, kot je raztopina za blokiranje na osnovi serumu ali kazeina).
4. Odrezki tkiv se med inkubacijo sprejemo s stekelcem – Preverite stekelca, da zagotovite, da so pozitivno nanelektrena.
5. Specifično barvanje je pretemno – Preverite protokol, da ugotovite, ali je bil na objektнем stekelcu uporabljen ustrezni titer protiteles, kot tudi ustrezne inkubacijske čase za vse reagente. Poleg tega zagotovite, da ima protokol dovolj korakov pranja, da odstranite odvečne reagente po zaključku korakov inkubacije.

## Reference:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

105/118



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Spanish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Uso previsto:

Para *in vitro* Uso diagnóstico

El Kit de cromógeno betazoide DAB está diseñado para su uso en protocolos de tinción de inmunohistoquímica (IHC) manuales o automatizados para la detección de抗igenos diana en tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina (FFPE) cuando se usa junto con el sistema de detección apropiado y anticuerpos primarios. La interpretación clínica de cualquier tinción o su ausencia debe complementarse con estudios morfológicos y controles adecuados y debe ser evaluada dentro del contexto de la historia clínica del paciente y otras pruebas diagnósticas por un patólogo calificado.

## Resumen y explicación:

3,3' Diaminobencidina (DAB) es un cromógeno bien establecido utilizado en protocolos de tinción IHC que, en presencia de una enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), produce un precipitado marrón que es insoluble en disolventes orgánicos y se puede cubrir con un medio de montaje permanente. Este producto viene en un sistema de dos componentes que consta de un cromógeno DAB líquido estable y un tampón de sustrato DAB. El color de la mezcla tampón cromógeno puede variar de incoloro a marrón pálido. Las propiedades de tinción no se ven afectadas por el color de la mezcla de tampón cromógeno. Betazoid DAB es una formulación muy estable. Betazoid DAB se puede utilizar tanto manualmente como en teñidores automáticos.

## Principio de Procedimiento:

Este cromógeno DAB del kit de cromógeno Betazoid DAB, cuando se utiliza en pruebas IHC de secciones de tejido FFPE, permite la visualización de抗igenos mediante la aplicación secuencial de un anticuerpo específico contra el抗igeno (anticuerpo primario), un anticuerpo secundario contra el anticuerpo primario (enlace opcional anticuerpo/sonda), un complejo enzimático y un sustrato cromogénico con pasos de lavado interpuestos. La activación enzimática del cromógeno da como resultado un producto de reacción visible en el sitio del抗igeno. Luego se puede contrateñir la muestra y cubrirla con un cubreobjetos. Los resultados se interpretan utilizando una luz microscopio y ayuda en el diagnóstico diferencial de procesos fisiopatológicos, que pueden o Puede no estar asociado con un抗igeno en particular.

## Materiales y métodos:

### Reactivos proporcionados:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Reconstitución, mezcla, dilución, valoración:

El kit de cromógeno Betazoid DAB está optimizado para su uso con anticuerpos y reactivos auxiliares de Biocare y debe diluirse justo antes de su uso. Mezcle 1 gota (32 µl) de cromógeno DAB por 1,0 ml de tampón de sustrato DAB. La solución de trabajo de DAB es estable durante 5 días si se almacena a 2-8°C.

## Aplicaciones conocidas:

Inmunohistoquímica (tejidos incluidos en parafina y fijados con formalina)

## Se suministra como:

*Cromógeno betazoide DAB*

Solución DAB. Consulte la Hoja de datos de seguridad para obtener detalles adicionales.

## Tampón de sustrato betazoide DAB

La solución tamponada contiene una solución de peróxido de hidrógeno al 3%. Consulte la Hoja de datos de seguridad para obtener detalles adicionales.

## Materiales y reactivos necesarios pero no suministrados:

Portaobjetos de microscopio, cargados positivamente.  
Controles de tejido positivos y negativos.  
Cámara del Desierto\* o similar Estufa de secado (opcional)  
Xileno o sustituto del xileno  
Etanol o alcohol reactivo  
Cámara de ocultación\* o olla a presión similar (opcional)  
Agua desionizada o destilada  
Tampón de lavado\*  
Reactivos de pretratamiento\* (opcional)  
Digestión enzimática\* (opcional)  
Bloqueo de peroxidasa\*  
Bloque de proteínas\* (opcional)  
Anticuerpo primario\*  
Reactivos de control negativo\*  
Kits de detección\*  
Hematoxilina\* (contratinción)  
Reactivos azulante\*  
Medio de montaje\*  
Vidrio de protección  
Microscopio óptico (aumento 40-400X)

\* Productos médicos de Biocare: consulte el sitio web de Biocare Medical ubicado en <http://biocare.net> para obtener información sobre los números de catálogo y los pedidos. Ciertos reactivos enumerados anteriormente se basan en la aplicación específica y el sistema de detección utilizado.

## Almacenamiento y estabilidad:

Conservar entre 2°C y 8°C. El producto es estable hasta la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta del vial cuando se almacena en estas condiciones. No utilizar después de la fecha de caducidad. Se debe verificar el almacenamiento en cualquier condición distinta a las especificadas. Los reactivos diluidos deben usarse inmediatamente según las instrucciones. El reactivo diluido no utilizado es estable durante 5 días si se almacena a 2-8°C. Biocare no ha establecido la estabilidad del reactivo diluido por el usuario más allá de 5 días.

Se deben realizar controles positivos y negativos simultáneamente con todas las muestras de pacientes. Si se observa una tinción inesperada que no puede explicarse por variaciones en los procedimientos de laboratorio y se sospecha un problema con el anticuerpo, comuníquese con el soporte técnico de Biocare al 1-800-542-2002 o mediante la información de soporte técnico proporcionada en biocare.net.



60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

106/118



# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Spanish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Preparación de espécimen:

Los tejidos fijados en formalina son adecuados para su uso antes de la inclusión en parafina. Los tejidos óseos deben descalcificarse antes del procesamiento del tejido para facilitar el corte del tejido y evitar daños a las hojas del micrótomo.<sup>1,2</sup>

Los tejidos correctamente fijados e incluidos que expresen el antígeno objetivo especificado deben almacenarse en un lugar fresco. La Ley de Mejora de Laboratorios Clínicos (CLIA) de 1988 exige en 42 CFR§493.1259(b) que "El laboratorio debe conservar los portaobjetos teñidos al menos diez años a partir de la fecha de examen y conservar los bloques de muestras al menos dos años después de la fecha del examen".<sup>3</sup>

## Tratamiento de tejidos antes de la tinción:

Realice la recuperación de epítotos inducida por calor (HIER) según el protocolo recomendado a continuación. Se ha demostrado que el uso rutinario de HIER antes de la IHC minimiza la inconsistencia y estandariza la tinción.<sup>4,5</sup>

### Advertencias y precauciones:

1. Se sabe que el DAB es un carcinógeno sospechoso.
2. No exponga los componentes DAB a luz intensa ni a la luz solar directa.
3. DAB puede causar sensibilización de la piel. Evite el contacto con la piel y los ojos.
4. Use guantes y ropa protectora y tome precauciones razonables al manipularlo, ya que el DAB está clasificado como peligroso y puede causar cáncer y se sospecha que causa defectos genéticos.
5. Manipule materiales de origen humano o animal como potencialmente biopeligrosos y deséchelos con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, siga las directivas sanitarias de las autoridades responsables donde se utilice.<sup>6</sup>
6. Las muestras, antes y después de la fijación, y todos los materiales expuestos a ellas deben manipularse como si pudieran transmitir infecciones y eliminarse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetea reactivos con la boca y evite el contacto de la piel y las membranas mucosas con reactivos y muestras. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con áreas sensibles, lave con abundante agua.<sup>8</sup>
7. La contaminación microbiana de los reactivos puede provocar un aumento de la tinción inespecífica.
8. Tiempos de incubación o temperaturas distintas a las especificadas pueden dar resultados erróneos. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo.
9. No utilice el reactivo después de la fecha de vencimiento impresa en el vial.
10. Los reactivos del kit de detección de micropolímeros están optimizados y listos para usar con anticuerpos y reactivos auxiliares de Biocare. Consulte las instrucciones de uso del anticuerpo primario y otros reactivos auxiliares para conocer los protocolos y condiciones de uso recomendados.
11. Siga los requisitos de las autoridades locales y/o estatales para el método de eliminación.
12. La SDS está disponible previa solicitud y se encuentra en <http://biocare.net>.
13. Informe cualquier incidente grave relacionado con este dispositivo comunicándose con el representante local de Biocare y la autoridad competente correspondiente del Estado miembro o país donde se encuentra el usuario.

Este kit de cromógeno contiene componentes clasificados como se indica en la siguiente tabla de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1272/2008.

Peligro	Código	Indicación de peligro
	H314 H350	Se sospecha que causa defectos genéticos. Puede causar cáncer.

## Instrucciones de uso:

Los reactivos del kit de cromógeno están optimizados para su uso con anticuerpos y reactivos auxiliares de Biocare. Consulte las instrucciones de uso del anticuerpo primario y otros reactivos auxiliares para conocer los protocolos y condiciones de uso recomendados. Los tiempos y temperaturas de incubación varían según el protocolo de anticuerpos específico seguido.

Cuando utilice un instrumento de tinción automatizado, consulte el manual del operador del instrumento específico y las instrucciones de uso para conocer los parámetros operativos.

