

## Obecné pokyny Pro imunohistochemické barvení

### Použití

K diagnostice in vitro.

Tyto pokyny platí pro imunohistochemické reagenty od společnosti Dako. Mohou, avšak nemusejí platit pro výrobky obsažené v této dodávce.

Protilátky Dako jsou určeny k laboratornímu použití ke kvalitativní identifikaci antigenů na buňkách nebo v buňkách z tkáňových nebo buněčných vzorků prostřednictvím světelné mikroskopie. Pozitivní a negativní výsledky napomáhají klasifikaci normálních a abnormálních buněk a tkání a slouží jako doplněk konvenční histopatologie. Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněna morfoloickými a histologickými studii s řádnými kontrolami. Hodnocení musí v kontextu klinické anamnézy pacienta a jiných diagnostických testů provádět kvalifikovaný patolog. obraťte se na technickou podporu společnosti Dako a nahláste jakékoli neobvyklé zbarvení.

### Princip metody

Protilátky Dako lze používat jako primární protilátky s různými imunohistochemickými (IHC) metodami včetně metod využívajících značený streptavidin-biotin (LSAB<sup>TM</sup>+ a Dako LSAB<sup>TM</sup>2), značený polymer a vylepšené polymerové systémy EnVision<sup>TM</sup>, EnVision<sup>TM</sup>+, EnVision<sup>TM</sup> FLEX a FLEX+, EnVision<sup>TM</sup> G|2, EnVision<sup>TM</sup> G|2 Doublestain, ADVANCE<sup>TM</sup>, Dako REAL<sup>TM</sup> a katalyzovanou amplifikaci signálu (CSA) pro průkaz antigenů v tkáňových / buněčných vzorcích. Metody IHC barvení obecně zahrnují demaskování a vizualizaci antigenů předběžným zpracováním proteolytickými enzymy nebo tepelným vyhledáváním (pokud je zapotřebí), po němž následuje postupná aplikace specifické protilátky proti antigenu (primární protilátky), sekundární protilátky proti primární protilátce (spojovací protilátka nebo značený polymer), komplexu enzymů a chromogenního substrátu, která je proložena kroky promývání. Enzymatická aktivace chromogenu způsobuje vznik viditelného produktu reakce v místě antigenu. Vzorek pak lze obarvit kontrastním barvivem a zakrýt krycím sklíčkem. Kvalifikovaný patolog pak výsledky prohlíží světelným mikroskopem a interpretuje, čímž napomáhá v diagnostice patofyziologických procesů, které mohou, avšak nemusejí, souviset s určitým antigenem. (1-4)

### Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

Barvicí reagenty, například reagenty dodávané v systémech Dako EnVision<sup>TM</sup>, EnVision<sup>TM</sup>+, EnVision<sup>TM</sup> G|2, EnVision<sup>TM</sup> G|2 Doublestain, EnVision<sup>TM</sup> FLEX, Dako REAL<sup>TM</sup> LSAB (detekční systémy využívající peroxidázu a alkalickou fosfatázu), Dako LSAB<sup>TM</sup>+, Dako LSAB<sup>TM</sup>2 a systémech Artisan Staining Systems a také ředící roztoky Dako Antibody Diluents a reagenty pro negativní kontrolu. Určité protilátky mohou vyžadovat citlivější detekční systém, například EnVision<sup>TM</sup> FLEX+, ADVANCE<sup>TM</sup>, CSA nebo CSA II. U svého distributora ověřte, zda jsou výrobky k dispozici.

