

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

English

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Intended Use:

For *in vitro* Diagnostic Use

The intelliPATH FLX™ 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 pale brown to orange. Staining properties are not affected by the color of the chromogen buffer mixture. intelliPATH FLX™ DAB is a formulation that is very stable. intelliPATH FLX™ DAB is designed to be used on the intelliPATH FLX™ automated stainer.

Principle of Procedure:

This DAB chromogen in the intelliPATH FLX™ 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
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration:

The intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit is optimized for use with Biocare antibodies and ancillary reagents and must be diluted just prior to use. On-line Mix: 120 µL of DAB Chromogen per 2000 µL of DAB Buffer. If chromogen is mixed off-line, use the same ratio. The DAB working solution is stable for 5 days. Store the DAB working solution at 2-8°C.

Known Applications:

Immunohistochemistry (formalin-fixed paraffin-embedded tissues)

Supplied As:

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen

DAB solution. See Safety Data Sheet for additional details.

intelliPATH FLX™ DAB 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. The stability of user diluted reagent 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.^{1,2}

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."³

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.^{4,5}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

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.^{6,7}
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.⁸
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
	H341 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). 2011⁹

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 laboratorian 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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

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 Program¹⁰ for Immunohistochemistry and/or the NCCLS IHC guideline¹¹. 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 intelliPATH FLX™ 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.¹²

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.¹⁴
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.¹⁴
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.¹⁵ 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.¹³
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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

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 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. AmJ 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Bulgarian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Предназначение:

За *in vitro* Диагностична употреба

Комплектът intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit е предназначен за използване в протоколи за ръчно или автоматизирано имунохистохимично (ИНС) 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 антители. 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 ИНС 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 бледокафяв до оранжев. Свойствата на оцветяване не се влияят от цвета на хромогенната буферна смес. intelliPATH FLX™ DAB е формула, която е много стабилна. intelliPATH FLX™ DAB е проектиран да се използва на intelliPATH FLX™ автоматизиран оцветител.

Принцип на процедурата:

Този DAB хромоген в intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit, когато се използва при ИНС тестване на FFPE тъканни срезове, позволява визуализиране на антигени чрез последователно прилагане на специфично анти тяло към антигена (първично анти тяло), вторично анти тяло към първичното анти тяло (по избор свързващо анти тяло/сонда), ензимен комплекс и хромогенен субстрат с вмъкнати 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 помощ 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
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Разтваряне, смесване, разреждане, титруване:

Комплектът intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit е оптимизиран за използване с антители на Biocare и спомагателни реагенти и трябва да се разрежда точно преди употреба.

Онлайн смесване: 120 µL DAB Chromogen на 2000 µL DAB буфер. Ако хромогенът се смесва офлайн, използвайте същото съотношение. Работният разтвор на DAB е стабилен за 5 дни. Съхранявайте работния разтвор на DAB при 2-8°C.

Известни приложения:

Имунохистохимия (фиксирана във формалин тъкани, вградени в парафин)

Доставя се като:

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen

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

intelliPATH FLX™ DAB буфер

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

Необходими, но неосигурени материали и реагенти:

Предметни стъкла 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 тенджерка под налягане (по избор)

Дейониизирана или дестилирана вода

Измиващ буфер*

Реагенти за предварителна обработка* (по избор)

Ензимно смилане* (по избор)

Пероксидазен блок*

Протеинов блок* (по избор)

Първично анти тяло*

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 каталожните 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. Стабилността на разреждения от потребителя реагент не е установена от Biocare.

Положителните и отрицателните контроли трябва да се провеждат едновременно с всички проби от пациенти. Ако се наблюдава неочаквано оцветяване, което не може да се обясни с вариации в лабораторните процедури и се подозира проблем с анти тялото, 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:

Тъкани, фиксирани във формалин са подходящи за използване преди парафиново вграждане. Костните тъкани трябва да бъдат декалцифицирани преди обработката на тъканите, за да се улесни разрязването на тъканите и да се предотврати повреда на остриетата на микротомата.^{1,2}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Bulgarian

BIOCARE
M E D I C A L

Правилно фиксирани 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 проби най-малко две години от датата на изследването.“³

Третиране на тъкани преди оцветяване:

Извършете индуцирано от топлина извличане на епитоп (HIER) съгласно препоръчания протокол по-долу. Доказано е, че рутинното използване на HIER преди IHC минимизира несъответствието и стандартизира оцветяването.^{4,5}

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 сенсibiliзация 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.^{6,7}
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 проби влязат в контакт с чувствителни зони, измийте ги с обилно количество вода.⁸
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 антияло 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. Докладвайте 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.

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
	H341 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 антияло и други спомагателни реагенти за употреба за препоръчителните протоколи и условия за употреба. Времето и температурите на инкубация ще варират 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 IHC:

1. Депарафинизиране: Депарафинизирайте предметните стъкла в Slide Bite или ксилен. Хидратът се плъзга в серия градиращи алкохоли до вода.
2. Блокиране на пероксид: Блокирайте за 5 минути с Peroxidized 1.
3. Разтвор/протокол за предварително третиране: Моля, вижте съответния лист с данни за първично антияло за препоръчан 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 антияло: Моля, вижте съответния лист с данни за първично антияло 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 CAЩ (www.clsi.org). 2011 г.

Положителен тъканен контрол:

Материалите за външна положителна контрола трябва да бъдат пресни проби, фиксирани, обработени и вградени възможно най-скоро по същия начин като пробата(ите) на пациента. Положителните тъканни контроли са показателни за правилно подготвени 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.

Тъканите, използвани за материалите за външна положителна контрола, трябва да бъдат избрани от проби от пациенти с добре охарактеризирани ниски нива на положителна целева активност, която дава слабо положително оцветяване. Ниското ниво на положителност

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Bulgarian

BIOCARE
M E D I C A L

за външни положителни контроли е проектирано така, че да осигури откриване на фини промени в чувствителността на първичното анти тяло от нестабилност или проблеми с ИНС методологията. Предлаганите в търговската мрежа предметни стъкла за контрол на тъкани или проби, 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 помощ при формулиране на конкретна диагноза на проби от пациенти. Ако положителните тъканни контроли не успеят да покажат положително оцветяване, резултатите с тестовите проби 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 ИНС първичното анти тяло за демонстрация на целевия антиген и за предоставяне на индикация за специфично фоново оцветяване (фалшиво положително оцветяване). Освен това разнородните 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 ИНС спецификации. Типовете и източниците на проби, 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 пробите на пациента трябва да се считат за невалидни.

Неспецифичен отрицателен контролен реагент:

Използвайте неспецифична отрицателна контрола на реагента на мястото на първичното анти тяло със секция от всяка проба 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 анти тяло (т.е. разрежено до същата концентрация с помощта на същия разреждател) за използване по същия начин като първичното анти тяло, но не проявява специфична реактивност с човешки тъкани в същата матрица/разтвор като първично анти тяло. Само разреждател 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 анти тяло.

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

Проверка на анализа:

Преди първоначалното използване на анти тяло или система за оцветяване в диагностична процедура, потребителят трябва да провери специфичността на анти тялото, 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® за имунохистохимия и/или насоките за ИНС на NCCLS™. Тези процедури за контрол на качеството трябва да се повтарят за всяка нова партида

анти тяло 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 анти тела съгласно предоставения лист с данни. Ако възникнат нетипични резултати, свържете се с техническата поддръжка на Biocare на 1-800-542-2002.

Тълкуване на оцветяването:

Комплектът intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit произвежда кафява цветна реакция на антигенните места, локализиращи от първичното анти тяло. 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 анти тяло, трябва първо да се изследва, за да се установи, че всички реагенти функционират правилно. Подходящото оцветяване на прицелните клетки (както е посочено по-горе) е показателно за положителна реактивност. Ако положителните тъканни контроли не успеят да покажат положително оцветяване, всички резултати с тестовите проби 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 метакромоазията може да се наблюдава при вариации на метода на оцветяване.¹² 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 контраоцветяване.

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 анти тяло. Липсата на специфично оцветяване в отрицателната тъканна контрола потвърждава липсата на кръстосана реактивност на анти тела към клетки/клетъчни компоненти. Ако се появи специфично оцветяване (фалшиво положително оцветяване) в отрицателната външна тъканна контрола, резултатите от пробата от пациента трябва да се считат за невалидни.

Неспецифичното 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 дегенерирани клетки често се оцветяват неспецифично.

Тъкан на пациента:

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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Bulgarian

BIOCARE
M E D I C A L

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

Ограничения:

Общи ограничения:

1. *Заинвитро* диагностична (IVD) употреба
2. Този продукт е само за професионална употреба: Имунохистохимията е многоетапен диагностичен процес, който се състои от специализирано обучение за избор на подходящи реагенти; подбор, фиксиране и обработка на тъкани; подготовка на ИНС слайда; и интерпретация на резултатите от оцветяването.
3. За употреба само по лекарско предписание. (Само Rx)
4. Оцветяването на тъканта зависи от обработката и обработката на тъканта преди оцветяването. Неправилното фиксиране, замразяване, размразяване, измиване, сушене, нагряване, нарязване или замърсяване с други тъкани или течности може да доведе до артефакти, улавяне на антигенов или фалшиво отрицателни резултати. Непоследователните резултати може да се дължат на вариации в методите за фиксиране и вграждане или на присъщи нередности в тъканта.¹⁴
5. Прекомерното или непълно контрастно оцветяване може да компрометираща правилното тълкуване на резултатите.
6. 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 ИНС антигенов, реагенти и методи, е да интерпретира всички стъпки, използвани за подготовка и тълкуване на крайния ИНС препарат.
7. Оптималните протоколи за конкретно приложение могат да варират. Те включват, но не се ограничават до фиксация, метод за извличане на топлина, времена на инкубация, разреждане на антигенов, дебелина на тъканния участък и използван комплект за откриване. Обърнете се към инструкциите за първично антигенов 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.
8. Този продукт не е предназначен за използване в поточна цитометрия. Характеристики на ефективността не са определени за поточна цитометрия.
9. 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.¹⁴
10. Реагентите могат да покажат неочаквани реакции в нетествани преди това тъкани. Възможността за неочаквани реакции дори в тествани тъканни групи не може да бъде напълно елиминирана поради биологичната варибилност на експресията на антиген в неоплазми или други патологични тъкани.¹⁵ Свържете се с техническата поддръжка на Biocare на 1-800-542-2002 или чрез информацията за техническа поддръжка, предоставена на biocare.net, с документираните неочаквани реакции.
11. 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 автоантигенов или естествени антигенов.
12. Могат да се наблюдават фалшиви положителни резултати поради неимуннологично 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, бъбрек) в зависимост от вида на използваното имунооцветяване.¹³
13. Отрицателен резултат означава, че антигенов не е бил открит, а не че антигенов 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 специфичните инструкции за употреба на антигенов 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 антигенов.

Възпроизводимост:

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

Отстраняване на неизправности:

1. Няма оцветяване на предметни стъкла – Проверете, за да определите, че са използвани подходящи тъкани за положителна контрола, антигенов и продукти за откриване. Проверете за непълно или неправилно отстраняване или предварителна обработка.
2. Слабо оцветяване на всички предметни стъкла – Проверете, за да определите, че са използвани подходящи тъкани за положителна контрола, антигенов и продукти за откриване.
3. Прекален фон на всички предметни стъкла – 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 излишно неспецифично протеиново взаимодействие (използвайте протеин блок, като блокиращ разтвор на базата на серум или казеин).
4. Тъканните срезове се измиват от предметните стъкла по време на инкубацията – Проверете предметните стъкла, за да се уверите, че са положително заредени.
5. Специфично оцветяване е твърде тъмно – Проверете протокола, за да определите дали към предметното стъкло е приложен правилен титър на антигенов, 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.

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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Bulgarian

BIOCARE
M E D I C A L

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. AmJ 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Chinese (Simplified)

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

有可能的使用:

为了体外诊断用途

intelliPATH FLX™ DAB 显色剂试剂盒适用于手动或自动免疫组织化学 (IHC) 染色方案, 与适当的检测系统结合使用时, 可检测福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织中的靶抗原一抗。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。显色剂缓冲混合物的颜色可能从浅棕色到橙色不等。染色特性不受显色剂缓冲混合物颜色的影响。智能路径 FLX™ DAB 是一种非常稳定的配方。智能路径 FLX™ DAB 设计用于智能路径 FLX™ 自动染色机。

程序原则:

intelliPATH FLX™ 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
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

重构、混合、稀释、滴定:

intelliPATH FLX™ 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。

在线混合: 每 2000 µL DAB 缓冲液含 120 µL DAB 显色剂。如果色原是离线混合的, 请使用相同的比例。DAB 工作液可稳定 5 天。将 DAB 工作溶液储存在 2-8°C 下。

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:

intelliPATH FLX™ DAB 显色剂

DAB 溶液。有关更多详细信息, 请参阅安全数据表。

intelliPATH FLX™ DAB 缓冲液

缓冲液含有 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。Biocare 尚未确定用户稀释试剂的稳定性。

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:

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。^{1,2}

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。³

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723
Chinese (Simplified)

BIOCARE
M E D I C A L

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。⁴⁵

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。⁶⁷
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置, 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。⁸
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

危险	代码	危险声明
	H341 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. Chromogen: 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)。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 and 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和

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。

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Chinese (Simplified)

BIOCARE
M E D I C A L

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¹⁰ 用于免疫组织化学和/或 NCCLS IHC 指南¹¹。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用于检测验证。

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：

intelliPATH FLX™ DAB 显色试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。¹² 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固定。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。¹⁴
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和阴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。¹⁴
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。¹⁵ 请致电 1-800-542-2002 联系 Biocare 的技术支持，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。¹³
13. 阴性结果意味着未检测到抗原，而不是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。

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Chinese (Simplified)

BIOCARE
M E D I C A L

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, Ashcavi 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 Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194*.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Chinese (Traditional)

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

有可能的使用:

為了體外診斷用途

intelliPATH FLX™ DAB 顯色劑試劑盒適用於手動或自動免疫組織化學 (IHC) 染色方案，與適當的檢測系統結合使用時，可檢測福馬林固定石蠟包埋 (FFPE) 組織中的目標抗原-抗。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來進行評估。

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。顯色劑緩衝混合物的顏色可能從淺棕色到橙色不等。染色特性不受顯色劑緩衝混合物顏色的影響。智慧路徑 FLX™ DAB 是一種非常穩定的配方。智慧路徑 FLX™ DAB 設計用於智慧路徑 FLX™ 自動染色機。

程序原則:

intelliPATH FLX™ DAB 顯色劑試劑盒中的這種 DAB 顯色劑在用於 FFPE 組織切片的 IHC 測試時，可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:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

重構、混合、稀釋、滴定:

intelliPATH FLX™ DAB 顯色劑試劑盒經過最佳化，可與 Biocare 抗體和輔助試劑一起使用，並且必須在使用前稀釋。

線上混合: 每 2000 µL DAB 緩衝液含 120 µL DAB 顯色劑。如果色原是離線混合的，請使用相同的比例。DAB 工作液可穩定 5 天。將 DAB 工作溶液儲存在 2-8°C 下。

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:

intelliPATH FLX™ DAB 顯色劑

DAB 溶液。有關更多詳細信息，請參閱安全資料表。

intelliPATH FLX™ DAB 緩衝區

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。Biocare 尚未確定使用者稀釋試劑的穩定性。

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:

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。^{1,2}

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。³

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723
Chinese (Traditional)

BIOCARE
M E D I C A L

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。⁴⁵

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。⁶⁷
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。⁸
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。

此顯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
	H341 H350	疑似造成基因缺陷 可能致癌

使用說明：

顯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. Chromogen：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, PA USA (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和

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。

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723
Chinese (Traditional)

BIOCARE
M E D I C A L

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/非特异性結合背景對照。為了區分內源性酵素活性或酵素的非特异性結合與特异性免疫反應性，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制程序以及 CAP 認證計劃的品質控制建議¹⁰ 用於免疫組織化學和/或 NCCLS IHC 指南¹¹。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制程序。性能特徵部分列出的組織適合用於檢測驗證。

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：

intelliPATH FLX™ 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异性交互作用的結果。

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被視為無效。

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。¹² 當使用複染劑時，根據培養長度和所用複染劑的效力，複染將導致細胞核着色。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异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异性染色 (假陽性染色)，則病患檢體的結果應被視為無效。

非特异性染色 (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异性染色。

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异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 載玻片的製備；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。¹⁴
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异性染色。¹⁴
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。¹⁵ 請致電 1-800-542-2002 聯繫 Biocare 的技術支持，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。¹³
13. 陰性結果意味著未檢測到抗原，而不是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。

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Chinese (Traditional)

BIOCARE
M E D I C A L

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。檢查除蠟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）或過量的非特异性蛋白質交互作用（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洗掉 - 檢查載玻片以確保它們帶正電。
5. 特异性染色太深 - 檢查實驗方案以確定是否對玻片應用了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. AmJ 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*.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Croatian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Namjena:

Zain vitro Dijagnostička upotreba

Kromogen kit intelliPATH FLX™ DAB 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 primarna antitijela. 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 blijedo smeđe do narančaste. Na svojstva bojenja ne utječe boja smjese kromogenog pufera.intelliPATH FLX™DAB je formulacija koja je vrlo stabilna.intelliPATH FLX™DAB je dizajniran za korištenje naintelliPATH FLX™automatizirani stainer.

Princip postupka:

Ovaj DAB kromogen u kompletu intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit, kada se koristi u IHC testiranju FFPE presjeka tkiva, omogućuje vizualizaciju antigena putem sekvencijalne 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. Enzimaska aktivacija kromogena rezultira vidljivim produktom reakcije na mjestu antigena. Uzorak se zatim može obojiti suprotno i prekriti stakalcem. Rezultati se tumače pomoću svjetla mikroskop i pomoć u diferencijalnoj dijagnozi 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
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Rekonstitucija, miješanje, razrjeđivanje, titracija:

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit optimiziran je za upotrebu s Biocare antitijelima i pomoćnim reagensima i mora se razrijediti neposredno prije upotrebe.

Mješavina na mreži: 120 µL DAB kromogena na 2000 µL DAB pufera. Ako se kromogen miješa izvan mreže, koristite isti omjer. Radna otopina DAB-a stabilna je 5 dana. Čuvajte DAB radnu otopinu na 2-8°C.

Poznate primjene:

Imunohistokemija (tkiva fiksirana formalinom i parafinom)

Isporučuje se kao:

intelliPATH FLX™ DAB kromogen

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

intelliPATH FLX™ DAB međuspremnik

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
Pustinska komora* ili slična pećnica za sušenje (opcionalno)
Ksilen ili zamjena za ksilen
Etanol 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)
Enzimaska probava* (nije obavezno)
Blok peroksidaze*
Proteinski blok* (opcionalno)
Primarno antitijelo*
Reagensi negativne kontrole*
Kompleti za otkrivanje*
Hematoksilin* (kontrabojenje)
Reagens za plavljenje*
Medij za montažu*
Pokrivo 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.

Škladištenje i stabilnost:

Čuvati 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. Razrijeđene reagentse treba upotrijebiti odmah prema uputama. Biocare nije utvrdio stabilnost reagensa razrijeđenog korisnikom.

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 Biocareovoj tehničkoj podršci na 1-800-542-2002 ili putem informacija o tehničkoj podršci na biocare.net.

Priprema uzorka:

Tkiva fiksirana u formalinu prikladni su za upotrebu prije ugradnje parafina. Koštana tkiva treba dekalificirati prije obrade tkiva kako bi se olakšalo rezanje tkiva i spriječilo oštećenje oštrica mikrotoma.^{1,2}

Ispravno fiksirana i ugrađena tkiva koja ekspiriraju specficirani 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 ispitivanja i čuvati blokove uzoraka najmanje dvije godine od datuma ispitivanja.“³

Obrada tkiva prije bojenja:

Provedite toplinski inducirano vraćanje epitopa (HIER) prema dolje preporučenom protokolu. Pokazalo se da rutinska uporaba HIER-a prije IHC-a smanjuje nedosljednost i standardizira bojenje.^{4,5}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Croatian

BIOCARE
M E D I C A L

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 odložite takve materijale uz odgovarajuće mjere opreza. U slučaju izlaganja, slijedite zdravstvene upute nadležnih tijela gdje se upotrebljava.^{6,7}
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 reagense 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.⁸
7. Mikroba 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 povezano 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
	H341 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: Blokirate 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 miša protutijela ili 30 minuta za zečja protutijela na sobnoj temperaturi s MACH 4 HRP polimerom.
8. Kromogen: Inkubirajte 5 minuta na sobnoj temperaturi s Biocare DAB
9. Kontrabojenje: Kontrabojenje hematoksinom. 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). 2011⁹

Pozitivna kontrola tkiva:

Materijali za vanjsku pozitivnu kontrolu trebaju biti svježi uzorci fiksirani, obrađeni 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 ciljane 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 drugačiji 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 formuliranju specifične dijagnoze uzoraka pacijenata. Ako pozitivne kontrole tkiva ne pokažu pozitivno bojenje, rezultate testnih uzoraka treba smatrati nevažecima.

Negativna kontrola tkiva:

Upotrijebite negativnu kontrolu tkiva fiksiranu, obrađenu i ugrađenu na način identičan uzorcima pacijenta sa svakim bojenjem kako biste potvrdili specifičnost IHC primarnog protutijela za demonstracija ciljnih 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 mjesta 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 nevažecima.

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 antigena. U idealnom slučaju, negativna kontrola reagensa sadrži proizvedeno i pripremljeno protutijelo (tj. razrijeđeno 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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Croatian

BIOCARE
M E D I C A L

inkubacije za negativnu kontrolu reagensa treba odgovarati onom primarnog protutijela.

Kada se paneli nekoliko protutijela koriste na serijskim presjecima, negativno obojena područja jednog stalca 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 certifikacije¹⁰ za imunohistokemiju i/ili NCCLS IHC smjernice¹¹. 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:

Kromogen komplet intelliPATH FLX™ DAB 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 stalcima 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 nevažecima.

Boja produkta reakcije može varirati ovisno o korištenim kromogenima supstrata. Za očekivane reakcije boja pogledajte upute za pakiranje supstrata. Nadalje, metakromazija se može uočiti u varijacijama metode bojenja.¹² Kada se koristi protubojenje, ovisno o duljini inkubacije i jačini korištenog protubojenja, 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 antigena primarnim protutijelom. Odsutnost specifičnog bojenja u negativnoj kontroli tkiva potvrđuje nedostatak unakrsne reaktivnosti protutijela na stanice/stanične komponente. Ako dođe do specifičnog bojenja (lažno pozitivno bojenje) u negativnoj vanjskoj kontroli tkiva, rezultate uzorka s pacijenta treba smatrati nevažecima.

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 intaktne stanice za tumačenje rezultata bojenja. Nekrotične ili degenerirane stanice često se boje nespecifično.

Tkivo pacijenta:

Pregledajte uzorke 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 indiciranom imunoreaktivnošću protutijela.

Ograničenja:

Opća ograničenja:

1. *Zain vitro* dijagnostička (IVD) upotreba
2. Ovaj proizvod je samo za profesionalnu upotrebu: Imunohistokemija je višestupanjski dijagnostički proces koji se sastoji od specijalizirane obuke u odabiru odgovarajućih reagensa; selekcija, fiksacija i obrada tkiva; priprema IHC stalca; i tumačenje rezultata bojenja.
3. Za korištenje samo prema liječničkom receptu. (Samo Rx)
4. 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.¹⁴
5. Pretjerano ili nepotpuno kontrastno bojenje može ugroziti pravilno tumačenje rezultata.
6. Kliničku interpretaciju bilo kojeg pozitivnog ili negativnog bojenja treba procijeniti u kontekstu kliničke slike, morfoloije 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 upotrebom IHC protutijela, reagensa i metoda za tumačenje svih koraka korištenih za pripremu i tumačenje konačnog IHC priprema.
7. Optimalni protokoli za određenu aplikaciju mogu varirati. To uključuje, ali nije ograničeno na fiksaciju, metodu povrata topline, vrijeme inkubacije, razrjeđivanje antitijela, debljinu 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 upotrebi Biocare proizvoda. U konačnici, odgovornost je istraživača da odredi optimalne uvjete.
8. Ovaj proizvod nije namijenjen za upotrebu u protočnoj citometriji. Radne karakteristike nisu utvrđene za protočnu citometriju.
9. Tkiva osoba zaraženih virusom hepatitisa B i koja sadrže površinski antigen hepatitisa B (HBsAg) mogu pokazivati nespecifično obojenje peroksidazom hrena.¹⁴
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 antigena u novotvorinama, odnosno drugim patološkim tkivima.¹⁵ 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, mozak, bubreg) ovisno o vrsti korištenog imunološkog bojenja.¹³
13. Negativan rezultat znači da antigen nije detektiran, a ne da antigen nije bio prisutan u ispitivanim stanicama ili tkivu.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Croatian

BIOCARE
M E D I C A L

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 detekcije i reagensa sustava potvrđena je mjerenjem 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 jesu li korištena odgovarajuća pozitivna kontrola tkiva, antitijela i proizvoda za otkrivanje.
3. Prevelika pozadina svih stakalca – 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 stakalca 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. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
14. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. AmJ 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Czech

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Zamýšlené použití:

Pro in vitro Diagnostické použití

Sada intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit je určena pro použití v manuálních nebo automatických imunohistochemických (IHC) protokolech barvení pro detekci cílových antigenů v tkáních fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu (FFPE), pokud se používá ve spojení s příslušným detekčním systémem a primární protilátkou. Klinická interpretace jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti by měla být doplněna morfologickými studii 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 křénové peroxidázy (HRP) vytváří hnědou sraženinu, která je nerozpustná 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 pufru. Barva směsi chromogenového pufru se může lišit od světle hnědé po oranžovou. Barvicí vlastnosti nejsou ovlivněny barvou směsi chromogenového pufru. IntelliPATH FLX™ DAB je formulace, která je velmi stabilní. IntelliPATH FLX™ DAB je navržen pro použití na IntelliPATH FLX™ automatický barvicí stroj.

Princip postupu:

Tento DAB chromogen v sadě intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit, pokud se používá při IHC testování tkáňových řezů FFPE, umožňuje vizualizaci antigenů pomocí sekvenční aplikace specifické protilátky k antigenu (primární protilátka), sekundární protilátka k primární protilátce (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 pomůcka při diferenciální diagnostice patofyziologických 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
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Rekonstituce, míchání, ředění, titrace:

Sada intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit je optimalizována pro použití s protilátkami Biocare a pomocnými činidly a musí být naředěna těsně před použitím.

On-line mix: 120 µL DAB Chromogenu na 2000 µL DAB Bufferu. Pokud se chromogen míchá off-line, použijte stejný poměr. Pracovní roztok DAB je stabilní po dobu 5 dnů. Pracovní roztok DAB skladujte při 2-8°C.

Znamé aplikace:

Imunohistochemie (tkáň zalitá v parafínu fixovaná formalínem)

Dodáváno jako:

intelliPATH FLX™ DAB chromogen

DAB řešení. Další podrobnosti viz Bezpečnostní list.

vyrovnávací paměť intelliPATH FLX™ DAB

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

Potřebné materiály a činidla, které nejsou součástí dodávky:

Mikroskopická sklíčka, kladně nabitá
Pozitivní a negativní tkáňové kontroly
Pouštní komora* nebo podobná Sušicí pec (volitelně)
Xylen nebo náhrada xylynu
Ethanol nebo reagenční alkohol
Decloaking Chamber* nebo podobný tlakový hrnec (volitelně)
Deionizovaná nebo destilovaná voda
Promývací pufr*
Činidla pro předúpravu* (volitelně)
Enzymové trávení* (volitelně)
Peroxidázový blok*
Proteinový blok* (volitelně)
Primární protilátka*
Negativní kontrolní činidla*
Detekční sady*
Hematoxylin* (kontrabarva)
Blueingovo činidlo*
Montážní médium*
Krycí sklo
Světelný 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 použitím detekčním systémem.

Skladování a stabilita:

Skladujte při teplotě 2°C až 8°C. Při skladování za těchto podmínek je přípravek stabilní do data expirace vytištěného na štítku lahvičky. Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti. Skladování za jakýchkoli jiných než uvedených podmínek musí být ověřeno. Naředěná činidla by měla být použita okamžitě podle pokynů. Stabilita uživatelem naředěného činidla 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.

Příprava vzorku:

Tkáň fixovaná ve formalínu jsou vhodné pro použití před zalitím parafínem. Kostní tkáň by měla být před zpracováním tkáň odvápněna, aby se usnadnilo řezání tkáň a zabránilo se poškození čepelí mikrotomu.^{1,2}

Správně fixované a zapuštěné tkáň exprimující specifický 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 „Laborař musí uchovávat obarvená sklíčka nejméně deset let od data vyšetření a uchovávat bloky vzorků nejméně dva roky od data vyšetření.“³

Ošetření tkání před barvením:

Provedte Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) podle doporučeného protokolu níže. Ukázalo se, že rutinní použití HIER před IHC minimalizuje nekonzistenci a standardizuje barvení.^{4,5}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Czech

BIOCARE
M E D I C A L

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 řiďte zdravotními směrnicemi odpovědných úřadů, kde byly použity.^{6,7}
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 reagentie ústy a vyhněte se kontaktu kůže a sliznic s reagentii a vzorky. Pokud se činidla nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody.⁸
7. Mikrobiální kontaminace činidel může vést ke zvýšení nespecifického zbarvení.
8. Jiné než specifikované inkubační doby nebo teploty mohou vést k chybným výsledkům. Uživatel musí každou takovou změnu potvrdit.
9. Nepoužívejte činidlo po uplynutí doby použitelnosti vytištěné 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
	H341 H350	Podezření na genetické poškození Může způsobit rakovinu

Návod k použití:

Reagentie chromogenové sady jsou optimalizovány pro použití s protilátkami Biocare a pomocnými reagentii. 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 barvicího 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: Blokujte 5 minut pomocí Peroxidazed 1.
3. Roztok/protokol pro předběžnou úpravu: Doporučený roztok a protokol pro předúpravu naleznete v příslušném datovém listu primární protilátky.
4. Proteinový blok (volitelné): Inkubujte 5-10 minut při pokojové teplotě (RT) pomocí Background Punisher.

5. Primární protilátka: 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 místnosti s MACH 4 HRP Polymer.
8. Chromogen: Inkubujte 5 minut při teplotě místnosti 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). 2011⁹

Pozitivní tkáňová kontrola:

Materiály pro externí pozitivní kontrolu by měly být čerstvé vzorky fixované, zpracované a zalité 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 úrovní 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 reagentii 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 zalitou 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 řezů být používány laboratoří jako interní negativní kontrolní místa k ověření výkonu IHC Specifikace. Typy a zdroje vzorků, které lze použít pro negativní tkáň ovládací prvky jsou uvedeny v části Výkonové charakteristiky.

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 stejného ředidla) pro použití stejným způsobem jako primární protilátka, ale nevykazuje žádnou specifickou reaktivitu s lidskými tkáněmi ve stejné matici/roztoku jako primární protilátka. Samotné ředidlo 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Czech

BIOCARE
M E D I C A L

Když se na sériových řezech použijí panely několika protilátek, negativně barvené oblasti jednoho sklíčka mohou sloužit jako negativní/nеспецифická 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 barvicího 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[®] pro imunohistochemii a/nebo doporučení NCCLS IHC¹¹. Tyto postupy kontroly kvality by se měly opakovat pro každou novou šarži protilátek nebo kdykoli dojde ke změně parametrů testu. Tkáně uvedené v části Výkonnostní charakteristiky jsou vhodné pro ověření testu.

Odstraňování problémů:

Dodržte 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 intelliPATH FLX™ 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 porovnájí 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.¹²

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 reaktivity 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 formalínem. 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 zbarvení by měla být posouzena v kontextu jakéhokoli nespecifického zbarvení pozadí negativní kontroly reagentů. Jako u každého imunohistochemického testu negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli že antigen v testovaných buňkách/tkáni chyběl. V případě potřeby použijte panel protilátek k identifikaci falešně negativních reakcí.