### Pasos generales del procedimiento para realizar IHC:

1. Desparafinización: Desparafinar los portaobjetos en Slide Brite o xileno. Hidratar los portaobjetos en una serie de alcoholos graduados hasta el agua.
2. Bloqueo de Peróxido: Bloquear durante 5 minutos con Peroxidized 1.
3. Solución/Protocolo de pretratamiento: consulte la hoja de datos del anticuerpo primario respectivo para conocer la solución y el protocolo de pretratamiento recomendados.
4. Bloque de proteínas (opcional): Incubar durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente (RT) con Background Punisher.
5. Anticuerpo primario: consulte la hoja de datos del anticuerpo primario respectivo para conocer el tiempo de incubación.
6. Sonda (solo anticuerpos de ratón): Incubar durante 5 a 15 minutos a temperatura ambiente con MACH 4 Mouse Probe.
7. Polímero: Incubar durante 10 a 20 minutos para anticuerpos de conejo a temperatura ambiente con polímero MACH 4 HRP.
8. Cromógeno: Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente con DAB de Biocare.
9. Contratinación: Contratinación con hematoxilina. Enjuague con agua desionizada. Aplicar la Solución Azulante de Tacha durante 1 minuto. Enjuague con agua desionizada.

### Notas técnicas:

1. Utilice TBS para los pasos de lavado.

### Control de calidad:

Consulte los Estándares de calidad del CLSI para el diseño e implementación de ensayos de inmunohistoquímica; Guía aprobada-Segunda edición (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

### Control Positivo de Tejidos:

Los materiales de control positivo externo deben ser muestras frescas fijadas, procesadas e incluidas lo antes posible de la misma manera que las muestras del paciente. Los controles de tejido positivos son indicativos de tejidos correctamente preparados y técnicas de tinción adecuadas. En cada proceso de tinción se debe incluir un control de tejido externo positivo para cada conjunto de condiciones de prueba.

Los tejidos utilizados para los materiales de control positivo externo deben seleccionarse de muestras de pacientes con niveles bajos bien caracterizados de actividad diana positiva que proporcione una tinción positiva débil. El bajo nivel de positividad para los controles positivos externos está diseñado para garantizar la detección de cambios sutiles en la sensibilidad del anticuerpo primario debido a inestabilidad o problemas con la metodología IHC. Los portaobjetos de control de tejido disponibles comercialmente o las muestras procesadas de manera diferente a las muestras del paciente validan únicamente el rendimiento del reactivo y no verifican la preparación del tejido.

Los controles de tejido positivos conocidos solo deben utilizarse para monitorear el desempeño correcto de los tejidos procesados y los reactivos de prueba, en lugar de como ayuda para formular un diagnóstico específico

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Spanish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

de muestras de pacientes. Si los controles de tejido positivos no logran demostrar una tinción positiva, los resultados de las muestras de prueba deben considerarse inválidos.

## Control de tejido negativo:

Utilice un control de tejido negativo fijado, procesado e incluido de manera idéntica a las muestras del paciente en cada proceso de tinción para verificar la especificidad del anticuerpo primario IHC para demostración del antígeno diana y para proporcionar una indicación de tinción de fondo específica (tinción falsa positiva). Además, la variedad de diferentes tipos de células presentes en la mayoría de las secciones de tejido puede ser utilizado por el laboratorio como sitios de control negativo interno para verificar el desempeño de la IHC, especificaciones. Los tipos y fuentes de muestras que pueden usarse para tejido negativo. Los controles se enumeran en la sección Características de rendimiento.

Si se produce una tinción específica (tinción falsa positiva) en el control de tejido negativo, los resultados de las muestras del paciente se deben considerar no válidos.

## Control de reactivos negativos no específicos:

Utilice un control reactivo negativo no específico en lugar del anticuerpo primario con una sección de cada muestra de paciente para evaluar la tinción no específica y permitir una mejor interpretación de la tinción específica en el sitio del antígeno. Idealmente, un control reactivo negativo contiene un anticuerpo producido y preparado (es decir, diluido a la misma concentración usando el mismo diluyente) para usar de la misma manera que el anticuerpo primario, pero no muestra reactividad específica con tejidos humanos en la misma matriz/solución que el anticuerpo primario. Se puede utilizar diluyente solo como una alternativa menos deseable a los controles reactivos negativos descritos anteriormente. El período de incubación del control reactivo negativo debe corresponder al del anticuerpo primario.

Cuando se utilizan paneles de varios anticuerpos en secciones en serie, las áreas teñidas negativamente de un portaobjetos pueden servir como control de fondo de unión negativa/no específica para otros anticuerpos. Para diferenciar la actividad enzimática endógena o la unión no específica de enzimas de la inmunorreactividad específica, se pueden teñir tejidos adicionales del paciente exclusivamente con sustrato-cromógeno o complejos enzimáticos (PAP, avidina-biotina, estreptavidina) y sustrato-cromógeno, respectivamente.

## Verificación del ensayo:

Antes del uso inicial de un anticuerpo o sistema de tinción en un procedimiento de diagnóstico, el usuario debe verificar la especificidad del anticuerpo probándolo en una serie de tejidos internos con características de rendimiento inmunohistoquímico conocidas que representen tejidos positivos y negativos conocidos. Consulte los procedimientos de control de calidad descritos anteriormente en esta sección del prospecto del producto y las recomendaciones de control de calidad del Programa de Certificación CAP.<sup>10</sup> para inmunohistoquímica y/o la guía NCCLS IHC<sup>11</sup>. Estos procedimientos de control de calidad deben repetirse para cada nuevo lote de anticuerpos o siempre que haya un cambio en los parámetros del ensayo. Los tejidos enumerados en la sección Características de rendimiento son adecuados para la verificación del ensayo.

## Solución de problemas:

Siga las recomendaciones del protocolo específico de anticuerpos según la hoja de datos proporcionada. Si se producen resultados atípicos, comuníquese con el soporte técnico de Biocare al 1-800-542-2002.

## Interpretación de la tinción:

El kit de cromógeno Betazoid DAB produce una reacción de color marrón en los sitios del antígeno localizados por el anticuerpo primario. Antes de interpretar los resultados del paciente, un patólogo calificado debe evaluar la tinción de los controles. Los controles negativos se evalúan y comparan con portaobjetos teñidos para garantizar que cualquier tinción observada no sea el resultado de interacciones no específicas.

## Control Positivo de Tejidos:

Primero se debe examinar el control de tejido positivo teñido con el anticuerpo indicado para comprobar que todos los reactivos funcionan correctamente. La tinción apropiada de las células diana (como se indicó anteriormente) es indicativa de reactividad positiva. Si los controles de tejido positivos no logran demostrar una tinción positiva, cualquier resultado con las muestras de prueba debe considerarse inválido.

El color del producto de reacción puede variar dependiendo de los cromógenos del sustrato utilizados. Consulte los prospectos del paquete del sustrato para conocer las reacciones de color esperadas. Además, se puede observar metacromasia en variaciones del método de tinción.<sup>12</sup>

Cuando se utiliza una contratinción, dependiendo de la duración de la incubación y la potencia de la contratinción utilizada, la contratinción dará como resultado una coloración de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Consulte los protocolos para conocer la contratinción recomendada.

## Control de tejido negativo:

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la especificidad del marcaje del antígeno diana por parte del anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la falta de reactividad cruzada de anticuerpos con células/componentes celulares. Si se produce una tinción específica (tinción falsa positiva) en el control de tejido externo negativo, los resultados con la muestra del paciente se deben considerar no válidos.

La tinción inespecífica, si está presente, suele tener una apariencia difusa. También se puede observar tinción esporádica del tejido conectivo en secciones de tejidos excesivamente fijados con formalina. Utilice células intactas para la interpretación de los resultados de la tinción. Las células necróticas o degeneradas a menudo se tiñen de forma inespecífica.

## Tejido del paciente:

Examinar muestras de pacientes teñidas con el anticuerpo indicado. Último. La intensidad de la tinción positiva debe evaluarse en el contexto de cualquier tinción de fondo inespecífica del control de reactivo negativo. Como ocurre con cualquier prueba inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que no se detectó el antígeno, no que el antígeno estuviera ausente en las células/tejido analizado. Si es necesario, utilice un panel de anticuerpos para identificar reacciones falsas negativas.

Consulte Resumen y explicación, limitaciones y características de rendimiento para obtener información específica sobre la inmunorreactividad de los anticuerpos indicada.