Další potřebné materiály, které se nedodávají, zahrnují vybavení, chemikálie a pomocné předměty. Vybavení zahrnuje světelný mikroskop, barvicí nádoby nebo automatizovaný systém pro imunohistochemické barvení od společnosti Dako, časový spínač (umožňující intervaly 3–40 minut) a stříčky. Chemikálie zahrnují hydroxid amonný 15 mol/L naředěný na 0,037 mol/L, kontrastní barvivo, např. hematoxylin, destilovanou vodu, etanol (absolutní a 95 %) a xylene nebo substituty xylenu. Pomocné předměty mohou zahrnovat absorpční utěrky; kontrolní tkáň (pozitivní a negativní); krycí sklíčka, vodné montážní médium a nebo bezvodé permanentní montážní médium a podložní skla, nabitá, poly-L-lysinem potažená nebo silanizovaná podložní skla. Mohou být zapotřebí další pomocné předměty, včetně podložních skel s kontrolními vzorky. Výrobky společnosti Dako zahrnují cílové vyhledávací (demaskovací) roztoky; roztoky pro ředění protilátek; blokovací reagenty; kontrastní barviva; proteolytické enzymy; chromogenní substráty pro peroxidázu a alkalickou fosfatázu; promývací pufové roztoky; PAP Pen; vodná montážní média; silanizovaná skla Silanized Slides; a podložní skla s kontrolními vzorky. Informace o většině nejnovějších výrobků naleznete na webových stránkách společnosti Dako, v katalogu společnosti Dako nebo se obraťte přímo na společnost Dako.

### Skladování

Protilátky pro IHC od společnosti Dako je nutno skladovat podle podmínek podrobně popsanych v příslušných specifičních listech. Pokud používáte neředěnou (koncentrovanou), nekonjugovanou protilátku, lze ji rozdělit na alikvótní podíly o vhodných objemech a zmrazit na -20 °C. Používáte-li protilátku, která byla zmrazena, nezmrazujte ji opakovaně. Zmrazené protilátky lze skladovat v malých alikvótních podílech, dokud nebudou při pravidelném ověřování testu zjištěny nepřijatelné změny reaktivity. (Viz Kontrola kvality, část Ověření testu.) Čerstvě naředěné roztoky protilátky je nutno připravovat před použitím. Nevyužité podíly připravených protilátek je nutno zlikvidovat v souladu s místními zdravotními a bezpečnostními předpisy. Stabilitu naředěných protilátek musí ověřit uživatel. Jednotlivé protilátky jsou vhodné pro použití do data expirace vytištěného na štítku výrobku, pokud jsou skladovány při 2–8 °C.

Žádné viditelné známky nenaznačují zhoršení kvality IHC reagentů. Proto je nutno provádět pozitivní a negativní kontroly současně s pacientovými vzorky. Pokud zpozorujete neočekávané zbarvení, které nelze vysvětlit změnami laboratorních postupů, a máte podezření, že se jedná o problém s protilátkou, obraťte se na technickou podporu společnosti Dako.

Nepoužívejte výrobky po datu expirace. Pokud se reagenty skladují za jakýchkoli jiných podmínek, než jaké jsou uvedeny v příbalovém letáku, musí uživatel provést jejich kontrolu. (5)

Přítomnost zákalu nebo sraženiny v reagentu může být známkou zhoršení kvality reagentu v důsledku ztráty titru protilátky nebo růstu bakterií. Pozitivní a negativní kontroly je nutno provádět vždy současně se vzorky pacienta, aby byla zjištěna jakákoli ztráta titru nebo citlivosti. Pokud zpozorujete neočekávané zabarvení, které nelze vysvětlit změnami laboratorních postupů, a máte podezření, že se jedná o problém s protilátkou, obraťte se na technickou podporu společnosti Dako.

## Příprava vzorků

Před IHC barvením musí být tkáň nejprve fixována a zpracována. Fixace zabráňuje autolýze a nekróze vyříznutých tkání, zachovává antigenitu, zvyšuje index lomu částí tkáň a odolnost prvků buňky vůči zpracování tkáně. Zpracování tkáně zahrnuje dehydrataci, odstranění dehydratačních činidel, infiltraci zalévacího média, zalití a řezání tkání. Nejběžnější fixativa pro IHC tkáňové preparáty jsou popsána níže.