Specifické informace týkající se indikované imunoreaktivity protilátek naleznete v části Souhrn a vysvětlení, 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 víceúrovňový diagnostický proces, který se skládá ze specializovaného školení ve výběru vhodných činidel; výběr tkáně, fixace a zpracování; příprava podložního 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, zmrazování, 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 nepravidłnostmi v tkáni.¹⁴
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, morfolgie a dalších histopatologických kritérií. Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního nebo negativního zbarvení by měla být doplněna morfolgickými studii 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 aplikace se mohou lišit. Mezi ně patří mimo jiné fixace, metoda získávání tepla, inkubační doby, ředění protilátek, tloušťka řezu tkáně a použitá detekční souprava. Doporučené protokoly a podmínky použití naleznete v pokynech k použití primární protilátky a dalších pomocných činidel. Doporučení a protokoly datových listů jsou založeny na výhradním použití produktů 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 křenuvou peroxidázou.¹⁴
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.¹⁵ 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 stejného 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.¹³

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Czech

BIOCARE
M E D I C A L

13. Negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli že antigen ve vyšetřovaných buňkách nebo tkáni 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 specifická barvení byla hodnocena v celé řadě normálních a neoplastických typů tkání hodnocených během vývoje primárních protilátek.

Reprodukovatelnost:

Reprodukovatelnost detekčních systémů a systémových reagentů Biocare je ověřena měřeními střední přesnosti, při kterém byly různé šarže reagentů testovány po delší dobu pomocí různých operátorů, analytiků, šarží reagentů, 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 tkáň, protilátka a detekční produkty. Zkontrolujte neúplné nebo nesprávné odstranění vosku nebo předúpravu.
2. Slabé zbarvení všech sklíček – Zkontrolujte, zda byly použity vhodné pozitivní kontrolní tkáň, protilátka 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 nabitá.
5. Specifické barvení je příliš tmavé – Zkontrolujte protokol, abyste zjistili, zda byl na sklíčko aplikován správný titr protilátek, a také správné inkubační doby pro všechna činidla. Dále zajistěte, aby protokol obsahoval dostatek promývacích kroků k odstranění přebytkových činidel po dokončení inkubačních kroků.

Reference:

1. Kiernan JA. Histologické a histochemické metody: Teorie a praxe. New York: Pergamon Press 1981.
2. Sheehan DC a Hrapchak BB. Teorie a praxe histotechnologie. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
3. Dodatky pro zlepšení klinické laboratoře z roku 1988: Konečné pravidlo, 57 FR 7163, 28. února 1992.
4. Shi S-R, Cote RJ, Taylor ČR. J Histotechnol. 1999 září;22(3):177-92.
5. Taylor CR, a kol. Biotech Histochem. 1996 leden;71(5):263-70.
6. Normy bezpečnosti a ochrany zdraví při práci: Pracovní expozice nebezpečným chemikáliím v laboratořích. (29 CFR část 1910.1450). Fed. Registrovat.
7. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/54/ES ze dne 18. září 2000 o ochraně zaměstnanců před riziky spojenými s expozicí biologickým činitelům při práci.
8. Institut pro klinické a laboratorní standardy (CLSI). Ochrana laboratorních pracovníků před infekcemi získanými z povolání; Schválená směrnice – čtvrté vydání dokumentu CLSI M29-A4 Wayne, PA 2014.
9. Standardy kvality CLSI pro návrh a implementaci imunohistochemických testů; Schválená směrnice – druhé vydání (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011
10. Certifikační program College of American Pathologists (CAP) pro imunohistochemii. 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 ČR. Zajištění kvality pro imunocytochemii; Navrhovaná

směrnice. MM4-P. Národní výbor pro klinické laboratorní standardy (NCCLS). Wayne, PA. 1997;1-46.

12. Koretzik K, Lemain ET, Brandt I a Moller P. Metachromázie 3-amino-9-ethylkarbazolu (AEC) a její prevence v imunoperoxidázových technikách. Histochemistry 1987; 86:471-478.
13. Nadji M, Morales AR. Imunoperoxidáza, část I: techniky a její úskalí. Lab Med 1983; 14:767.
14. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Neimunologická vazba křenové peroxidázy na povrchový antigen hepatitidy B: možný zdroj chyb v imunohistochemii. AmJ Clin Path 1980; 73:626.
15. Herman GE a Elfont EA. Zkrocení imunohistochemie: nová éra kvality řízení. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Danish

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Anvendelsesformål:

Til *in vitro* Diagnostisk brug

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit er beregnet til brug i enten manuel eller automatiseret immunhistokemi (IHC) farvningsprotokoller til påvisning af målantigener i formalinfikerede, paraffin-indlejrede (FFPE) væv, når det bruges sammen med det relevante 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 opløsningsmidler og kan dækglas med et permanent monteringsmedie. Dette produkt kommer i et to-komponent system bestående af et væskestabil DAB-kromogen og en DAB-substratbuffer. Farven på kromogenbufferblandingen kan variere fra lysebrun til orange. Farvningsegenskaberne påvirkes ikke af farven på kromogenbufferblandingen. intelliPATH FLX™ DAB er en formulering, der er meget stabil. intelliPATH FLX™ DAB er designet til at blive brugt på intelliPATH FLX™ automatisk farvning.

Procedureprincip:

Dette DAB-kromogen i intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit, når det bruges i IHC-test af FFPE-vævsnit, 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 kromogent 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
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Rekonstitution, blanding, fortynding, titrering:

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit er optimeret til brug med Biocare-antistoffer og hjælpereagenser og skal fortyndes lige før brug.

On-line blanding: 120 µL DAB Chromogen pr. 2000 µL DAB Buffer. Hvis kromogen blandes offline, skal du bruge samme forhold. DAB-arbejdsopløsningen er stabil i 5 dage. Opbevar DAB-arbejdsopløsningen ved 2-8°C.

Kendte applikationer:

Immunhistokemi (formalinfikseret paraffinindlejret væv)

Leveres som:

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen

DAB løsning. Se sikkerhedsdatabladet for yderligere detaljer.

intelliPATH FLX™ DAB-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 xylenestatning
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. Stabiliteten af brugerfortyndet reagens 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 velegnet til brug før paraffinindstøbning. Ossøst væv bør afkalkes før vævsbehandling for at lette vævsskæring og forhindre beskadigelse af mikrotomblade.^{1,2}

Korrekt fikserede og indlejrede væv, der udtrykker det specificerede antigenmål, skal opbevares på et køligt 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."³

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.^{4,5}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Danish

BIOCARE
M E D I C A L

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 bortskaft sådanne materialer med passende forholdsregler. I tilfælde af eksponering, følg sundhedsdirektiverne fra de ansvarlige myndigheder, hvor det anvendes.^{6,7}
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 bortskaftes med passende forholdsregler. Pipettér aldrig reagenser gennem munden, 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.⁸
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. Mikropolymerdetektionsreagenserne 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 bortskaftelsesmetode.
12. SDS er tilgængeligt efter anmodning og findes på <http://biocare.net>.
13. Rapportér 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 befinder sig.

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

Fare	Kode	Faresætning
	H341 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 farvningsinstrument, skal du se den specifikke betjeningsvejledning til instrumentet og brugsanvisningen for driftsparametre.

Generelle proceduremæssige trin til udførelse af IHC:

1. Afparaffinerings: Afparaffiner objektglas i Slide Brite eller xylen. Hydrat objektglas i en række graderede alkoholer til vand.
2. Peroxidblok: Bloker i 5 minutter med Peroxidazed 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.
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 immunohistokemiske analyser; Godkendt guideline-anden udgave (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011⁹

Positiv vævs kontrol:

Eksterne positive kontrolmaterialer skal være friske prøver fikseret, behandlet og indlejret så hurtigt som muligt på samme måde som patientprøven/patienterne. Positive vævs kontroller er tegn på korrekt forberedt væv og korrekte farvningsteknikker. En positiv ekstern vævs kontrol 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 måltaktivitet, 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 vævs kontrolobjektglas eller -prøver, der er behandlet anderledes end patientprøven(-erne), validerer kun reagensydelse og verificerer ikke vævsforberedelse.

Kendte positive vævs kontroller 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 vævs kontroller ikke viser positiv farvning, bør resultaterne med testprøverne betragtes som ugyldige.

Negativ vævs kontrol:

Brug en negativ vævs kontrol fikseret, behandlet og indlejret på en måde, der er identisk med patientprøven/patienterne med hver farvningskørsel for at verificere specificiteten af det primære IHC-antistof for demonstration af måltantigenet og for at give en indikation af specifik baggrundsfarvning (falsk positiv farvning). Det kan også de mange forskellige celletyper, der findes i de fleste vævs snit 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 vævs kontrol, bør resultaterne med patientprøverne betragtes som ugyldige.

Uspecifik negativ reagens kontrol:

Brug en uspecifik negativ reagens kontrol 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 reagens kontrol 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/opløsning som primært antistof. Fortyndingsmiddel alene kan anvendes som et mindre ønskeligt alternativ til de tidligere beskrevne negative reagens kontroller. Inkubationsperioden for den negative reagens kontrol 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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Danish

BIOCARE
M E D I C A L

enzymaktivitet eller uspecifik binding af enzymer fra specifik immunreaktivitet, kan yderligere patientvæv udelukkende farves med henholdsvis substrat-chromogen eller enzymkomplekser (PAP, avidin-biotin, streptavidin) og substrat-chromogen.

Assaybekræftelse:

Før den første brug af et antistof eller farvningssystem 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-certificeringsprogrammet¹³ til immunhistokemi og/eller NCCLS IHC guideline¹⁴. 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 protokolbefalinger 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:

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit producerer en brunfarveregion 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 substratchromogener. Se substratets indlægssedler for forventede farveregioner. Yderligere kan metakromasi observeres i variationer af farvningsmetoden.¹²

Når der anvendes en modfarvning, vil modfarvning, afhængigt af inkubationslængden og styrken af den anvendte modfarvning, resultere i en farvning af cellekernerne. 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 farvningsresultater. 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-glasset; og fortolkning af farvningsresultaterne.
3. Kun til brug efter lægerecept. (Kun Rx)
4. Vævsfarvning er afhængig af håndtering og behandling af vævet før farvning. Forkert fiksering, frysning, optøning, 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.¹⁴
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, varmhentningsmetode, inkubationstider, antistoffortynding, vævsnitthævelse og det anvendte detektionskit. Se instruktionerne til det primære antistof og andre hjælpereagenser til brug for anbefalede 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.
9. Væv fra personer inficeret med hepatitis B-virus og indeholdende hepatitis B-overfladeantigen (HBsAg) kan udvise uspecifik farvning med peberrodsperoxidase.¹⁴
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 antigenekspresion i neoplasmer eller andre patologiske væv.¹⁵ 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.¹³
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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Danish

BIOCARE
M E D I C A L

Ydelseskarakteristika:

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

Reproducerbarhed:

Reproducerbarheden af Biocares detektionssystemer og systemreagenser verificeres gennem en måling af mellemprecision, hvor forskellige reagensslots blev testet over en længere periode ved hjælp af forskellige operatører, analytikere, reagensslots, 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 ufuldstændig eller ukorrekt voksjernelse 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 blokeringsopløsning).
4. Vævssektioner 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](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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Dutch

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Beoogd gebruik:

Voor *in vitro* Diagnostisch gebruik

De intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit is bedoeld voor gebruik in handmatige of geautomatiseerde immunohistochemische (IHC) kleuringsprotocollen voor de detectie van doelantigenen in in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (FFPE) weefsels, indien gebruikt 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 lichtbruin tot oranje. De kleureigenschappen worden niet beïnvloed door de kleur van het chromogeenbuffermengsel. intelliPATH FLX™ DAB is een formulering die zeer stabiel is. intelliPATH FLX™ DAB is ontworpen voor gebruik op de intelliPATH FLX™ geautomatiseerde kleurmachine.

Principe van procedure:

Dit DAB-chromogeen in de intelliPATH FLX™ 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 antigeen (primair antilichaam), een secundair antilichaam tegen het primaire antilichaam (optioneel verbindingantilichaam/probe), een enzymcomplex en een chromogeen substraat met tussenliggende wasstappen. De enzymatische activering van het chromogeen resulteert in een zichtbaar reactieproduct op de antigeenplaats. 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 antigeen.

Materialen en methodes:

Meegeleverde reagentia:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Reconstitutie, mengen, verdunnen, titratie:

De intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit is geoptimaliseerd voor gebruik met Biocare-antilichamen en hulpreagentia en moet vlak vóór gebruik worden verdund.

Online mix: 120 µl DAB-chromogeen per 2000 µl DAB-buffer. Als chromogeen offline wordt gemengd, gebruik dan dezelfde verhouding. De DAB-werkoplossing is 5 dagen stabiel. Bewaar de DAB-werkoplossing bij 2-8°C.

Bekende toepassingen:

Immunohistochemie (formaline-gefixeerde, in paraffine ingebedde weefsels)

Geleverd als:

intelliPATH FLX™ DAB-chromogeen

DAB-oplossing. Zie het veiligheidsinformatieblad voor aanvullende details.

intelliPATH FLX™ DAB-buffer

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

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

Microscopglaasjes, positief geladen
Positieve en negatieve weefselcontroles
Woestijnkamer* of soortgelijke droogoven (optioneel)
Xyleen of xyleenvervanger
Ethanol of reagensalcohol
Onthulkamer* of soortgelijke snelkookpan (optioneel)
Gedeïoniseerd of gedestilleerd water
Wasbuffer*
Voorbehandelingsreagentia* (optioneel)
Enzymvertering* (optioneel)
Peroxidaseblok*
Eiwitblok* (optioneel)
Primair antilichaam*
Negatieve controlereagentia*
Detectiekits*
Hematoxyline* (tegenkleuring)
Blauwingsreagens*
Montagemedium*
Dekglasje
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 vermeld, 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. De stabiliteit van door de gebruiker verdund reagens 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.

Monstervoorbereiding:

Weefsels gefixeerd in formaline zijn geschikt voor gebruik voorafgaand aan het inbedden van paraffine. Botweefsel moet vóór de weefselverwerking worden ontkalkt om het snijden van het weefsel te vergemakkelijken en schade aan de microtoombladen te voorkomen.^{1,2}

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."³

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Dutch

BIOCARE
M E D I C A L

Behandeling van weefsels voorafgaand aan kleuring:

Voer Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) uit volgens het aanbevolen protocol hieronder. Er is aangetoond dat het routinematige gebruik van HIER voorafgaand aan IHC de inconsistentie minimaliseert en de kleuring standaardiseert.^{4,5}

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.^{6,7}
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.⁸
7. Microbiële contaminatie van reagentia kan resulteren in een toename van niet-specifieke 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 micropolymeerdetectiekit 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
	H341 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 objectglasjes 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 primaire 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 gedeïoniseerd water. Breng Tacha's Blueing Solution aan gedurende 1 minuut. Spoelen met gedeïoniseerd 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). 2011*

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 kleuringrun moet voor elke reeks testomstandigheden één positieve externe weefselcontrole worden meegenomen.

De weefsels die voor de externe positieve controlematerialen worden gebruikt, moeten worden geselecteerd uit patiëntspecimens 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 objectglasjes 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Dutch

BIOCARE
M E D I C A L

Negatieve weefselcontrole:

Gebruik bij elke kleuringrun 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 celypen 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 specimina 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 patiëntspecimens 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 antigeenplaats mogelijk. Idealiter bevat een negatieve reagenscontrole een antilichaam dat is geproduceerd en bereid (d.w.z. verdund 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 enzymen te onderscheiden van specifieke immunoreactiviteit, kunnen extra 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 productbijsluiters zijn beschreven en de aanbevelingen voor kwaliteitscontrole van het CAP-certificeringsprogramma[®] voor immunohistochemie en/of de NCCLS IHC-richtlijn[™]. 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 intelliPATH FLX™ DAB-chromogenkit produceert een bruine kleurreactie op de antigeenplaatsen 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 objectglasjes

om er zeker van te zijn dat eventuele waargenomen kleuring niet het gevolg 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 substraatchromogenen. Raadpleeg de bijsluiters van het substraat voor de verwachte kleurreacties. Verder kan metachromasie worden waargenomen bij variaties op de kleuringmethode.¹²

Wanneer een tegenkleuring wordt gebruikt, zal de tegenkleuring, afhankelijk van de incubatieduur en de sterkte 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 diffuus uiterlijk. Sporadische kleuring van bindweefsel kan ook worden waargenomen in coupes van overmatig formalinegefixeerd weefsel. Gebruik intacte cellen voor de interpretatie van kleuringresultaten. Necrotische of gedegenerende cellen kleuren vaak niet-specifiek.

Patiëntweefsel:

Onderzoek patiëntspecimens 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 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 kleuringresultaten.
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, ontdooven, 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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Dutch

BIOCARE
M E D I C A L

- inbeddingsmethoden, of aan inherente onregelmatigheden in het weefsel.¹⁴
- Overmatige of onvolledige tegenkleuring kan de juiste interpretatie van de resultaten in gevaar brengen.
 - 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.
 - De optimale protocollen voor een specifieke toepassing kunnen variëren. Deze omvatten, maar zijn niet beperkt tot, fixatie, warmtewinningsmethode, incubatietijden, antilichaamverdunding, 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.
 - Dit product is niet bedoeld voor gebruik bij flowcytometrie. Prestatiekenmerken zijn niet bepaald voor flowcytometrie.
 - Weefsels van personen die zijn geïnfecteerd met het hepatitis B-virus en die hepatitis B-oppervlakteantigen (HBsAg) bevatten, kunnen niet-specifieke kleuring vertonen met mierikswortelperoxidase.¹⁴
 - 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.¹⁵ 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).
 - Normale/niet-immune sera uit dezelfde dierlijke bron als secundaire antisera die bij blokkeringsstappen worden gebruikt, kunnen vals-negatieve of vals-positieve resultaten veroorzaken als gevolg van auto-antilichamen of natuurlijke antilichamen.
 - 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 (erythrocyten, endogene peroxidase-activiteit (cytochrom C) of endogene biotine (bijv. Lever, borst, hersenen, nier), afhankelijk van het gebruikte type immunokleuring.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.

Probleemoplossen:

- Geen kleuring van objectglasjes – Controleer of er geschikt positief controleweefsel, antilichaam en detectieproducten zijn gebruikt. Controleer op onvolledige of onjuiste wasverwijdering of voorbehandeling.
- Zwakke kleuring van alle objectglasjes – Controleer of er geschikt positief controleweefsel, antilichaam en detectieproducten zijn gebruikt.
- Overmatige achtergrond van alle objectglasjes – 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).
- Weefselcoupes worden tijdens de incubatie van de objectglasjes gewassen – Controleer de objectglasjes om er zeker van te zijn dat ze positief geladen zijn.
- Specifieke kleuring te donker – Controleer het protocol om te bepalen of de juiste antilichaamtiter op het objectglasje is aangebracht, evenals de juiste incubatietijden voor alle reagentia. Zorg er bovendien voor dat het protocol voldoende wasstappen heeft om overtollige reagentia te verwijderen nadat de incubatiestappen zijn voltooid.

Referenties:

- Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
- Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
- Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
- Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
- Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- 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.
- 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.
- 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
- College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
- 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.
- 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.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Lab Med* 1983; 14:767.
- Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Path* 1980; 73:626.
- Herman GE and Elfant EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Estonian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Mõeldud kasutamiseks:

Sest *in vitro* Diagnostiline kasutamine

IntelliPATH FLX™ DAB kromogeenkomplekt on ette nähtud kasutamiseks kas käsitsi või automaatse immunohistokeemia (IHC) värvimisprotokollides sihtantigeenide tuvastamiseks formaliniiga fikseeritud, parafiiniga manustatud (FFPE) kudedes, kui seda kasutatakse koos sobiva tuvastamissüsteemiga ja primaarsed antikehad. 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' diaminobensidiin (DAB) on väljakujunenud kromogeen, mida kasutatakse IHC värvimisprotokollides, mis ensüümi määrõika peroksidaasi (HRP) juuresolekul tekitab pruuni sademe, mis ei lahustu orgaanilistes lahustites ja mida saab katta püsiva paigalduskandjaga. See toode on saadaval kahekomponendilises süsteemis, mis koosneb vedelikukindlast DAB-kromogeenist ja DAB-substraadipuhvrst. Kromogeeni puhversegu värvus võib varieeruda kahvatupruunist oranžini. Värvimisomadusi ei mõjuta kromogeeni puhversegu värvus.intelliPATH FLX™DAB on väga stabiilne koostis.intelliPATH FLX™DAB on mõeldud kasutamiseksintelliPATH FLX™automatiseeritud värvimismasin.

Menetluse põhimõte:

See IntelliPATH FLX™ DAB kromogeenkomplektis olev DAB kromogeen, mida kasutatakse FFPE koelõikude IHC testimisel, võimaldab antigeene visualiseerida järjestikulise antigeeni vastane spetsiifiline antikeha (primaarne antikeha), primaarse antikeha sekundaarne antikeha (valikuline linkantikeha/sond), ensüümikompleksi ja kromogeenne substraat, millesse on paigutatud pesemisetapid. Kromogeeni ensümaatilise aktiveerimine annab antigeeni kohas nähtava reaktsiooniproducti. Seejärel võib proovi värvida ja katta katteklasaasiga. Tulemusi tõlgendatakse valguse abil mikroskoop ja abi patofüsioloogiliste protsesside diferentsiaaldiagnostikas, mis võivad või ei pruugi olla seotud konkreetse antigeeniga.

Materjalid ja meetodid:

Kaasasolevad reaktiivid:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Lahustamine, segamine, lahjendamine, tiitrimine:

IntelliPATH FLX™ DAB kromogeenikomplekt on optimeeritud kasutamiseks koos Biocare'i antikehade ja abireaktiividega ning seda tuleb vahetult enne kasutamist lahjendada.

On-line Mix: 120 µL DAB kromogeeni 2000 µL DAB puhvri kohta. Kui kromogeen segatakse võrguühendusega, kasutage sama suhet. DAB töölahus on stabiilne 5 päeva. Säilitage DAB töölahust temperatuuril 2–8 °C.

Tuntud rakendused:

Immunohistokeemia (formaliiniga fikseeritud parafiiniga kaetud koed)

Tarnitakse järgmiselt:

intelliPATH FLX™ DAB kromogeen

DAB lahendus. Lisateabe saamiseks vaadake ohutuskaarti.

intelliPATH FLX™ DAB puhver

Puhverdatud lahus sisaldab 3% vesinikperoksiidi 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
Etanool või reaktiivalkohol
Decloaking Chamber* või sarnane kiirkeetja (valikuline)
Deioniseeritud või destilleeritud vesi
pesupuhver*
Eeltötlusreaktiivid* (valikuline)
Ensüümi seedimine* (valikuline)
peroksidaasi blokaad*
Valguplokk* (valikuline)
Primaarne antikeha*
Negatiivsed kontrollreaktiivid*
Tuvastamiskomplektid*
Hematoküliin* (vastuvärv)
Sinistamise reaktiiv*
Paigaldusvahend*
Katteklasaas
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 konkreetsetel kasutusel ja kasutataval tuvastamissüsteemil.

Säilitamine ja stabiilsus:

Hoida temperatuuril 2°C kuni 8°C. Toode on sellistes tingimustes säilitamisel stabiilne kuni vaalet etiketile trükitud aegumiskuupäevani. Ärge kasutage pärast aegumiskuupäeva. Säilitamist muudes tingimustes kui ette nähtud tuleb kontrollida. Lahjendatud reaktiive tuleb vastavalt juhistele viivitamatult kasutada. Biocare ei ole kindlaks teinud kasutaja lahjendatud reaktiivi stabiilsust.

Positiivsed ja negatiivsed kontrollid tuleb läbi viia samaaegselt kõigi patsiendi proovidega. Kui täheldatakse ootamatut värvimist, mida ei saa seletada erinevustega laboratoorses 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.^{1,2}

Korralikult fikseeritud ja sisestatud kudesid, mis ekspresseerivad määratud sihtmärkantigeeni, tuleb hoida jahedas. 1988. aasta Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) nõuab 42 CFR-i§493.1259(b), et „Labor peab säilitama värvitud objektiklaase vähemalt kümme aastat alates uurige ja säilitage prooviplokkid vähemalt kaks aastat alates uurimise kuupäevast.“³

Kudede töötlemine enne värvimist:

Tehke kuumuse põhjustatud epitoopide otsimine (HIER) vastavalt allolevale soovitatud protokollile. On näidatud, et HIER-i rutiinne kasutamine enne IHC-d vähendab ebakõlasid ja standardiseerib värvimist.^{4,5}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Estonian

BIOCARE
M E D I C A L

Hoiatus ja ettevaatusabinõud:

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

See kromogeenikomplekt sisaldab komponente, mis on vastavalt määrusele (EÜ) nr 1272/2008 klassifitseeritud allolevas tabelis näidatud viisil.

Oht	Kood	Ohuavaldus
	H341 H350	Arvatavasti põhjustab geneetilisi defekte Võib põhjustada vähi

Kasutusjuhend:

Kromogeenikomplekti reaktiivid on optimeeritud kasutamiseks koos Biocare'i antikehade ja abireagentidega. Soovitavate protokollide ja kasutustingimuste kohta vaadake esmase antikeha ja teiste lisareaktiivide kasutusjuhiseid. Inkubatsiooniajad ja temperatuurid varieeruvad sõltuvalt järgitavast spetsiifilisest antikehade protokollist.

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

Üldised protseduuritapid IHC läbiviimiseks:

1. Parafiini eemaldamine: Deparafineerige slaidid Slide Brite'is või ksüleenis. Hüdraatiseerige slaidid sorteeritud alkoholide seerias vette.
2. Peroksiidplokki: blokeerige 5 minutit Peroxidized 1-ga.
3. Eeltöötluslahus/-protokoll: soovitatud eeltöötluslahuse ja -protokolli leiata vastava primaarse antikeha andmelehel.
4. Protein Block (valikuline): inkubeerige 5-10 minutit toatemperatuuril (RT) Background Punisheriga.
5. Primaarne antikeha: inkubatsioonaja kohta vaadake vastavat primaarset 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: hematoksuiliiniga vastuvärv. Loputage deioniseeritud veega. Kandke Tacha sinisetsulust 1 minutiks. Loputage deioniseeritud veega.

Tehnilised märkused:

1. Kasutage pesemistappideks TBS-i.

Kvaliteedi kontroll:

Vaadake CLSI kvaliteedistandardeid immunohistokeemiliste analüüside kavandamiseks ja rakendamiseks; Heakskiidetud juhistega teine väljaanne (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011. aastal⁹

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 värvimistsükklisse tuleks lisada üks positiivne väline koekontroll iga katsetingimuste komplekti kohta.

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

Teadaolevaid positiivseid koekontrole tuleks kasutada ainult töödeldud kudede ja testreaktiivide õige 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 värvimistsükklis 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 värvimine). Samuti võivad enamikus koosades esinevad erinevad rakutüübid labori poolt kasutada sisemiste negatiivsete kontrollikohtadena, et kontrollida IHC toimivust spetsifikatsioonid. Negatiivse koe jaoks kasutatavate proovide tüübid ja allikad juhtelemendid on loetletud jaotises Toimivusnäitajad.

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

Mittespetsiifiline negatiivse reaktiivi kontroll:

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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Estonian

BIOCARE
M E D I C A L

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

Testi kinnitamine:

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

Veotsing:

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

Värvimise tõlgendamine:

IntelliPATH FLX™ DAB kromogeeni kompleks tekitab primaarse antikeha poolt lokaliseeritud antigeenikohtades pruuni värvuse reaktsiooni. Enne patsiendi tulemuste tõlgendamist peab kvalifitseeritud patoloog kontrollide värvimist hindama. Negatiivseid kontrole hinnatakse ja võrreldakse värvitud objektiklaasidega, et tagada, et täheldatud värvumine ei ole mittespetsiifiliste interaktsioonide tagajärg.

Positiivne koekontroll:

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

Reaktsiooniproducti värvus võib varieeruda sõltuvalt kasutatud substraadi kromogeenidest. Oodatavate värvireaktsioonide kohta vaadake aluspinnal pakendi infolehti. Lisaks võib metakromaatid täheldada värvimismeetodi variatsioonides.¹²

Kui kasutatakse vastuvärvi, olenevalt kasutatud vastuvärvi inkubatsiooni pikkusest ja tõhususest, põhjustab vastuvärvimine raku tuumade värvuse. Liigne või mittetäielik vastuvärvimine võib kahjustada tulemuste õiget tõlgendamist. Soovitatud vastuvärvimise kohta vaadake protokolliprotoollis.

Negatiivsete kudede kontroll:

Negatiivset koekontrolli tuleks uurida pärast positiivset koekontrolli, et kontrollida sihtantigeeni märgistamise spetsiifilisust primaarse antikehaga. Spetsiifilise värvumise puudumine negatiivses koekontrollis kinnitab antikehade ristreaktiivsuse puudumist rakkude/rakukomponentide suhtes. Kui negatiivse väliskoe kontrolli korral ilmneb spetsiifiline värvumine (valepositiivne värvumine), tuleb patsiendi proovi tulemusi lugeda kehtetuks.

Mittespetsiifiline värvumine, kui see on olemas, on tavaliselt hajusa välisusega. Sidekoe juhuslikku värvimist võib täheldada ka liigselt formaliniiga fikseeritud kudede lõikudes. Värvimistulemuste tõlgendamiseks kasutage terveid rakke. Nekrootilised või degeneroonud rakud värvuvad sageli mittespetsiifiliselt.

Patsiendi kude:

Uurige näidatud antikehaga värvitud patsiendi proove viimane. Positiivset värvimise intensiivsust tuleks hinnata negatiivse reaktiivi kontrolli mis tahes

mittespetsiifilise taustavärvimise kontekstis. Nagu iga immunohistokeemilise testi puhul, tähendab negatiivne tulemus seda, et antigeeni ei tuvastatud, mitte seda, et antigeen ei olnud analüüsitud rakkudes/koes. Vajadusel kasutage valenegatiivsete reaktsioonide tuvastamiseks antikehade paneeli.

Täpsemat teavet näidatud antikehade immunoreaktiivsuse kohta leiate jaotisest Kokkuvõtte 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; kudede valik, fikseerimine ja töötlemine; IHC slaidi ettevalmistamine; ja värvimistulemuste tõlgendamine.
3. Kasutamiseks ainult arsti retsepti alusel. (Ainult Rx)
4. Kudede värvimine sõltub koe käsitlemisest ja töötlemisest enne värvimist. Ebaõige fikseerimine, külmutamine, sulatamine, pesemine, kuivatamine, kuumutamine, lõikamine või saastumine teiste kudede või vedelikega võib põhjustada artefakte, antikehade kinnijäämist või valenegatiivset tulemusi. Ebajärjekindlad tulemused võivad olla tingitud fikseerimis- ja kinnistamismeetodite erinevustest või koe omastest ebakorrapärasustest.¹⁴
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, reaktiivide ja meetodite õiget kasutamist, vastutab kõigi IHC lõpliku preparaadi ettevalmistamiseks ja tõlgendamiseks kasutatud etappide tõlgendamise eest.
7. Konkreetse rakenduse optimaalsed protokollid võivad erineda. Nende hulka kuuluvad (kuid mitte ainult) fikseerimine, kuumuse taastamise meetod, inkubatsiooniajad, antikehade lahjendamine, koelõike paksumus ja kasutatud tuvastamiskomplekt. Soovitatavate protokollide ja kasutustingimuste kohta vaadake esmase antikeha ja teiste lisareaktiivide kasutusjuhiseid. Andmelehe soovitusi ja protokollid põhinevad ainult Biocare toodete kasutamisel. Lõppkokkuvõttes vastutab uurija optimaalsete tingimuste kindlaksmääramise eest.
8. See toode ei ole ette nähtud kasutamiseks voolutsütomeetrias. Voolutsütomeetria jõudlusnäitajaid ei ole määratud.
9. B-hepatiidi viirusega nakatunud ja B-hepatiidi pinnaantigeeni (HBsAg) sisaldavate inimeste kudedel võib ilmuda määratõike peroksüdaasiga mittespetsiifiline värvumine.¹⁴
10. Reaktiivid võivad avaldada ootamatuid reaktsioone varem testimata kudedes. Ootamatute reaktsioonide võimalust isegi testitud koerühmades ei saa täielikult välistada antigeeni ekspresiooni bioloogilise varieeruvuse tõttu kasvajates või muudes patoloogilistes kudedes.¹⁵ Dokumenteeritud ootamatu(te) reaktsiooni(de)ga võtke ühendust Biocare'i tehnilise toega numbril 1-800-542-2002 või veebisaidil biocare.net pakutava tehnilise toe teabe kaudu.
11. Normaalsed/mitteimmuunsed seerumid, mis pärinevad samast loomsest allikast kui blokeerimis-etappides kasutatavad sekundaarsed antiseerumid, võivad autoantikehade või looduslike antikehade tõttu põhjustada valenegatiivseid või valepositiivseid tulemusi.
12. Valepositiivseid tulemusi võib näha valkude või substraadi reaktsiooniproductide mitteimmunoloogilise seondumise tõttu. Need võivad olla põhjustatud ka pseudoperoksüdaasi aktiivsusest (erütrotsüüdid), endogeense peroksüdaasi aktiivsusest (tsütokroom C) või endogeensest biotiinist (nt maks, rind, aju, neer), olenevalt kasutatavast immunovärvi tüübist.¹³

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Estonian

BIOCARE
M E D I C A L

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 kasutusjuhistes või vastavalt täpsustatule. Värvimise tundlikkust ja spetsiifilisust hinnati mitmesuguste normaalsete ja neoplastiliste koetüüpide puhul, mida hinnati primaarsete antikehade väljatöötamise ajal.