## Limitaciones:

### Limitaciones generales:

1. Para *in vitro* Uso de diagnóstico (IVD)
2. Este producto es sólo para uso profesional: La inmunohistoquímica es un proceso de diagnóstico de varios pasos que consiste en una capacitación especializada en la selección de los reactivos adecuados;

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Spanish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

- selección, fijación y procesamiento de tejidos; preparación del portaobjetos IHC; e interpretación de los resultados de la tinción.
3. Para uso exclusivo con receta médica. (Solo receta)
  4. La tinción de tejidos depende de la manipulación y procesamiento del tejido antes de la tinción. La fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento, corte o contaminación inadecuados con otros tejidos o fluidos pueden producir artefactos, atrapamiento de anticuerpos o resultados falsos negativos. Los resultados inconsistentes pueden deberse a variaciones en los métodos de fijación e inclusión, o a irregularidades inherentes dentro del tejido.<sup>14</sup>
  5. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
  6. La interpretación clínica de cualquier tinción positiva o negativa debe evaluarse dentro del contexto de la presentación clínica, la morfología y otros criterios histopatológicos. La interpretación clínica de cualquier tinción positiva o negativa debe complementarse con estudios morfológicos utilizando controles internos y externos positivos y negativos adecuados, así como otras pruebas de diagnóstico. Es responsabilidad de un patólogo calificado que esté familiarizado con el uso adecuado de los anticuerpos, reactivos y métodos de IHC interpretar todos los pasos utilizados para preparar e interpretar la preparación IHC final.
  7. Los protocolos óptimos para una aplicación específica pueden variar. Estos incluyen, entre otros, fijación, método de recuperación de calor, tiempos de incubación, dilución de anticuerpos, espesor de la sección de tejido y kit de detección utilizado. Consulte las instrucciones de uso del anticuerpo primario y otros reactivos auxiliares para conocer los protocolos y condiciones de uso recomendados. Las recomendaciones y protocolos de la ficha técnica se basan en el uso exclusivo de productos Biocare. En última instancia, es responsabilidad del investigador determinar las condiciones óptimas.
  8. Este producto no está diseñado para usarse en citometría de flujo. No se han determinado las características de rendimiento para la citometría de flujo.
  9. Los tejidos de personas infectadas con el virus de la hepatitis B y que contienen el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) pueden presentar tinciones inespecíficas con peroxidasa de rábano picante.<sup>14</sup>
  10. Los reactivos pueden demostrar reacciones inesperadas en tejidos no probados previamente. La posibilidad de reacciones inesperadas incluso en grupos de tejidos probados no se puede eliminar por completo debido a la variabilidad biológica de la expresión de antígenos en neoplasias u otros tejidos patológicos.<sup>15</sup> Comuníquese con el soporte técnico de Biocare al 1-800-542-2002, o a través de la información de soporte técnico proporcionada en biocare.net, con reacciones inesperadas documentadas.
  11. Los sueros normales/no inmunes de la misma fuente animal que los antisueros secundarios utilizados en los pasos de bloqueo pueden causar resultados falsos negativos o falsos positivos debido a autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
  12. Se pueden observar resultados falsos positivos debido a la unión no inmunológica de proteínas o productos de reacción del sustrato. También pueden ser causados por actividad pseudo peroxidasa (eritrocitos), actividad peroxidasa endógena (citocromo C) o biotina endógena (p. ej., hígado, mama, cerebro, riñón), según el tipo de inmunotinción utilizada.<sup>13</sup>
  13. Un resultado negativo significa que no se detectó el antígeno, no que el antígeno estuviera ausente en las células o el tejido examinados.

## Limitaciones específicas del producto:

Sin limitaciones adicionales específicas del producto

## Características de presentación:

La tinción se realizó utilizando los protocolos proporcionados en las instrucciones de uso específicas del anticuerpo o según se especifica. La sensibilidad y especificidad de la tinción se evaluaron en una variedad de

tipos de tejido normales y neoplásicos evaluados durante el desarrollo de anticuerpos primarios.

## Reproducibilidad:

La reproducibilidad de los sistemas de detección y los reactivos del sistema de Biocare se verifica mediante una medición de precisión intermedia en la que se probaron varios lotes de reactivos durante un período prolongado utilizando varios operadores, analistas, lotes de reactivos, muestras de tejido y equipos. La tinción obtenida para cada reactivo de detección evaluado fue consistente y se realizó como se esperaba.

## Solución de problemas:

1. Sin tinción de ningún portaobjetos: verifique que se hayan utilizado tejido de control positivo, anticuerpos y productos de detección adecuados. Compruebe si hay eliminación de cera o tratamiento previo incompletos o inadecuados.
2. Tinción débil de todos los portaobjetos: verifique que se hayan utilizado tejido de control positivo, anticuerpos y productos de detección adecuados.
3. Fondo excesivo en todos los portaobjetos: puede haber niveles altos de biotina endógena (si se utilizan productos de detección a base de biotina), actividad HRP endógena que convierte el cromógeno en un producto final coloreado (use un bloqueo de peroxidasa) o un exceso de interacción proteica no específica (use una proteína). bloqueante, como una solución bloqueadora a base de suero o caseína).
4. Las secciones de tejido se lavan de los portaobjetos durante la incubación. Revise los portaobjetos para asegurarse de que estén cargados positivamente.
5. Tinción específica demasiado oscura: consulte el protocolo para determinar si se aplicó el título de anticuerpos adecuado al portaobjetos, así como los tiempos de incubación adecuados para todos los reactivos. Además, asegúrese de que el protocolo tenga suficientes pasos de lavado para eliminar el exceso de reactivos una vez completados los pasos de incubación.

## Referencias:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.

## Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Spanish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. *Histochemistry* 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Lab Med* 1983; 14:767.
14. 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. *Am J Clin Path* 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Swedish

**BIOCARE**  
MEDICAL

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Avsedd användning:

För *in vitro* Diagnostisk användning

DeBetazoid DAB Chromogen Kit är avsedd att användas i antingen manuella eller automatiserade immunhistokemi (IHC) färgningsprotokoll för detektering av målantigen i formalinfixerade, paraffinibäddade (FFPE) vävnader när de används i kombination med lämpligt detektionssystem och primära antikroppar. Den kliniska tolkningen av eventuell färgning eller frånvaro av denna bör kompletteras med morfologiska studier och lämpliga kontroller och bör utvärderas inom ramen för patientens kliniska historia och andra diagnostiska tester av en kvalificerad patolog.

## Sammanfattning och förklaring:

3,3' diaminobensidin (DAB) är en väletablerad kromogen som används i IHC-färgningsprotokoll som i närvilo av ett enzym pepparrotsperoxidas (HRP) producerar en brun fällning som är olöslig i organiska lösningsmedel och som kan täckglas med ett permanent monteringsmedium. Denna produkt kommer i ett tvåkomponentsystem bestående av en vätskestabil DAB-kromogen och en DAB-substratbuffert. Färgen på kromogenbuffertblandningen kan variera från färglös till ljusbrun. Färgningsegenskaperna påverkas inte av färgen på kromogenbuffertblandningen. Betazoid DAB är en formulering som är mycket stabil. Betazoid DAB kan användas både manuellt och på automatiska färgare.

## Procedurprincip:

Denna DAB-kromogen i Betazoid DAB Chromogen Kit, när den används i IHC-testning av FFPE-vävnadsnitt, möjliggör visualisering av抗原er via sekventiell applicering av en specifik antikropp mot antigenet (primär antikropp), en sekundär antikropp mot den primära antikroppen (valfri länkantikropp/sond), ett enzymkomplex och ett kromogen substrat med mellanliggande tvättsteg. Den enzymatiska aktiveringstenheten av kromogenen resulterar i en synlig reaktionsprodukt vid antigenstället. Provet kan sedan motfärgas och täckglas. Resultaten tolkas med hjälp av ett ljus mikroskop och hjälp vid differentialdiagnos av patofysiologiska processer, som kan eller kanske inte vara associerad med ett visst antigen.

## Material och metoder:

### Reagens som tillhandahålls:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Rekonstitution, blandning, spädning, titrering:

Betazoid DAB Chromogen Kit är optimerat för användning med Biocare-antikroppar och hjälpreakenser och måste spädas ut precis före användning. Blanda 1 droppe (32µL) DAB-kromogen per 1,0mL DAB-substratbuffert. DAB-arbetslösningen är stabil i 5 dagar om den förvaras vid 2-8°C.

## Kända applikationer:

Immunhistokemi (formalinfixerade paraffinibäddade vävnader)

## Levereras som:

Betazoid DAB kromogen

DAB-lösning. Se säkerhetsdatabladet för ytterligare information.

## Betazoid DAB Substrate Buffer

Buffertlösning innehåller 3 % väteperoxidlösning. Se säkerhetsdatabladet för ytterligare information.

## Material och reagens som behövs men inte tillhandahålls:

Objektglas, positivt laddade

Positiva och negativa vävnadskontroller

Desert Chamber\* eller liknande torkugn (valfritt)

Xylen eller xylensubstitut

Etanol eller reagens alkohol

Decloaking Chamber\* eller liknande tryckkokare (valfritt)

Avjoniserat eller destillerat vatten

Tvättbuffert\*

Förbehandlingsreagens\* (valfritt)

Enzymnedbrytning\* (valfritt)

Peroxidasblock\*

Proteinblock\* (valfritt)

Primär antikropp\*

Negativa kontrollreagens\*

Detektionssatser\*

Hematoxylin\* (motfärgning)

Blånande reagens\*

Monteringsmedium\*

Täckglas

Ljusmikroskop (40-400X förstoring)

\* Biocare Medical Products: Se Biocare Medicals webbplats på <http://biocare.net> för information om katalognummer och beställning. Vissa reagenser listade ovan är baserade på specifik tillämpning och detektionssystem som används.

## Lagring och stabilitet:

Förvara vid 2°C till 8°C. Produkten är stabil till det utgångsdatum som är tryckt på injektionsflaskans etikett när den förvaras under dessa förhållanden. Använd inte efter utgångsdatum. Förvaring under alla andra förhållanden än de angivna måste verifieras. Utspädd reagens ska användas omedelbart enligt instruktionerna. Oanvänt utspätt reagens är stabil i 5 dagar om det förvaras vid 2-8°C. Stabiliteten för användarutspädd reagens längre än 5 dagar har inte fastställts av Biocare.

Positiva och negativa kontroller bör köras samtidigt med alla patientprover. Om oväntad färgning observeras som inte kan förklaras av variationer i laboratorieprocedurer och ett problem med antikroppen misstänks, kontakta Biocares tekniska support på 1-800-542-2002 eller via den tekniska supportinformationen på biocare.net.