Toto jsou pouze obecné pokyny. Optimální postupy musí stanovit a ověřit uživatel. Konkrétní informace ohledně fixace a zpracování tkání naleznete v referencích 1 a 6. Seznamte se s místními zdravotními a bezpečnostními předpisy.

### Tkáň zalitá v parafínu

#### *Obecné poznámky*

Nejběžnějším fixativem je 10 % (v/v) formalin pufrovaný neutrálním fosfátem (v EU běžně označovaný jako 4 % w/v pufrovaný formalin), avšak detekční systémy Dako (uvedené v části „Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky“) se úspěšně používají s tkáněmi zpracovanými různými fixativy. Proto volba fixativa závisí na omezeních primární protilátky a omezeních platných v instituci nebo laboratoři uživatele.

Přežití tkáňových antigenů pro imunohistochemické barvení může záviset na typu a koncentraci fixativa, na době fixace a na velikosti vzorku tkáně, který bude fixován. (7) Je důležité dodržovat pokud možno optimální, standardizované podmínky fixace, abychom dosáhli reprodukovatelného zabarvení. Doporučuje se používat pokud možno tenčí vzorky a kratší doby fixace. Příliš dlouhé vystavení vlivu fixativ může způsobit zamaskování, poškození nebo zničení antigenů, což může přispět k redukci imunohistochemického zabarvení. Zenkerův roztok, B-5 a Bouinův roztok se často doporučují jako alternativní fixativa pro konzervaci tkáňových antigenů citlivých na běžnou fixaci formalinem (10 % neutrálním pufrovaným formalinem). (8, 9) Další informace o fixaci tkáně naleznete v referencích 1 a 6, v příbalových letáčích k primárním protilátkám a v protokolech dodávaných s fixačními reagenty.

#### *Fixace tkáně v roztoku formaldehydu (neutrální pufrovaný formalin a Bouinův roztok)*

Většina formaldehydových fixativ obsahuje 10 % formalin, neutrální sůl pro zachování tonicity a pufrovaný systém pro zachování pH. Tato fixativa jsou tkáněmi dobře tolerována a vykazují dobrou histologickou penetraci. U špatně fixovaných a zalitých vzorků tkání však může docházet ke smršťování nebo deformaci tkáně. Fixujte malé bločky tkáně (10,0 x 10,0 x 3,0 mm) v 5–10 mL neutrálního pufrovaného roztoku po dobu 24 hodin. Bouinův roztok je alternativní formaldehydové fixativum, které obsahuje kyselinu pikrovou a je vhodné k použití pro všechny tkáně kromě ledviny. Vzorky lze fixovat 1 až 12 hodin v závislosti na tloušťce tkáně. Příliš fixované tkáně se stávají křehkými a vzhled a množství lipidů jsou nepříznivě ovlivněny. Fixaci dokončete promýváním 70 % etanolem, aby před vodnými lázněmi došlo ke sražení rozpustných pikrátů.

#### *Fixativa obsahující chlorid rtuťnatý (B-5 a Zenkerův roztok)*

Fixativa s chloridem rtuťnatým, například B-5 a Zenkerův roztok, často obsahují neutrální sůl pro zachování tonicity a lze je míchat s jinými fixativy. Fixativa s chloridem rtuťnatým se obecně vyznačují špatnou histologickou penetrací a nejsou dobře tolerována vzorky tkání. Proto se doporučují menší bločky tkáně (7,0 x 7,0 x 2,5 mm) a kratší doby fixace (1 až 6 hodin pro B-5 a 2 až 15 hodin pro Zenkerův roztok). Po fixaci je nutno bločky tkání dobře opláchnout vodou a vložit do 70 % etanolu za účelem mokrého skladování nebo do doby, než bude možné dokončit zpracování tkáně. Fixaci dokončete zpracováním tkáně a zalitím do parafínu (viz část Zpracování a zalití do parafínu). Před imunohistochemickým barvením očistěte pomocí roztoku jódu / etanolu / thiosíranu sodného řezy tkání od usazenin rtuti. (10) Při manipulaci s reagenty obsahujícími sloučeniny rtuti dodržujte nezbytná bezpečnostní opatření.