Reprodutseeritavus:

Biocare'i tuvastussüsteemide ja süsteemireaktiivide reprodutseeritavust kontrollitakse keskmise täpsusega mõõtmise teel, mille käigus testiti erinevaid reaktiivipartiisid pikema aja jooksul, kasutades erinevaid operaatoreid, analüütikuid, reaktiivipartiisid, koeproove ja seadmeid. Iga hinnatud tuvastamisreagenti värvimine oli järjepidev ja viidi läbi ootuspäraselt.

Veotsing:

1. Objektiklaasid ei värvunud – Kontrollige, kas on kasutatud sobivat positiivset kontrollkudet, antikeha ja tuvastamisprodukte. Kontrollige, kas vaha eemaldamine või eeltöötlemine on puudulik või vale.
2. Kõigi objektiklaaside nõrk värvumine – 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 lõpptooteks (kasutage peroksidaasi plokki), või võib esineda liigne mittespetsiifiline valgu interaktsioon (kasutage valku). blokk, nagu seerumi- või kaseiinipõhine blokeeriv lahus).
4. Koeosad pesevad slaididelt inkubeerimise ajal maha – Kontrollige slaide, et veenduda, et need on positiivselt laetud.
5. Spetsiifiline värvumine on liiga tume – kontrollige protokollid, et teha kindlaks, kas objektiklaasile on rakendatud õige antikehade tiiter, samuti kõigi reaktiivide õiged inkubatsiooniajad. Lisaks veenduge, et protokollis 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). 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. AmJ 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Finnish

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Käyttötarkoitus:

varten *in vitro* Diagnostinen käyttö

IntelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit on tarkoitettu käytettäväksi joko manuaalisissa tai automatisoiduissa immunohistokemian (IHC) värjäysprotokollissa kohdeantigeenien havaitsemiseksi formaliinilla kiinnitetyissä, parafiiniin upotetuissa (FFPE) kudoksissa, kun sitä käytetään yhdessä sopivan havaitsemisjärjestelmän ja primaariset vasta-aineet. Minkä tahansa värjäytymisen tai sen puuttumisen kliinistä tulkintaa tulisi täydentää morfologisilla tutkimuksilla ja asianmukaisilla kontrolleilla, ja pätevä patologin tulee arvioida potilaan kliinisen historian ja muiden diagnostisten testien yhteydessä.

Yhteenveto ja selitys:

3, 3' diaminobentsidiini (DAB) on vakiintunut kromogeeni, jota käytetään IHC-värjäysmenetelmissä ja joka tuottaa piparjuuriperoksidaasi (HRP) -entsyymin läsnäollessa ruskean sakan, joka ei liukene orgaanisiin liuottimiin ja joka voidaan peittää pysyvällä kiinnitysväliaineella. Tämä tuote toimitetaan kaksikomponenttisessä järjestelmässä, joka koostuu nestestabiilista DAB-kromogeenista ja DAB-substraattipuskurista. Kromogeenipuskuriseoksen väri voi vaihdella vaaleanruskeasta oranssiin. Kromogeenipuskuriseoksen väri ei vaikuta värjäytymisominaisuuksiin. IntelliPATH FLX™ DAB on formulaatio, joka on erittäin vakaa. IntelliPATH FLX™ DAB on suunniteltu käytettäväksi IntelliPATH FLX™ automaattinen värjäyskone.

Menettelyn periaate:

Tämä IntelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit -sarjassa oleva DAB-kromogeeni, kun sitä käytetään FFPE-kudosleikkeiden IHC-testauksessa, mahdollistaa antigeenin visualisoinnin käyttämällä peräkkäistä spesifinen vasta-aine antigeenille (primaarinen vasta-aine), sekundaarinen vasta-aine primaariselle vasta-aineelle (valinnainen linkkivasta-aine/koetin), entsyymikompleksi ja kromogeeninen substraatti, jossa on pesuvaiheet. Kromogeenin entsyymaattinen aktivaatio johtaa näkyvään reaktiotuotteeseen antigeenikohdassa. Näyte voidaan sitten vastavärjätä ja peittää. Tulokset tulkitaan valon avulla mikroskoopi ja apu patofysiologisten prosessien erotusdiagnoosissa, jotka voivat tai olla ei välttämättä liity tiettyyn antigeeniin.

Materiaalit ja menetelmät:

Mukana toimitetut reagenssit:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Liuottaminen, sekoitus, laimennus, titraus:

IntelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit on optimoitu käytettäväksi Biocare-vasta-aineiden ja apureagenssien kanssa, ja se on laimennettava juuri ennen käyttöä.

On-line-sekoitus: 120 µl DAB-kromogeenia per 2 000 µl DAB-puskuria. Jos kromogeeniä sekoitetaan offline-tilassa, käytä samaa suhdetta. DAB-työliuos on vakaa 5 päivää. Säilytä DAB-työliuos 2-8°C:ssa.

Tunnetut sovellukset:

Immunohistokemia (formaliinilla kiinnitetyt parafiiniin upotetut kudokset)

Toimitettu nimellä:

intelliPATH FLX™ DAB Kromogeeni

DAB-ratkaisu. Katso lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta.

intelliPATH FLX™ DAB-puskuri

Puskuroitu liuos sisältää 3 % vetyperoksidiliuosta. Katso lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta.

Tarvittavat materiaalit ja reagenssit, joita ei toimiteta:

Mikroskoopin objektilasit, positiivisesti varautuneet
Positiiviset ja negatiiviset kudokset
Desert Chamber* tai vastaava kuivausuuni (valinnainen)
Ksyleeni tai ksyleenin korvike
Etanoli tai reagenssialkoholi
Decoaking Chamber* tai vastaava painekattila (valinnainen)
Deionisoitu tai tislattu vesi
Pesupuskuri*
Esikäsittelyreagenssit* (valinnainen)
Entsyymisulatus* (valinnainen)
peroksidaasi esto*
Proteiinilohko* (valinnainen)
Primaarinen vasta-aine*
Negatiiviset kontrollireagenssit*
Tunnistussarjat*
Hematoksyliini* (vastavärjäys)
Sinitysreagenssi*
Asennusväline*
Suojalasi
Valomikroskooppi (40-400X suurennus)

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

Varastointi ja vakaus:

Säilytä 2°C - 8°C. Tuote säilyy näissä olosuhteissa säilytettyinä injektiopullon etikettiin painettuun viimeiseen käyttöpäivään asti. Älä käytä viimeisen käyttöpäivän jälkeen. Varastointi muissa kuin määritellyissä olosuhteissa on tarkistettava. Laimennetut reagenssit tulee käyttää viipymättä ohjeiden mukaisesti. Biocare ei ole vahvistanut käyttäjän laimennetun reagenssin stabiilisuutta.

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

Näytteen valmistus:

Kudokset kiinnitetty formaliiniin soveltuvat käytettäväksi ennen parafiinin upottamista. Luukudokset tulee poistaa kalkki ennen kudosten käsittelyä kudoksen leikkaamisen helpottamiseksi ja mikrotomin terien vaurioitumisen estämiseksi.^{1,2}

Asianmukaisesti kiinnitetty ja upotetut kudokset, jotka ilmentävät määritettyä antigeenikohdetta, tulee säilyttää viileässä paikassa. Vuoden 1988 Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) -laki edellyttää 42 CFR:ssä §493.1259(b), jonka mukaan "Laboratorion on säilytettävä värjätty objektilasit vähintään kymmenen vuotta tutkia ja säilyttää näytekappaleet vähintään kaksi vuotta tutkimuspäivästä."³

Kudosten hoito ennen värjäystä:

Suorita Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) alla suositellun protokollan mukaisesti. Hier:n rutiinomaisen käytön ennen IHC:tä on osoitettu minimoivan epäohjonmukaisuudet ja standardoivan värjäytymistä.^{4,5}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Finnish

BIOCARE
M E D I C A L

Varoitukset ja varoimet:

1. DAB:n tiedetään olevan syöpää aiheuttava aine.
2. Älä altista DAB-komponentteja voimakkaalle valolle tai suoralle auringonvalolle.
3. DAB voi aiheuttaa ihon herkistymistä. 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 ihmis- tai eläinperäisiä materiaaleja mahdollisesti biologisesti vaarallisina ja hävitä tällaiset materiaalit asianmukaisin varotoimin. Noudata altistumistapauksessa vastaavien viranomaisten antamia terveysturvamääräyksiä.^{6,7}
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 reagenssit tai näytteet joutuvat kosketuksiin herkkien alueiden kanssa, pese runsaalla vedellä.⁸
7. Reagenssien mikrobikontaminaatio voi johtaa epäspesifisen värjäytymisen lisääntymiseen.
8. Muut kuin ilmoitetut inkubointiajat 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 hävitysmenettelmistä.
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
	H341 H350	Epäillään aiheuttavan geneettisiä vikoja. Saattaa aiheuttaa syöpää

Käyttöohjeet:

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

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

Yleiset menettelyvaiheet IHC:n suorittamiseksi:

1. Parafiinien poisto: Poista paraffinointi objektilaseilta Slide Britellä tai ksyleenillä. Hydratoi liukulevyt sarjassa luokiteltuja alkoholeja veteen.
2. Peroksidiblokki: Lopeta 5 minuuttia Peroxidized 1:llä.
3. Esikäsitelyliuos/protokolla: Katso suositeltu esikäsitelyliuos ja -protokolla vastaavasta primäärivasta-ainetiedotteesta.
4. Proteiiniolho (valinnainen): Inkuboi 5-10 minuuttia huoneenlämpötilassa (RT) Background Punisherilla.

5. Primaarinen vasta-aine: Katso inkubaatioaika vastaavasta primäärivasta-aineesta.
6. Koetin (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 hematoksyliinillä. Huuhtelee deionisoidulla vedellä. Levitä Tacha's Bluing -liuosta 1 minuutin ajan. Huuhtelee deionisoidulla vedellä.

Tekniset huomautukset:

1. Käytä pesuvaiheisiin TBS:ää.

Laadunvalvonta:

Katso CLSI-laatusandardit immunohistokemiallisten määritysten suunnittelua ja toteutusta varten; Hyväksytyt Guideline-Second edition (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011⁹

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 kudoksia ja asianmukaisia värjäystekniikoita. Yksi positiivinen ulkoinen kudoskontrolli jokaista testiolosuhteita kohden tulisi sisällyttää jokaiseen värjäysajoon.

Ulkoisiin positiivisiin kontrollimateriaaleihin käytetyt kudokset tulee valita potilasnäytteistä, joissa on hyvin karakterisoitu alhainen positiivinen kohdeaktiivisuus, joka antaa heikon positiivisen värjäytymisen. Ulkoisten positiivisten kontrollien alhainen positiivisuustaso on suunniteltu varmistamaan pienten muutosten havaitseminen primaarisen vasta-aineen herkkyudessa epästabiilisuudesta 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 valmistelua.

Tunnettuja positiivisia kudoskontroleja 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 värjäytymistä, testinäytteiden tuloksia on pidettävä virheellisinä.

Negatiivisten kudosten kontrolli:

Käytä negatiivista kudoskontrollia, joka on kiinnitetty, käsitelty ja upotettu identtisellä tavalla potilasnäytteiden kanssa joka värjäysajossa varmistaaksesi IHC:n primaarisen vasta-aineen spesifisyyden. Kohdeantigeenin osoittamiseen ja spesifisen taustavärjäytymisen osoittamiseen (väärä positiivinen värjäys). Myös useimmat eri solutyypit, joita esiintyy useimmissa kudosleikkeissä, voivat laboratorio käyttää niitä sisäisinä negatiivisina kontrollipaikkoina IHC:n suorituskyvyn tarkistamiseen tekniset tiedot. Näytetyypit ja -lähteet, joita voidaan käyttää negatiiviseen kudokseen säätimet on lueteltu Suorituskyvyminaisuudet-osiossa.

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

Epäspesifinen negatiivinen reagenssikontrolli:

Käytä epäspesifistä negatiivista reagenssikontrollia primaarisen vasta-aineen sijasta kunkin potilasnäytteen leikkeen kanssa arvioidaksesi epäspesifistä värjäytymistä ja mahdollistaa spesifisen värjäytymisen paremman tulokinnan antigeenikohdassa. Ihannetapauksessa negatiivinen reagenssikontrolli sisältää vasta-aineen, joka on tuotettu ja valmistettu (eli laimennettu samaan pitoisuuteen käyttäen samaa laimennusainetta) käytettäväksi samalla tavalla

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Finnish

BIOCARE
M E D I C A L

kuin primäärinen 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 kuvatuille negatiivisille reagenssikontrolleille. Negatiivisen reagenssikontrolin inkubaatioajan tulee vastata primaarisen vasta-aineen inkubaatioaikaa.

Kun sarjaleikkeissä käytetään useiden vasta-aineiden paneeleja, yhden objektilasin negatiivisesti värjättyneet alueet voivat toimia negatiivisena/epäspesifisenä sitoutumisen taustakontrolina muille vasta-aineille. Endogeenisen entsyymiaktiivisuuden tai entsyymien epäspesifisen sitoutumisen erottamiseksi spesifisestä immunoreaktiivisuudesta voidaan potilaan lisäkudoksia värjätä yksinomaan substraatti-kromogeeni- tai entsyymikomplekseilla (PAP, avidiini-biotiini, streptavidiini) ja substraatti-kromogeenilla, vastaavasti.

Määrityksen 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 positiivisia ja negatiivisia kudoksia. Tutustu laadunvalvontamenettelyihin, jotka on kuvattu aiemmin tässä tuoteselosteen osassa ja CAP-sertifiointiohjelman laadunvalvontasuosituksissa.¹⁰ Immunohistokemiaa ja/tai NCCLS IHC -ohjetta varten¹¹. Nämä laadunvalvontatoimenpiteet on toistettava jokaiselle uudelle vasta-aineerälle tai aina, kun määritysparametreissa tapahtuu muutoksia. Suorituskykyominaisuudet-osiossa luetellut kudokset soveltuvat määrityksen todentamiseen.

Ongelmien kartoittaminen:

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

Värjäyksen tulkinta:

IntelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit saa aikaan ruskean värireaktion primaarisen vasta-aineen paikantamisessa antigeenikohtissa. Ennen potilastulosten tulkintaa pätevän patologin on arvioitava kontrollien värjäys. Negatiiviset kontrolit arvioidaan ja niitä verrataan värjättyihin objektilaseihin sen varmistamiseksi, että havaittu värjäytyminen ei ole seurausta epäspesifisistä vuorovaikutuksista.

Positiivinen kuduskontrolli:

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

Reaktiotuotteen väri voi vaihdella riippuen käytetyistä substraattikromogeenista. Katso odotetut värireaktiot alustan pakkauslaseista. Lisäksi metakromiaa voidaan havaita värjäysmenetelmän muunnelmissa.¹²

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

Negatiivinen kuduskontrolli:

Negatiivinen kuduskontrolli tulee tutkia positiivisen kuduskontrolin jälkeen primaarisen vasta-aineen kohdeantigeenin leiman spesifisyyden varmistamiseksi. Spesifisen värjäytymisen puuttuminen negatiivisessa kuduskontrolissa vahvistaa vasta-aineen ristireaktiivisuuden puuttumisen solu- ja solukomponentteja kohtaan. Jos negatiivisessa ulkoisessa

kuduskontrolissa esiintyy erityistä värjäytymistä (väärä positiivinen värjäytyminen), potilasnäytteen tuloksia on pidettävä virheellisinä.

Epäspesifinen värjäys, jos sitä esiintyy, on yleensä hajanainen. Sidekudoksen satunnaista värjäytymistä voidaan havaita myös leikkeissä, jotka ovat peräisin liikaa formaliinista kiinnitetystä kudoksesta. Käytä ehjiä soluja värjäystulosten tulkittamiseen. Nekroottiset tai rappeutuneet solut värjäytyvät usein epäspesifisesti.

Potilaan kudokset:

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

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

Rajoitukset:

Yleiset rajoitukset:

1. varten *in vitro* diagnostinen (IVD) käyttö
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. Kudostulokset riippuvat kudoksen käsittelystä ja prosessoinnista ennen värjäystä. Väärä kiinnitys, jäädyttäminen, sulattaminen, pesu, kuivaus, kuumennus, leikkaus tai kontaminaatio muilla kudoksilla tai nesteillä voi aiheuttaa artefakteja, vasta-aineiden vangitsemista tai vääriä negatiivisia tuloksia. Epäohdonmukaiset tulokset voivat johtua vaihteluista kiinnitys- ja upotusmenetelmissä tai kudoksen sisäisistä epäsäännöllisyyksistä.¹⁴
5. Liiallinen tai epätätymäinen 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 kontrolleja 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 tietyille sovellukselle voivat vaihdella. Näitä ovat muun muassa kiinnitys, lämmön talteenotto menetelmä, inkubaatioajat, vasta-ainelaimennus, kudostulosten paksuus ja käytetty havaitsemispakkaus. Katso suositellut protokollat ja käyttöolosuhteet ensisijaisen vasta-aineen ja muiden apureagenssien käyttöohjeista. Käyttöturvallisuustiedotteen suositukset ja protokollat perustuvat Biocare-tuotteiden yksinomaiseen käyttöön. Viime kädessä on tutkijan vastuulla määrittää optimaaliset olosuhteet.
8. Tätä tuotetta ei ole tarkoitettu käytettäväksi virtausytometriassa. Virtausytometrian suorituskykyominaisuuksia ei ole määritetty.
9. Hepatiitti B -viruksella infektoiden henkilöiden kudoksissa, jotka sisältävät hepatiitti B -pinta-antigeeniä (HBsAg), voi esiintyä epäspesifistä piparjuuriperoksidaasin värjäytymistä.¹⁴
10. Reagenssit voivat osoittaa odottamattomia reaktioita aiemmin testamattomissa kudoksissa. Odottamattomien reaktioiden mahdollisuutta ei edes testatuissa kudostyypeissä voida täysin eliminoida antigeenin ilmentymisen biologisen vaihtelun vuoksi kasvaimissa tai muissa patologisissa kudoksissa.¹⁵ Ota yhteyttä Biocaren tekniseen tukeen numerossa 1-800-542-2002 tai biocare.net-sivustossa olevien

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Finnish

BIOCARE
M E D I C A L

teknisen tuen tietojen kautta ja kerro dokumentoiduista odottamattomista reaktioista.

11. Normaaliit/ei-immuniseerumit samasta eläinlähteestä kuin estovaiheissa käytetyt sekundaariset antiseerumit voivat aiheuttaa vääriä negatiivisia tai vääriä positiivisia tuloksia autovasta-aineista tai luonnollisista vasta-aineista johtuen.
12. Vääriä positiivisia tuloksia voidaan nähdä johtuen proteiinien tai substraattireaktiivien ei-immunologisesta sitoutumisesta. Ne voivat johtua myös pseudoperoksidaasiaktiivisuudesta (erytrosyytit), endogeenisestä peroksidaasiaktiivisuudesta (sytokromi C) tai endogeenisestä biotiinista (esim. maksa, rinta, aivot, munuaiset) riippuen käytetyn immunovärjäyksen tyypistä.¹³
13. Negatiivinen tulos tarkoittaa, että antigeeniä ei havaittu, ei sitä, että antigeeni puuttui tutkituista soluista tai kudoksesta.

Tuotekohtaiset rajoitukset:

Ei muita tuotekohtaisia rajoituksia

Suorituskyvyminaisuudet:

Värjäys suoritettiin käyttämällä vasta-ainekohtaisissa käyttöohjeissa annettuja tai määriteltyjä protokollia. Värjäytymisen herkkyys ja spesifisyys arvioitiin useissa normaaleissa ja neoplastisissa kudostyypeissä, jotka arvioitiin primaaristen vasta-aineiden kehittymisen aikana.

Toistettavuus:

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

Objektien kartoittaminen:

1. Objektit eivät värjäytyneet – Tarkista, että on käytetty asianmukaista positiivista kontrollikudosta, vasta-ainetta ja havaitsemistuotteita. Tarkista, ettei vahanpoisto tai esikäsitteily ole täydellinen tai virheellinen.
2. Kaikkien objektien heikko värjäys – Tarkista, että on käytetty asianmukaista positiivista kontrollikudosta, vasta-ainetta ja havaitsemistuotteita.
3. Kaikkien objektien liiallinen tausta – Endogeenistä biotiinia (jos käytät biotiinipohjaisia tunnistustuotteita), endogeenistä HRP-aktiivisuutta, joka muuttaa kromogeenin värilliseksi lopputuotteeksi (käytä peroksidaasialpaa), tai ylimääräistä epäspesifistä proteiiniuorovaikutusta (käytä proteiinia) esto, kuten seerumi- tai kaseiinipohjainen estoliuos).
4. Kudokset pesevät objektit pois inkubaation aikana – Tarkista objektit varmistaaksesi, että ne ovat positiivisesti varautuneita.
5. Erytinen värjäys liian tumma – Tarkista protokolla määrittääksesi, onko objektiasiin käytetty oikea vasta-ainetiiteri, sekä oikeat inkubaatioajat kaikille reagenssille. 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. Nadjji 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

French

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Utilisation prévue :

Pour *in vitro* Utilisation diagnostique

Le kit intelliPATH FLX™ DAB Chromogen est 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 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 du brun pâle à l'orange. Les propriétés colorantes ne sont pas affectées par la couleur du mélange tampon chromogène.intelliPATH FLX™Le DAB est une formulation très stable.intelliPATH FLX™DAB est conçu pour être utilisé sur leintelliPATH FLX™colorant automatisé.

Principe de procédure :

Ce chromogène DAB du kit intelliPATH FLX™ 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. Le spécimen 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
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Reconstitution, Mélange, Dilution, Titrage :

Le kit intelliPATH FLX™ DAB Chromogen est optimisé pour une utilisation avec les anticorps Biocare et les réactifs auxiliaires et doit être dilué juste avant utilisation.

Mélange en ligne : 120 µL de chromogène DAB pour 2 000 µL de tampon DAB. Si le chromogène est mélangé hors ligne, utilisez le même rapport. La solution de travail DAB est stable pendant 5 jours. Conservez la solution de travail DAB entre 2 et 8 °C.

Applications connues :

Immunohistochimie (tissus inclus en paraffine fixés au formol)

Fourni comme :

Chromogène intelliPATH FLX™ DAB

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

Tampon DAB intelliPATH FLX™

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 décroissance* 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. La stabilité du réactif dilué par l'utilisateur 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.

Préparation des échantillons :

Tissus fixés au formol conviennent pour une utilisation 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.^{1,2}

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.»³

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

French

BIOCARE
M E D I C A L

Traitement 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.^{4,5}

Avertissement et précautions:

1. Le DAB est connu pour être un cancérigène 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.^{6,7}
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.⁸
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
	H341 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 : Déparaffinez 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 Peroxidazed 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'hématoxyline. 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). 2011⁹

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.

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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

French

BIOCARE
M E D I C A L

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[®] pour l'immunohistochimie et/ou la directive NCCLS IHC¹. 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 intelliPATH FLX™ 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.¹² 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 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.¹⁴
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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

French

BIOCARE
M E D I C A L

- 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.
- 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.
 - 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.
 - 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.¹⁴
 - 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.¹⁵ 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.
 - Les sérums normaux/non immuns provenant de la même source animale que les antisérums 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.
 - 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.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 lors 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:

- 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 inapproprié.

- Faible coloration de toutes les lames – Vérifiez que le tissu de contrôle positif, les anticorps et les produits de détection appropriés ont été utilisés.
- 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).
- Les coupes de tissus sont lavées sur les lames pendant l'incubation. Vérifiez les lames pour vous assurer qu'elles sont chargées positivement.
- 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:

- Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
- Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
- Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
- Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
- Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- 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.
- 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.
- 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
- College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
- 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.
- 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.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Lab Med* 1983; 14:767.
- 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.
- Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

German

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Verwendungszweck:

Für *in vitro* Diagnostische Verwendung

Das intelliPATH FLX™ 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 verwendet wird Primärantikörper. 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 hellbraun bis orange variieren. Die Färbereigenschaften werden durch die Farbe der Chromogenpuffermischung nicht beeinflusst. intelliPATH FLX™ DAB ist eine Formulierung, die sehr stabil ist. intelliPATH FLX™ DAB ist für die Verwendung im Internet konzipiert. intelliPATH FLX™ automatisierter Färbeautomat.

Verfahrensgrundsatz:

Dieses DAB-Chromogen im intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit ermöglicht bei Verwendung in IHC-Tests von FFPE-Gewebeschnitten die Visualisierung von Antigenen durch die sequentielle Anwendung von a 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 Waschstschritten. 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.

Materialien und Methoden:

Mitgelieferte Reagenzien:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration:

Das intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit ist für die Verwendung mit Biocare-Antikörpern und Hilfsreagenzien optimiert und muss unmittelbar vor der Verwendung verdünnt werden.

Online-Mischung: 120 µL DAB-Chromogen pro 2000 µL DAB-Puffer. Wenn Chromogen offline gemischt wird, verwenden Sie dasselbe Verhältnis. Die DAB-Arbeitslösung ist 5 Tage lang stabil. Lagern Sie die DAB-Arbeitslösung bei 2–8 °C.

Bekannte Anwendungen:

Immunhistochemie (formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebe)

Geliefert als:

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen

DAB-Lösung. Weitere Einzelheiten finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

intelliPATH FLX™ DAB-Puffer

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 Xylolersatz
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)
Bläunungsreagenz*
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. Die Stabilität des vom Benutzer verdünnten Reagenzes 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.

Probenvorbereitung:

In Formalin fixierte Gewebe eignen sich zur Verwendung vor der Paraffineinbettung. Knochengewebe sollte vor der Gewebearbeitung entkalkt werden, um das Gewebeschnneiden zu erleichtern und Schäden an den Mikrotomklingen zu verhindern.^{1,2}

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 Objektträger mindestens zehn Jahre ab dem Datum aufbewahren Prüfung durchführen und Probenblöcke mindestens zwei Jahre ab dem Datum der Prüfung aufbewahren.“³

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

German

BIOCARE
M E D I C A L

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.^{4,5}

Warnung und Vorsichtsmaßnahmen:

1. DAB steht im Verdacht, krebserregend zu sein.
2. Setzen Sie DAB-Komponenten keinem starken Licht oder direkter Sonneneinstrahlung 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.^{6,7}
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.⁸
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 Primäntikörper 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
	H341 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 Primäntikörper 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: Objektträger in Slide Brite oder XyloL entparaffinieren. Hydrat-Objektträger in einer Reihe abgestufter Alkohole zu Wasser geben.
2. Peroxidblock: 5 Minuten lang mit Peroxidazed 1 blockieren.
3. Vorbehandlungslösung/Protokoll: Die empfohlene Vorbehandlungslösung und das empfohlene Protokoll finden Sie im Datenblatt des jeweiligen Primäntikörpers.
4. Proteinblock (optional): 5–10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) mit Background Punisher inkubieren.
5. Primäntikörper: Die Inkubationszeit entnehmen Sie bitte dem Datenblatt des jeweiligen Primäntikörpers.
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 Hämatoxylin. Mit entionisiertem Wasser spülen. Tragen Sie Tachas Bläuungslösung 1 Minute lang auf. Mit entionisiertem Wasser spülen.

Technische Hinweise:

1. Verwenden Sie TBS für die Waschschritte.

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). 2011⁹

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 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 Gewebepreparation.

Bekannt 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-Primäntikörpers zu überprüfen. Nachweis des Zielantigens und um einen Hinweis auf eine spezifische

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

German

BIOCARE
M E D I C A L

Hintergrundfärbung zu liefern (falsch positive Färbung). Auch die Vielfalt der verschiedenen Zelltypen, die in den meisten Gewebeschritten 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 Serienschritten 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 Immunreaktivität 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[®] für Immunhistochemie und/oder die NCCLS IHC-Leitlinie¹¹. 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 intelliPATH FLX™ 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.¹²

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-Kreuzreaktivität 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 Farbeergebnisse. 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.

Spezifische Informationen zur angegebenen Antikörper-Immunreaktivität 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 Farbeergebnisse.
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, Schneiden oder Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper einschließen oder falsch negativen Ergebnissen führen. Inkonsistente Ergebnisse können auf unterschiedliche Fixierungs- und Einbettungsmethoden oder auf inhärente Unregelmäßigkeiten im Gewebe zurückzuführen sein.¹⁴
5. Übermäßiges oder unvollständiges Gegenfärben kann die korrekte Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

German

BIOCARE
M E D I C A L

- 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.
- Die optimalen Protokolle für eine bestimmte Anwendung können variieren. Dazu gehören unter anderem Fixierung, Wärmerückgewinnungsmethode, Inkubationszeiten, Antikörperverdünnung, Gewebeschnittdicke und das verwendete Nachweiskit. Empfohlene Protokolle und Verwendungsbedingungen finden Sie in den Gebrauchsanweisungen für Primäntikörper 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.
- Dieses Produkt ist nicht für die Verwendung in der Durchflusszytometrie bestimmt. Für die Durchflusszytometrie wurden keine Leistungsmerkmale ermittelt.
- Gewebe von Personen, die mit dem Hepatitis-B-Virus infiziert sind und Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) enthalten, können eine unspezifische Färbung mit Meerrettichperoxidase aufweisen.¹⁴
- 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.¹⁵ Kontaktieren Sie den technischen Support von Biocare unter 1-800-542-2002 oder über die technischen Supportinformationen auf biocare.net mit dokumentierten unerwarteten Reaktionen.
- 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.
- 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.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 Primäntikörpern 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:

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

Verweise:

- Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
- Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
- Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
- Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
- Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- 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.
- 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.
- 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
- College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
- 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.
- Koretz 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.
- Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med* 1983; 14:767.
- Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry*. *AmJ Clin Path* 1980; 73:626.
- Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Greek

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Προβλεπόμενη χρήση:

Για *in vitro* Διαγνωστική χρήση

Το kit χρωμογόνου intelliPATH FLX™ DAB προορίζεται για χρήση σε πρωτόκολλα χρώσης με χειροκίνητο ή αυτοματοποιημένο ανοσοϊστοχημείο (IHC) για την ανίχνευση αντιγόνων-στόχων σε ιστούς που είναι σταθεροποιημένοι με φορμαλίνη, ενσωματωμένοι σε παραφίνη (FFPE) όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το κατάλληλο σύστημα ανίχνευσης και πρωτογενή 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 άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από εξειδικευμένο παθολόγο.

Περιληψη και Επεξήγηση:

3, 3' Διαμινοβενζιδίνη (DAB) είναι ένα καλά καθιερωμένο χρωμογόνο που χρησιμοποιείται σε πρωτόκολλα χρώσης IHC, το οποίο παρουσιάζει 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 διαλύματος χρωμογόνου μπορεί να ποικίλλει από ανοιχτό καφέ έως πορτοκαλί. Οι ιδιότητες χρώσης δεν επηρεάζονται από το χρώμα του ρυθμιστικού μίγματος χρωμογόνου.intelliPATH FLX™ Το DAB είναι ένα σκεύασμα που είναι πολύ σταθερό.intelliPATH FLX™ Το DAB έχει σχεδιαστεί για χρήση στοintelliPATH FLX™ αυτοματοποιημένο χρωματιστή.