## Provförberedelse:

Vävnader fixerade i formalin är lämpliga för användning före paraffinibäddning. Ossös vävnad bör avkalkas före vävnadsbearbetning för att underlättar vävnadsskärning och förhindra skador på mikrotombladen.<sup>1,2</sup>

Korrekt fixerade och inbäddade vävnader som uttrycker det specificerade antigenmålet bör förvaras på en sval plats. Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) från 1988 kräver i 42 CFR§493.1259(b) att "Laboratoriet måste behålla färgade objektglas minst tio år från datumet för undersöka och behålla provblocken minst två år från datumet för undersökningen."<sup>3</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Swedish

**BIOCARE**  
MEDICAL

## Behandling av vävnader före färgning:

Utför Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) enligt rekommenderat protokoll nedan. Rutinmässig användning av HIER före IHC har visat sig minimera inkonsekvens och standardisera färgning.<sup>4,5</sup>

## Varning och försiktighetsåtgärder:

1. DAB är känt för att vara ett misstänkt cancerframkallande ämne.
2. Utsätt inte DAB-komponenter för starkt ljus eller direkt solljus
3. DAB kan orsaka sensibilisering av huden. Undvik kontakt med hud och ögon.
4. Bär handskar och skyddskläder och vidta rimliga försiktighetsåtgärder vid hantering då DAB klassas som en fara och kan orsaka cancer och misstänks orsaka genetiska defekter.
5. Hantera material av mänskligt eller animaliskt ursprung som potentiellt biologiskt farligt och kassera sådant material med lämpliga försiktighetsåtgärder. I händelse av exponering, följ hälsodirektiven från de ansvariga myndigheterna där det används.<sup>6,7</sup>
6. Prover, före och efter fixering, och allt material som exponeras för dem ska hanteras som om de skulle kunna överföra infektion och kasseras med lämpliga försiktighetsåtgärder. Pipettera aldrig reagens genom munnen och undvik att komma i kontakt med huden och slemhinnorna med reagenser och prover. Om reagenser eller prover kommer i kontakt med känsliga områden, tvätta med rikliga mängder vatten.<sup>8</sup>
7. Mikrobiell kontaminerings av reagenser kan resultera i en ökning av ospecifik färgning.
8. Andra inkubationstider eller temperaturer än de angivna kan ge felaktiga resultat. Användaren måste validera alla sådana ändringar.
9. Använd inte reagens efter det utgångsdatum som är tryckt på flaskan.
10. Mikropolymerdetektionsreagenserna är optimerade och redo att användas med Biocare-antikroppar och hjälpreagenser. Se den primära antikroppen och andra hjälpreagensanvisningar för användning för rekommenderade protokoll och villkor för användning.
11. Följ lokala och/eller statliga myndigheters krav för avfallshantering.
12. Säkerhetsdatabladet är tillgängligt på begäran och finns på <http://biocare.net>.
13. Rapportera alla allvarliga incidenter relaterade till denna enhet genom att kontakta den lokala Biocare-representanten och tillämplig behörig myndighet i den medlemsstat eller det land där användaren befinner sig.

Detta kromogenkit innehåller komponenter som klassificeras enligt tabellen nedan i enlighet med förordning (EG) nr 1272/2008

Fara	Koda	Faroangivelse
	H314 H350	Misstänks orsaka genetiska defekter Kan orsaka cancer

## Användningsinstruktioner:

Kromogenkitsreagenserna är optimerade för användning med Biocare-antikroppar och hjälpreagenser. Se den primära antikroppen och andra hjälpreagensanvisningar för användning för rekommenderade protokoll och villkor för användning. Inkubationstider och temperaturer kommer att variera beroende på det specifika antikroppsprotokoll som följs.

När du använder ett automatiserat färgningsinstrument, se den specifika instrumentets användarmanual och bruksanvisningar för driftsparametrar.

## Allmänna procedursteg för att utföra IHC:

1. Avparaffinering: Avparaffinera objektglasen i Slide Brite eller xylen. Hydrera objektglasen i en serie graderade alkoholer till vatten.
2. Peroxidblock: Blockera i 5 minuter med Peroxidized 1.

3. Förbehandlingslösning/-protokoll: Se respektive primär antikroppsdatablad för rekommenderad förbehandlingslösning och protokoll.

4. Proteinblock (valfritt): Inkubera i 5-10 minuter vid rumstemperatur (RT) med Background Punisher.

5. Primär antikropp: Se respektive datablad för primär antikropp för inkubationstid.

6. Sond (endast musantikroppar): Inkubera i 5-15 minuter vid rumstemperatur med MACH 4 musprob.

7. Polymer: Inkubera i 10-20 minuter för musantikroppar eller 30 minuter för kaninantikroppar vid RT med MACH 4 HRP-polymer.

8. Kromogen: Inkubera i 5 minuter vid RT med Biocares DAB.

9. Motfärgning: Motfärgning med hematoxylin. Skölj med avjoniserat vatten. Applicera Tacha's Blueing Solution i 1 minut. Skölj med avjoniserat vatten.

## Tekniska anmärkningar:

1. Använd TBS för tvättstegen.

## Kvalitetskontroll:

Se CLSI kvalitetsstandarder för design och implementering av immunhistokemianalyser; Godkänd guideline-andra upplagan (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011.

## Positiv vävnadskontroll:

Externt positiv kontrollmaterial bör vara färska prover fixerade, bearbetade och inbäddade så snart som möjligt på samma sätt som patientproverna. Positiva vävnadskontroller tyder på korrekt preparerade vävnader och korrekta färgningstekniker. En positiv extern vävnadskontroll för varje uppsättning testbetingelser bör inkluderas i varje färgningskörsning.

De vävnader som används för de externa positiva kontrollmaterialen bör väljas från patientprover med välkarteriserade låga nivåer av den positiva mälanaktiviteten som ger svag positiv färgning. Den låga nivån av positivitet för externa positiva kontroller är utformad för att säkerställa upptäckt av subtila förändringar i den primära antikroppens känslighet från instabilitet eller problem med IHC-metoden. Kommersiellt tillgängliga vävnadskontrollobjektglas eller prover som bearbetats annorlunda än patientproven/patienterna validerar endast reagensprestanda och verifierar inte vävnadsberedning.

Kända positiva vävnadskontroller bör endast användas för att övervaka korrekt prestanda hos bearbetade vävnader och testreagens, snarare än som ett hjälpmittel för att formulera en specifik diagnos av patientprover. Om de positiva vävnadskontrollerna inte visar positiv färgning, bör resultaten med testproverna anses ogiltiga.

## Negativ vävnadskontroll:

Använd en negativ vävnadskontroll fixerad, bearbetad och inbäddad på ett sätt som är identiskt med patientproverna med varje färgningskörsning för att verifiera specificiteten hos den primära IHC-antikroppen för demonstration av mälanigenet och för att ge en indikation på specifik bakgrundsfärgning (falsk positiv färgning). Det kan också mångfalden av olika celltyper som finns i de flesta vävnadssnitt användas av laboratoriet som interna negativa kontrollplatser för att verifiera IHC:s prestanda specificiteter. Typer och källor för prover som kan användas för negativ vävnad kontrollerna listas i avsnittet Prestandaegenskaper.

Om specifik färgning (falsk positiv färgning) inträffar i den negativa vävnadskontrollen, bör resultaten med patientproverna anses ogiltiga.

## Ospecifik negativ reagenskontroll:

Använd en ospecifik negativ reagenskontroll i stället för den primära antikroppen med en sektion av varje patientprov för att utvärdera ospecifik färgning och

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen  
901-BDB2004-102523

Swedish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

möjliggör bättre tolkning av specifik färgning på antigenstället. Helst innehåller en negativ reagenskontroll en antikropp som producerats och preparerats (dvs spädd till samma koncentration med samma spädningsmedel) för användning på samma sätt som den primära antikroppen men uppvisar ingen specifik reaktivitet mot mänskliga vävnader i samma matris/lösning som primär antikropp. Enbart utspädningsmedel kan användas som ett mindre önskvärt alternativ till de tidigare beskrivna negativa reagenskontrollerna. Inkubationstiden för den negativa reagenskontrollen bör motsvara den för den primära antikroppen.

När paneler med flera antikroppar används på seriella snitt, kan de negativt färgande områdena på ett objektglas fungera som en negativ/icsespecifik bindningsbakgrundskontroll för andra antikroppar. För att differentiera endogen enzymaktivitet eller ospecifik bindning av enzymer från specifik immunreaktivitet, kan ytterligare patientvävnader färgas uteslutande med substrat-kromogen eller enzymkomplex (PAP, avidin-biotin, streptavidin) respektive substrat-kromogen.

#### Assayverifiering:

Innan en antikropp eller färgningssystem används i ett diagnostiskt förfarande, bör användaren verifiera antikroppens specificitet genom att testa den på en serie interna vävnader med kända immunhistokemiska prestandaegenskaper som representerar kända positiva och negativa vävnader. Se kvalitetskontrollprocedurerna som tidigare beskrivits i detta avsnitt av produktdragan och till kvalitetskontrollrekommendationerna i CAP Certification Program<sup>10</sup> för immunhistokemi och/eller NCCLS IHC-riktlinje<sup>11</sup>. Dessa kvalitetskontrollprocedurer bör upprepas för varje nytt antikroppsparti, eller närmest det sker en förändring i analysparametrarna. Vävnader listade i avsnittet Prestandaegenskaper är lämpliga för analysverifiering.