Αρχή Διαδικασίας:

Αυτό το χρωμογόνο DAB στο kit χρωμογόνου intelliPATH FLX™ DAB, όταν χρησιμοποιείται σε δοκιμές IHC τμημάτων ιστού FFPE, επιτρέπει την οπτικοποίηση των αντιγόνων μέσω της διαδοχικής εφαρμογής ενός ειδικού αντισώματος στο αντιγόνο (πρωτεΐον αντισώμα), ένα δευτερεύον αντισώμα στο πρωτεύον αντισώμα (προαιρετικό αντισώμα σύνδεσης/ανιχνευτής), ένα σύμπλεγμα ενζύμων και ένα χρωμογόνο υπόστρωμα με παρεμβαλλόμενα στάδια έκλυσης. 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 αποτελέσματα ερμηνεύονται χρησιμοποιώντας ένα φως μικροσκόπιο και βοήθεια στη διαφορική διάγνωση παθολογικών διεργασιών, που μπορεί ή μπορεί να μην σχετίζεται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

Υλικά και μέθοδοι:

Παρεχόμενα αντιδραστήρια:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Ανασύσταση, ανάμιξη, αραιώση, τιτλοδότηση:

Το intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit είναι βελτιστοποιημένο για χρήση με αντισώματα Biocare και βοηθητικά αντιδραστήρια και πρέπει να αραιώνεται ακριβώς πριν από τη χρήση.

Μείγμα σε απευθείας σύνδεση: 120 μL χρωμογόνου DAB ανά 2000 μL ρυθμιστικού διαλύματος DAB. Εάν το χρωμογόνο αναμιγνύεται εκτός

σύνδεσης, χρησιμοποιήστε την ίδια αναλογία. Το διάλυμα εργασίας DAB είναι σταθερό για 5 ημέρες. Αποθηκεύστε το διάλυμα εργασίας DAB στους 2-8°C.

Γνωστές εφαρμογές:

Ανοσοϊστοχημεία (ιστοί ενσωματωμένοι σε παραφίνη σταθεροποιημένοι με φορμαλίνη)

Παρέχεται ως:

intelliPATH FLX™ DAB Χρωμογόνο

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

intelliPATH FLX™ DAB Buffer

Το ρυθμισμένο διάλυμα περιέχει 3% διάλυμα υπεροξειδίου 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 ξυλόλιο
Αιθανόλη ή αλκοόλη αντιδραστηρίου
Θάλαμος αποκάλυψης* ή παρόμοια χύτρα ταχύτητας (προαιρετικά)
Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης*
Αντιδραστήρια προεπεξεργασίας* (προαιρετικά)
Πέψη ενζύμων* (προαιρετικό)
Μπλοκ υπεροξειδάσης*
Μπλοκ πρωτεΐνης* (προαιρετικό)
Πρωτογενές αντισώμα*
Αντιδραστήρια αρνητικού ελέγχου*
Kit ανίχνευσης*
Αιματοξυλίνη* (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 φιαλιδίου όταν φυλάσσεται υπό αυτές τις συνθήκες. Να μη χρησιμοποιείται μετά την ημερομηνία λήξης. Η αποθήκευση υπό οποιαδήποτε συνθήκες εκτός από αυτές που καθορίζονται πρέπει να επαληθεύεται. Τα αραιωμένα αντιδραστήρια θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αμέσως σύμφωνα με τις οδηγίες. Η σταθερότητα του αντιδραστηρίου αραιωμένου χρήστη 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 υποψία για πρόβλημα με το αντισώμα, 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:

Ιστοί στερεωμένοι σε φορμαλίνη είναι κατάλληλα για χρήση πριν από την ενσωμάτωση παραφίνης. Οι οστικοί ιστοί θα πρέπει να απασβετώνονται πριν από την επεξεργασία του ιστού για να διευκολυνθεί η κοπή του ιστού και να αποφευχθεί η ζημία στις λεπίδες του μικροτόμου.^{1,2}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Greek

BIOCARE
M E D I C A L

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 διατήρηση των τμημάτων δειγμάτων τουλάχιστον δύο χρόνια από την ημερομηνία εξέτασης.»³

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.^{4,5}

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.^{6,7}
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 ευαίσθητες περιοχές, πλύνετε με άφθονη ποσότητα νερού.⁸
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.

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

Κίνδυνος	Κώδικας	Δήλωση κινδύνου
	H341 H350	Υποπτο ότι 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 ποικίλλουν ανάλογα με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αντισωμάτων 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. Αποπαραφίνιση: Αποπαραφίνιση διαφανειών σε Slide Brite ή Ξυλόλιο. Η ενυδάτωση ολισθαίνει σε μια σειρά από διαβαθμισμένες αλκοόλες σε νερό.
2. Μπλοκ υπεροξειδίου: Μπλοκάρτε για 5 λεπτά με Peroxidase 1.
3. Διάλυμα/Πρωτόκολλο προεπεξεργασίας: Ανατρέξτε στο αντίστοιχο φύλλο δεδομένων πρωτογενών αντισωμάτων για το προτεινόμενο διάλυμα και πρωτόκολλο προεπεξεργασίας.
4. Μπλοκ πρωτεΐνης (προαιρετικό): Επώαστε για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT) με Background Punisher.
5. Πρωτεύον αντισώμα: Ανατρέξτε στο αντίστοιχο φύλλο δεδομένων πρωτογενούς αντισώματος για το χρόνο επώασης.
6. Ανιχνευτής (μόνο για αντισώματα ποντικού): Επώαστε για 5-15 λεπτά σε RT με MACH 4 Mouse Probe.
7. Πολυμερές: Επώαστε για 10-20 λεπτά για αντισώματα ποντικού ή 30 λεπτά για αντισώματα κουνελιού σε RT με MACH 4 HRP Polymer.
8. Χρωμογόνο: Επώαστε για 5 λεπτά σε RT με το DAB της Biocare
9. Αντίχρηση: Αντίχρηση με αιματοξυλίνη. Ξεπλύνετε με αποιονισμένο νερό. Εφαρμόστε Tacha's Bluing Solution για 1 λεπτό. Ξεπλύνετε με αποιονισμένο νερό.

Τεχνικές σημειώσεις:

1. Χρησιμοποιήστε TBS για τα βήματα πλυσίματος.

Έλεγχος 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). 2011⁹

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.

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 δίνει ασθενή θετική χρώση. Το χαμηλό επίπεδο θετικότητας για εξωτερικούς θετικούς ελέγχους

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Greek

BIOCARE
M E D I C A L

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 ή τα δείγματα που έχουν υποστεί διαφορετική επεξεργασία από τα δείγματα ασθενούς επικυρώνουν μόνο την απόδοση του αντιδραστήριου 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 διακρίβωση 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 χρώσης 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 αντιδραστήριου:

Χρησιμοποιήστε έναν μη ειδικό μάρτυρα αρνητικού αντιδραστήριου στη θέση του πρωτογενούς αντισώματος με μια τομή από κάθε δείγμα ασθενούς για να αξιολογήσετε τη μη ειδική χρώση και επιτρέπουν την καλύτερη ερμηνεία της ειδικής χρώσης στη θέση του αντιγόνου. Στην ιδανική περίπτωση, ένας αρνητικός έλεγχος αντιδραστήριου περιέχει ένα αντίσωμα που παράγεται και παρασκευάζεται (δηλαδή αραιωμένο 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 επιθυμητή εναλλακτική λύση στα προηγούμενα περιγραφέντα αρνητικά αντιδραστήρια ελέγχου. Η περίοδος επώασης για τον αρνητικό μάρτυρα αντιδραστήριου 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 χρησιμοποιούνται ως έλεγχος υποβάθρου αρνητικής/μη ειδικής δέσμευσης για άλλα αντισώματα. Για να διαφοροποιηθεί η ενδογενής ενζυμική 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, αντίστοιχα.

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 περιγράφθηκαν προηγουμένως σε αυτήν την ενότητα του ένθετου προϊόντος και στις συστάσεις ποιοτικού ελέγχου του προγράμματος πιστοποίησης CAP® για την ανοσοϊστοχημεία και/ή την κατευθυντήρια γραμμή NCCLS IHC⁺. 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 kit χρωμογόνου intelliPATH FLX™ DAB προκαλεί μια αντίδραση καφέ χρώματος στις θέσεις αντιγόνου που εντοίζονται 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 βαμμένες 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.¹²

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(α) πρωτόκολλο(α) 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 θεωρηθούν άκυρα.

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

Ιστός ασθενούς:

Εξετάστε δείγματα ασθενών που έχουν χρωματιστεί με ενδεικνυόμενο αντίσωμα τελευταίος. Η θετική ένταση χρώσης θα πρέπει να αξιολογείται στο πλαίσιο οποιασδήποτε μη ειδικής χρώσης υποβάθρου του αρνητικού αντιδραστήριου 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 ενδεικνυόμενη ανοσοαντιδραστικότητα αντισωμάτων.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Greek

BIOCARE
M E D I C A L

Περιορισμοί:

Γενικοί περιορισμοί:

1. Για *in vitro* διαγνωστική (IVD) Χρήση
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 χρώσης.
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 τεχνουργήματα, 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.¹⁴
5. Η υπερβολική ή ατελής αντιχρώση μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων.
6. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε θετικής ή αρνητικής χρώσης θα πρέπει να αξιολογείται στο πλαίσιο της κλινικής εικόνας, της μορφολογίας και άλλων ιστοπαθολογικών κριτηρίων. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε θετικής ή αρνητικής χρώσης 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 επώασης, την αραίωση αντισωμάτων, το πάχος του τμήματος ιστού και το kit 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 ιό της ηπατίτιδας B και που περιέχουν επιφανειακό αντιγόνο ηπατίτιδας B (HBsAg) μπορεί να εμφανίσουν μη ειδική χρώση με υπεροξειδάση χρένου.¹⁴
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 νεοπλασμάτα ή άλλους παθολογικούς ιστούς.¹⁵ 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 πρωτεϊνών ή προϊόντων αντίδρασης υποστρώματος. Μπορεί επίσης να προκληθούν από δραστηριότητα ψευδο-υπεροξειδάσης (ερυθροκύτταρα), ενδογενή δραστηριότητα υπεροξειδάσης (κυτόχρωμα C) ή ενδογενή βιοτίνη (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός) ανάλογα με τον τύπο της ανοσοχρήσης που χρησιμοποιείται.¹³

13. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύτηκε, όχι ότι το αντιγόνο απουσίαζε στα κύτταρα ή στον ιστό που εξετάστηκαν.

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

Αντιμετώπιση προβλημάτων:

1. Δεν υπάρχει χρώση οποιαδήποτε 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. Αδύναμη χρώση όλων των πλακών – Ελέγξτε για να προσδιορίσετε ότι έχουν χρησιμοποιηθεί κατάλληλοι ιστοί θετικού ελέγχου, αντισώματα και προϊόντα ανίχνευσης.
3. Υπερβολικό υπόβαθρο όλων των διαφανειών – Μπορεί να υπάρχουν υψηλά 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 ανασταλτικό διάλυμα με βάση τον ορό ή την καζείνη).
4. Τα τμήματα ιστού ξεπλένουν τις αντικειμενοφόρες πλάκες κατά τη διάρκεια της επώασης – Ελέγξτε τις αντικειμενοφόρες 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 αντικειμενοφόρο πλάκα, καθώς και οι κατάλληλοι χρόνοι επώασης για όλα τα αντιδραστήρια. Επιπλέον, βεβαιωθείτε ότι το πρωτόκολλο έχει αρκετά βήματα πλύσης για την αφαίρεση της περισσεύας αντιδραστηρίων μετά την ολοκλήρωση των βημάτων επώασης.

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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Greek

BIOCARE
M E D I C A L

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. AmJ 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Hungarian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Rendeltetészerű használat:

Mert *in vitro* Diagnosztikai felhasználás

Az intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit manuális vagy automatizált immunhisztokémiai (IHC) festési protokollokban használható célantigének kimutatására formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetekben, ha a megfelelő detektáló rendszerrel és rendszerrel együtt használják. elsődleges antitestek. Bármely festődés vagy annak hiánya klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollokkal 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 torna-peroxidáz (HRP) enzim jelenlétében barna csapadékot hoz létre, amely szerves oldószerekben nem oldódik, és tartós rögzítőközeggel fedhető le. Ez a termék két komponensű rendszerben érkezik, amely folyadékstabil DAB kromogénből és DAB szubsztrát pufferből áll. A kromogén pufferkeverék színe a halványbarnától a narancssárgáig változhat. A festési tulajdonságokat nem befolyásolja a kromogén pufferkeverék színe. intelliPATH FLX™ A DAB nagyon stabil készítmény. intelliPATH FLX™ A DAB-t úgy tervezték, hogy aintelliPATH FLX™ automata festő.

Eljárás elve:

Ez az intelliPATH FLX™ 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 enzimaktiválása az antigén helyén látható reakcióterméket eredményez. A minta ezután ellenfesthető, és fedőlemezzel festhető. Az eredményeket fény segítségével értelmezzük mikroszkóppal és segítséget nyújt a kóreléttani folyamatok differenciáldiagnózisában, amely lehet, ill nem kapcsolódhat egy adott antigénhez.

Anyagok és módszerek:

Mellékelt reagensek:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Feloldás, keverés, hígítás, titrálás:

Az intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit Biocare antitestekkel és kiegészítő reagensekkel való használatra optimalizált, és közvetlenül használat előtt fel kell hígítani.

On-line Mix: 120 µl DAB kromogén 2000 µl DAB pufferenként. Ha a kromogént off-line keverik, használja ugyanazt az arányt. A DAB munkaoldat 5 napig stabil. Tárolja a DAB munkaoldatot 2-8°C-on.

Ismert alkalmazások:

Immunhisztokémia (formalinnal rögzített paraffinba ágyazott szövetek)

Így szállítva:

intelliPATH FLX™ DAB kromogén

DAB megoldás. További részletekért lásd a biztonsági adatlapot.

intelliPATH FLX™ DAB 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*
Hematoxilín* (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 lejárati időig stabil, ha ilyen körülmények között tárolják. Ne használja a lejárati idő után. A meghatározottaktól eltérő körülmények közötti tárolást ellenőrizni kell. A hígított reagenseket az utasításoknak megfelelően azonnal fel kell használni. A felhasználó által hígított reagens 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, lépjen kapcsolatba a Biocare műszaki támogatásával az 1-800-542-2002 telefonszámon vagy a biocare.net oldalon található műszaki támogatási információkon keresztül.

Minta előkészítés:

Formalinnal rögzített szövetek alkalmasak paraffin beágyazás előtti használatra. A csontszöveteket a szövetfeldolgozás előtt vízköteleníteni kell a szövetvágás megkönnyítése és a mikrotom pengéi károsodásának elkerülése érdekében.^{1,2}

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 tíz évig meg kell őriznie a megfestett tárgylemezeket megvizsgálja és megőrzi a mintatömböket a vizsgálat időpontjától számított legalább két évig.”³

A szövetek kezelése festés előtt:

Hajtsa végre a hőindukált epitóp-visszakeresést (HIER) az alábbi javasolt protokoll szerint. Kimutatták, hogy a HIER rutinszerű használata az IHC előtt minimálisra csökkenti az inkonzisztenciát és szabványosítja a festődést.^{4,5}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Hungarian

BIOCARE
M E D I C A L

Figyelmeztetés 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 túlérzékenységet okozhatja. Kerülje a bőrrel és szemmel való érintkezést.
4. Viseljen kesztyűt és védőruházatot, és tegye meg az ésszerű óvintézkedéseket a kezelés során, mivel a DAB veszélyesnek minősül, rákot okozhat, és feltételezhető, hogy genetikai hibákat okoz.
5. Az emberi vagy állati eredetű anyagokat potenciálisan biológiai veszélyesként kezelje, és megfelelő óvintézkedésekkel ártalmatlanítsa az ilyen anyagokat. Expozíció esetén kövesse az illetékes hatóságok egészségügyi irányelveit.^{6,7}
6. A mintákat a rögzítés előtt és után, valamint az ezeknek kitett anyagokat úgy kell kezelni, 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, mossa le bő vízzel.⁸
7. A reagensek mikrobiális szennyeződése a nem specifikus festődés növekedését eredményezheti.
8. A megadottól eltérő inkubációs idők vagy hőmérsékletek hibás eredményeket adhatnak. A felhasználónak minden ilyen változtatást érvényesítenie kell.
9. Ne használja fel a reagenst az injekciós 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 használati útmutatóját az ajánlott protokollokhoz és használati 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
	H341 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 használati útmutatóját az ajánlott protokollokhoz és használati feltételekhez. Az inkubációs idők és hőmérsékletek 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 eljárás lépései:

1. Paraffinmentesítés: Paraffinmentesítse a tárgylemezeket Slide Brite-ben vagy xilolban. A lemezeket osztályozott alkoholos 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 ioncserélt vízzel. Alkalmazza a Tacha's Blueing Solution-t 1 percig. Öblítse le ioncserélt 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). 2011⁹

Positív szövetkontroll:

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

A külső pozitív kontrollanyagokhoz használt szöveteket olyan betegmintákból kell kiválasztani, amelyekben a pozitív célaktivitás jól jellemezhető alacsony szintje, ami gyenge pozitív festést eredményez. A külső pozitív kontrollok alacsony pozitívítási szintjét úgy tervezték, hogy biztosítsa az elsődleges antitest-érzékenységekben 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 betegminta 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 specifikitását a célantigén kimutatása, valamint a specifikus háttérfestődés jelzése (téves pozitív festés). Ezenkívül a legtöbb szövetmetszetben jelenlévő különféle sejttípusok sokfélesége képes a laboratórium belső negatív kontrollhelyként használni az IHC teljesítményének ellenőrzésére specifikációk. A negatív szövetekhez használható minták típusai és forrásai A vezérlőelemek a Teljesítményjellemezők részben találhatóak.

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

Nem specifikus negatív reagens kontroll:

Használjon nem specifikus negatív reagens kontrollt az elsődleges antitest helyett minden egyes betegminta egy metszetével, hogy értékelje a nem specifikus festődést és lehetővé teszi 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 elsődleges antitest, de nem mutat specifikus reaktivitást az emberi szövetekkel ugyanabban a mátrixban/oldatban, mint a elsődleges antitest. A korábban leírt negatív reagens kontrollok kevésbé kívánatos alternatívájaként a hígító

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Hungarian

BIOCARE
M E D I C A L

önmagában is használható. A negatív reagens kontroll inkubációs időszakának meg kell egyeznie az elsődleges antitest 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 megkülönböztetésére a specifikus immunreaktivitástól további betegszövetek festhető kizárólag 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 specifikitását úgy, hogy egy sor házon belüli szöveten teszteli, amelyek ismert immunhisztokémiai teljesítményjellemzői ismertek, amelyek ismert pozitív és negatív szöveteket képviselnek. Tekintse meg a termékismertető ezen részében korábban ismertetett minőség-ellenőrzési eljárásokat és a CAP tanúsítási program minőség-ellenőrzési ajánlásait.¹⁰ az immunhisztokémiához és/vagy az NCCLS IHC-irányelvéhez.¹¹ Ezeket a minőség-ellenőrzési eljárásokat meg kell ismételni minden új antitest-tételnél, vagy amikor a vizsgálati paraméterek megváltoznak. A teljesítményjellemzők részben felsorolt szövetek alkalmasak a teszt ellenőrzésére.

Hibaelhárítás:

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

A festés értelmezése:

Az intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit barna színű reakciót vált ki az elsődleges antitest által lokalizált antigén helyeken. A betegek eredményeinek értelmezése előtt a kontrollok festését szakképzett patológusnak kell értékelnie. A negatív kontrollokat 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 célsejtek megfelelő festése (amint azt fentebb jeleztük) pozitív reaktivitást jelez. Ha a pozitív szöveti kontrollok nem mutatnak pozitív festést, a vizsgálati minták minden eredményét érvénytelennek kell tekinteni.

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

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

Negatív szövetkontroll:

A negatív szöveti kontrollt a pozitív szöveti kontroll után meg kell vizsgálni, hogy ellenőrizzük a célantigén elsődleges antitest általi jelölésének specifikitását. 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 szórványos festődése is megfigyelhető. Használjon ép sejteket a festési eredmények értelmezéséhez. A nekrotikus vagy degenerált sejtek gyakran nem specifikusan festődnek.

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 reakciók azonosításához.

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. Mert *in vitro* diagnosztikai (IVD) Használata
2. Ez a termék kizárólag professzionális használatra készült: Az immunhisztokémia egy többlépcsős 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, fagyasztás, felolvasztás, 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 inhereus szabálytalanságok.¹⁴
5. A túlzott vagy hiányos ellenfestés veszélyeztetheti az eredmények megfelelő értelmezését.
6. Bármely pozitív vagy negatív festődés klinikai értelmezését a klinikai megjelenés, a morfológia és egyéb kórszöveti 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 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 hőviszanyerési 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 protokollokhoz és használati feltételekhez. Az adatlap ajánlásai és protokolljai a Biocare termékek kizárólagos felhasználásán alapulnak. Végső soron a vizsgáló feladata az optimális feltételek meghatározása.
8. Ezt a terméket nem áramlási citometriában való használatra tervezték. Az áramlási citometria teljesítményjellemzőit nem határozták meg.
9. A hepatitis B vírussal fertőzött és hepatitis B felületi antigént (HBsAg) tartalmazó személyek szövetei torna-peroxidázzal nem specifikus festődést mutathatnak.¹⁴
10. A reagensek váratlan reakciókat mutathatnak korábban nem tesztelt szövetekben. A nem várt reakciók lehetősége még a vizsgált szövetszövetekben sem zárható ki teljesen az antigénexpresszió biológiai variabilitása miatt daganatokban vagy más patológiai szövetekben.¹⁵ 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 antiszérumokkal azonos állati forrásból származó normál/nem immunszérum álnegatív vagy álpozitív eredményeket okozhat az autoantitestek vagy természetes antitestek miatt.
12. A fehérjék vagy szubsztrát reakciótermékek nem immunológiai kötődése miatt álpozitív eredményeket lehet látni. A pseudo-peroxidáz aktivitás

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Hungarian

BIOCARE
M E D I C A L

(eritrociták), az endogén peroxidáz aktivitás (citokrom C) vagy az endogén biotin (például máj, emlő, agy, vese) is okozhatja a használt immunfestés típusától függően.¹³

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 specifikitását számos normál és daganatos szövet típuson értékelték, amelyeket az elsődleges antitestek kialakulása során értékelték.

Reprodukálhatóság:

A Biocare érzékelőrendszereinek és rendszerreagensinek reprodukálhatóságát közepes pontosságú méréssel igazolják, amelyek során különböző reagenstételeket teszteltek hosszabb időn keresztül különböző kezelők, elemzők, reagenstételek, szövetminták és berendezések segítségével. Az egyes kiértékelt kimutatási reagensknél kapott festődés konzisztens volt, és a várt módon történt.

Hibaelhárítás:

1. A tárgylemez nem festődnek – Ellenőrizze, hogy megfelelő pozitív kontrollszövetet, 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 kontrollszövetet, antitestet és kimutatási termékeket használt-e.
3. Az összes tárgylemez túlzott háttér – Magas szintű endogén biotin (biotin alapú kimutatási termékek használata esetén), endogén HRP aktivitás, amely a kromogént színes végtermékké alakítja (használgjon peroxidáz blokkot), vagy túl sok nem specifikus fehérje kölcsönhatás (fehérje használata) blokkoló, például szérum- vagy kazein alapú blokkoló oldat).
4. A szövetmetszetek lemosásuk a tárgylemezeket az inkubáció során – Ellenőrizze a lemezeket, hogy megbizonyosodjon arról, hogy pozitív töltésűek.
5. A specifikus festés túl sötét – Ellenőrizze a protokollt, hogy megállapítsa, megfelelő antitestitert alkalmaztak-e a tárgylemezen, valamint az összes reagens megfelelő inkubációs idejét. Ezenkívül győződjön meg arról, hogy a protokoll elegendő mosási lépést tartalmaz a felesleges reagens 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, Ashcavi 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 Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Italian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Destinazione d'uso:

Per *in vitro* Uso diagnostico

Il kit intelliPATH FLX™ DAB Chromogen è destinato all'uso in protocolli di colorazione immunostochimica (IHC) manuali o automatizzati per il rilevamento di antigeni target in tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) se utilizzato insieme al sistema di rilevamento appropriato e 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 dal marrone chiaro all'arancione. Le proprietà della colorazione non sono influenzate dal colore della miscela tampone cromogena. intelliPATH FLX™ DAB è una formulazione molto stabile. intelliPATH FLX™ DAB è progettato per essere utilizzato su intelliPATH FLX™ coloratore automatizzato.

Principio della procedura:

Questo cromogeno DAB nel kit cromogeno DAB intelliPATH FLX™, se 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'attivazione 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
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Ricostituzione, miscelazione, diluizione, titolazione:

Il kit intelliPATH FLX™ DAB Chromogen è ottimizzato per l'uso con anticorpi Biocare e reagenti ausiliari e deve essere diluito appena prima dell'uso. Miscela in linea: 120 µl di cromogeno DAB per 2000 µl di tampone DAB. Se il cromogeno viene miscelato off-line, utilizzare lo stesso rapporto. La soluzione di lavoro DAB è stabile per 5 giorni. Conservare la soluzione di lavoro DAB a 2-8°C.

Applicazioni conosciute:

Immunostochimica (tessuti inclusi in paraffina fissati in formalina)

Fornito come:

intelliPATH FLX™ DAB cromogeno

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

Buffer DAB intelliPATH FLX™

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
Etanolo o alcool reagente
Camera di disoccultamento* 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. La stabilità del reagente diluito dall'utente 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.

Preparazione del campione:

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.^{1,2}

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."³

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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Italian

BIOCARE
M E D I C A L

HIER prima dell'IHC riduce al minimo l'incoerenza e standardizza la colorazione.⁴⁵

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.⁶⁷
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.⁸
7. La contaminazione microbica 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
	H341 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. Idratare i vetrini in una serie di alcoli graduati in acqua.

2. Blocco del perossido: bloccare per 5 minuti con Peroxidazed 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). 2011⁸

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 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Italian

BIOCARE
M E D I C A L

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 immunostochimica 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[®] per immunostochimica e/o la linea guida NCCLS IHC¹. 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 intelliPATH FLX™ 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.¹²

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 immunostochimico, 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'immunostochimica è un processo diagnostico in più fasi che consiste in una formazione specializzata nella selezione dei reagenti appropriati; selezione, 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.¹⁴
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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Italian

BIOCARE
M E D I C A L

Biocare. In definitiva, è responsabilità del ricercatore determinare le condizioni ottimali.

- Questo prodotto non è destinato all'uso nella citometria a flusso. Le caratteristiche prestazionali non sono state determinate per la citometria a flusso.
- 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.¹⁴
- 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.¹⁵ 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.
- 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.
- 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.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

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 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:

- Nessuna colorazione dei vetrini – Verificare che siano stati utilizzati tessuto di controllo positivo, anticorpi e prodotti di rilevamento adeguati. Verificare la rimozione o il pretrattamento della cera incompleto o improprio.
- Colorazione debole di tutti i vetrini – Controllare per determinare se sono stati utilizzati tessuti di controllo positivo, anticorpi e prodotti di rilevamento adeguati.
- 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).
- Le sezioni di tessuto vengono rimosse dai vetrini durante l'incubazione – Controllare i vetrini per assicurarsi che siano caricati positivamente.
- 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:

- Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
- Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
- Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
- Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
- Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- 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.
- 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.
- 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
- College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
- 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.
- Koretz 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.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. *Lab Med* 1983; 14:767.
- 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.
- Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Korean

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

사용 목적:

을 위한 *시험관 내에서* 진단용

intelliPATH FLX™ DAB 염색체 키트는 적절한 검출 시스템과 함께 사용할 경우 포르말린 고정 파라핀 포매(FPPE) 조직에서 표적 항원을 검출하기 위한 수동 또는 자동 면역조직화학(IHC) 염색 프로토콜에 사용하도록 고안되었습니다. 1차 항체, 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' 디아미노벤지딘(DAB) HRP(양고추냉이 과산화효소) 효소가 있는 경우 유기 용매에 불용성인 갈색 침전물을 생성하고 연구 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 연한 갈색에서 주황색까지 다양할 수 있습니다. 염색 특성은 발색체 완충액 혼합물의 색상에 영향을 받지 않습니다. IntelliPATH FLX™ DAB 는 매우 안정적인 제제입니다. IntelliPATH FLX™ DAB 는 다음에서 사용하도록 설계되었습니다. IntelliPATH FLX™ 자동염색기.

절차 원칙:

intelliPATH FLX™ DAB 염색체 키트의 이 DAB 염색체는 FPPE 조직 섹션의 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 대비염색하고 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
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

재구성, 혼합, 희석, 적정:

intelliPATH FLX™ DAB 염색체 키트는 Biocare 항체 및 보조 시약과 함께 사용하도록 최적화되어 있으며 사용 직전에 희석해야 합니다.

온라인 믹스: DAB 버퍼 2000µL 당 DAB 발색원 120µL. 염색체가 오프라인으로 혼합된 경우 동일한 비율을 사용합니다. DAB 작업 솔루션은 5 일 동안 안정적입니다. DAB 작업 용액을 2~8°C 에 보관하세요.

알려진 응용 프로그램:

면역조직화학(포르말린 고정 파라핀 포매 조직)

다음과 같이 제공됩니다:

intelliPATH FLX™ DAB 발색제

DAB 솔루션. 자세한 내용은 안전 보건 자료를 참조하십시오.

intelliPATH FLX™ DAB 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
- 디클로링 챔버* 또는 이와 유사한 압력술(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)

* 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°C 에서 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. 사용자 희석 시약의 안정성은 Biocare 에 의해 확립되지 않았습니다.

 Biocare Medical
60 Berry Drive
Pacheco, CA 94553
USA

63/111



TP v1 (03/30/2022)

 EMERGO EUROPE
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Korean

BIOCARE
M E D I C A L

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 1-800-542-2002 로 전화하거나 biocare.net 에서 제공하는 기술 지원 정보를 통해 Biocare 기술 지원에 문의하십시오.

표본 준비:

포르말린으로 고정된 조직 파라핀 포매 전에 사용하기에 적합합니다. 골조직은 조직 절단을 용이하게 하고 마이크로톰 블레이드의 손상을 방지하기 위해 조직 처리 전에 석회질을 제거해야 합니다.¹²

특정 항원 표적을 발현하는 적절하게 고정되고 매립된 조직은 서늘한 곳에 보관해야 합니다. 1988 년 임상검사실 개선법(CLIA)에서는 42 CFR 을 요구합니다.§493.1259(b) "실험실은 염색된 슬라이드를 날짜로부터 최소 10 년 동안 보관해야 합니다. 검사를 실시하고 검사일로부터 최소 2 년 동안 표본 블록을 보관해야 합니다."⁴⁸

염색 전 조직 처리:

아래 권장 프로토콜에 따라 열 유도 항원결정부 검색(HIER)을 수행하십시오. IHC 이전에 HIER 을 일상적으로 사용하면 불일치를 최소화하고 염색을 표준화하는 것으로 나타났습니다.⁴⁵

경고 및 주의 사항:

1. DAB 는 발암물질로 의심되는 물질로 알려져 있습니다.
2. DAB 컴포넌트를 강한 빛이나 직사광선에 노출시키지 마십시오.
3. DAB 는 피부 민감성을 유발할 수 있습니다. 피부와 눈에 닿지 않도록 하세요.
4. DAB 는 위험물질로 분류되어 암을 유발할 수 있고 유전적 결함을 일으킬 것으로 의심되므로 장갑과 보호복을 착용하고 취급 시 합당한 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.⁶⁷
6. 고정 전후의 검체와 이에 노출된 모든 물질은 감염을 전파할 수 있는 것처럼 취급하고 적절한 예방 조치에 따라 폐기해야 합니다. 절대로 시약을 입으로 피펫팅하지 말고 시약 및 검체가 피부와 점막에 닿지 않도록 하십시오. 시약이나 검체가 민감한 부위에 닿은 경우 다량의 물로 씻어내십시오.⁸
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 1 차 항체 및 기타 보조 시약 사용 지침을 참조하세요.
11. 폐기 방법은 지역 및/또는 주 당국의 요구 사항을 따르십시오.
12. SDS 는 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 1272/2008 에 따라 아래 표에 표시된 대로 분류된 구성 요소가 포함되어 있습니다.