#### Felsökning:

Följ de antikoppsspecifika protokollrekommendationerna enligt databladet som tillhandahålls. Om atypiska resultat uppstår, kontakta Biocares tekniska support på 1-800-542-2002.

#### Tolkning av färgning:

Betazoid DAB Chromogen Kit producerar en brun färgreaktion vid antigenställena lokaliseringen av den primära antikroppen. Före tolkning av patientresultat måste färgningen av kontroller utvärderas av en kvalificerad patolog. Negativa kontroller utvärderas och jämförs med färgade objektglas för att säkerställa att eventuell observerad färgning inte är ett resultat av ospecifika interaktioner.

#### Positiv vävnadskontroll:

Den positiva vävnadskontrollen färgad med indikerad antikropp bör undersökas först för att säkerställa att alla reagenser fungerar korrekt. Lämplig färgning av målceller (som indikerat ovan) indikerar positiv reaktivitet. Om de positiva vävnadskontrollerna inte visar positiv färgning, bör alla resultat med testproverna anses ogiltiga.

Färgen på reaktionsprodukten kan variera beroende på använda substratkromogener. Se substratets bipacksedel för förväntade färgreaktioner. Vidare kan metakromasi observeras i variationer av färgningsmetoden.<sup>12</sup>

När en motfärgning används, beroende på inkubationslängden och styrkan hos den använda motfärgningen, kommer motfärgning att resultera i en färgning av cellkärnorna. Överdriven eller ofullständig motfärgning kan äventyra korrekt tolkning av resultaten. Se protokoll för rekommenderad motfärgning.

#### Negativ vävnadskontroll:

Den negativa vävnadskontrollen bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen för att verifiera specificiteten för märkningen av

måltantigenet med den primära antikroppen. Frånvaron av specifik färgning i den negativa vävnadskontrollen bekräftar avsnaden av antikroppeksaktivitet mot celler/cellulära komponenter. Om specifik färgning (falsk positiv färgning) inträffar i den negativa externa vävnadskontrollen, bör resultaten med patientprovet anses ogiltiga.

Ospecifik färgning, om sådan finns, har vanligtvis ett diffust utseende. Sporadisk färgning av bindväv kan också observeras i snitt från alltför formalinfixerade vävnader. Använd intakta celler för tolkning av färgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler färgas ofta ospecifikt.

#### Patientvävnad:

Undersök patientprover färgade med indikerad antikropp sista. Positiv färgningsintensitet bör bedömas inom ramen för eventuell ospecifik bakgrundsfärgning av den negativa reagenskontrollen. Som med alla immunhistokemiska tester betyder ett negativt resultat att antigenet inte upptäcktes, inte att antigenet saknades i cellerna/vävnaden som analyserades. Använd vid behov en panel av antikroppar för att identifiera falsknegativa reaktioner.

Se Sammanfattnings och förklaring, begränsningar och prestandaegenskaper för specifik information om indikerad antikoppsimmunreaktivitet.

#### Begränsningar:

##### Allmänna begränsningar:

1. För *in vitro* diagnostisk (IVD) användning
2. Denna produkt är endast avsedd för professionellt bruk: Immunhistokemi är en diagnostisk process i flera steg som består av specialiserad utbildning i val av lämpliga reagenser; vävnadsval, fixering och bearbetning; förberedelse av IHC-objektglaset; och tolkning av färgningsresultaten.
3. Endast för användning av läkares recept. (Endast Rx)
4. Vävnadsfärgning är beroende av hantering och bearbetning av vävnaden före färgning. Felaktig fixering, frysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärming, sektionering eller kontaminering med andra vävnader eller vätskor kan ge artefakter, antikroppeksfärgning eller falskt negativt resultat. Inkonsekventa resultat kan bero på variationer i fixerings- och inbäddningsmetoder, eller på inneboende oregelbundenhet i vävnaden.<sup>14</sup>
5. Överdriven eller ofullständig motfärgning kan äventyra korrekt tolkning av resultaten.
6. Den kliniska tolkningen av positiv eller negativ färgning bör utvärderas mot bakgrund av klinisk presentation, morfologi och andra histopatologiska kriterier. Den kliniska tolkningen av positiv eller negativ färgning bör kompletteras med morfologiska studier med korrektta positiva och negativa interna och externa kontroller samt andra diagnostiska tester. Det är en kvalificerad patolog som är bekant med korrekt användning av IHC-antikroppar, reagens och metoder som ansvarar för att tolka alla steg som används för att förbereda och tolka det slutliga IHC-preparatet.
7. De optimala protokollen för en specifik applikation kan variera. Dessa inkluderar, men är inte begränsade till fixering, värmeartervinningsmetod, inkubationstider, antikroppeksfärgning, vävnadssnittjocklek och detektionskit som används. Se den primära antikroppen och andra hjälpreagensanvisningar för användning för rekommenderade protokoll och villkor för användning. Databladets rekommendationer och protokoll är baserade på exklusiv användning av Biocare-produkter. Ytterst är det utredarens ansvar att fastställa optimala förhållanden.
8. Denna produkt är inte avsedd för användning i flödescytometri. Prestandaegenskaper har inte fastställts för flödescytometri.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Swedish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

9. Vävnader från personer infekterade med hepatit B-virus och som innehåller hepatitis B-tytanten (HBsAg) kan uppvisa ospecifik färgning med pepparotsperoxidat.<sup>14</sup>
10. Reagenser kan uppvisa oväntade reaktioner i tidigare otestade vävnader. Möjligheten för oväntade reaktioner även i testade vävnadsgrupper kan inte helt elimineras på grund av biologisk variation av antigenuttryck i neoplasmer eller andra patologiska vävnader.<sup>15</sup> Kontakta Biocares tekniska support på 1-800-542-2002, eller via den tekniska supportinformationen på biocare.net, med dokumenterade oväntade reaktioner.
11. Normala/icke-immuna sera från samma djurkälla som sekundära antisera som används i blockeringsssteg kan orsaka falsknegativa eller falskt positiva resultat på grund av autoantikroppar eller naturliga antikroppar.
12. Falskt positiva resultat kan ses på grund av icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av pseudoperoxidasaktivitet (erytrocyter), endogen peroxidasaktivitet (cytokrom C) eller endogent biotin (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure) beroende på vilken typ av immunfärgning som används.<sup>13</sup>
13. Ett negativt resultat betyder att antigenet inte detekterades, inte att antigenet saknades i de undersökta cellerna eller vävnaden.

#### Produktspecifika begränsningar:

Inga ytterligare produktspecifika begränsningar

#### Prestandaegenskaper:

Färgning utfördes med användning av protokoll som tillhandahålls i de antikoppsspecifika bruksanvisningarna eller som specificerats. Färgningens känslighet och specificitet utvärderades över en rad normala och neoplastiska vävnadstyper som utvärderades under utveckling av primära antikroppar.

#### Reproducerbarhet:

Reproducerbarheten av Biocares detektionssystem och systemreagenser verifieras genom en mätning av mellanprecision där olika reagenslots testades under en längre tidsperiod med hjälp av olika operatörer, analytiker, reagenslots, vävnadsprover och utrustning. Färgningen som erhölls för varje detektionsreagens som utvärderades var konsekvent och utfördes som förväntat.

#### Felsökning:

1. Ingen färgning av några objektglas – Kontrollera att lämplig positiv kontrollvävnad, antikroppar och detektionsprodukter har använts. Kontrollera om det finns ofullständig eller felaktig borttagning eller förbehandling av vax.
2. Svag färgning av alla objektglas – Kontrollera att lämplig positiv kontrollvävnad, antikroppar och detektionsprodukter har använts.
3. Överdriven bakgrund av alla objektglas – Det kan finnas höga nivåer av endogent biotin (om du använder biotinbaserade detektionsprodukter), endogen HRP-aktivitet som omvandlar kromogen till färgad slutprodukt (använd peroxidasblock) eller överskott av icke-specific proteininteraktion (använd ett protein block, såsom serum- eller kaseinbaserad blockeringslösning).
4. Vävnadssektioner tvättar bort objektglasen under inkubationen – Kontrollera objektglasen för att säkerställa att de är positivt laddade.
5. Specifik färgning för mörk – Kontrollera protokollet för att avgöra om korrekt antikoppstiter applicerades på objektglaset, samt korrekta inkubationstider för alla reagenser. Se dessutom till att protokollet har tillräckligt med tvättsteg för att ta bort överflödigt reagens efter att inkubationsstegen har slutförts.

#### Referenser:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

114/118



TP v1 (03/30/2022) | Tel: 800-799-9499 | www.biocare.net | Fax: 925-603-8080

 EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60

6827 AT Arnhem

The Netherlands

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Turkish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Available Product Formats

Catalog Number	Volume
BDB2004H	25 mL
BDB2004L	100 mL
BDB2004MM	1L

## Kullanım amacı:

İçin laboratuvar ortamında Tanısal Kullanım

Betazoid DAB Kromojen Kit iyi tespit sistemi ve birincil antikorlarla birlikte kullanıldığından formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü (FFPE) dokulardaki hedef抗原lerin saptanmasına yönelik manuel veya otomatik imünohistokimya (IHC) boyama protokollerinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Herhangi bir lekelenmenin veya yokluğunun klinik yorumu, morfolojik çalışmalar ve uygun kontrollerle tamamlanmalı ve hastanın klinik geçmişi ve diğer tanısal testler bağlamında kalifiye bir patolog tarafından değerlendirilmelidir.