위험	암호	위험 설명
	H341 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 1 차 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 1 로 5 분간 블록합니다.
3. 전처리 용액/프로토콜: 권장되는 전처리 용액 및 프로토콜은 해당 1 차 항체 데이터 시트를 참조하십시오.
4. 단백질 차단(선택 사항): Background Punisher 를 사용하여 실온(RT)에서 5~10 분 동안 배양합니다.
5. 1 차 항체: 배양 시간은 해당 1 차 항체 데이터 시트를 참조하세요.
6. 프로브(마우스 항체만 해당): MACH 4 마우스 프로브를 사용하여 실온에서 5~15 분 동안 배양합니다.
7. 폴리머: MACH 4 HRP 폴리머를 사용하여 RT 에서 마우스 항체의 경우 10~20 분 동안, 토끼 항체의 경우 30 분 동안 배양합니다.
8. 발색체: Biocare 의 DAB 를 사용하여 RT 에서 5 분간 배양합니다.
9. 대조염색: 헤마톡실린을 이용한 대조염색. 탈이온수로 행급니다. 타차 블루잉 솔루션을 1 분간 도포합니다. 탈이온수로 행급니다.

기술 노트:

1. 세척 단계에는 TBS 를 사용합니다.

품질 관리:

면역조직화학 분석의 설계 및 구현에 대한 CLSI 품질 표준을 참조하십시오. 승인된 지침-제 2 판(I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA(www.clsi.org). 2011 년⁹

양성 조직 대조:

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Korean

BIOCARE
M E D I C A L

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 검체의 특정 진단을 공식화하는 데 도움이 되기보다는 처리된 조직 및 테스트 시약의 올바른 성능을 모니터링하는 데에만 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 나와되어 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.¹⁰ 면역조직화학 및/또는 NCCLS IHC 지침¹¹. 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. 비정상 결과가 발생하면 1-800-542-2002 번으로 Biocare 기술 지원부에 문의하십시오.

염색의 해석:

intelliPATH FLX™ 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.¹²

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.

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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Korean

BIOCARE
M E D I C A L

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

제한사항:

일반 제한사항:

1. 을 위한 *시험관 내에서* 진단(IVD) 용도
2. 이 제품은 전문가용입니다. 면역조직화학은 적절한 시약 선택에 대한 전문 교육으로 구성된 다단계 진단 과정입니다. 조직 선택, 고정 및 처리; IHC 슬라이드 준비; 염색 결과의 해석.
3. 의사의 처방에 의해서만 사용하십시오. (수신 전용)
4. 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.¹⁴
5. 과도하거나 불완전한 대조염색은 결과의 올바른 해석을 손상시킬 수 있습니다.
6. 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.
7. 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 참조하십시오. 데이터 시트 권장 사항 및 프로토콜은 Biocare 제품의 독점적인 사용을 기반으로 합니다. 궁극적으로 최적의 조건을 결정하는 것은 조사자의 책임입니다.
8. 이 제품은 유세포 분석에 사용하기 위한 것이 아닙니다. 유세포분석에 대한 성능 특성은 결정되지 않았습니다.
9. B형 간염 바이러스에 감염되고 B형 간염 표면 항원(HBsAg)을 함유한 사람의 조직은 양 고추 냉이 퍼옥시다제에 의한 비특이적 염색을 나타낼 수 있습니다.¹⁴
10. 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.¹⁵ 예상치 못한 반응이 기록되어 있으면 1-800-542-2002 번으로 전화하거나 biocare.net 에서 제공하는 기술 지원 정보를 통해 Biocare 기술 지원부에 문의하십시오.
11. 차단 단계에 사용되는 2 차 항혈청과 동일한 동물 유래의 정상/비면역 혈청은 자가항체나 천연항체로 인해 위음성 또는 위양성 결과를 초래할 수 있습니다.

12. 단백질이나 기질 반응 생성물의 비면역학적 결합으로 인해 위양성 결과가 나타날 수 있습니다. 또한 사용된 면역염색제의 유형에 따라 가스 과산화효소 활성(적혈구), 내인성 과산화효소 활성(시토크롬 C) 또는 내인성 비오틴(예: 간, 유방, 뇌, 신장)으로 인해 발생할 수도 있습니다.¹³
13. 음성 결과는 항원이 검출되지 않았음을 의미하며, 검사된 세포나 조직에 항원이 없다는 의미는 아닙니다.

제품별 제한 사항:

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:

바이오캐어의 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.

문제 해결:

1. 슬라이드에 염색이 되지 않음 - 적절한 양성 대조 조직, 항체 및 검출 제품이 사용되었는지 확인하십시오. 불완전하거나 부적절한 왁스 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 색상이 슬라이드를 씻어냅니다. 슬라이드가 양전하를 띠고 있는지 확인하십시오.
5. 특정 염색이 너무 어둡음 - 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 Histochemistry*. 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 Histochemol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
5. Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Korean

BIOCARE
M E D I C A L

- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- 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.
- 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.
- 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
- College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
- 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.
- 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.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
- 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.
- Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Latvian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Paredzētais lietojums:

Priekš*in vitro* Diagnostikas lietošana

IntelliPATH FLX™ DAB hromogēna komplekts ir paredzēts lietošanai manuālās vai automatizētās imūnhistokīmiskās (IHC) krāsošanas protokolos mērķa antigēnu noteikšanai formalinā fiksētos, parafinā iestrādātos (FFPE) audos, ja to lieto kopā ar atbilstošu noteikšanas sistēmu un primārās antivielas. Jebkuras iekrāsošanās vai tās neesamības klīniskā interpretācija ir jāpapildina ar morfoloģiskiem pētījumiem un atbilstošām kontrolēm, un tā jānovērtē pacienta klīniskās vēstures un citu diagnostisko testu kontekstā, ko veic kvalificēts patologs.

Kopsavilkums un skaidrojums:

3, 3' diaminobenzidīns (DAB) ir vispārēts hromogēns, ko izmanto IHC krāsošanas protokolos, kas mērruktu peroksidāzes (HRP) enzīma klātbūtnē rada brūnas nogulsnes, kas nešķīst organiskajos šķīdinātājos un kuras var pārklāt ar pastāvīgu montāžas materiālu. Šis produkts ir pieejams divkomponentu sistēmā, kas sastāv no šķīdumā stabila DAB hromogēna un DAB substrāta buferšķīduma. Hromogēna bufera maisījuma krāsa var atšķirties no gaiši brūnas līdz oranžai. Krāsošanas īpašības neietekmē hromogēna bufera maisījuma krāsa.intelliPATH FLX™DAB ir ļoti stabils sastāvs.intelliPATH FLX™DAB ir paredzēts lietošanai uzintelliPATH FLX™automatizēts krāsotājs.

Procedūras princips:

Šis DAB hromogēns intelliPATH FLX™ DAB hromogēna komplektā, ja to izmanto FFPE audu sekciju IHC testēšanā, ļauj vizualizēt antigēnus, secīgi pielietojot specifisku antivielu pret antigēnu (primārā antivielu), sekundārā antivielu pret primāro antivielu (neobligāta saite antivielu/zonde), enzīmu komplekss un hromogēns substrāts ar starplikām mazgāšanas soļiem. Hromogēna fermentatīvā aktivizēšana rada redzamu reakcijas produktu antigēna vietā. Pēc tam paraugu var iekrāsot un pārklāt ar vāku. Rezultāti tiek interpretēti, izmantojot gaismu mikroskopu un palīgīdzekli patofizioloģisko procesu diferenciāldiagnozē, kas var vai var nebūt saistīts ar noteiktu antigēnu.

Materiāli un metodes:

Piedāvātie reaģenti:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Atšķaidīšana, sajaukšana, atšķaidīšana, titrēšana:

IntelliPATH FLX™ DAB hromogēna komplekts ir optimizēts lietošanai ar Biocare antivielām un palīgreaģentiem, un tas ir jāatšķaida tieši pirms lietošanas.

Tiešsaistes maisījums: 120 µL DAB hromogēna uz 2000 µL DAB buferšķīduma. Ja hromogēns tiek sajaukts bezsaistē, izmantojiet to pašu attiecību. DAB darba risinājums ir stabils 5 dienas. Uzglabājiet DAB darba šķīdumu 2-8°C temperatūrā.

Zināmās lietojumprogrammas:

Imūnhistokīmija (formalinā fiksēti parafinā iestrādāti audi)

Piegādāts kā:

intelliPATH FLX™ DAB hromogēns

DAB risinājums. Papildinformāciju skatiet drošības datu lapā.

intelliPATH FLX™ DAB buferis

Buferšķīdums satur 3% ūdeņraža peroksīda šķīdumu. Papildinformāciju skatiet drošības datu lapā.

Nepieciešamie materiāli un reaģenti, kas nav nodrošināti:

Mikroskopa priekšmetstikliņi, pozitīvi uzlādēti
Pozitīvās un negatīvās audu kontroles
Desert Chamber* vai līdzīga žāvēšanas krāsns (pēc izvēles)
Ksilols vai ksilola aizstājējs
Etanols vai reaģenta spirts
Atslāņošanas kamera* vai līdzīga spiediena katls (pēc izvēles)
Dejonizēts vai destilēts ūdens
Mazgāšanas buferis*
Priekšapstrādes reaģenti* (pēc izvēles)
Fermentu gremošana* (pēc izvēles)
peroksidāzes blokāde*
Olbaltumvielu bloks* (pēc izvēles)
Primārā antivielu*
Negatīvie kontroles reaģenti*
Atklāšanas komplekti*
Hematoksilīns* (pretkrāsa)
Bluing reaģents*
Montāžas līdzeklis*
Vāka stikls
Gaisma 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 etiķetes. Nelietot pēc derīguma termiņa beigām. Uzglabāšana citos apstākļos, izņemot norādītos, ir jāpārbauda. Atšķaidītie reaģenti jāizlieto nekavējoties, kā norādīts. Biocare nav noteikusi lietotāja atšķaidītā reaģenta stabilitāti.

Pozitīvās un negatīvās 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 sniegta vietnē biocare.net.

Parauga sagatavošana:

Formalinā fiksēti audi ir piemēroti lietošanai pirms parafinā iestrādāšanas. Kauļu audi pirms audu apstrādes ir jāatkaļķo, lai atvieglotu audu griešanu un novērstu mikrotomu asmeņu bojājumus.^{1,2}

Pareizi fiksēti un iestrādāti audi, kas ekspresē norādīto antigēna mērķi, jāuzglabā vēsā vietā. 1988. gada Klīniskās laboratorijas uzlabošanas likums (CLIA) pieprasa 42 CFR.§493.1259(b), ka "Laboratorijai ir jāsaņem iekrāsotie priekšmetstikliņi vismaz desmit gadus no datuma, kad pārbaudi un saglabā paraugu blokus vismaz divus gadus no pārbaudes datuma."³

Audu apstrāde pirms krāsošanas:

Veiciet siltuma izraisītu epitopu izgušanu (HIER) saskaņā ar tālāk ieteikto protokolu. Ir pierādīts, ka regulāra HIER lietošana pirms IHC samazina nekoncekvenci un standartizē krāsošanu.^{4,5}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Latvian

BIOCARE
M E D I C A L

Bīdinājumi 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. Valkājiet cimdus un aizsargtērpu 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 atbrīvojieties no šādiem materiāliem, ievērojot atbilstošus piesardzības pasākumus. Iedarbības gadījumā ievērojiet atbilstīgo iestāžu norādījumus par veselību, ja tas tiek lietots.^{6,7}
6. Paraugi pirms un pēc fiksācijas un visi tiem pakļautie materiāli ir jārikojas tā, it kā tie varētu pārnēsāt infekciju, un tie jāiznīcina, ievērojot atbilstošus piesardzības pasākumus. Nekad nepieejiet reaģentus iekšīgi un izvairieties no saskares ar ādu un gļotādām ar reaģentiem un paraugiem. Ja reaģenti vai paraugi nonāk saskarē ar jutīgām zonām, nomazgājiet ar lielu ūdens daudzumu.⁸
7. Reaģentu piesārņojums ar mikrobiem var izraisīt nespecifiskas iekrāsošanās palielināšanos.
8. Inkubācijas laiki vai temperatūra, kas nav norādīta, var sniegt kļūdainus rezultātus. Lietotājam ir jāapstiprina visas šādas izmaiņas.
9. Nelietot reaģentu pēc derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz flakona.
10. Mikropolimēru noteikšanas komplekta reaģents (-i) ir optimizēti un gatavi lietošanai ar Biocare antivielām 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. Ziņojiet par visiem nopietniem incidentiem, kas saistīti ar šo ierīci, sazinoties ar vietējo Biocare pārstāvi un attiecīgās dalībvalsts vai valsts, kurā atrodas lietotājs, kompetento iestādi.

Šis hromogēna komplekts satur sastāvdaļas, kas klasificētas, kā norādīts tālāk esošajā tabulā saskaņā ar Regulu (EK) Nr. 1272/2008

Apdraudējums	Kods	Bīstamības paziņojums
	H341 H350	Ir aizdomas, ka var izraisīt ģenētiskus defektus Var izraisīt vēzi

Lietošanas instrukcija:

Hrogēna komplekta reaģenti ir optimizēti lietošanai ar Biocare antivielām un palīgreaģentiem. Ieteiktos lietošanas protokolus un nosacījumus skatiet primāro antivielu un citu palīgreaģentu lietošanas instrukcijās. Inkubācijas laiki un temperatūras mainīsies 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. Deparafinizācija: deparafinējiet priekšmetstiklīņus Slide Brite vai ksilolā. Hidrējiet priekšmetstiklīņus vairākos šķīrotos spirtos līdz ūdenim.
2. Peroksīda bloks: 5 minūtes bloķējiet ar peroksīdētu 1.
3. Priekšapstrādes šķīdums/protokols: lūdzu, skatiet attiecīgo primāro antivielu datu lapu, lai uzzinātu ieteicamo pirmapstrādes šķīdumu un protokolu.
4. Proteīna bloks (pēc izvēles): inkubējiet 5–10 minūtes istabas temperatūrā (RT) ar Background Punisher.

5. Primārā antivielā: 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. Uzklājiet Tacha's Bluing Solution 1 minūti. Noskalo ar dejonizētu ūdeni.

Tehniskas piezīmes:

1. Mazgāšanas soļiem izmantojiet TBS.

Kvalitātes kontrole:

Skatiet CLSI kvalitātes standartus imūnhistoķīmijas testu izstrādei un ieviešanai; Apstiprināts vadlīniju otrais izdevums (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011. gads⁹

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 pozitivitātes 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 priekšmetstiklīņi vai paraugi, kas apstrādāti atšķirīgi no pacienta parauga(-iem), apstiprina tikai reaģenta darbību un nepārbauda audu sagatavošanu.

Zināmas pozitīvās audu kontroles ir jāizmanto tikai apstrādāto audu testa reaģentu pareizas darbības uzraudzībai, nevis kā palīgizvēles konkrētas pacienta paraugu diagnozes formulēšanā. Ja pozitīvās audu kontroles neizdodas uzrādīt pozitīvu iekrāsošanos, testa paraugu rezultāti jāuzskata par nederīgiem.

Negatīva 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 dažādība, kas atrodas lielākajā daļā audu sekciju, var Laboratorijā izmantos kā iekšējās negatīvās kontroles vietas, lai pārbaudītu IHC darbību specifiskācijai. Paraugu veidi un avoti, ko var izmantot negatīviem audiem vadīklas ir uzskaitītas sadaļā Veikspējas raksturlielumi.

Ja negatīvajā audu kontrolē notiek specifiska iekrāsošanās (viltus pozitīva iekrāsošanās), pacienta paraugu rezultāti jāuzskata par nederīgiem.

Nespecifiskā negatīvā reaģenta kontrole:

Primārās antivielas vietā izmantojiet nespecifisku negatīvu reaģenta kontroli ar katra pacienta parauga daļu, lai novērtētu nespecifisko krāsošanos un ļauj labāk interpretēt specifisko krāsojumu antigēna vietā. Ideālā gadījumā negatīvā reaģenta kontrole satur antivielu, kas ražota no sagatavota (t.i., atšķaidīta līdz tādai pašai koncentrācijai, izmantojot to pašu šķīdinātāju) lietošanai tādā pašā veidā kā primārā antivielā, bet tai nav specifiskas reaktivitātes ar cilvēka audiem tajā pašā matricā/šķīdumā kā primārā antivielā. Atšķaidītāju vienu pašu var izmantot kā mazāk vēlamu alternatīvu iepriekš aprakstītajām negatīvajām reaģentu kontrolēm. Negatīvā reaģenta kontroles inkubācijas periodam jāatbilst primārās antivielas inkubācijas periodam.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Latvian

BIOCARE
M E D I C A L

Ja sērījveida sekcijās tiek izmantoti vairāku antivielu paneli, viena priekšmetstikliņa negatīvi iekrāsotie apgabali var kalpot kā negatīva/neprecīza saistīšanās fona kontrole citām antivielām. Lai atšķirtu endogēno enzīmu aktivitāti vai nespecifisku enzīmu saistīšanos no specifiskās imūnreaktivitātes, papildu pacienta audus var iekrāsot tikai ar substrāta-hromogēnu vai enzīmu kompleksiem (PAP, avidīns-biotīns, streptavidīns) 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 imūnhistoķīmiskās veikspējas raksturlielumiem, kas atspoguļo zināmus pozitīvus un negatīvus audus. Skatiet kvalitātes kontroles procedūras, kas iepriekš aprakstītas šajā produkta ievietošanas sadaļā, un KLP sertifikācijas programmas kvalitātes kontroles ieteikumus.¹⁰ Imūnhistoķīmijai un/vai NCCLS IHC vadlīnijām.¹¹ Šīs kvalitātes kontroles procedūras jāatkārto katrai jaunai antivielu partijai vai ikreiz, kad notiek izmaiņas testa parametriem. 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:

IntelliPATH FLX™ DAB hromogēna komplekts rada brūnas krāsas reakciju antigēna vietās, ko lokalizē primārā antivielā. Pirms pacienta rezultātu interpretācijas kvalificētam patoloģam ir jānovērtē kontroles iekrāsošanās. Negatīvās kontroles tiek novērtētas un salīdzinātas ar iekrāsotajiem priekšmetstikliņiem, 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 reaģenti 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. Turklāt metahromāziju var novērot krāsošanas metodes variācijās.¹²

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 marķēšanas specifiku. Specifiskas iekrāsošanās trūkums negatīvajā audu kontrolē apstiprina antivielu krusteniskās reaktivitātes trūkumu pret šūnām/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 sekcijās no pārmērīgi formalīna fiksētiem audiem. Krāsošanas rezultātu interpretācijai izmantojiet neskartas šūnas. Nekrotiskas vai deģenerētas šūnas bieži krāsojas nespecifiski.

Pacienta audi:

Pārbaudiet pacientu paraugus, kas iekrāsoti ar norādītajām antivielām Pēdējais. Pozitīvā krāsošanas intensitāte jānovērtē saistībā ar jebkuru nespecifisku negatīvā reaģenta kontroles fona krāsojumu. Tāpat kā ar jebkuru imūnhistoķīmisko 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 *in vitro* diagnostikas (IVD) lietošana
2. Šis produkts ir paredzēts tikai profesionālai lietošanai: Imūnhistoķīmija ir daudzpakāpju diagnostikas process, kas sastāv no specializētas apmācības atbilstošu reaģentu izvēlē; audu atlase, fiksācija un apstrāde; IHC priekšmetstikliņa sagatavošana; un krāsošanas rezultātu interpretācija.
3. Lietošanai tikai pēc ārsta receptes. (tikai Rx)
4. Adu krāsošana ir atkarīga no audu apstrādes un apstrādes pirms krāsošanas. Nepareiza fiksācija, sasaldēšana, atkausēšana, mazgāšana, žāvēšana, karsēšana, sadalīšana vai piesārņošana ar citiem audiem vai šķīdumiem var radīt artefaktus, antivielu slazdošanu vai viltus negatīvus rezultātus. Nekonsekventi rezultāti var būt fiksācijas un iegulšanas metožu atšķirību dēļ vai audos raksturīgu nelīdzenumu dēļ.¹⁴
5. Pārmērīga vai nepilnīga pretkrāsošana var apdraudēt pareizu rezultātu interpretāciju.
6. Jebkuras pozitīvas vai negatīvas iekrāsošanās klīniskā interpretācija jānovērtē klīniskā attēla, morfoloģijas un citu histopatoloģisku kritēriju kontekstā. Jebkuras pozitīvas vai negatīvas iekrāsošanās klīniskā interpretācija jāpapildina ar morfoloģiskiem pētījumiem, izmantojot atbilstošus pozitīvos un negatīvos iekšējos kontroles testus, kā arī citus diagnostikas testus. Kvalificēts patoloģis, kurš ir iepazinies ar pareizu IHC antivielu, reaģentu un metožu lietošanu, ir atbildīgs, lai interpretētu visas darbības, kas izmantotas, lai sagatavotu un interpretētu galīgo IHC preparātu.
7. Optimālie protokoli konkrētai lietojumprogrammai var atšķirties. Tie ietver (bet ne tikai) fiksāciju, siltuma iegūšanas metodi, inkubācijas laikus, antivielu atšķaidīšanu, audu sekcijas biežumu un izmantoto noteikšanas komplektu. Ieteiktos lietošanas protokolus un nosacījumus skatiet primāro antivielu un citu palīgreaģentu lietošanas instrukcijās. Datu lapas ieteikumi ir 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 vīrusa antigēnu (HBsAg), var būt nespecifiska iekrāsošanās ar mārutku peroksīdāzi.¹⁴
10. Reaģenti var parādīt negaidītas reakcijas iepriekš nepārbaudītos audos. Negaidītu reakciju iespējamību pat pārbaudītajās audu grupās nevar pilnībā novērst antigēnu ekspresijas bioloģiskās variabilitātes dēļ jaunveidojumos vai citos patoloģiskos audos.¹⁵ Saasinieties ar Biocare tehnisko atbalstu pa tālruni 1-800-542-2002 vai izmantojot tehniskā atbalsta informāciju, kas sniegta vietnē biocare.net, norādot dokumentētu neparedzētu reakciju.
11. Normāli/neimūnie serumi no tā paša dzīvnieku izcelsmes avota kā sekundārie antiserumi, ko izmanto bloķēšanas posmos, var izraisīt kļūdaini negatīvus vai kļūdaini pozitīvus rezultātus autoantivielu vai dabisko antivielu dēļ.
12. Kļūdaini pozitīvus rezultātus var redzēt proteīnu vai substrāta reakcijas produktu neimunoloģiskas saistīšanās dēļ. Tos var izraisīt arī pseidoperoksīdāzes aktivitāte (eritrocīti), endogēna peroksīdāzes aktivitāte (citohroms C) vai endogēns biotīns (piemēram, aknas, krūts, smadzenes, nieres) atkarībā no izmantotā imūnkrāsojuma veida.¹³
13. Negatīvs rezultāts nozīmē, ka antigēns netika atklāts, nevis to, ka pārbaudītajās šūnās vai audos antigēna nebija.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Latvian

BIOCARE
M E D I C A L

Produkta specifiskie ierobežojumi:

Nav papildu produktu specifisku ierobežojumu

Veiktspējas 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 reaģentu reproducējamība tiek pārbaudīta, veicot vidējas precizitātes mērījumu, kurā dažādas reaģentu partijas tika pārbaudītas ilgākā laika periodā, izmantojot dažādus operatorus, analītiskus, reaģentu partijas, audu paraugus un aprīkojumu. Katram novērtētajam noteikšanas reaģentam iegūtā krāsošana bija konsekventa un tika veikta, kā paredzēts.

Problēmu novēršana:

1. Priekšmetstikliņi nav iekrāsoti – pārbaudiet, lai noteiktu, vai ir izmantoti atbilstoši pozitīvās kontroles audi, antivielas un noteikšanas produkti. Pārbaudiet, vai vaska noņemšana vai pirmapstrāde nav veikta pilnībā vai nepareizi.
2. Vāja visu priekšmetstikliņu krāsošana – pārbaudiet, lai noteiktu, vai ir izmantoti atbilstoši pozitīvās kontroles audi, antivielas un noteikšanas produkti.
3. Pārmērīgs visu priekšmetstikliņu fons — var būt augsts endogēnā biotīna līmenis (ja izmanto noteikšanas produktus uz biotīna bāzes), endogēna HRP aktivitāte, kas pārvērš hromogēnu krāsainā galaproduktā (izmantojiet peroksīdāzes bloku) vai pārmērīga nespecifiskā proteīna mijiedarbība (izmantojiet proteīnu). blokādi, piemēram, blokējošs šķīdums uz seruma vai kazeīna bāzes).
4. Adu sekcijas nomazgā priekšmetstikliņu inkubācijas laikā – pārbaudiet priekšmetstikliņus, lai pārliecinātos, ka tie ir pozitīvi uzlādēti.
5. Īpaša krāsošanās ir pārāk tumša – pārbaudiet protokolu, lai noteiktu, vai priekšmetstikliņiem ir piemērots pareizs antivielu titrs, kā arī pareizu visu reaģentu inkubācijas laiku. Turklāt pārliecinieties, ka protokolā ir pietiekami daudz mazgāšanas soļu, lai pēc inkubācijas darbību pabeigšanas noņemtu liekos reaģentus.

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). 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Lithuanian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Paskirtis:

Dėl *in vitro* Diagnostinis naudojimas

IntelliPATH FLX™ DAB chromogenų rinkinys skirtas naudoti rankinio arba automatinio imunohistocheminio (IHC) dažymo protokoluose, skirtuose tiksliniams antigenams aptikti formalinu fiksuotuose, į parafiną įterptuose (FFPE) audiniuose, kai naudojamas kartu su atitinkama aptikimo sistema ir pirminiai antikūnai. Klinikinį bet kokio dažymo ar jo nebuvimo aiškinimą turėtų papildyti morfologiniai tyrimai ir tinkama kontrolė, o kvalifikuotas patologas turi įvertinti paciento klinikinę istoriją ir kitus diagnostinius tyrimus.

Saundraukia ir paaiškinimas:

3, 3' diaminobenzidinas (DAB) yra gerai žinomas chromogenas, naudojamas IHC dažymo protokoluose, kuris, esant krienų peroksidazės (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 šviesiai rudos iki oranžinės. Chromogeno buferio mišinio spalva neturi įtakos dažymo savybėms. IntelliPATH FLX™ DAB yra labai stabili formulė. IntelliPATH FLX™ DAB skirtas naudoti IntelliPATH FLX™ automatizuotam dažikliui.

Procedūros principas:

Šis DAB chromogenas, esantis IntelliPATH FLX™ DAB chromogenų rinkinyje, naudojamas atliekant FFPE audinių sekcijų IHC tyrimus, leidžia vizualizuoti antigenus nuosekliai naudojant specifinius antikūnus prieš antigeną (pirminis antikūnas), antrinis antikūnas prieš pirminį 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:

Pateikiami reagentai:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Atskiedimas, maišymas, skiedimas, titravimas:

IntelliPATH FLX™ DAB chromogenų rinkinys yra optimizuotas naudoti su Biocare antikūnais ir pagalbiniais reagentais ir turi būti atskiestas prieš pat naudojimą.

Tiesioginis mišinys: 120 µL DAB chromogeno 2000 µL DAB buferio. Jei chromogenas maišomas neprisijungus, naudokite tą patį santykį. DAB darbinis sprendimas yra stabilus 5 dienas. DAB darbinį tirpalą laikykite 2–8°C temperatūroje.

Žinomos programos:

Imunohistochemija (formalinu fiksuoti audiniai, įterpti į parafiną)

Tiekama kaip:

intelliPATH FLX™ DAB chromogenas

DAB sprendimas. Daugiau informacijos rasite saugos duomenų lape.

intelliPATH FLX™ DAB buferis

Buferiniame tirpale yra 3% vandenilio peroksido tirpalo. Daugiau informacijos rasite saugos duomenų lape.

Reikalingos, bet nepateiktos medžiagos ir reagentai:

Mikroskopo stikleliai, teigiamai įkrauti
Teigiama ir neigiama audinių kontrolė
Desert Chamber* arba panaši džiovimo 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)
peroksidazės blokada*
Baltymų 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 kitomis sąlygomis nei nurodytos. Praskiesti reagentai turi būti naudojami nedelsiant, kaip nurodyta. Biocare nenustatė vartotojo praskiesto reagento stabilumo.

Teigiamas ir neigiamas kontrolė turi būti atliekama vienu metu su visais paciento mėginiais. Jei pastebimas netikėtas dažymas, kurio negalima paaiškinti 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:

Audiniai fiksuoti formalinu tinka naudoti prieš įterpiant į parafiną. Kauliniai audiniai turi būti nukalkinti prieš audinių apdorojimą, kad būtų lengviau nupjauti audinį ir nepažeisti mikrotomo ašmenų.^{1,2}

Tinkamai fiksuoti ir įterpti audiniai, išreiškiantys nurodytą antigeno taikinį, turi būti laikomi vėsioje vietoje. 1988 m. Klinikinių laboratorijų tobulinimo įstatymas (CLIA) reikalauja 42 CFR§493.1259(b), kad „Laboratorija turi saugoti beicuotus stiklelius mažiausiai dešimt metų nuo iširti ir saugoti mėginių blokus mažiausiai dvejus metus nuo tyrimo datos.“³

Audinių gydymas prieš dažymą:

Atlikite šilumos sukeltą epitopų paiešką (HIER) pagal toliau pateiktą rekomenduojamą protokolą. Įrodyta, kad įprastas HIER naudojimas prieš IHC sumažina nenuoseklumą ir standartizuoja dažymą.^{4,5}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Lithuanian

BIOCARE
M E D I C A L

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 pagrįstą atsargumo priemonių tvarkydami, nes DAB yra klasifikuojama kaip pavojinga ir gali sukelti vėžį bei, kaip įtariama, sukelia genetinius defektus.
5. Žmonių arba gyvūninės kilmės medžiagas tvarkykite kaip potencialiai biologiškai pavojingas ir šalinkite tokias medžiagas laikydamiesi tinkamų atsargumo priemonių. Poveikio atveju laikykitės atsakingų institucijų, kuriose naudojamas, sveikatos nurodymų.^{6,7}
6. Mėginiai prieš ir po fiksavimo bei visos su jais paveiktos medžiagos turi būti tvarkomos taip, lyg galėtų perduoti infekciją, ir sunaikintos laikantis tinkamų atsargumo priemonių. Niekada nepilkite reagentų pipete per burną ir venkite reagentų bei mėginių sąlyčio su oda ir gleivinėmis. Jei reagentai ar mėginiai pateko į jautrias vietas, nuplaukite dideliu kiekiu vandens.⁸
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 tinkamumo laikui, nurodytam ant buteliuko.
10. Mikropolimero aptikimo rinkinio reagentas (-ai) yra optimizuotas (-i) ir paruoštas naudoti su Biocare antikūnais ir pagalbiniais reagentais. Rekomenduojamas protokolus ir naudojimo sąlygas žr. pirminio antikūno ir kitų pagalbinių reagentų naudojimo instrukcijose.
11. Laikykitės 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 pavojų
	H341 H350	Įtariama, kad sukelia genetinius defektus Gali sukelti vėžį

Naudojimo instrukcijos:

Chromogeno rinkinio reagentai yra optimizuoti naudoti su Biocare antikūnais ir pagalbiniais reagentais. Rekomenduojamas protokolus ir naudojimo sąlygas žr. pirminio antikūno ir kitų pagalbinių 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 procedūriniai veiksmai:

1. Deparafinizavimas: deparafinuokite stiklelius „Slide Brite“ arba ksilenu. Hidratuokite stiklelius rūšiuotą alkoholių serijoje iki vandens.
2. Peroksido blokas: blokuokite 5 minutes peroksiduotu 1.
3. Pirminio apdorojimo tirpalas/protokolas: rekomenduojamą pirminio apdorojimo tirpalą ir protokolą rasite atitinkamame pirminio antikūno duomenų lape.
4. Baltymų 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 triušų 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 tirpalo. Nuplaukite dejonizuotu vandeniu.

Techninės pastabos:

1. Skalavimo 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). 2011 m⁹

Teigiama audinių kontrolė:

Išorinės teigiamos kontrolės medžiagos turi būti kuo greičiau užfiksuoti, apdoroti ir įterpti švieži mėginiai tokiu pat būdu kaip ir paciento mėginys (-iai). Teigiamas audinių kontrolė rodo tinkamai paruoštus audinius ir tinkamus dažymo būdus. Į kiekvieną dažymo eigą turėtų būti įtraukta viena teigiama išorinio audinio kontrolė kiekvienam tyrimo sąlygų rinkiniui.

Audiniai, naudojami išorinėms teigiamoms kontrolinėms medžiagoms, turėtų būti parenkami iš pacientų mėginių, kurių teigiamas tikslinis aktyvumas yra žemas, o tai suteikia silpną teigiamą dažymą. Žemas teigiamumo lygis išorinėms teigiamoms kontrolėms yra sukurtas taip, kad būtų galima aptikti subtilius pirminio antikūno jautrumo pokyčius dėl nestabilumo ar problemų, susijusių su IHC metodika. Paroduodamos audinių kontrolinės skaidrės arba mėginiai, apdoroti kitaip nei paciento mėginys (-iai), patvirtina tik reagento veikimą ir netikrina audinių paruošimo.

Žinomos teigiamos audinių kontrolės priemonės turėtų būti naudojamos tik norint stebėti tinkamą apdorotų audinių ir tiriamųjų reagentų veikimą, o ne kaip pagalbinė priemonė nustatant konkrečią paciento mėginių diagnozę. Jei teigiamų audinių kontroliniai mėginiai neparodo teigiamo dažymosi, bandinių rezultatai turėtų būti laikomi negaliojančiais.

Neigiamų audinių kontrolė:

Kiekvieną dažymo ciklą naudokite neigiamą audinių kontrolę, fiksuotą, apdorotą ir įterptą identiška paciento mėginiui (-iams), kad patikrintumėte IHC pirminio antikūno specifiškumą, tikslinio antigeno demonstravimas ir specifinio fono dažymo požymis (klaidingai teigiamas dažymas). Be to, daugumoje audinių sekcijų gali būti įvairių tipų ląstelių Laboratorijos gali naudoti kaip vidines neigiamos kontrolės vietas, kad patikrintų IHC veikimą specifikacijas. Mėginių, kurie gali būti naudojami neigiamiems audiniams, tipai ir šaltiniai valdikliai išvardyti skyriuje Veikimo charakteristikos.

Jei neigiamų audinių kontrolėje atsiranda specifinis dažymas (klaidingai teigiamas dažymas), paciento mėginių rezultatai turėtų būti laikomi negaliojančiais.

Nespecifinė neigiamo reagento kontrolė:

Vietoj pirminio antikūno naudokite nespecifinio neigiamo reagento kontrolę su kiekvieno paciento mėginio dalimi, kad įvertintumėte nespecifinį dažymąsi ir leidžia geriau interpretuoti specifinį dažymąsi 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 pirminis antikūnas, bet neturi specifinio reaktyvumo su žmogaus audiniais toje pačioje matricoje / tirpale kaip ir pirminis antikūnas. Vien tik skiediklis gali būti naudojamas kaip mažiau pageidautina anksčiau aprašytų neigiamų reagentų kontrolės alternatyva.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Lithuanian

BIOCARE
M E D I C A L

Neigiamo reagento kontrolės inkubacinis laikotarpis turi atitikti pirminio 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 antikūną arba dažymo sistemą diagnostikos procedūroje, vartotojas turėtų patikrinti antikūno specifiskumą, išbandydamas jį su keletu vidinių audinių su žinomomis imunohistocheminėmis charakteristikomis, atitinkančiomis žinomus teigiamus ir neigiamus audinius. Žr. kokybės kontrolės procedūras, anksčiau aprašytas šiame gaminio informacinio lapelio skyriuje, ir BŽŪP sertifikavimo programos kokybės kontrolės rekomendacijas.¹⁰ imunohistochemijai ir (arba) NCCLS IHC gairėms.¹¹ 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.

Problemų sprendimas:

Laikykitės specifinių antikūnų protokolo rekomendacijų pagal pateiktą duomenų lapą. Jei atsiranda netipinių rezultatų, susisiekite su Biocare technine pagalba telefonu 1-800-542-2002.

Dažymo aiškinimas:

IntelliPATH FLX™ DAB chromogeno rinkinys sukelia rudos spalvos reakciją antigeno vietose, kurias lokalizuoja pirminis antikūnas. Prieš interpretuojamas paciento rezultatus, kontrolinių mėginių dažymą turi įvertinti kvalifikuotas patologas. Neigiamos kontrolinės medžiagos įvertinamos ir palyginamos su nudažytomis stiklėmis, siekiant užtikrinti, kad pastebėtas dažymas nėra nespecifinės sąveikos rezultatas.

Teigiama audinių kontrolė:

Pirmiausia reikia ištirti teigiamą audinių kontrolę, nudažytą nurodytu antikūnu, siekiant įsitikinti, kad visi reagentai veikia tinkamai. Tinkamas tikslinių ląstelių dažymas (kaip nurodyta aukščiau) 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. Numatytas spalvų reakcijas žr. pagrindo pakuotės lapeliuose. Be to, metachromazija gali būti stebima dažymo metodo variante.¹² Kai naudojamas kontrastinis dažymas, priklausomai nuo inkubacijos trukmės ir naudojamo priešinio dažymo stiprumo, priešdažymas sukels ląstelių branduolių spalvą. Pernelyg didelis arba neišsamus dažymas gali pakenkti tinkamam rezultatų interpretavimui. Žr. protokolą (-us) dėl rekomenduojamo priešdažo.

Neigiamų audinių kontrolė:

Neigiama audinių kontrolė turėtų būti ištirta po teigiamos audinių kontrolės, siekiant patikrinti tikslinio antigeno žymėjimo pirminiu antikūnu specifiskumą. Specifinio dažymo nebuvimas neigiamoje audinių kontrolėje patvirtina antikūnų kryžminio reaktyvumo su ląstelėmis / ląstelių komponentais nebuvimą. Jei neigiamo išorinio audinio kontrolėje atsiranda specifinis dažymas (klaidingai 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 fiksuotų audinių. Dažymo rezultatams interpretuoti naudokite nepažeistas ląsteles. Nekrotinės arba išsigimusios ląstelės dažnai nusidažo nespecifiškai.

Paciento audiniai:

Ištirkite paciento mėginius, nudažytus nurodytais antikūnais paskutinis. Teigiamas dažymo intensyvumas turėtų būti vertinamas atsižvelgiant į bet kokį nespecifinį neigiamo 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 ląstelėse / audiniuose. Jei reikia, naudokite antikūnų grupę, kad nustatytumėte klaidingai neigiamas reakcijas.

Konkrečios informacijos apie nurodytą antikūnų imunoreaktyvumą žr. Santrauka ir paaiškinimas, Apribojimai ir Veikimo charakteristikos.

Apribojimai:

Bendrieji apribojimai:

1. Dėl *in vitro* diagnostikos (IVD) naudojimas
2. Šis gaminy skirtas tik profesionaliam naudojimui: Imunohistochemija yra daugiapakopis 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, užšaldymas, atšildymas, plvimas, džiovinimas, kaitinimas, pjaustymas arba užteršimas kitais audiniais ar skysčiais gali sukelti artefaktus, antikūnų įstrigimą arba klaidingai neigiamus rezultatus. Nenuoseklūs rezultatai gali atsirasti dėl fiksavimo ir įterpimo metodų skirtumų arba dėl įgimtų audinių nelygumų.¹⁴
5. Pernelyg didelis arba neišsamus dažymas gali pakenkti tinkamam rezultatų 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 morfologiniais tyrimais, naudojant tinkamą teigiamą ir neigiamą vidinę ir išorinę kontrolę, taip pat kitus diagnostinius tyrimus. Kvalifikuotas patologas, susipažinęs su tinkamu IHC antikūnų, reagentų ir metodų naudojimu, yra atsakingas už visus veiksmus, naudojamus ruošiant ir interpretuojant galutinį IHC preparatą.
7. Optimalūs konkrečios 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. pirminio antikūno ir kitų pagalbinių reagentų naudojimo instrukcijose. Duomenų lapo rekomendacijos ir protokolai yra pagrįsti išskirtiniu Biocare produktų naudojimu. Galiausiai tyrėjas turi nustatyti optimalias sąlygas.
8. Šis produktas nėra skirtas naudoti srauto citometrijoje. Srauto citometrijos veikimo charakteristikos nenustatytos.
9. Asmenų, užsikrėtusių hepatito B virusu ir turinčių hepatito B paviršiaus antigeno (HBsAg), audiniai gali būti nespecifiniai krienų peroksidaze.¹⁴
10. Reagentai gali parodyti netikėtas reakcijas anksčiau nepatvirtuose audiniuose. Netikėtų reakcijų galimybės net tirtose audinių grupėse negali būti visiškai pašalintos dėl biologinio antigeno ekspresijos neoplazmų ar kitų patologinių audinių kintamumo.¹⁵ Susisiekite su Biocare technine pagalba telefonu 1-800-542-2002 arba per techninės pagalbos informaciją, pateiktą biocare.net, ir pateikite dokumentuotą (-as) netikėtą (-as) reakciją (-as).
11. Normalūs/neimuniniai serumai iš to paties gyvūninio šaltinio kaip ir antriniai antiserumai, naudojami blokavimo etapuose, dėl autoantikūnų arba natūralių antikūnų gali sukelti klaidingai neigiamus arba klaidingai teigiamus rezultatus.
12. Klaidingai teigiami rezultatai gali būti matomi dėl neimunologinio baltymų ar substrato reakcijos produktų prisijungimo. Juos taip pat gali sukelti pseudoperoksidazės aktyvumas (eritrocitai), endogeninis peroksidazės aktyvumas (citochromas C) arba endogeninis biotinas (pvz.,

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Lithuanian

BIOCARE
M E D I C A L

kepenys, krūtys, smegenys, inkstai), priklausomai nuo naudojamos imunitinės dažų rūšies.¹³

13. Neigiamas rezultatas reiškia, kad antigenas nebuvo aptiktas, o ne tai, kad antigeno nebuvo tiriamose ląstelėse ar audiniuose.

Specifiniai gaminio apribojimai:

Jokių papildomų specifinių gaminio apribojimų

Veikimo charakteristikos:

Dažymas buvo atliktas naudojant protokolus, pateiktus specifinėse antikūnų naudojimo instrukcijose arba kaip nurodyta. Dažymo jautrumas ir specifiskumas buvo įvertintas įvairiuose normalių ir neoplastinių audinių tipuose, įvertintuose pirminių antikūnų susidarymo metu.

Atkuriamumas:

Biocare aptikimo sistemų ir sistemos reagentų atkuriamumas 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 nevisiškai 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 produktu (naudokite peroksidazės bloką) arba perteklinė nespecifinė baltymų sąveika (naudokite baltymą). 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 nustatytumėte, 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. AmJ 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Norwegian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Tiltenkt bruk:

Til *in vitro* Diagnostisk bruk

IntelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit er beregnet for bruk i enten manuelle eller automatiserte immunhistokjemi (IHC)-fargeprotokoller for påvisning av målantigener i formalinfiksert, parafininnstøpt (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-fargeprotokoller som i nærvær av et pepperrotperoksidase (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 kromogenbufferblandingen kan variere fra blekbrun til oransje. Fargeegenskapene påvirkes ikke av fargen på kromogenbufferblandingen.intelliPATH FLX™DAB er en formulering som er svært stabil.intelliPATH FLX™DAB er designet for å brukes påintelliPATH FLX™automatisert farging.

Prosedyreprinsipp:

Dette DAB-kromogenet i IntelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit, når det brukes i IHC-testing av FFPE-vevsseksjoner, 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 motfarges og dekkes. Resultatene tolkes ved hjelp av et lys mikroskop og hjelp til differensialdiagnose av patofysiologiske 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
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Rekonstituering, blanding, fortyning, titrering:

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit er optimalisert for bruk med Biocare-antistoffer og hjelpeagenser og må fortynnes rett før bruk. On-line blanding: 120 µL DAB-kromogen per 2000 µL DAB-buffer. Hvis kromogen blandes off-line, bruk samme forhold. DAB-arbeidsløsningen er stabil i 5 dager. Oppbevar DAB-arbeidsløsningen ved 2-8°C.

Kjente applikasjoner:

Immunhistokjemi (formalinfiksert parafininnstøpt vev)

Leveres som:

intelliPATH FLX™ DAB kromogen

DAB-løsning. Se sikkerhetsdatabladet for ytterligere detaljer.

intelliPATH FLX™ DAB-buffer

Bufret løsning inneholder 3 % hydrogenperoksidløsning. Se sikkerhetsdatabladet for ytterligere detaljer.

Materialer og reagenser som trengs, men følger ikke med:

Mikroskopobjektglass, positivt ladet
Positive og negative vevskontroller
Desert Chamber* eller lignende Tørkeovn (valgfritt)
Xylen eller xylenestatning
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. Fortynnete reagenser skal brukes umiddelbart som instruert. Stabiliteten til brukerfortynnet reagens 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.^{1,2}

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 datoen for undersøkelse og oppbevaringsproblekker i minst to år fra eksamensdatoen."³

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.^{4,5}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Norwegian

BIOCARE
M E D I C A L

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 hansker og verneklær 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.^{6,7}
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.⁸
7. Mikrobiell kontaminering av reagenser kan føre til en økning i uspesifikk 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 hjelpereagenser. Se bruksanvisningen for det primære antistoffet og andre hjelpereagenser for anbefalte protokoller og bruksbetingelser.
11. Følg lokale og/eller statlige myndigheters krav for avhendingsmetode.
12. SDS er tilgjengelig på forespørsel og ligger på <http://biocare.net>.
13. Rapportert 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 kromogensettet inneholder komponenter klassifisert som angitt i tabellen nedenfor i samsvar med forordning (EC) nr. 1272/2008

Hazard	Code	Hazard Statement
	H341 H350	Suspected of causing genetic defects May cause cancer

Instruksjoner for bruk:

Kromogensettets reagenser er optimalisert for bruk med Biocare-antistoffer og hjelpereagenser. Se bruksanvisningen for det primære antistoffet og andre hjelpereagenser for anbefalte protokoller og bruksbetingelser. 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. Avparafinisering: Avparafiniser objektglassene i Slide Brite eller xylen. Hydrat objektglass i en serie graderte alkoholer til vann.
2. Peroxide Block: Blokker i 5 minutter med Peroxidazed 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. Primært 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). 2011⁹

Positiv vevskontroll:

Eksternt positivt kontrollmateriale bør være ferske prøver fiksert, behandlet og innebygd så snart som mulig på samme måte som pasientprøven(e). Positive vevskontroller er en indikasjon på korrekt forberedt vev og riktige fargeteknikker. En positiv ekstern vevskontroll for hvert sett med testbetingelser bør inkluderes i hver farging.

Vevene som brukes til de eksterne positive kontrollmaterialene bør velges fra pasientprøver med godt karakteriserte lave nivåer av den positive måltaktiviteten 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 vevsforberedelse.

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 spesifikk 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 spesifikk bakgrunnsfarging (falsk positiv farging). Også mangfoldet av forskjellige celletyper som finnes i de fleste vevssnitt kan brukes av laboratoriet som interne negative kontrollsteder for å verifisere IHCs ytelse spesifikasjoner. Typen og kilden til prøver som kan brukes for negativt vev kontrollene er oppført i delen Ytelseskaraktistikk.

Hvis spesifikk farging (falsk positiv farging) oppstår i den negative vevskontrollen, bør resultatene med pasientprøvene anses som ugyldige.

Uspesifikk negativ reagenskontroll:

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 immunreaktivitet, kan ytterligere pasientvev farges utelukkende med

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Norwegian

BIOCARE
M E D I C A L

henholdsvis substrat-kromogen eller enzymkomplekser (PAP, avidin-biotin, streptavidin) og substrat-kromogen.

Assaybekreftelse:

Før den første bruken av et antistoff eller fargesystem 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 kvalitetskontrollbefalingene til CAP-sertifiseringsprogrammet[®] for immunhistokjemi og/eller NCCLS IHC-retningslinjer¹¹. 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 analyseverifisering.

Feilsøking:

Følg de antistoffspesifikke protokollbefalingene i henhold til databladet som følger med. Hvis det oppstår atypiske resultater, kontakt Biocares tekniske støtte på 1-800-542-2002.

Tolkning av farging:

IntelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit produserer en brunfargereaksjon på antigenstedene 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 vevskontrollen 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.¹²

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 motbeis.

Negativ vevskontroll:

Den negative vevskontrollen bør undersøkes etter den positive vevskontrollen for å verifisere spesifisiteten til merkingen av målantigenet med det primære antistoffet. Fraværet av spesifikk farging i den negative vevskontrollen bekrefter mangelen på antistoffkryssreaktivitet til celler/cellekomponenter. Hvis spesifikk farging (falsk positiv farging) oppstår i den negative eksterne vevskontrollen, 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 fargerresultater. 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 antistoffimmunreaktivitet.

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 fargerresultatene.
 3. Kun til bruk etter resept fra lege. (Kun Rx)
 4. Vevsfarging 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. Inkonsekvente resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpingsmetoder, eller iboende uregelmessigheter i vevet.¹⁴
 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-preparatet.
 7. De optimale protokollene for en spesifikk applikasjon kan variere. Disse inkluderer, men er ikke begrenset til, fiksering, varmeheftingsmetode, inkubasjonstider, antistofffortynning, vevssnitthet og deteksjonssett som brukes. Se bruksanvisningen for det primære antistoffet og andre hjelpereagenser for anbefalte protokoller og bruksbetingelser. Databladbefalingene 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. Ytelseskarakteristikk 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 pepperrøtperoksidase.¹⁴
 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.¹⁵ 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 negative eller falskt positive 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.¹³
1. 3. 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 spesifisiteten til

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Norwegian

BIOCARE
M E D I C A L

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 endogen 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 blokkeringsløsning).
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. AmJ 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Polish

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Przeznaczenie:

Dla *in vitro* Zastosowanie diagnostyczne

Zestaw intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit jest przeznaczony do stosowania w ręcznych lub automatycznych protokołach barwienia immunohistochemicznego (IHC) w celu wykrywania antygenów docelowych w tkankach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE), gdy jest używany w połączeniu z odpowiednim systemem detekcji i przeciwciała pierwotne. 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' Diaminobenzzydina (DAB) to chromogen o ugruntowanej pozycji stosowany w protokołach barwienia IHC, który w obecności enzymu peroksydazy chranowej (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 jasnobrązowego do pomarańczowego. Barwa mieszaniny buforów chromogenowych nie ma wpływu na właściwości barwiące. intelliPATH FLX™ DAB to preparat bardzo stabilny. intelliPATH FLX™ DAB jest przeznaczony do użytku naintelliPATH FLX™ automatyczna barwiarka.

Zasada postępowania:

Chromogen DAB w zestawie intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit, gdy jest używany w badaniu IHC skrawków tkanek FFPE, umożliwia wizualizację antygenów poprzez sekwencyjne nakładanie swoiste przeciwciała przeciwko antygenowi (przeciwciała pierwotne), przeciwciała wtórne przeciwko przeciwciału pierwotnemu (opcjonalnie przeciwciała łączące/sonda), kompleks enzymatyczny i substrat chromogenowy z nałożonymi na siebie etapami przemiany. Enzymatyczna aktywacja chromogenu powoduje powstanie widocznego produktu reakcji w miejscu antygeny. Następnie próbkę można wybarwić kontrastowo i zamknąć 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 antygenem.

Materiały i metody:

Dostarczone odczynniki:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Rekonstytucja, mieszanie, rozcieńczenie, miareczkowanie:

Zestaw chromogenu intelliPATH FLX™ DAB jest zoptymalizowany do stosowania z przeciwciałami Biocare i odczynniki pomocniczymi i należy go rozcieńczyć tuż przed użyciem.

Mieszanie on-line: 120 µl chromogenu DAB na 2000 µl buforu DAB. Jeśli chromogen jest mieszany off-line, użyj tego samego stosunku. Roztwór roboczy DAB jest stabilny przez 5 dni. Przechowywać roztwór roboczy DAB w temperaturze 2-8°C.

Znane zastosowania:

Immunohistochemia (tkanki utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie)

Dostarczane jako:

Chromogen intelliPATH FLX™ DAB

Rozwiązanie DAB. Dodatkowe szczegóły znajdują się w Karcie Charakterystyki.

Bufor DAB intelliPATH FLX™

Roztwór buforowany zawiera 3% roztwór nadtlenu wodoru. Dodatkowe szczegóły znajdują się w Karcie Charakterystyki.

Materiały i odczynniki potrzebne, ale niedostarczane:

Szkiełka mikroskopowe, naładowane dodatnio
Pozytywne i negatywne kontrole tkanek
Komora pustynna* lub podobna Suszarka (opcjonalnie)
Ksylen lub substytut ksylenu
Etanol lub alkohol odczynnikowy
Komora usuwania maskowania* lub podobna szybkar (opcjonalnie)
Woda dejonizowana lub destylowana
Bufor płuczący*
Odczynniki do obróbki wstępnej* (opcjonalnie)
Trawienie enzymatyczne* (opcjonalnie)
Blok peroksydazy*
Blok białkowy* (opcjonalnie)
Przeciwciała pierwotne*
Odczynniki do kontroli negatywnej*
Zestawy detekcyjne*
Hematoksylina* (barwnik kontrastowy)
Odczynnik niebieszcący*
Środek montażowy*
Szklana 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 fiolki, jeśli jest przechowywany w tych warunkach. Nie stosować po upływie terminu ważności. Należy zweryfikować przechowywanie w warunkach innych niż określone. Rozcieńczone odczynniki należy natychmiast zużyć zgodnie z instrukcją. Stabilność odczynnika rozcieńczonego przez użytkownika nie została ustalona przez firmę Biocare.

Kontrole dodatnie i ujemne należy oznaczyć jednocześnie ze wszystkimi próbkami od pacjentów. W przypadku zaobserwowania nieoczekiwanego zabarwienia, którego nie można wytłumaczyć różnicami w procedurach laboratoryjnych i jeśli podejrzewa się problem z przeciwciałem, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Biocare pod numerem 1-800-542-2002 lub za pośrednictwem informacji pomocy technicznej dostępnych na stronie biocare.net.

Przygotowanie próbek:

Tkanki utrwalone w formalinie nadają się do stosowania przed zatapianiem w parafinie. Tkanki kostne należy odwapnić przed obróbką tkanki, aby ułatwić przecięcie tkanki i zapobiec uszkodzeniu ostrzy mikrotomu.^{1,2}

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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Polish

BIOCARE
M E D I C A L

„Laboratorium musi przechowywać wybarwione preparaty przez co najmniej dziesięć lat od daty badania i przechowywać bloki próbek przez co najmniej dwa lata od daty badania.”⁴

Obróbka tkanek przed barwieniem:

Wykonaj indukowane ciepłem pobieranie epitopów (HIER) zgodnie z zalecanym protokołem poniżej. Wykazano, że rutynowe stosowanie HIER przed IHC minimalizuje niespójności i standaryzuje barwienie.^{4,5}

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 podejrzewa 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.^{6,7}
6. Z próbkami przed i po utrwaleniu 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 odczynniki lub próbki wejdą w kontakt z wrażliwymi miejscami, należy je przemyć dużą ilością wody.⁸
7. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne odczynników może skutkować zwiększeniem nieswoistego barwienia.
8. Czasy 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 fiolece.
10. Odczynniki zestawu do wykrywania mikropolimerów są zoptymalizowane i gotowe do użycia z przeciwciałami Biocare i odczynnikami pomocniczymi. Aby zapoznać się z zalecanymi protokołami i warunkami stosowania, należy zapoznać się z instrukcją użycia przeciwciała 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. Zgłaszaj wszelkie poważne zdarzenia związane z tym urządzeniem, kontaktując się z lokalnym przedstawicielem Biocare i właściwymi organami państwa członkowskiego lub kraju, w którym przebywa użytkownik.

Ten zestaw chromogenu zawiera komponenty sklasyfikowane zgodnie z poniższą tabelą, zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1272/2008

Zaryzykować	Kod	Oświadczenie o zagrożeniu
	H341 H350	Podejrzewa się, że powoduje wady genetyczne. Może powodować raka

Instrukcja użycia:

Odczynniki zestawu chromogenu są zoptymalizowane do stosowania z przeciwciałami Biocare i odczynnikami pomocniczymi. Aby zapoznać się z zalecanymi protokołami i warunkami stosowania, należy zapoznać się z

instrukcją użycia przeciwciała głównego i innych odczynników pomocniczych. Czasy i temperatury inkubacji będą się różnić w zależności od stosowanego protokołu konkretnego przeciwciała.

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 przeciwciała pierwotnych, aby zapoznać się z zalecanym roztworem do leczenia wstępnego i protokołem.
4. Blok białkowy (opcjonalnie): Inkubować przez 5-10 minut w temperaturze pokojowej (RT) za pomocą programu T10 Punisher.
5. Przeciwciała pierwotne: Czas inkubacji znajduje się w odpowiedniej karcie danych przeciwciała pierwotnego.
6. Sonda (tylko przeciwciała mysie): Inkubować przez 5-15 minut w temperaturze pokojowej z sondą MACH 4 Mouse Probe.
7. Polimer: Inkubować przez 10-20 minut w przypadku przeciwciał mysich lub 30 minut w przypadku przeciwciał 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). 2011⁹

Pozytywna kontrola tkanek:

Materiałami zewnętrznej 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.

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 zaprogramowano tak, aby zapewnić wykrycie subtelnych zmian we wrażliwości przeciwciał pierwotnych 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 przeciwciała pierwotnego IHC dla demonstracji

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Polish

BIOCARE
M E D I C A L

docelowego antygeny 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), wyniki uzyskane na próbkach pacjentów należy uznać za nieważne.

Nieswoista kontrola ujemna odczynnika:

Do wycinka każdej próbki pacjenta należy zastosować nieswoistą kontrolę ujemną z odczynnikiem zamiast przeciwciała pierwotnego w celu oceny nieswoistego barwienia i

pozwalają na lepszą interpretację specyficznego barwienia w miejscu antygeny. W idealnym przypadku kontrola ujemna odczynnika zawiera przeciwciała wytworzone i przygotowane (tj. rozcieńczone do tego samego stężenia przy użyciu tego samego rozcieńczalnika) do użycia w taki sam sposób jak przeciwciała pierwszorzędowe, ale nie wykazuje specyficznej reaktywności z tkankami ludzkimi w tej samej matrycy/roztworze co kontrola przeciwciała pierwotne. Można zastosować sam rozcieńczalnik jako mniej pożądaną alternatywę dla opisanych wcześniej kontroli ujemnych z odczynnikami. Okres inkubacji kontroli ujemnej odczynnika powinien odpowiadać okresowi inkubacji przeciwciała pierwszorzędowego.

Jeżeli w skrawkach seryjnych stosuje się panele kilku przeciwciał, obszary jednego szkiełka barwiące się negatywnie mogą służyć jako ujemna/nieswoiście wiążąca kontrola tła dla innych przeciwciał. Aby odróżnić endogenną aktywność enzymatyczną lub nieswoiste wiązanie enzymów od swoistej immunoreaktywności, dodatkowo tkanki pacjenta można wybarwić wyłącznie odpowiednio substratem-chromogenem lub kompleksami enzymatycznymi (PAP, awidyna-biotyna, streptawidyna) i substrat-chromogen.

Weryfikacja testu:

Przed pierwszym użyciem przeciwciała lub systemu barwienia w procedurze diagnostycznej użytkownik powinien zweryfikować specyficzność przeciwciała, 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[®] do immunohistochemii i/lub wytyczne NCCLS IHC¹. Te procedury kontroli jakości należy powtarzać dla każdej nowej partii przeciwciał 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 specyficznego przeciwciał, 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 intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit powoduje reakcję barwy brązowej w miejscach antygeny zlokalizowanych przez przeciwciała 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 przeciwciałem, 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.¹²

W przypadku stosowania barwnika kontrastowego, w zależności od długości inkubacji i siły użytego barwnika kontrastowego, barwienie kontrastowe spowoduje zabarwienie jąder komórkowych. Nadmierne 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 dodatniej kontroli tkankowej, aby zweryfikować specyficzność znakowania docelowego antygeny przez przeciwciała pierwszorzędowe. Brak swoistego barwienia w negatywnej kontroli tkankowej potwierdza brak reaktywności krzyżowej przeciwciał w stosunku do komórek/składników komórkowych. Jeżeli w ujemnej zewnętrżnej kontroli tkanek wystąpi specyficzne zabarwienie (fałszywie dodatnie zabarwienie), wyniki uzyskane dla próbki pacjenta należy uznać za nieważne.

Nieswoiste zabarwienie, jeśli występuje, zwykle ma charakter rozproszony. 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 nieswoiście.

Tkanka pacjenta:

Zbadaj próbki pacjentów wybarwione wskazanymi przeciwciałami ostatni. Intensywność barwienia dodatniego należy oceniać w kontekście wszelkich nieswoistych barwień tła kontroli negatywnej z odczynnikiem. 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. Jeśli to konieczne, użyj panelu przeciwciał w celu zidentyfikowania reakcji fałszywie ujemnych.

Aby uzyskać szczegółowe informacje dotyczące wskazanej immunoreaktywności przeciwciał, 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, utrwalenie 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 obróbki przed barwieniem. Niewłaściwe utrwalenie, zamrażanie, rozmrażanie, mycie, suszenie, podgrzewanie, dzielenie na skrawki lub zanieczyszczenie innymi tkankami lub płynami może spowodować artefakty, uwiecznienie przeciwciał lub wyniki fałszywie ujemne. Niespójne wyniki mogą wynikać z różnic w metodach utrwalania i osadzania lub z nieodłącznych nieprawidłowości w tkance.¹⁴
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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Polish

BIOCARE
M E D I C A L

- morfologicznymi z zastosowaniem odpowiednich pozytywnych i negatywnych 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 przeciwciał IHC, odczynników i metod.
- Optymalne protokoły dla konkretnego zastosowania mogą się różnić. Należą do nich między innymi utrwalanie, metoda odzyskiwania ciepła, czas inkubacji, rozcieńczenie przeciwciał, grubość skrawków tkanki i zastosowany zestaw do wykrywania. Aby zapoznać się z zalecanymi protokołami i warunkami stosowania, należy zapoznać się z instrukcją użycia przeciwciała 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.
 - Ten produkt nie jest przeznaczony do stosowania w cytometrii przepływowej. Charakterystyki działania nie zostały określone dla cytometrii przepływowej.
 - Tkanki osób zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu B i zawierające antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (HBsAg) mogą wykazywać niespecyficzne barwienie peroksydazą chrzanową.¹⁴
 - 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 antygenów w nowotworach lub innych tkankach patologicznych.¹⁵ 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.
 - 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 przeciwciał naturalnych.
 - Wyniki fałszywie dodatnie mogą wystąpić w wyniku nieimmunologicznego wiązania białek lub produktów reakcji substratu. Mogą być również spowodowane aktywnością pseudoperoxydazy (erytrocyty), endogenną aktywnością peroksydazy (cytochrom C) lub endogenną biotyną (np. wątroba, piersi, mózg, nerki), w zależności od rodzaju użytego barwnika immunologicznego.¹³
 - Wynik ujemny oznacza, że antygen nie został wykryty, a nie, że antygeny 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 przeciwciał lub zgodnie z wyszczególnieniem. Czułość i swoistość barwienia oceniano w szeregu typów tkanek prawidłowych i nowotworowych ocenianych podczas opracowywania przeciwciał pierwotnych.

Powtarzalność:

Powtarzalność systemów detekcyjnych i odczynników systemowych firmy Biocare jest weryfikowana poprzez pomiar o średniej precyzji, podczas którego testowano różne partie odczynników przez dłuższy okres czasu przy użyciu różnych operatorów, analityków, partii odczynników, próbek tkanek i sprzętu. Barwienie uzyskane dla każdego ocenianego odczynnika wykrywającego było spójne i przeprowadzone zgodnie z oczekiwaniami.

Rozwiązywanie problemów:

- Brak barwienia jakichkolwiek szkiełek – sprawdzić, czy użyto odpowiedniej tkanki kontroli pozytywnej, przeciwciał i produktów do

wykrywania. Sprawdź, czy wosk nie został całkowicie lub nieprawidłowo usunięty lub nie został poddany obróbce wstępnej.