## Özet ve Açıklama:

3,3' Diaminobenzidin (DAB) IHC boyama protokollerinde kullanılan, yaban turpu peroksiz (HRP) enziminin varlığında organik solventlerde çözünmeyecek kahverengi bir çökeltili üreten ve kalıcı bir montaj ortamı ile lamellenebilen köklü bir kromojenidir. Bu ürün, sıvı stabil bir DAB kromojeni ve bir DAB substrat tamponundan oluşan iki bileşenli bir sistemle gelir. Kromojen tampon karışımının rengi renksizden soluk kahverengiye kadar değişebilir. Boyama özellikleri kromojen tampon karışımının renginden etkilenmez. Betazoid DAB çok stabil bir formülasyondur. Betazoid DAB hem manuel hem de otomatik boyama makinelere kullanılabilir.

## Prosedür Prensibi:

Betazoid DAB Kromojen Kitindeki bu DAB kromojeni, FFPE doku kesitlerinin IHC testinde kullanıldığından, bir antijenin sıralı uygulanması yoluyla抗原lerin gösterilmesine olanak tanır. antijene spesifik antikor (birincil antikor), birincil antikora ikinci bir antikor (isteğe bağlı bağlantı antikoru/prob), bir enzim kompleksi ve araya giren yıkama adımlarına sahip bir kromojenik substrat. Kromojenin enzimatik aktivasyonu, antijen bölgesinde görünür bir reaksiyon ürünü ile sonuçlanır. Numune daha sonra zıt boyanabilir ve lame ile kaplanabilir. Sonuçlar bir ışık kullanılarak yorumlanır olabilecek veya patofizyolojik süreçlerin ayırcı tanısında yardımcı olabilir. belirli bir antijenle ilişkili olmayı bilir.

## Malzemeler ve yöntemler:

### Sağlanan Reaktifler:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
BDB2004H	BDB900C	Betazoid DAB Chromogen	1 x 1.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 25 mL
BDB2004L	BDB900F	Betazoid DAB Chromogen	1 x 4.0 mL
	DS900H	Betazoid DAB Substrate Buffer	4 x 25 mL
BDB2004MM	BDB900G20	Betazoid DAB Chromogen	2 x 20 mL
	DS900MM	Betazoid DAB Substrate Buffer	1 x 1L

## Sulandırma, Karıştırma, Seyretilme, Titrasyon:

Betazoid DAB Kromojen Kiti, Biocare antikorları ve yardımcı reaktiflerle kullanım için optimize edilmiştir ve kullanıldan hemen önce seyrettilmesi gereklidir. 1,0 mL DAB Substrat Tamponu başına 1 damla (32µL) DAB

Kromojeni karıştırın. DAB çalışma solüsyonu 2-8°C'de saklanırsa 5 gün stabildir.

## Bilinen Uygulamalar:

İmmünohistokimya (formalinle sabitlenmiş parafine gömülü dokular)

## Şu Şekilde Sağlanır:

*Betazoid DAB Kromojen*

DAB çözümü. Ek ayrıntılar için Güvenlik Veri Sayfasına bakın.

## Betazoid DAB Substrat Tamponu

Tamponlu çözelti %3 Hidrojen Peroksit çözeltisi içerir. Ek ayrıntılar için Güvenlik Veri Sayfasına bakın.

## Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler ve Reaktifler:

Mikroskop slaytları, pozitif yüklü

Pozitif ve negatif doku kontrolleri

Çöl Odası\* veya benzeri Kurutma fırını (isteğe bağlı)

Ksilen veya ksilen ikamesi

Etanol veya reaktif alkol

Gizlenme Odası\* veya benzeri düdüklü tencere (isteğe bağlı)

Deionize veya damitilmiş su

Yıkama tamponu\*

Ön arıtma reaktifleri\* (isteğe bağlı)

Enzim sindirim\* (isteğe bağlı)

Peroksizad bloğu\*

Protein bloğu\* (isteğe bağlı)

Birincil antikor\*

Negatif kontrol reaktifleri\*

Tespit kitleri\*

Hematoksilin\* (karşı boy'a)

Mavileştirme reaktifi\*

Montaj ortamı\*

Lamel camı

İşik Mikroskopu (40-400X büyütme)

\* Biocare Tıbbi Ürünler: Katalog numaraları ve siparişle ilgili bilgi için <http://biocare.net> adresindeki Biocare Medical web sitesine bakın. Yukarıda listelenen bazı reaktifler, kullanılan spesifik uygulama ve tespit sistemine dayanmaktadır.

## Depolama ve Stabilité:

2°C ile 8°C arasında saklayın. Ürün, bu koşullar altında saklandığında flakon etiketi üzerinde yazılı olan son kullanma tarihine kadar stabildir. Son kullanma tarihinden sonra kullanmayın. Belirtilenlerin dışındaki koşullar altında depolama doğrulanmalıdır. Seyretilmiş reaktifler talimat verildiği şekilde derhal kullanılmalıdır. Kullanılmayan seyretilmiş reaktif 2-8°C'de saklanırsa 5 gün stabildir. Kullanıcı tarafından seyretilen reaktifin 5 günden sonraki stabilitesi Biocare tarafından belirlenmemiştir.

Pozitif ve negatif kontroller tüm hasta örnekleriyle aynı anda çalıştırılmalıdır. Laboratuvar prosedürlerindeki değişikliklerde açıklanamayan beklenmedik bir lekelenmenirse ve antikorla ilgili bir sorundan şüpheleniyorsa, 1-800-542-2002 numaralı telefondan veya biocare.net adresine sağlanan teknik destek bilgileri aracılığıyla Biocare Teknik Desteğiyle iletişime geçin.

## Numune hazırlama:

Formalinde sabitlenen dokular parafine gömülümeden önce kullanıma uygundur. Doku kesmeyi kolaylaştırmak ve mikrotom bıçaklarının zarar görmesini önlemek için doku işlemeden önce kemik dokuların kireçten arındırılması gereklidir.<sup>1,2</sup>

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Turkish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

Belirtilen antijen hedefini ifade eden uygun şekilde sabitlenmiş ve gömülü dokular serin bir yerde saklanmalıdır. 1988 tarihli Klinik Laboratuvar İyileştirme Yasası (CLIA), 42 CFR'de§493.1259(b) uyarınca "Laboratuvar boyalı slaytları, alındığı tarihten itibaren en az on yıl saklamalıdır. numune bloklarını inceleme tarihinden itibaren en az iki yıl boyunca saklayın.<sup>3</sup>

## Dokuların Boyama Öncesi Tedavisi:

Aşağıda önerilen protokole göre Isı Kaynaklı Epitop Alma (HIER) işlemini gerçekleştirin. HIER'in IHC'den önce rutin kullanımının tutarsızlığı en aza indirdiği ve boyamayı standartlaştırdığı gösterilmiştir.<sup>4,5</sup>

## Uyarı ve Önlemler:

1. DAB'nın kanserojen olduğunu şüphelenildiği bilinmektedir.
2. DAB bileşenlerini güçlü ışığa veya doğrudan güneş ışığına maruz bırakmayın
3. DAB ciltte hassasiyete neden olabilir. Cilt ve gözlerle temasından kaçının.
4. DAB tehlike olarak sınıflandırıldığından, kansere neden olabileceğinden ve genetik hasara neden olduğundan şüphelenildiğinden, eldiven ve koruyucu kıyafet giyin ve kullanırken makul önlemleri alın.
5. İnsan veya hayvan kökenli malzemeleri potansiyel olarak biyolojik olarak tehlikeli olarak ele alın ve bu tür malzemeleri uygun önlemlerle atın. Maruz kalma durumunda, kullanıldığı yerde sorumlu makamların sağlık direktiflerine uyın.<sup>6,7</sup>
6. Tespitten önce ve sonra numuneler ve bunlara maruz kalan tüm materyaller, enfeksiyon bulaştırılabilecekmiş gibi kullanılmalı ve uygun önlemler alınarak imha edilmelidir. Reaktifler asla ağız yoluyla pipetlemeyin ve reaktiflerin ve numunelerin cilt ve mukoza zarlarına temasından kaçının. Reaktifler veya numuneler hassas alanlarla temas ederse bol mikarda suyla yıkayın.<sup>8</sup>
7. Reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyonu spesifik olmayan boyamanın artmasına neden olabilir.
8. Belirtilenlerin dışındaki inkübasyon süreleri veya sıcaklıklar hatalı sonuçlar verebilir. Kullanıcının bu tür değişiklikleri doğrulaması gereklidir.
9. Reaktif şişenin üzerinde yazılı olan son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
10. Mikro polimer saptama kiti reaktif(ler)i optimize edilmiştir ve Biocare antikorları ve yardımcı reaktiflerle kullanıma hazırlıdır. Önerilen protokoller ve kullanım koşulları için birincil antikor ve diğer yardımcı reaktif talimatlarına bakın.
11. Bertaraf yöntemi için yerel ve/veya resmi makamların gerekliliklerine uyın.
12. SDS talep üzerine sağlanır ve <http://biocare.net> adresinde bulunur.
13. Bu cihazla ilgili her türlü ciddi olayı, yerel Biocare temsilcisiyle ve kullanıcının bulunduğu Üye Devletin veya ülkenin geçerli yetkili makamıyla iletişime geçerek bildirin.

Bu kromojen kiti, 1272/2008 Sayılı Yönetmelik (EC) uyarınca aşağıdaki tabloda belirtilen şekilde sınıflandırılan bileşenleri içerir.