- Słabe barwienie wszystkich preparatów – sprawdzić, czy użyto odpowiedniej tkanki kontroli pozytywnej, przeciwciał i produktów do wykrywania.
- 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).
- Skrawki tkanek zmywają szkiełka podczas inkubacji – Sprawdź szkiełka, aby upewnić się, że są naładowane dodatnio.
- Specyficzne barwienie jest zbyt ciemne – Sprawdź protokół, aby ustalić, czy do szkiełka nałożono właściwe miano przeciwciał, 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:

- Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
- Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
- Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
- Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
- Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- 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.
- 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.
- 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
- College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
- 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.
- Koretz 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.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.
- Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Am J Clin Path 1980; 73:626.
- Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Portuguese

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Usos pretendidos:

Para *in vitro* Uso de diagnóstico

O kit de cromogénio intelliPATH FLX™ DAB destina-se ao uso em protocolos de coloração imuno-histoquímica (IHC) manuais ou automatizados para a detecção de antígenos 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 cromogénio pode variar de marrom claro a laranja. As propriedades de coloração não são afetadas pela cor da mistura tampão de cromogénio. intelliPATH FLX™ DAB é uma formulação muito estável. intelliPATH FLX™ DAB foi projetado para ser usado no intelliPATH FLX™ corante automatizado.

Princípio do Procedimento:

Este cromogénio DAB no kit intelliPATH FLX™ DAB Chromogen, quando usado em testes IHC de seções de tecido FFPE, permite a visualização de antígenos por meio da aplicação sequencial de um anticorpo específico para o antígeno (anticorpo primário), um anticorpo secundário para o anticorpo primário (ligação anticorpo/sonda opcional), um complexo enzimático e um substrato cromogénico com etapas de lavagem interpostas. A ativação enzimática do cromogénio resulta em um produto de reação visível no local do antígeno. A amostra pode então ser contrastada e coberta com lamínula. Os resultados são interpretados usando uma luz microscópio e auxiliar no diagnóstico diferencial de processos fisiopatológicos, que podem ou pode não estar associado a um antígeno específico.

Materiais e métodos:

Reagentes fornecidos:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Reconstituição, mistura, diluição, titulação:

O kit de cromogénio intelliPATH FLX™ DAB é otimizado para uso com anticorpos Biocare e reagentes auxiliares e deve ser diluído imediatamente antes do uso.

Mistura on-line: 120 µL de cromogénio DAB por 2.000 µL de tampão DAB. Se o cromogénio for misturado off-line, use a mesma proporção. A solução de trabalho DAB é estável por 5 dias. Armazene a solução de trabalho DAB entre 2-8°C.

Aplicações conhecidas:

Imunohistoquímica (tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina)

Fornecido como:

Cromógeno intelliPATH FLX™ DAB

Solução DAB. Consulte a Ficha de Dados de Segurança para obter detalhes adicionais.

Buffer DAB intelliPATH FLX™

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 Descamufagem* ou panela de pressão semelhante (opcional)
Água desionizada ou destilada
Tampão de lavagem*
Reagentes de pré-tratamento* (opcional)
Digestão enzimática* (opcional)
Bloqueio 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. A estabilidade do reagente diluído pelo utilizador 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.

Preparação de amostras:

Tecidos fixados em formalina são adequados para uso 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.^{1,2}

Os tecidos devidamente fixados e embebidos 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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Portuguese

BIOCARE
M E D I C A L

da data de exame e reter blocos de amostras por pelo menos dois anos a partir da data do exame.⁴⁵

Tratamento de tecidos antes da coloração:

Execute a recuperação de epítomos 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.⁴⁵

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.^{6,7}
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 contato da pele e das membranas mucosas com reagentes e amostras. Se os reagentes ou as amostras entrarem em contato com áreas sensíveis, lave com água em abundância.⁸
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
	H341 H350	Suspeito de causar defeitos genéticos Pode causar câncer

Instruções de uso:

Os reagentes do kit cromogénio 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. Desparafinação: 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 Peroxidized 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 Ensaio Imunohistoquímico; Diretriz Aprovada – Segunda edição (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA EUA (www.clsi.org). 2011⁹

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 níveis baixos bem caracterizados da actividade alvo positiva que proporcionam 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.

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 controlo 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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Portuguese

BIOCARE
M E D I C A L

tipos de células presentes na maioria das secções de tecido pode ser usados 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 controles estão listados na secção Características de desempenho.

Se ocorrer coloração específica (coloração falso 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 secção 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. O diluente sozinho pode ser utilizado como uma alternativa menos desejável aos controles 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 controlo de fundo de ligação negativo/inespecífico para outros anticorpos. Para diferenciar a atividade enzimática endógena ou a ligação inespecífica de enzimas da imunorreatividade 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 controlo de qualidade descritos anteriormente nesta secção da bula do produto e as recomendações de controlo de qualidade do Programa de Certificação CAP® para imunohistoquímica e/ou a diretriz NCCLS IHC¹. Estes procedimentos de controlo de qualidade devem ser repetidos para cada novo lote de anticorpos ou sempre que houver alteração nos parâmetros do ensaio. Os tecidos listados na secção 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 kit intelliPATH FLX™ DAB Chromogen 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 reactividade 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.¹²

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 contração 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 controlo tecidual negativo deve ser examinado após o controlo 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 reactividade 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 conjuntivo 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 imunorreatividade de anticorpos indicada.

Limitações:

Limitações Gerais:

1. Para *em 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.¹⁴
5. A contração 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 controlos internos e externos positivos e negativos adequados, bem como outros testes de diagnóstico. É responsabilidade de um patologista qualificado que esteja familiarizado

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Portuguese

BIOCARE
M E D I C A L

- 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.
- 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.
 - Este produto não se destina ao uso em citometria de fluxo. As características de desempenho não foram determinadas para citometria de fluxo.
 - 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.¹⁴
 - 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.¹⁵ 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.
 - 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.
 - 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.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:

- 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.
- Coloração fraca de todas as lâminas – Verifique para determinar se foram utilizados tecidos de controle positivo apropriados, anticorpos e produtos de detecção.

- 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).
- As secções de tecido são removidas das lâminas durante a incubação – Verifique as lâminas para garantir que estão carregadas positivamente.
- 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:

- Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
- Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
- Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 17163, February 28, 1992.
- Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
- Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- 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.
- 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.
- 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
- College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
- 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.
- Koretz 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.
- Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med* 1983; 14:767.
- Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. *Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry*. *Am J Clin Path* 1980; 73:626.
- Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Romanian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Utilizarea prevăzută:

Pentru *in vitro* Utilizare pentru diagnosticare

Kit-ul intelliPATH FLX™ DAB Chromogen este destinat utilizării fie în protocoalele de colorare cu imunohistochimie (IHC) manuale sau automate pentru detectarea antigenelor țintă în țesuturi fixate în formol, încorporate în parafină (FFPE) atunci când este utilizat împreună cu sistemul de detectare adecvat și anticorpi primari. Interpretarea clinică a oricărei 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 protocoalele de colorare IHC care, în prezența unei enzime peroxidază de hrean (HRP), produce un precipitat maro care este insolubil în solvenți 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 maro deschis la portocaliu. Proprietățile de colorare nu sunt afectate de culoarea amestecului tampon de cromogen. intelliPATH FLX™ DAB este o formulare foarte stabilă. intelliPATH FLX™ DAB este conceput pentru a fi utilizat pe intelliPATH FLX™ colorator automatizat.

Principiul procedurii:

Acest cromogen DAB din kit-ul intelliPATH FLX™ 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 opțional link), un complex enzimatic și un substrat cromogen cu etape de spălare interpusă. Activarea enzimatică a cromogenului are ca rezultat un produs de reacție vizibil la locul antigenului. Eșantionul poate fi apoi contracolorat 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
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Reconstituire, amestecare, diluare, titrare:

Kit-ul intelliPATH FLX™ DAB Chromogen este optimizat pentru utilizare cu anticorpi Biocare și reactivi auxiliari și trebuie diluat chiar înainte de utilizare. Amestecare on-line: 120 µL de cromogen DAB la 2000 µL de tampon DAB. Dacă cromogenul este amestecat offline, utilizați același raport. Soluția de lucru DAB este stabilă timp de 5 zile. Depozitați soluția de lucru DAB la 2-8°C.

Aplicații cunoscute:

Imunohistochimie (țesuturi încorporate în parafină fixate în formol)

Furnizat ca:

cromogen intelliPATH FLX™ DAB

Soluție DAB. Consultați Fișa cu date de securitate pentru detalii suplimentare.

tampon DAB intelliPATH FLX™

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 deșert* sau cuptor de uscare similar (opțional)
Xilen sau înlocuitor de xilen
Etanol sau alcool reactiv
Camera de decloaking* sau oala sub presiune similară (opțional)
Apă deionizată sau distilată
tampon de spălare*
Reactivi de pretratare* (opțional)
Digestia enzimatică* (opțional)
bloc de peroxidază*
Bloc de proteine* (opțional)
Anticorp primar*
Reactivi de control negativ*
Truse de detectare*
Hematoxilina* (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 comenzile. Anumiți reactivi enumerați mai sus se bazează pe aplicații specifice și pe sistemul de detectare utilizat.

Depozitare și stabilitate:

A se păstra la 2°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 utilizați prompt conform instrucțiunilor. Stabilitatea reactivului diluat de utilizator 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.

Pregătirea probei:

Țesuturi fixate în formol sunt adecvate pentru utilizare înainte de încorporarea parafinei. Țesuturile osoase trebuie decalcificate înainte de prelucrarea țesuturilor pentru a facilita tăierea țesuturilor și pentru a preveni deteriorarea lamelor microtomului.^{1,2}

Țesuturile fixate și încorporate în mod corespunzător care exprimă antigenul țintă 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 examinării și păstrarea blocurilor de specimene cel puțin doi ani de la data examinării.”³

Tratamentul țesuturilor înainte de colorare:

Efectuați recuperarea epitopului indusă 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.^{4,5}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Romanian

BIOCARE
M E D I C A L

Avertisment și precauții:

1. DAB este cunoscut ca fiind un cancerigen suspectat.
2. Nu expuneți componentele DAB la lumină puternică sau la lumina directă a soarelui
3. DAB poate provoca sensibilizarea pielii. Evitați contactul cu pielea și ochii.
4. Purtați 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 potențial 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.^{6,7}
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.⁸
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 protocoalele 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 competentă 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
	H341 H350	Suspectat de a provoca defecte genetice Poate provoca cancer

Instrucțiuni 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 protocoalele 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: Deparafinizați lamele în Slide Brite sau xilen. Hidratează lamele într-o serie de alcooli clasificați până la apă.
2. Bloc de peroxid: Blocați timp de 5 minute cu Peroxidazed 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 (Opțional): 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 incubare.
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 anticorpii de șoarece sau 30 de minute pentru anticorpii 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 hematoxilina. 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 imunohistochemice; Ghid aprobat-A doua ediție (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA SUA (www.clsi.org). 2011⁹

Control pozitiv al țesuturilor:

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 tehnicile 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.

Țesuturile utilizate pentru materialele de control pozitiv extern trebuie selectate din mostre de pacient cu niveluri scăzute bine caracterizate ale activității țintei 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 diferit 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 pacienți. 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 eșantionul(e) pacientului la fiecare cursă de colorare pentru a verifica specificitatea anticorpului primar IHC pentru demonstrarea antigenului țintă și pentru a oferi o indicație a colorării specifice de fond (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.

Control 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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Romanian

BIOCARE
M E D I C A L

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 incubare 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/nescific de legare pentru alți anticorpi. Pentru a diferenția activitatea enzimatică endogenă 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 imunohistochemice 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,¹⁰ pentru imunohistochimie și/sau ghidul NCCLS IHC¹¹. 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 intelliPATH FLX™ DAB Chromogen produce o reacție de culoare maro la localurile antigenului localizate de anticorpul primar. Înainte de interpretarea rezultatelor pacientului, colorarea controalelor trebuie evaluată de un patolog calificat. Martorii negativi sunt evaluați 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 țintă (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 utilizați. Consultați prospectele de ambalaj pentru substrat pentru reacțiile de culoare așteptate. Mai mult, metacromazia poate fi observată în variațiile metodei de colorare.¹²

Când se folosește o contracolorare, în funcție de durata de incubare și de potența contracolorului utilizat, contracolorarea va avea ca rezultat o colorare a nucleilor celulari. 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 țintă de către anticorpul primar. Absența colorației specifice în controlul negativ al țesutului confirmă lipsa reactivității încrucișate 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 intacte pentru interpretarea rezultatelor colorării. Celulele necrotice sau degenerate se colorează adesea nespecific.

Țesutul 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/țesutul testat. Dacă este necesar, utilizați un panou de anticorpi pentru a identifica reacțiile fals-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 corespunzători; 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, dezghețarea, spălarea, uscarea, încălzirea, secționarea sau contaminarea cu alte țesuturi sau fluide pot produce artefacte, captarea anticorpilor sau rezultate fals negative. Rezultatele inconsecvente se pot datora variațiilor în metodele de fixare și încorporare sau neregularităților inerente în țesut.¹⁴
5. Contracolorarea excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea corectă a rezultatelor.
6. Interpretarea clinică a oricărei colorații 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 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 pașii utilizați pentru pregătirea și interpretarea preparatului final IHC.
7. Protocoalele 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 protocoalele și condițiile recomandate de utilizare. Recomandările și protocoalele 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.¹⁴
10. Reactivii 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 neoplasme sau în alte țesuturi patologice.¹⁵ Contactați asistența tehnică Biocare la 1-800-542-2002 sau prin intermediul informațiilor de asistență tehnică furnizate pe biocare.net, cu reacții neașteptate documentate.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Romanian

BIOCARE
M E D I C A L

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.¹³
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 protocoalele 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 diverși operatori, analiști, loturi de reactivi, probe de țesut și echipamente. Colorația obținută pentru fiecare reactiv de detecție evaluat a fost consecventă și a fost efectuată conform așteptărilor.

Depanare:

1. Nicio colorare a niciunei lame – Verificați pentru a determina dacă au fost utilizate țesuturi de control pozitiv adecvate, anticorpi și produse de detectare. Verificați dacă există îndepărtarea sau pretratarea ceareă incompletă sau necorespunzătoare.
2. Colorare slabă a tuturor lamelor – Verificați pentru a determina dacă au fost utilizate țesuturi de control pozitiv adecvate, anticorpi și produse de detectare.
3. Fundal excesiv al tuturor diapozitivelor – Pot exista niveluri ridicate de biotină endogenă (dacă se utilizează produse de detecție 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 incubăției – 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.

Referințe:

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. AmJ 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Slovak

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Zamýšľané použitie:

Pre *in vitro* Diagnostické použitie

Súprava intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit je určená na použitie v manuálnych alebo automatických imunohistochemických (IHC) protokoloch farbenia na detekciu cieľových antigénov v tkanivách fixovaných vo formalíne, v parafíne (FFPE), ak sa používa v spojení s príslušným detekčným systémom a primárne protilátky. Klinická interpretácia akéhokoľvek zafarbenia alebo jeho absencie by mala byť doplnená morfológickými štúdiami a náležitými 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 chrovej peroxidázy (HRP) vytvára hnedú zrazeninu, ktorá je nerozpustná v organických rozpúšťadlách a môže byť prekrytá permanentným montážnym médiom. Tento produkt sa dodáva v dvojzložkovom systéme pozostávajúcom z tekutého stabilného DAB chromogénu a DAB substrátového pufru. Farba zmesi chromogénového pufru sa môže meniť od svetlohnedej po oranžovú. Farbiace vlastnosti nie sú ovplyvnené farbou zmesi chromogénneho pufru. intelliPATH FLX™ DAB je formulácia, ktorá je veľmi stabilná. intelliPATH FLX™ DAB je navrhnutý na použitie naintelliPATH FLX™ automatické farbenie.

Princíp postupu:

Tento DAB chromogén v súprave intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit, keď sa používa pri IHC testovaní tkanivových rezov FFPE, umožňuje vizualizáciu antigénov prostredníctvom sekvenčnej aplikácie špecifickej protilátky k antigénu (primárna protilátka), sekundárna protilátka k primárnej protilátke (voliteľná väzba protilátka/sonda), enzýmový komplex a chromogénny substrát s vloženými krokmi premývania. Enzymatická aktivácia chromogénu vedie k viditeľnému reakčnému produktu v mieste antigénu. Vzorka sa potom môže kontrastne zafarbiť a zakryť krycím sklíčkom. Výsledky sa interpretujú pomocou svetla mikroskop a pomôcka pri diferenciálnej diagnostike patofyziologických procesov, ktoré môžu resp nemusia byť spojené s konkrétnym antigénom.

Materiály a metódy:

Dodávané činidlá:

Katalógové číslo súpravy	Katalógové číslo komponentov	Popis komponentu	Množstvo x Objem
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB chromogén	2 x 3 ml
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB vyrovnávací pamät'	4 x 20 ml

Rekonštitúcia, miešanie, riedenie, titrácia:

Súprava intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit je optimalizovaná na použitie s protilátkami Biocare a pomocnými činidlami a musí sa zriediť tesne pred použitím.

On-line mix: 120 ul DAB Chromogen na 2 000 ul DAB pufru. Ak sa chromogén mieša off-line, použite rovnaký pomer. Pracovný roztok DAB je stabilný 5 dní. Pracovný roztok DAB skladujte pri 2-8°C.

Známe aplikácie:

Imunohistochemia (tkanivá fixované v parafíne fixované vo formalíne)

Dodávané ako:

intelliPATH FLX™ DAB chromogén

DAB riešenie. Ďalšie podrobnosti nájdete v karte bezpečnostných údajov.

intelliPATH FLX™ DAB vyrovnávací pamät'

Pufrovaný roztok obsahuje 3% roztok peroxidu vodíka. Ďalšie podrobnosti nájdete v karte bezpečnostných údajov.

Potrebné materiály a činidlá, ktoré nie sú súčasťou dodávky:

Mikroskopické sklíčka, kladne nabité
Pozitívne a negatívne kontroly tkaniva
Púštna komora* alebo podobná Sušiacia pec (voliteľné)
Xylén alebo náhrada xylénu
Etanol alebo reagenčný alkohol
Odmasťovacia komora* alebo podobný tlakový hrniec (voliteľné)
Deionizovaná alebo destilovaná voda
Premývací pufoer*
Činidlá na predúpravu* (voliteľné)
Enzýmové trávenie* (voliteľné)
Peroxidázový blok*
Proteínový blok* (voliteľné)
Primárna protilátka*
Negatívne kontrolné činidlá*
Detekčné súpravy*
Hematoxylin* (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. Zriedené činidlá by sa mali použiť okamžite podľa pokynov. Stabilita užívateľom zriedeného činidla nebola stanovená spoločnosťou Biocare.

Pozitívne a negatívne kontroly by sa mali vykonávať súčasne so všetkými vzorkami pacienta. Ak spozorujete neočakávané zafarbenie, ktoré nemožno vysvetliť odchýlkami v laboratórnych postupoch a máte podozrenie na problém s protilátkou, kontaktujte technickú podporu spoločnosti Biocare na čísle 1-800-542-2002 alebo prostredníctvom informácií o technickej podpore poskytovanej na biocare.net.

Príprava vzorky:

Tkanivá fixované vo formalíne sú vhodné na použitie pred zaliatím parafínom. Kostné tkanivá by sa mali pred spracovaním tkaniva odvápnit, aby sa uľahčilo rezanie tkaniva a zabránilo sa poškodeniu čepielok mikrotómu.^{1,2}

Správne fixované a zaliaté tkanivá exprimujúce špecifikovaný cieľový antigén 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.“³

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Slovak

BIOCARE
M E D I C A L

Ošetrovanie tkanív pred farbením:

Vykonajte teplom indukované vyhládavanie epitopu (HIER) podľa odporúčaného protokolu uvedeného nižšie. Ukázalo sa, že rutinné používanie HIER pred IHC minimalizuje nekonzistentnosť a štandardizuje farbenie.^{4,5}

Varovanie a bezpečnostné opatrenia:

1. Je známe, že DAB je podozrivý karcinogén.
2. Nevystavujte komponenty DAB silnému svetlu 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 zdravotných smerníc zodpovedných orgánov, kde sa používa.^{6,7}
6. So vzorkami pred a po fixácii 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 reagenty ústami a vyhýbajte sa kontaktu kože a slizníc s číidlami a vzorkami. Ak sa reagentie alebo vzorky dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, umyte ich veľkým množstvom vody.⁸
7. Mikrobiálna kontaminácia číidiel 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 číidlo po dátume expirácie vytlačenej na injekčnej liekovej.
10. Číidlá súpravy na detekciu mikropolymérov sú optimalizované a pripravené na použitie s protilátkami Biocare a pomocnými číidlami. Odporúčané protokoly a podmienky použitia nájdete v pokynoch na použitie primárnej protilátky a ďalších pomocných reagentov.
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 vážne 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	Vyhlasenie o nebezpečnosti
	H341 H350	Podozrenie, že spôsobuje genetické defekty Môže spôsobiť rakovinu

Inštrukcie na používanie:

Číidlá súpravy chromogen sú optimalizované na použitie s protilátkami Biocare a pomocnými číidlami. Odporúčané protokoly a podmienky použitia nájdete v pokynoch na použitie primárnej protilátky a ďalších pomocných reagentov. Inkubačné časy a teploty sa budú líšiť v závislosti od špecifického protokolu protilátky, ktorý sa použije.

Pri používaní automatického farbiaceho prístroja si preštudujte prevádzkové parametre v návode na obsluhu konkrétneho prístroja a v návode na použitie.

Všeobecné procesné kroky na vykonávanie IHC:

1. Deparafinizácia: Deparafinizujte 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 protilátok.
4. Proteínový blok (voliteľný): Inkubujte 5-10 minút pri izbovej teplote (RT) s Background Punisher.
5. Primárna protilátka: Inkubačný čas nájdete v príslušnom údajovom liste primárnej protilátky.
6. Sonda (iba myšacie protilátky): Inkubujte 5-15 minút pri teplote miestnosti so sondou MACH 4 Mouse Probe.
7. Polymér: Inkubujte 10-20 minút pre myšie protilátky alebo 30 minút pre králičie protilátky 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). 2011⁹

Positívna kontrola tkaniva:

Externé pozitívne kontrolné materiály by mali byť čerstvé vzorky fixované, spracované a zaliate 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 cieľovej aktivity, ktorá poskytuje slabé pozitívne zafarbenie. Nízka úroveň pozitívity pre externé pozitívne kontroly je navrhnutá tak, aby zabezpečila detekciu jemných zmien citlivosti primárnej protilátky z nestability alebo problémov s metodikou IHC. Komerčne dostupné tkanivové kontrolné sklíčka alebo vzorky spracované inak ako vzorka (vzorky) pacienta iba overujú účinnosť číidla a neoverujú prípravu tkaniva.

Známe pozitívne kontroly tkaniva by sa mali používať len na monitorovanie správneho výkonu spracovaných tkanív a testovacích číidiel, a nie ako pomôcka pri formulovaní špecifickej diagnózy vzoriek pacientov. Ak pozitívne kontroly tkaniva nepreukážu pozitívne zafarbenie, výsledky s testovanými vzorkami by sa mali považovať za neplatné.

Negatívna kontrola tkaniva:

Na overenie špecificity primárnej protilátky IHC použite negatívnu tkanivovú kontrolu fixovanú, spracovanú a zapustenú rovnakým spôsobom ako vzorka (vzorky) pacienta pri každom cykle farbenia. preukázanie cieľového antigénu 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Slovak

BIOCARE
M E D I C A L

Nešpecifická negatívna kontrola reagensí:

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. zriedenú na rovnakú koncentráciu použitím rovnakého riedidla) na použitie rovnakým spôsobom ako primárna protilátka, ale nevykazuje žiadnu špecifickú reaktivitu s ľudskými tkanivami v rovnakej matici/roztoku ako primárna protilátka. Samotné riedidlo sa môže použiť ako menej žiaduca alternatíva k predtým opísaným negatívnym kontrolným činidlám. Inkubačná doba pre negatívnu reagenčnú kontrolu by mala zodpovedať dobe primárnej protilátky.

Keď sa na sériových rezoch použijú panely niekoľkých protilátok, negatívne zafarbené oblasti jedného sklíčka môžu slúžiť ako negatívna/nešpecifická väzbová kontrola pozadia pre iné protilátky. Na odlišenie endogénnej enzýmovej aktivity alebo nešpecifickej väzby enzýmov od špecifickej imunoreaktivity môžu byť ďalšie tkanivá pacienta zafarbené výlučne substrát-chromogén alebo enzýmovými 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[®] pre imunohistochémiu a/alebo usmernenie NCCLS IHC¹. Tieto postupy kontroly kvality by sa mali opakovať pre každú novú šaržu protilátok alebo vždy, keď dôjde k zmene parametrov testu. Na overenie testu sú vhodné tkanivá uvedené v časti Výkonnosť 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 intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit vytvára hnedú farebnú reakciu na miestach antigénu lokalizovaných primárnou protilátkou. Pred interpretáciou výsledkov pacienta musí zafarbenie kontrol vyhodnotiť kvalifikovaný patológ. Negatívne kontroly sa vyhodnotia a porovnajú so zafarbenými sklíčkami, 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 cieľových buniek (ako je uvedené vyššie) svedčí o pozitívnej reaktivite. Ak pozitívne kontroly tkaniva nepreukážu 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.¹²

Keď 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 cieľového antigénu primárnou protilátkou. Neprítomnosť špecifického zafarbenia v negatívnej kontrole

tkaniva potvrdzuje nedostatok krížovej 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. Sporadické 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 farbja 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 nebol 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 protilátok nájdete v časti Súhrn a vysvetlenie, obmedzenia a výkonnosť charakteristiky.

Obmedzenia:

Všeobecné obmedzenia:

1. *Pre in vitro* diagnostické (IVD) použitie
2. Tento produkt je určený len na profesionálne použitie: Imunohistochemia je viackrokový diagnostický proces, ktorý pozostáva zo špecializovaného školenia vo výbere vhodných činidiel; výber tkaniva, fixácia a spracovanie; príprava podložného sklíčka 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, rozmrazovanie, 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.¹⁴
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 patológa, ktorý je oboznámený so správnym používaním IHC protilátok, činidiel a metód, interpretovať všetky kroky použité na prípravu a interpretáciu konečného IHC preparátu.
7. Optimálne protokoly pre konkrétnu aplikáciu sa môžu líšiť. Tieto zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na fixáciu, metódu získania tepla, inkubačné časy, riedenie protilátky, hrúbku tkanivového rezu a použitý detekčný súpravu. Odporúčané protokoly a podmienky použitia nájdete v pokynoch na použitie primárnej protilátky a ďalších pomocných reagensí. Odporúčania a protokoly údajových listov sú založené na výhradnom používaní produktov Biocare. V konečnom dôsledku je zodpovednosťou vyšetrovateľa určiť optimálne podmienky.
8. Tento produkt nie je určený na použitie v prietokovej cytometrii. Výkonnosť charakteristiky neboli stanovené pre prietokovú cytometriu.
9. Tkanivá od osôb infikovaných vírusom hepatitídy B a obsahujúce povrchový antigén hepatitídy B (HBsAg) môžu vykazovať nešpecifické zafarbenie chrenovou peroxidázou.¹⁴
10. Reagencie môžu vykazovať neočakávané reakcie v predtým netestovaných tkanivách. Možnosť neočakávaných reakcií ani v

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Slovak

BIOCARE
M E D I C A L

testovaných skupinách tkanív nie je možné úplne eliminovať z dôvodu biologickej variability expresie antigénu v novotvaroch alebo iných patologických tkanivách.¹⁵ 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 falošne negatívne alebo falošne pozitívne výsledky v dôsledku autoprotilátok alebo prirodzených protilátok.
12. Falošne pozitívne výsledky môžu byť pozorované v dôsledku neimunologickej väzby proteínov alebo produktov reakcie substrátu. Môžu byť spôsobené aj pseudoperoxidázovou aktivitou (erytrocyty), endogénnou peroxidázovou aktivitou (cytochróm C) alebo endogénnym biotínom (napr. pečeň, prsia, mozog, obličky) v závislosti od typu použitého imunofarbiva.¹³
13. Negatívny výsledok znamená, že antigén nebol detegovaný, nie že antigén 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 protilátku alebo podľa špecifikácie. Citlivosť a špecifická farbenia sa hodnotila v celom rozsahu normálnych a neoplastických typov tkanív hodnotených počas vývoja primárnych protilátok.

Reprodukovateľnosť:

Reprodukovateľnosť detekčných systémov Biocare a systémových činidiel sa overuje meraním strednej presnosti, pri ktorom boli rôzne šarže činidiel testované počas dlhého časového obdobia pomocou rôznych operátorov, analytikov, šarží činidiel, vzoriek tkanív a zariadení. Farbenie získané pre každé hodnotené detekčné činidlo bolo konzistentné a uskutočnilo sa podľa očakávania.

Riešenie problémov:

1. Žiadne zafarbenie na sklíčkach – Skontrolujte, či sa použilo vhodné tkanivo pozitívnej kontroly, protilátka a detekčné produkty. Skontrolujte neúplné alebo nesprávne odstránenie vosku alebo predbežnú úpravu.
2. Slabé zafarbenie všetkých sklíčok – Skontrolujte, či sa použilo vhodné tkanivo pozitívnej kontroly, protilátka a detekčné produkty.
3. Nadmerné pozadie všetkých sklíčok – Môžu existovať vysoké hladiny endogénneho biotínu (ak používate detekčné produkty na báze biotínu), endogénna aktivita HRP premieňajúca chromogén na farebný konečný produkt (použite peroxidázový blok) alebo nadmerná nešpecifická proteínová interakcia (použite proteín blok, ako je blokovací roztok na báze séra alebo kazeínu).
4. Tkanivové rezy zmyjú sklíčka počas inkubácie – Skontrolujte sklíčka, aby ste sa uistili, že sú pozitívne nabité.
5. Špecifické zafarbenie je príliš tmavé – Skontrolujte protokol a zistite, či bol na sklíčko aplikovaný správny titer protilátok, ako aj správne inkubačné časy pre všetky činidlá. Okrem toho sa uistite, že protokol obsahuje dostatok premývacích krokov na odstránenie nadbytočných činidiel po dokončení inkubačných krokov.

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 (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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Slovenian

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Predvidena uporaba:

Za *in vitro* Diagnostična uporaba

Kromogeni komplet intelliPATH FLX™ DAB je namenjen za uporabo v protokolih ročnega ali avtomatiziranega imunohistokemijskega (IHC) barvanja za odkrivanje ciljnih antigenov v tkivih, fiksiranih s formalinom, v parafin (FFPE), kadar se uporablja v povezavi z ustreznim sistemom za odkrivanje in primarna protitelesa. Klinično interpretacijo kakršnega koli obarvanja ali njegove odsotnosti je treba dopolniti z morfološki študijami in ustreznimi kontrolami ter jo mora oceniti usposobljen patolog v kontekstu bolnikove klinične anamneze in drugih diagnostičnih testov.

Povzetek in razlaga:

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 pritrnitev. Ta izdelek je na voljo v dvokomponentnem sistemu, sestavljenem iz tekočega stabilnega DAB kromogena in substratnega pufru DAB. Barva mešanice kromogenega pufru se lahko spreminja od blede rjave do oranžne. Barva mešanice kromogenega pufru ne vpliva na lastnosti obarvanja. intelliPATH FLX™ DAB je formulacija, ki je zelo stabilna. intelliPATH FLX™ DAB je zasnovan za uporabo naintelliPATH FLX™ avtomatizirani barvalec.

Načelo postopka:

Ta kromogen DAB v kompletu za kromogen intelliPATH FLX™ DAB pri uporabi pri IHC testiranju tkivnih odsekov FFPE omogoča vizualizacijo antigenov z zaporedno uporabo specifično protitelo proti antigenu (primarno protitelo), sekundarno protitelo proti primarnemu protitelesu (neobvezno povezovalno protitelo/sonda), encimski 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 s pokrivnim stekelcem. Rezultati se interpretirajo z uporabo luči 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
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Rekonstitucija, mešanje, redčenje, titracija:

Kromogeni komplet intelliPATH FLX™ DAB je optimiziran za uporabo s protitelesi Biocare in pomožnimi reagenti in ga je treba razredčiti tik pred uporabo.

Mešanica na spletu: 120 µL kromogena DAB na 2000 µL pufru DAB. Če kromogen mešate brez povezave, uporabite isto razmerje. Delovna raztopina DAB je stabilna 5 dni. Delovno raztopino DAB shranjujte pri 2-8°C.