Tehlike	Kod	Tehlike Beyanı
	H314 H350	Genetik kusurlara neden olduğundan şüpheleniliyor Kansere neden olabilir

## Kullanım için talimatlar:

Kromojen kit reaktifleri Biocare antikorları ve yardımcı reaktiflerle kullanım için optimize edilmiştir. Önerilen protokoller ve kullanım koşulları için birincil antikor ve diğer yardımcı reaktif talimatlarına bakın. Kuluçka süreleri ve sıcaklıklar, takip edilen spesifik antikor protokolüne bağlı olarak değişecektir.

Otomatik bir boyama aleti kullanırken, çalışma parametreleri için özel aletin kullanım kılavuzuna ve kullanım talimatlarına bakın.

## IHC gerçekleştirmek için genel prosedür adımları:

1. Deparafinizasyon: Slaytları Slide Brite veya ksilende parafinden arındırın. Slaytları bir dizi dereceli alkollerle suya hidratlayın.
2. Peroksit Bloku: Peroxidized 1 ile 5 dakika süreyle bloke edin.
3. Ön Tedavi Çözümü/Protokolü: Önerilen ön tedavi çözümü ve protokolü için lütfen ilgili birincil antikor veri sayfasına bakın.
4. Protein Bloğu (İsteğe Bağlı): Arkaplan Punisher ile oda sıcaklığında (RT) 5-10 dakika inkübe edin.
5. Birincil Antikor: Kuluçka süresi için lütfen ilgili birincil antikor veri sayfasına bakın.
6. Prob (yalnızca fare antikorları): MACH 4 Fare Probu ile oda sıcaklığında 5-15 dakika inkübe edin.
7. Polimer: Fare antikorları için 10-20 dakika veya tavşan antikorları için 30 dakika boyunca MACH 4 HRP Polimeri ile oda sıcaklığında inkübe edin.
8. Kromojen: Biocare'in DAB'si ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin.
9. Karşıt boyama: Hematoksilen ile karıştır boyama. Deionize su ile durulayın. Tacha'nın Bluing Solüsyonunu 1 dakika boyunca uygulayın. Deionize su ile durulayın.

## Teknik Notlar:

1. Yıkama adımları için TBS'yi kullanın.

## Kalite kontrol:

İmmünohistokimya Testlerinin Tasarımı ve Uygulanmasına İlişkin CLSI Kalite Standartlarına bakın; Onaylanmış Kılavuz-İkinci Baskı (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA ABD ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011<sup>9</sup>

## Pozitif Doku Kontrolü:

Harici pozitif kontrol materyalleri, hasta numunesi/numuneleri ile aynı şekilde mümkün olan en kısa sürede sabitlenmiş, işlenmiş ve gömülü taze numunelerden oluşmalıdır. Pozitif doku kontrolleri, doğru hazırlanmış dokuların ve uygun boyama tekniklerinin göstergesidir. Her boyama işlemeye, her test koşulu seti için bir pozitif dökü kontrolü dahil edilmelidir.

Harici pozitif kontrol materyalleri için kullanılan dokular, zayıf pozitif boyama veren, iyi karakterize edilmiş düşük pozitif hedef aktivitesi seviyelerine sahip hasta numunelerinden seçilmelidir. Harici pozitif kontroller için düşük pozitiflik düzeyi, birincil antikor duyarlılığında kararsızlıktan veya IHC metodolojisindeki sorunlardan kaynaklanan hafif değişikliklerin tespit edilmesini sağlayacak şekilde tasarlanmıştır. Ticari olarak temin edilebilen doku kontrol slaytları veya hasta numunesinden/numunelerinden farklı şekilde işlenmiş numuneler yalnızca reaktif performansını doğrular ve dökü hazırlığını doğrulamaz.

Bilinen pozitif doku kontrolleri, hasta örneklerine yönelik spesifik bir teshisin formüle edilmesine yardımcı olmak yerine, yalnızca işlenmiş dokuların ve test reaktiflerinin doğru performansını izlemek için kullanılmalıdır. Pozitif doku kontrolleri pozitif boyama göstermezse test örnekleriyle elde edilen sonuçlar geçersiz sayılmalıdır.

## Negatif Doku Kontrolü:

IHC birincil antikorunun özgüllüğünü doğrulamak için her boyama işleminde hasta numunesi/numuneleri ile aynı şekilde sabitlenmiş, işlenmiş ve gömülü bir negatif dökü kontrolü kullanın. Hedef antijenin gösterilmesi ve spesifik arka plan boyamasının bir göstergesinin sağlanması (yanlış pozitif boyama). Ayrıca çoğu doku kesidine mevcut olan farklı hücre tiplerinin çeşitliliği, IHC'nin performansını doğrulamak için laboratuvarı tarafından dahili negatif kontrol alanları olarak kullanılacaktır özellikler. Negatif dökü kullanılabilecek örnek türleri ve kaynakları kontroller Performans Özellikleri bölümünde listelenmiştir.

Negatif dökü kontrollünde spesifik boyama (yanlış pozitif boyama) meydana gelirse hasta numuneleriyle elde edilen sonuçlar geçersiz sayılmalıdır.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Turkish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

## Spesifik Olmayan Negatif Reaktif Kontrolü:

Spesifik olmayan boyamayı değerlendirmek için her hasta örneğinin bir bölümü ile birincil antikor yerine spesifik olmayan bir negatif reaktif kontrolü kullanın ve antijen bölgesindeki spesifik boyamanın daha iyi yorumlanmasına izin verir. Ideal olarak bir negatif reaktif kontrolü, birincil antikorla aynı şekilde kullanılmak üzere üretilmiş ve hazırlanmış (yani aynı seyrelticiler kullanılarak aynı konsantrasyona seyreltilmiş) bir antikor içerir ancak aynı matris/cözelti içinde insan dokularıyla spesifik bir reaktivite sergilemez. birincil antikor. Tek başına seyrelticili, daha önce açıklanan negatif reaktif kontrollerine daha az tercih edilen bir alternatif olarak kullanılabilir. Negatif reaktif kontrolüne yönelik kuluçka süresi, birincil antikorunkine karşılık gelmelidir.

Seri böülümlerde birkaç antikordan oluşan paneller kullanıldığında, bir slaydin negatif boyama alanları, diğer antikorlar için negatif/spesifik olmayan bağlanma arka planı kontrolü görevi görebilir. Endojen enzim aktivitesini veya enzimlerin spesifik olmayan bağlanması spesifik immünoreaktiviteden ayırt etmek için, ilave hasta dokuları sırasıyla substrat-kromojen veya enzim kompleksleri (PAP, avidin-biyotin, streptavidin) ve substrat-kromojen ile özel olarak boyanabilir.

## Test Doğrulaması:

Bir antikorun veya boyama sisteminin bir teşhis prosedüründe ilk kullanımından önce kullanıcı, antikoru bilinen pozitif ve negatif dokuları temsil eden bilinen immünohistokimyasal performans özelliklerine sahip bir dizi kurum içi doku üzerinde test ederek antikorun özgüllüğünü doğrulamalıdır. Ürün ekinin bu bölümünde daha önce özetlenen kalite kontrol prosedürlerine ve CAP Sertifikasyon Programının kalite kontrol tavsiyelerine bakın.<sup>10</sup> İmmünohistokimya ve/veya NCCLS IHC kılavuzu için<sup>11</sup>. Bu kalite kontrol prosedürleri her yeni antikor lotu için veya test parametrelerinde her değişiklik olduğunda tekrarlanmalıdır. Performans Özellikleri bölümünde listelenen dokular test doğrulaması için uygundur.

## Sorun giderme:

Sağlanan veri sayfasına göre antikora özel protokol önerilerini izleyin. Tipik olmayan sonuçlar ortaya çıkarsa 1-800-542-2002 numaralı telefondan Biocare Teknik Desteğiyle iletişime geçin.

## Boyamanın Yorumlanması:

Betazoid DAB Kromojen Kiti, birincil antikorun lokalize ettiği antijen bölgelerinde kahverengi renk reaksiyonu üretir. Hasta sonuçlarının yorumlanmasımdan önce kontrollerin boyanması yetkililer patolog tarafından değerlendirilmelidir. Negatif kontroller değerlendirilir ve gözlemlenen herhangi bir lekelemenin spesifik olmayan etkileşimlerin sonucu olmadığından emin olmak için boyalı slaytlarla karşılaşılır.

## Pozitif Doku Kontrolü:

Belirtlen antikorla boyanmış pozitif doku kontrolü, tüm reaktiflerin düzgün çalıştığından emin olmak için ilk önce incelenmelidir. Hedef hücrelerin uygun şekilde boyanması (yukarıda belirtildiği gibi) pozitif reaktivitenin göstergesidir. Pozitif doku kontrolleri pozitif boyama göstermezse test numuneleriyle elde edilen sonuçlar geçersiz sayılmalıdır.

Reaksiyon ürününün rengi, kullanılan substrat kromojenlerine bağlı olarak değişebilir. Belirlenen renk reaksiyonları için alt tabaka paketindeki ekler bakın. Ayrıca boyama yönteminin varyasyonlarında metakromazi gözlemlenebilir.<sup>12</sup>

Bir karşı boyama kullanıldığından, kuluçka süresine ve kullanılan karşı boyamanın gücüne bağlı olarak karşı boyama, hücre çekirdeklerinin renklenmesine neden olacaktır. Aşırı veya eksik karşı boyama, sonuçların doğru şekilde yorumlanmasına tehlkiye atabilir. Önerilen karşı boyama için protokol(ler)e bakın.