Znane aplikacije:

Imunohistokemija (tkiva, fiksirana s formalinom in parafinom)

Dobavljeno kot:

intelliPATH FLX™ DAB kromogen

DAB rešitev. Za dodatne podrobnosti glejte varnostni list.

medpomnilnik intelliPATH FLX™ 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)
Ksilen ali nadomestek ksilena
Etanol ali reagentni alkohol
Komora za razkrivanje* ali podoben lonček na pritisk (neobvezno)
Deionizirana ali destilirana voda
Pralni pufer*
Reagenti 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*
Pokrívno steklo
Svetlobni mikroskop (40-400-kratna povečava)

* Biocare Medical Products: Za informacije o kataloških številkah in naročanju 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 vial. Ne uporabljajte po preteku roka uporabnosti. Preveriti je treba shranjevanje pod kakršnimi koli pogoji, razen navedenih. Razredčene reagente je treba uporabiti takoj po navodilih. Biocare ni ugotovil stabilnosti uporabniško razredčenega reagenta.

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:

Tkiva fiksirana v formalinu so primerni za uporabo pred vgradnjo parafina. Kostna tkiva je treba pred obdelavo tkiva dekalificirati, da olajšamo rezanje tkiva in preprečimo poškodbe rezil mikrotoma.¹²

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 hraniti obarvana stekelca najmanj deset let od datuma pregledati in hraniti bloke vzorcev vsaj dve leti od datuma pregleda.¹³

Obdelava tkiv pred barvanjem:

Izvedite toplotno povzročeno pridobivanje epitopov (HIER) po priporočenem protokolu spodaj. Pokazalo se je, da rutinska uporaba HIER pred IHC zmanjšuje nedoslednost in standardizira barvanje.¹⁴

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Slovenian

BIOCARE
M E D I C A L

Opozorilo in previdnostni ukrepi:

1. Znano je, da je DAB rakotvorna 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 rokovanju, saj je DAB razvrščen kot nevaren in lahko povzroči raka ter obstaja sum, da povzroča genetske okvare.
5. S snovmi človeškega ali živalskega izvora ravnajte kot s potencialno biološko nevarnimi snovmi in jih odstranite z ustreznimi varnostnimi ukrepi. V primeru izpostavljenosti upoštevajte zdravstvene smernice pristojnih organov, kjer jih uporabljate.^{6,7}
6. Z vzorci pred in po fiksaciji ter z vsemi materiali, ki so jim izpostavljeni, je treba ravnati, kot da bi lahko prenašali okužbo, in jih odstraniti z ustreznimi varnostnimi ukrepi. Reagentov nikoli ne pipetirajte z usti 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 vode.⁸
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 pripravljene 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 ustrezne 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
	H341 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.

Splošni postopkovni koraki za izvajanje IHC:

1. Deparafinizacija: stekelca deparafinizirajte v Slide Brite ali ksilenu. Hidrat drsi v nizu razvrščenih alkoholov v vodo.
2. Peroxide Block: Blokiranje 5 minut s Peroxidazed 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 protitelo: Za čas inkubacije glejte ustrezn list s podatki o primarnih protitelesih.
6. Sonda (samo mišja protitelesa): Inkubirajte 5-15 minut pri sobni temperaturi z mišjo sondo 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 minuto. 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). 2011⁹

Pozitivna kontrola tkiva:

Materiali za zunanjo 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 zunanjo kontrolo tkiva za vsak niz testnih pogojev.

Tkiva, uporabljena za materiale za zunanjo pozitivno kontrolo, je treba izbrati iz bolnikovih vzorcev z dobro označenimi nizkimi ravnmi pozitivne ciljne aktivnosti, ki daje šibko pozitivno obarvanje. Nizka raven pozitivnosti za zunanjo pozitivno kontrolo je zasnovana tako, da zagotavlja odkrivanje subtilnih sprememb v občutljivosti primarnega protitelesa zaradi nestabilnosti ali težav z metodologijo IHC. Komercialno dostopna stekelca za kontrolo tkiva ali vzorci, obdelani drugače kot vzorec(-i) bolnika, potrjujejo 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 šteti 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.

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 antigena. 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 zaželeno alternativa prej opisanim negativnim kontrolam reagenta. Inkubacijsko obdobje za negativno kontrolo reagenta mora ustrezati obdobju primarnega protitelesa.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Slovenian

BIOCARE
M E D I C A L

Kadar se plošče z več protitelesi uporabljajo na serijskih odsekih, lahko negativno obarvana področja enega preparata služijo kot negativna/nepreciurna 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[®] za imunohistokemijo in/ali smernico NCCLS IHC¹. 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 barvanja:

Komplet intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit povzroči rjavo barvno reakcijo na mestih antigena, 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 uporabljene substratne kromogene. Za pričakovane barvne reakcije glejte navodila za embalažo substrata. Poleg tega lahko opazimo metakromazijo pri različnih metodah obarvanja.¹²

Ko se uporabi nasprotno barvanje, bo odvisno od dolžine inkubacije in moči uporabljenega nasprotnega barvanja povzročilo obarvanje celičnih jeder. 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 antigena 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 zunanji kontroli tkiva, je treba rezultate bolnikovega vzorca šteti 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. *Za in 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; izbira, 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 vdelahe ali inherentnih nepravilnosti v tkivu.¹⁴
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, morfološke 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 toplote, 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.
8. Ta izdelek ni namenjen uporabi v pretočni citometriji. Značilnosti delovanja za pretočno citometrijo niso bile določene.
9. Tkiva oseb, okuženih z virusom hepatitisa B in vsebujejo površinski antigen hepatitisa B (HBsAg), so lahko nespecifično obarvana s hrenovo peroksidazo.¹⁴
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 v novotvorbah ali drugih patoloških tkivih.¹⁵ 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 povzročijo tudi aktivnost psevdo peroksidaze (eritrociti), aktivnost endogene peroksidaze (citokrom C) ali endogeni biotin (npr. jetra, dojke, možgani, ledvice), odvisno od vrste uporabljenega imunskega barvanja.¹³

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Slovenian

BIOCARE
M E D I C A L

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 stekelcec ni obarvan – 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. Šibko obarvanje 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), endogena aktivnost 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 seruma ali kazeina).
4. Odrezki tkiv se med inkubacijo sperejo s stekelcev – Preverite stekelca, da zagotovite, da so pozitivno naelektrena.
5. Specifično barvanje je pretemno – Preverite protokol, da ugotovite, ali je bil na objektu stekelcu uporabljen ustrezen 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](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, Ashcavi 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 Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Spanish

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Uso previsto:

Para *in vitro* Uso diagnóstico

El kit de cromógeno intelliPATH FLX™ DAB está diseñado para usarse en protocolos de tinción de inmunohistoquímica (IHC) manuales o automatizados para la detección de antígenos 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 marrón pálido a naranja. Las propiedades de tinción no se ven afectadas por el color de la mezcla de tampón cromógeno. intelliPATH FLX™ DAB es una formulación muy estable. intelliPATH FLX™ DAB está diseñado para usarse en el intelliPATH FLX™ teñidor automatizado.

Principio de Procedimiento:

Este cromógeno DAB del kit de cromógeno DAB intelliPATH FLX™, cuando se utiliza en pruebas IHC de secciones de tejido FFPE, permite la visualización de antígenos mediante la aplicación secuencial de un anticuerpo específico contra el antígeno (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 antígeno. 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 Pueden no estar asociados con un antígeno en particular.

Materiales y métodos:

Reactivos proporcionados:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Reconstitución, mezcla, dilución, valoración:

El kit de cromógeno DAB intelliPATH FLX™ está optimizado para su uso con anticuerpos y reactivos auxiliares de Biocare y debe diluirse justo antes de su uso.

Mezcla en línea: 120 µL de cromógeno DAB por 2000 µL de tampón DAB. Si el cromógeno se mezcla fuera de línea, utilice la misma proporción. La solución de trabajo DAB es estable durante 5 días. Guarde la solución de trabajo DAB a 2-8°C.

Aplicaciones conocidas:

Inmunohistoquímica (tejidos incluidos en parafina y fijados con formalina)

Se suministra como:

Cromógeno DAB intelliPATH FLX™

Solución DAB. Consulte la Hoja de datos de seguridad para obtener detalles adicionales.

Búfer DAB intelliPATH FLX™

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)
Reactivo 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. Biocare no ha establecido la estabilidad del reactivo diluido por el usuario.

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.

Preparación de espécimen:

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 micrótopo.^{1,2}

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".³

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Spanish

BIOCARE
M E D I C A L

Tratamiento de tejidos antes de la tinción:

Realice la recuperación de epítomos 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.^{4,5}

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.^{6,7}
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 pipetee 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.⁸
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 aplicable 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) n° 1272/2008.

Peligro	Código	Indicación de peligro
	H341 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 variarán 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 alcoholes 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 ratón o 30 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. Contratinción: Contratinción 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). 2011*

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 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Spanish

BIOCARE
M E D I C A L

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. 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 inmunoreactividad 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,¹⁰ para inmunohistoquímica y/o la guía NCCLS IHC¹¹. 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 intelliPATH FLX™ 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.¹²

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 inmunoreactividad 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; 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.¹⁴
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

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Spanish

BIOCARE
M E D I C A L

- 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.
- Este producto no está diseñado para usarse en citometría de flujo. No se han determinado las características de rendimiento para la citometría de flujo.
 - 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.¹⁴
 - 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.¹⁵ 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.
 - 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.
 - 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.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:

- 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.
- Tinción débil de todos los portaobjetos: verifique que se hayan utilizado tejido de control positivo, anticuerpos y productos de detección adecuados.
- 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 bloque de peroxidasa) o un exceso de interacción proteica no específica (use una proteína) bloqueante, como una solución bloqueadora a base de suero o caseína).

- Las secciones de tejido se lavan de los portaobjetos durante la incubación. Revise los portaobjetos para asegurarse de que estén cargados positivamente.
- 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:

- Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. New York: Pergamon Press 1981.
- Sheehan DC and Hrapchak BB. *Theory and Practice of Histotechnology*. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
- Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
- Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. *J Histotechnol*. 1999 Sep;22(3):177-92.
- Taylor CR, et al. *Biotech Histochem*. 1996 Jan;71(5):263-70.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- 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.
- 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.
- 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
- College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. <http://www.cap.org> (800) 323-4040.
- 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.
- 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.
- Nadji M, Morales AR. *Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls*. *Lab Med* 1983; 14:767.
- 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.
- Herman GE and Elfont EA. *The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control*. *Biotech & Histochem* 1991; 66:194.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Swedish

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Avsedd användning:

För *in vitro* Diagnostisk användning

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit är avsett för användning i antingen manuella eller automatiserade immunhistokemi (IHC) färgningsprotokoll för detektering av målantigener i formalinfixerade, paraffinbäddade (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' diaminobesidin (DAB) är en väletablerad kromogen som används i IHC-färgningsprotokoll som i närvaro 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 ljusbrun till orange. Färgningsegenskaperna påverkas inte av färgen på kromogenbuffertblandningen. intelliPATH FLX™ DAB är en formulering som är mycket stabil. intelliPATH FLX™ DAB är designad för att användas på intelliPATH FLX™ automatisk färgare.

Procedurprincip:

Denna DAB-kromogen i intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit, när den används i IHC-testning av FFPE-vävnadsnitt, möjliggör visualisering av antigener 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 aktiveringen 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 differentialdiagnostik av patofysiologiska processer, som kan eller kanske inte är associerad med ett visst antigen.

Material och metoder:

Reagens som tillhandahålls:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Rekonstitution, blandning, spädning, titrering:

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit är optimerat för användning med Biocare-antikroppar och hjälpreagenser och måste spädas ut precis före användning.

On-line-blandning: 120 µL DAB-kromogen per 2000 µL DAB-buffert. Om kromogen blandas offline, använd samma förhållande. DAB-arbetslösningen är stabil i 5 dagar. Förvara DAB-arbetslösningen vid 2-8°C.

Kända applikationer:

Immunhistokemi (formalinfixerade paraffinbäddade vävnader)

Levereras som:

intelliPATH FLX™ DAB kromogen

DAB-lösning. Se säkerhetsdatabladet för ytterligare information.

intelliPATH FLX™ DAB-buffert

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 xylenersättning
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
Ljuskroskop (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. Utspädda reagenser ska användas omedelbart enligt instruktionerna. Stabiliteten för användarens utspädda reagens 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 att använda före paraffinbäddning. Ossös vävnad bör avkalkas före vävnadsbearbetning för att underlätta vävnadsskärning och förhindra skador på mikrotombladen.^{1,2}

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."³

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.^{4,5}

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Swedish

BIOCARE
M E D I C A L

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.^{6,7}
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.⁸
7. Mikrobiell kontaminering 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
	H341 H350	Misstänks orsaka genetiska defekter Kan orsaka cancer

Användningsinstruktioner:

Kromogenkitetsreagenserna 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 antikropsprotokoll 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 objektglaset i Slide Brite eller xylene. Hydrera objektglaset i en serie graderade alkoholer till vatten.
2. Peroxidblock: Blockera i 5 minuter med Peroxidazed 1.
3. Förbehandlingslösning/-protokoll: Se respektive primär antikropsdatablad 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 immunhistokemianalys; Godkänd guideline-andra upplagan (I/LA28-A2) CLSI Wayne, PA USA (www.clsi.org). 2011⁹

Positiv vävnadskontroll:

Extern positivt kontrollmaterial bör vara färskt 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 färgningskörning.

De vävnader som används för de externa positiva kontrollmaterialen bör väljas från patientprover med välkarakteriserade låga nivåer av den positiva målaktiviteten 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. Kommerciellt 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 hjälpmedel 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 färgningskörning för att verifiera specificiteten hos den primära IHC-antikroppen för demonstration av målantigenet 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 specifikationer. Typer och källor för prover som kan användas för negativ vävnadskontrollerna 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 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 med 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Swedish

BIOCARE
M E D I C A L

När paneler med flera antikroppar används på seriella snitt, kan de negativt färgande områdena på ett objektglas fungera som en negativ/ickespecifik 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.

Analysverifiering:

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 produktbilagan och till kvalitetskontrollrekommendationerna i CAP Certification Program[®] för immunhistokemi och/eller NCCLS IHC-riktlinje¹¹. Dessa kvalitetskontrollprocedurer bör upprepas för varje nytt antikroppsparti, eller närhelst det sker en förändring i analysparametrarna. Vävnader listade i avsnittet Prestandaegenskaper är lämpliga för analysverifiering.

Felsökning:

Följ de antikroppsspecifika protokollrekommendationerna enligt databladet som tillhandahålls. Om atypiska resultat uppstår, kontakta Biocares tekniska support på 1-800-542-2002.

Tolkning av färgning:

IntelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit producerar en brun färgreaktion vid antigenställena lokaliserade 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.¹²

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 målantigenet med den primära antikroppen. Frånvaron av specifik färgning i den negativa vävnadskontrollen bekräftar avsaknaden av antikroppskorsreaktivitet 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 Sammanfattning och förklaring, begränsningar och prestandaegenskaper för specifik information om indikerad antikroppsimmunreaktivitet.

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 valet 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, uppvärmning, sektionering eller kontaminering med andra vävnader eller vätskor kan ge artefakter, antikroppsfångning eller falskt negativa resultat. Inkonsekventa resultat kan bero på variationer i fixerings- och inbäddningsmetoder, eller på inneboende oregelbundenheter i vävnaden.¹⁴
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 korrekta 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, värmeåtervinningsmetod, inkubationstider, antikroppsspädning, 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.
9. Vävnader från personer infekterade med hepatit B-virus och som innehåller hepatit B-ytantigen (HBsAg) kan uppvisa ospecifik färgning med pepparrotsperoxidas.¹⁴
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.¹⁵ 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 blockeringssteg 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 (erythrocyter), endogen peroxidaktivitet (cytokrom C) eller endogent biotin (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure) beroende på vilken typ av immunfärgning som används.¹³

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Swedish

BIOCARE
M E D I C A L

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 hjälp av protokoll som tillhandahålls i de antikroppsspecifika 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 erhöles 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 endogen biotin (om du använder biotinbaserade detektionsprodukter), endogen HRP-aktivitet som omvandlar kromogen till färgad slutprodukt (använd peroxidblock) eller överskott av icke-specifik 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 antikropstiter applicerades på objektglasen, 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. AmJ 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.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Turkish

BIOCARE
M E D I C A L

Available Product Formats	
Catalog Number	Volume
IPK5010G80	80 mL, kit

Kullanım amacı:

İçin laboratuvar ortamında Tanısal Kullanım

intelliPATH FLX™ DAB Kromojen Kitinin, uygun tespit sistemi ve birincil antikorlar. 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 peroksidaz (HRP) enziminin varlığında organik solventlerde çözünmeyen kahverengi bir çökelti üreten ve kalıcı bir montaj ortamı ile lamellenebilen köklü bir kromojendir. Bu ürün, sıvı stabil bir DAB kromojeni ve bir DAB substrat tamponundan oluşan iki bileşenli bir sistemle gelir. Kromojen tampon karışımının rengi soluk kahverengiden turuncuya kadar değişebilir. Boyama özellikleri kromojen tampon karışımının renginden etkilenmez.intelliPATH FLX™DAB çok stabil bir formülyasyondur.intelliPATH FLX™DAB, kullanılmak üzere tasarlanmıştır.intelliPATH FLX™otomatik boyama makinesi.

Prosedür Prensipleri:

intelliPATH FLX™ DAB Kromojen Kitindeki bu DAB kromojeni, FFPE doku kesitlerinin IHC testinde kullanıldığında, bir antijene spesifik antikor (birincil antikor), birincil antikora ikincil bir antikor (isteğe bağlı bağlantı antikor/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 lamel ile kaplanabilir. Sonuçlar bir ışık kullanılarak yorumlanabilir veya patofizyolojik süreçlerin ayırıcı tanısında yardımcı olabilir. belirli bir antijenle ilişkili olmayabilir.

Malzemeler ve yöntemler:

Sağlanan Reaktifler:

Kit Catalog No.	Component Catalog No.	Component Description	Quantity x Volume
IPK5010G80	IPC5008G3	intelliPATH FLX™ DAB Chromogen	2 x 3 mL
	IPBF5009G20	intelliPATH FLX™ DAB Buffer	4 x 20 mL

Sulandırma, Karıştırma, Seyreltme, Titrasyon:

intelliPATH FLX™ DAB Kromojen Kiti, Biocare antikorları ve yardımcı reaktiflerle kullanım için optimize edilmiştir ve kullanımdan hemen önce seyreltilmesi gerekir.

Çevrimiçi Karışım: 2000 µL DAB Tamponu başına 120 µL DAB Kromojen. Kromojen çevrimdışı olarak karıştırılıyorsa aynı oranı kullanın. DAB çalışma çözümü 5 gün boyunca stabildir. DAB çalışma solüsyonunu 2-8°C'de saklayın.

Bilinen Uygulamalar:

İmmünohistokimya (formalinle sabitlenmiş parafine gömülü dokular)

Şu Şekilde Sağlanır:

intelliPATH FLX™ DAB Kromojen

DAB çözümü. Ek ayrıntılar için Güvenlik Veri Sayfasına bakın.

intelliPATH FLX™ DAB Arabelleği

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)
Deiyonize veya damıtılmış su
Yıkama tamponu*
Ön arıtma reaktifleri* (isteğe bağlı)
Enzim sindirimi* (isteğe bağlı)
Peroksidaz bloğu*
Protein bloğu* (isteğe bağlı)
Birincil antikor*
Negatif kontrol reaktifleri*
Tespit kitleri*
Hematoksilen* (karşı boya)
Mavileştirme reaktif*
Montaj ortamı*
Lamel camı
Işık Mikroskobu (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 Stabiliteler:

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 kullanmayınız. Belirtilenlerin dışındaki koşullar altında depolama doğrulanmalıdır. Seyreltilmiş reaktifler talimat verildiği şekilde derhal kullanılmalıdır. Kullanıcı tarafından seyreltilen reaktifin stabilitesi Biocare tarafından belirlenmemiştir.

Pozitif ve negatif kontroller tüm hasta örnekleriyle aynı anda çalıştırılmalıdır. Laboratuvar prosedürlerindeki değişikliklerle açıklanamayan beklenmedik bir lekelenme gözlemlenirse ve antikorla ilgili bir sorundan şüpheleniliyorsa, 1-800-542-2002 numaralı telefonla veya biocare.net adresine sağlanan teknik destek bilgileri aracılığıyla Biocare Teknik Desteğiyle iletişime geçin.

Numune hazırlama:

Formalinle sabitlenen dokular Parafine gömülmeden önce kullanıma uygundur. Doku kesmeyi kolaylaştırmak ve mikrotom bıçaklarının zarar görmesini önlemek için doku işlemeden önce kemik dokuların kireçten arındırılması gerekir.^{1,2}

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."³

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 indirildiği ve boyamayı standartlaştırdığı gösterilmiştir.^{4,5}

Uyarı ve Önlemler:

- DAB'nin kanserojen olduğundan şüphelenildiği bilinmektedir.
- DAB bileşenlerini güçlü ışığa veya doğrudan güneş ışığına maruz bırakmayın
- DAB ciltte hassasiyete neden olabilir. Cilt ve gözlerle temasından kaçının.

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Turkish

BIOCARE
M E D I C A L

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 uyun.^{6,7}
6. Tespitten önce ve sonra numuneler ve bunlara maruz kalan tüm materyaller, enfeksiyon bulaştırılabilecekmiş gibi kullanılmalı ve uygun önlemler alınarak imha edilmelidir. Reaktifleri asla ağız yoluyla pipetlemeyin ve reaktiflerin ve numunelerin cilt ve mukoza zarlarına temasından kaçınin. Reaktifler veya numuneler hassas alanlarla temas ederse bol miktarda suyla yıkayın.⁸
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 gerekir.
9. Reaktif şişenin üzerinde yazılı olan son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
10. Mikro polimer saptama kiti reaktif(ler)i optimize edilmiştir ve Biocare antikoları ve yardımcı reaktiflerle kullanıma hazırdır. Önerilen protokoller ve kullanım koşulları için birincil antikor ve diğer yardımcı reaktif talimatlarına bakın.
11. Bertaraf yöntemi için yerel ve/veya resmi makamların gerekliliklerine uyun.
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
	H341 H350	Genetik kusurlara neden olduğundan şüpheleniliyor Kansere neden olabilir

Kullanım için talimatlar:

Kromojen kit reaktifleri Biocare antikoları ve yardımcı reaktiflerle kullanım için optimize edilmiştir. Önerilen protokoller ve kullanım koşulları için birincil antikor ve diğer yardımcı reaktif talimatlarına bakın. Kuluçka süreleri ve sıcaklıkları, takip edilen spesifik antikor protokolüne bağlı olarak değişecektir.

Otomatik bir boyama aleti kullanırken, çalıştırma 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 alkolle suya hidratlayın.
2. Peroksit Bloku: Peroxidazed 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 antikoları): MACH 4 Fare Probu ile oda sıcaklığında 5-15 dakika inkübe edin.
7. Polimer: Fare antikoları için 10-20 dakika veya tavşan antikoları 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 karşıt boyama. Deiyonize su ile durulayın. Tacha'nın Bluing Solüsyonunu 1 dakika boyunca uygulayın. Deiyonize 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). 2011⁹

Pozitif Doku Kontrolü:

Harici pozitif kontrol materyalleri, hasta numunesi/numuneleri ile aynı şekilde mümkün olan en kısa sürede sabitlenmiş, işlenmiş ve gömülmüş taze numunelerden oluşmalıdır. Pozitif doku kontrolleri, doğru hazırlanmış dokuların ve uygun boyama tekniklerinin göstergesidir. Her boyama işlemine, her test koşulu seti için bir pozitif dış doku 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 doku hazırlığını doğrulamaz.

Bilinen pozitif doku kontrolleri, hasta örneklerine yönelik spesifik bir teşhis formüle edilmesinde 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 gömülmüş bir negatif doku kontrolü kullanın. hedef antijenin gösterilmesi ve spesifik arka plan boyamasının bir göstergesinin sağlanması (yanlış pozitif boyama). Ayrıca çoğu doku kesitinde mevcut olan farklı hücre tiplerinin çeşitliliği, IHC'nin performansını doğrulamak için laboratuvarcı tarafından dahili negatif kontrol alanları olarak kullanılacaktır özellikler. Negatif doku için kullanılacak örnek türleri ve kaynakları kontroller Performans Özellikleri bölümünde listelenmiştir.

Negatif doku kontrolünde spesifik boyama (yanlış pozitif boyama) meydana gelirse hasta numuneleriyle elde edilen sonuçlar geçersiz sayılmalıdır.

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 verin. İdeal olarak bir negatif reaktif kontrolü, birincil antikorla aynı şekilde kullanılacak üzere üretilmiş ve hazırlanmış (yani aynı seyreltici kullanılarak aynı konsantrasyona seyreltilmiş) bir antikor içerir ancak aynı matris/çözelti içinde insan dokularıyla spesifik bir reaktivite sergilemez. birincil antikor. Tek başına seyreltici, 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 bölümlerde birkaç antikordan oluşan paneller kullanıldığında, bir slaydın negatif boyama alanları, diğer antikolar için negatif/spesifik olmayan bağlanma arka planı kontrolü görevi görebilir. Endojen enzim aktivitesini veya enzimlerin spesifik olmayan bağlanmasını spesifik immünoreaktiviteden ayırt etmek için, ilave hasta dokuları sırasıyla substrat-kromojen veya enzim

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Turkish

BIOCARE
M E D I C A L

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, antikorun 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.¹⁰ İmmünohistokimya ve/veya NCCLS IHC kılavuzu için¹¹. 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:

intelliPATH FLX™ DAB Kromojen Kiti, birincil antikor tarafından lokalize edilen antijen bölgelerinde kahverengi renkli bir reaksiyon üretir. Hasta sonuçlarının yorumlanmasından önce kontrollerin boyanması yetkili bir patolog tarafından değerlendirilmelidir. Negatif kontroller değerlendirilir ve gözlemlenen herhangi bir lekelenmenin spesifik olmayan etkileşimlerin sonucu olmadığından emin olmak için boyalı slaytlarla karşılaştırılır.

Pozitif Doku Kontrolü:

Belirtilen antikora 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. Beklenen renk reaksiyonları için alt tabaka paketindeki eklere bakın. Ayrıca boyama yönteminin varyasyonlarında metakromazi gözlemlenebilir.¹²

Bir karşıt boyama kullanıldığında, kuluçka süresine ve kullanılan karşıt boyamanın gücüne bağlı olarak karşıt boyama, hücre çekirdeklerinin renklenmesine neden olacaktır. Aşırı veya eksik karşıt boyama, sonuçların doğru şekilde yorumlanmasını tehlikeye atabilir. Önerilen karşıt 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/hücre sel bileşenlere 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 görünüme sahiptir. Aşırı formalinle fikse edilmiş dokulardan alınan kesitlerde ara sıra bağ dokusunda lekelenme de gözlemlenebilir. Boyama sonuçlarının yorumlanması için sağlam hücreleri kullanın. Nekrotik veya dejeneren hücreler sıklıkla spesifik olmayan bir şekilde boyanır.

Hasta Dokusu:

Belirtilen antikora boyanmış hasta numunelerini inceleyin son. Pozitif boyama yoğunluğunda, 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.

Belirtilen antikor immünoreaktivitesi ile ilgili spesifik bilgiler için Özet 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 seçiminde özel eğitimden oluşan çok adımlı bir teşhis sürecidir; doku seçimi, fiksasyonu ve işlenmesi; IHC slaytının hazırlanması; ve boyama sonuçlarının yorumlanması.
3. Sadece doktor reçetesi 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 sıvıların kontaminasyonu; artefaktlara, antikor sıkışmasına veya yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. Tutarsız sonuçlar, sabitleme ve gömme yöntemlerindeki farklılıklara veya doku içindeki doğal düzensizliklere bağlı olabilir.¹⁴
5. Aşırı veya eksik karşıt boyama, sonuçların doğru şekilde yorumlanmasını tehlikeye 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 aşina 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 seyreltmesi, 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 protokolleri Biocare ürünlerinin özel kullanımına dayanmaktadır. Sonuçta optimal koşulları belirlemek araştırmacının sorumluluğundadır.
8. Bu ürünün akış sitometrisinde kullanılması amaçlanmamıştır. Akış sitometrisi için performans özellikleri belirlenmemiştir.
9. Hepatit B virüsü ile enfekte olmuş ve hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) içeren kişilerden alınan dokular, yaban turpu peroksidazıyla spesifik olmayan boyama sergileyebilir.¹⁴
10. Reaktifler daha önce test edilmemiş dokularda beklenmeyen reaksiyonlar gösterebilir. Test edilen doku gruplarında bile beklenmeyen reaksiyonların olasılığı, neoplazmalarda veya diğer patolojik dokularda antijen ekspresyonunun biyolojik değişkenliği nedeniyle tamamen ortadan kaldırılamaz.¹⁵ 1-800-542-2002 numaralı telefondan veya biocare.net'te sağlanan teknik destek bilgileri aracılığıyla, belirlenmiş beklenmeyen reaksiyon(lar)la birlikte Biocare'in Teknik Desteğiyle iletişime geçin.
11. Blokama adımlarında kullanılan ikincil antiserumlarla aynı hayvan kaynağından alınan normal/immün olmayan serumlar, otoantikolar veya doğal antikorlar nedeniyle yanlış negatif veya yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir.
12. Proteinlerin veya substrat reaksiyon ürünlerinin immünojenik olmayan bağlanması nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar görülebilir. Ayrıca kullanılan immün boyanın türüne bağlı olarak yabancı peroksidaz aktivitesi (eritrositler), endojen peroksidaz aktivitesi (sitokrom C) veya endojen biyotin (örn. karaciğer, meme, beyin, böbrek) nedeniyle de kaynaklanabilir.¹³
13. Negatif bir sonuç, incelenen hücrelerde veya dokuda antijenin bulunmadığı değil, antijenin tespit edilemediği anlamına gelir.

Ürüne Özel Sınırlamalar:

Ürüne özel ek sınırlama yok

intelliPATH FLX™ DAB Chromogen Kit

Chromogen
901-IPK5010-102723

Turkish

BIOCARE
M E D I C A L

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 üretilebilirlik:

Biocare'in tespit sistemlerinin ve sistem reaktiflerinin tekrar üretilebilirliği, çeşitli reaktif lotlarının çeşitli operatörler, analistler, reaktif lotları, doku numuneleri ve ekipmanlar kullanılarak uzun bir süre boyunca test edildiği orta düzeyde hassasiyet ölçümüyle doğrulanır. Değerlendirilen her tespit reaktif için elde edilen boyama tutarlıydı ve beklendiği gibi yapıldı.

Sorun giderme:

- Hiçbir slaytta lekelenme yok – Uygun pozitif kontrol dokusunun, antikorun ve tespit ürünlerinin kullanıldığını belirlemek için kontrol edin. Balmumunun eksik veya uygunsuz şekilde çıkarılması veya ön tedavisinin yapıp yapılmadığını kontrol edin.
- Tüm slaytların zayıf boyanması – Uygun pozitif kontrol dokusunun, antikorun ve tespit ürünlerinin kullanıldığını belirlemek için kontrol edin.
- Tüm slaytların aşırı arka planı – Yüksek seviyelerde endojen biyotin (biyotin bazı tespit ürünleri kullanılıyorsa), kromojeni renkli son ürüne dönüştüren endojen HRP aktivitesi (peroksidaz bloğu kullanın) veya aşırı spesifik olmayan protein etkileşimi (bir protein kullanın) olabilir serum veya kazein bazı bloke etme solüsyonu gibi blokaj).
- Doku bölümleri inkübasyon sırasında slaytları yıkar – Pozitif yüklü olduklarından emin olmak için slaytları kontrol edin.
- 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, kuluçka adımları tamamlandıktan sonra fazla reaktifleri çıkarmak için protokolün yeterli yıkama adımına sahip olduğundan emin olun.

Referanslar:

- Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
- Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
- Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 FR 7163, February 28, 1992.
- Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. J Histotechnol. 1999 Sep;22(3):177-92.
- Taylor CR, et al. Biotech Histochem. 1996 Jan;71(5):263-70.
- Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
- 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.
- 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.
- 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
- College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry. Northfield IL. Http://www.cap.org (800) 323-4040.
- 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.
- 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.
- Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767.

- 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.
- Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. Biotech & Histochem 1991; 66:194.