## Negatif Doku Kontrolü:

Hedef antijenin birincil antikor tarafından etiketlenmesinin özgüllüğünü doğrulamak için pozitif doku kontrolünden sonra negatif doku kontrolü incelenmelidir. Negatif doku kontrolünde spesifik boyamanın olmaması, hücrelere/hücrelere karşı antikor çapraz reaktivitesinin olmadığını doğrular. Negatif dış doku kontrolünde spesifik boyama (yanlış pozitif boyama) meydana gelirse hasta numunesiyle elde edilen sonuçlar geçersiz sayılmalıdır.

Spesifik olmayan boyama, mevcutsa genellikle yaygın bir görünüm sahiptir. Aşırı formalinle fiksasyon dokulardan alınan kesitlerde ara sıra bağ dokusunda lekelenme de gözlemlenebilir. Boyama sonuçlarının yorumlanması için sağlam hücreleri kullanın. Nekrotik veya dejeneratif hücreler sıklıkla spesifik olmayan bir şekilde boyanır.

## Hasta Dokusu:

Belirtlen antikor boyanmış hasta numunelerini inceleyin son. Pozitif boyama yoğunluğu, negatif reaktif kontrolünün spesifik olmayan arka plan boyaması bağlamında değerlendirilmelidir. Herhangi bir immünohistokimyasal testte olduğu gibi, negatif sonuç, antijenin test edilen hücrelerde/dokuda bulunmadığı anlamına değil, antijenin tespit edilmediği anlamına gelir. Gerekirse yanlış negatif reaksiyonları tanımlamak için bir antikor paneli kullanın.

Belirtlen antikor immünoreaktivitesi ile ilgili spesifik bilgiler için Özeti ve Açıklama, Sınırlamalar ve Performans Özellikleri'ne bakın.

## Sınırlamalar:

### Genel Sınırlamalar:

1. *İçin/laboratuvar ortamında* teşhis (IVD) Kullanımı
2. Bu ürün yalnızca profesyonel kullanım içindir: İmmünohistokimya, uygun reaktiflerin seçimi içinde özel eğitimden oluşan çok adımlı bir teşhis sürecidir; doku seçimi, fiksasyonu ve işlenmesi; IHC slaytinın hazırlanması; ve boyama sonuçlarının yorumlanması.
3. Sadece doktor reçetesesi ile kullanım içindir. (Yalnızca Rx)
4. Doku boyaması, boyamadan önce dokunun işlenmesine ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan sabitleme, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer doku veya sıvılarla kontaminasyon; artefaktlara, antikor sıkışmasına veya yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. Tutarlı sonuçlar, sabitleme ve gömme yöntemlerindeki farklılıklara veya doku içindeki doğal düzensizliklere bağlı olabilir.<sup>14</sup>
5. Aşırı veya eksik karşı boyama, sonuçların doğru şekilde yorumlanmasına tehlkiye atabilir.
6. Herhangi bir pozitif veya negatif boyamanın klinik yorumu, klinik sunum, morfoloji ve diğer histopatolojik kriterler kapsamında değerlendirilmelidir. Herhangi bir pozitif veya negatif boyamanın klinik yorumu, uygun pozitif ve negatif iç ve dış kontrollerin yanı sıra diğer teşhis testlerinin kullanıldığı morfolojik çalışmalarla tamamlanmalıdır. Nihai IHC hazırlığını hazırlamak ve yorumlamak için kullanılan tüm adımları yorumlamak, IHC antikorlarının, reaktiflerinin ve yöntemlerinin doğru kullanımına așina olan nitelikli bir patologun sorumluluğundadır.
7. Belirli bir uygulama için optimum protokoller farklılık gösterebilir. Bunlar arasında, bunlarla sınırlı olmamak üzere, fiksasyon, ısı geri alma yöntemi, inkübasyon süreleri, antikor seyreltetmesi, doku kesiti kalınlığı ve kullanılan tespit kiti yer alır. Önerilen protokoller ve kullanım koşulları için birincil antikor ve diğer yardımcı reaktif talimatlarına bakın. Veri sayfası önerileri ve protokollerini Biocare ürünlerinin özel kullanımına dayanmaktadır. Sonuçta optimal koşulları belirlemek araştırmacının sorumluluğundadır.
8. Bu ürünün akış sitometrisinde kullanılması amaçlanmamıştır. Akış sitometrisi için performans özellikleri belirlenmemiştir.

# Betazoid DAB Chromogen Kit

Chromogen

901-BDB2004-102523

Turkish

**BIOCARE**  
M E D I C A L

9. Hepatit B virüsü ile enfekte olmuş ve hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) içeren kişilerden alınan dokular, yaban turpu peroksidazıyla spesifik olmayan boyama sergileyebilir.<sup>14</sup>
10. Reaktifler daha önce test edilmemiş dokularda bile beklenmeyen reaksiyonlar gösterebilir. Test edilen doku gruplarında bile beklenmeyen reaksiyonların olasılığı, neoplazmalar veya diğer patolojik dokularda antjen ekspresyonunun biyolojik değişkenliği nedeniyle tamamen ortadan kaldırılamaz.<sup>15</sup> 1-800-542-2002 numaralı telefondan veya biocare.net'te sağlanan teknik destek bilgileri aracılığıyla, belgelenmiş beklenmeyen reaksiyon(lar)la birlikte Biocare'in Teknik Desteğiyle iletişime geçin.
11. Bloklama adımlarında kullanılan ikincil antiserumlarla aynı hayvan kaynağından alınan normal/immün olmayan serumlar, otoantikorlar veya doğal antikorlar nedeniyle yanlış negatif veya yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir.
12. Proteinlerin veya substrat reaksiyon ürünlerinin immünolojik olmayan bağlanması nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar görülebilir. Ayrıca kullanılan immün boyanın türüne bağlı olarak yalancı peroksidaz aktivitesi (eritrositler), endojen peroksidaz aktivitesi (sitokrom C) veya endojen biyotin (örn. karaciğer, meme, beyin, böbrek) nedeniyle de kaynaklanabilir.<sup>13</sup>
13. Negatif bir sonuç, incelenen hücrelerde veya dokuda antijenin bulunmadığı değil, antijenin tespit edilemediği anlamına gelir.

## Ürüne Özel Sınırlamalar:

Ürüne özel ek sınırlama yok

## Performans Özellikleri:

Boyama, antikora özel kullanım talimatlarında veya belirtildiği şekilde sağlanan protokoller kullanılarak gerçekleştirildi. Boyamanın duyarlılığı ve özgüllüğü, birincil antikorların geliştirilmesi sırasında değerlendirilen bir dizi normal ve neoplastik doku tipinde değerlendirildi.

## Yeniden üretilenebilirlik:

Biocare'in tespit sistemlerinin ve sistem reaktiflerinin tekrar üretilenebilirliği, çeşitli reaktif lotlarının çeşitli operatörler, analistler, reaktif lotları, doku numuneleri ve ekipmanlar kullanılarak uzun bir süre boyunca test edildiği orta düzeyde hassasiyet ölçümlü doğrulanır. Değerlendirilen her tespit reaktifi için elde edilen boyama tutarlıydı ve beklentiği gibi yapıldı.

## Sorun giderme:

1. Hiçbir slaytta lekelenme yok – Uygun pozitif kontrol dokusunun, antikorun ve tespit ürünlerinin kullanıldığını belirlemek için kontrol edin. Balmumunun eksik veya uygunsuz şekilde çıkarılması veya öntedavisiinin yapılmadığını kontrol edin.
2. Tüm slaytların zayıf boyanması – Uygun pozitif kontrol dokusunun, antikorun ve tespit ürünlerinin kullanıldığını belirlemek için kontrol edin.
3. Tüm slaytların aşırı arka planı – Yüksek seviyelerde endojen biyotin (biyotin bazlı tespit ürünleri kullanılıyorsa), kromojeni renkli son ürünü dönüştüren endojen HRP aktivitesi (peroksidaz bloğu kullanın) veya aşırı spesifik olmayan protein etkileşimi (bir protein kullanın) olabilir serum veya kazein bazlı bloke etme solüsyonu gibi blokaj.
4. Doku bölümleri inkübasyon sırasında slaytları yıkar – Pozitif yüklü olduklarından emin olmak için slaytları kontrol edin.
5. Spesifik boyama çok koyu – Slayda uygun antikor titresinin uygulanıp uygulanmadığını ve ayrıca tüm reaktifler için uygun inkübasyon sürelerini belirlemek için protokolü kontrol edin. Ek olarak, kuluça adımları tamamlandıktan sonra fazla reaktifleri çıkarmak için protokolün yeterli yıkama adımına sahip olduğundan emin olun.

## Referanslar:

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
6. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
7. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Fourth Edition CLSI document M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. CLSI Quality Standards for Design and Implementation of Immunohistochemistry Assays; Approved Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA ([www.clsi.org](http://www.clsi.org)). 2011
10. College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. [Http://www.cap.org](http://www.cap.org) (800) 323-4040.
11. O'Leary TJ, Edmonds P, Floyd AD, Mesa-Tejada R, Robinowitz M, Takes PA, Taylor CR. Quality assurance for immunocytochemistry; Proposed guideline. MM4-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.
12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in Immunoperoxidase techniques. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. 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. Am J Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

 Biocare Medical

60 Berry Drive

Pacheco, CA 94553

USA

118/118