#### *Fixace tkáně v etanolu*

Etanol se v důsledku své špatné penetrační schopnosti nepoužívá často jako fixativum pro běžné histologické metody. Malé kousky tkáně se však fixují velmi rychle a vykazují dobrou cytologickou konzervaci. Fixujte bločky tkání (5,0 x 5,0 x 2,0 mm) v absolutním alkoholu po dobu 48 hodin při pokojové teplotě (20–25 °C) a následně dvěma 1hodinovými lázněmi v čerstvém xylenu a dvěma 1hodinovými lázněmi v kapalném parafínu. Po infiltraci parafínu proveďte zalití.

#### *Zpracování a zalití do parafínu*

Po fixaci lze zpracování dokončit zařízením pro automatické zpracování tkání. Tkáň se dehydratují odstupňovanými alkoholy, čistí xylemem nebo substitutem xylenu a infiltrují parafínem. Tkáň se potom zalévá parafínem do forem nebo kazet, což usnadňuje řezání tkání. Aby byla denaturace antigenů minimální, nevystavuje tkáň při zpracování teplotám nad 60 °C. Bločky tkáně lze po zalití skladovat nebo rozřezat. Řádně fixované a v parafínu zalité tkáně vydrží neomezeně dlouhou dobu, pokud jsou skladovány na chladném místě.

Podložní skla s řezy tkání zalitými v parafínu lze uchovávat 1–3 roky, pokud jsou skladovány při teplotě 2–8 °C, v závislosti na dotyčném antigenu. (11)

#### *Přilnavost řezů tkání zalitých v parafínu k mikroskopickým podložním sklům*

Ukládejte řezy tkání z bločků zalitých v parafínu na čistá podložní skla. Dehydratujte je jednu hodinu v troubě při teplotě nejvýše 60°C. Pro zvýšení přilnavosti řezů tkání při IHC barvení se doporučuje používat skla FLEX IHC (kód K8020), nabitá podložní skla, podložní skla potažená poly-L-lysinem nebo silanizovaná skla Silanized Slides (kód S3003). Při použití nabitých podložních skel, podložních skel potažených poly-L-lysinem nebo silanizovaných podložních skel vynechejte v montážní vodné lázni veškerá adheziva, například želatinu, lepidlo nebo komerčně vyráběné výrobky s obsahem proteinu. Potažená podložní skla se důrazně doporučují pro metody barvení, které vyžadují proteolytické trávení nebo tepelné vyhledávání epitopu (vyhledávání cíle).

#### *Odstranění parafínu a rehydratace*

Před barvením musí být podložní skla s tkáněmi zbavena parafínu, aby se z nich odstranila zalévací média a aby byly tkáně rehydratovány. Zajistěte úplné odstranění parafínu. Přítomnost zbytků zalévacích médií způsobí zvýšené nespecifické zabarvení.

1. Vložte podložní skla do xylénové lázně a inkubujte 5 ( $\pm 1$ ) minut. Vyměňte lázně a jednou zopakujte postup.
2. Odstraňte přebytečnou kapalinu a vložte podložní skla do bezvodého etanolu na 3 ( $\pm 1$ ) minuty. Vyměňte lázně a jednou zopakujte postup.
3. Odstraňte přebytečnou kapalinu a vložte podložní skla do 95 % etanolu na 3 ( $\pm 1$ ) minuty. Vyměňte lázně a jednou zopakujte postup.
4. Odstraňte přebytečnou kapalinu a vložte podložní skla do destilované nebo deionizované vody na minimálně 30 sekund. Pokud není vyžadováno proteolytické trávení nebo vyhledávání cíle, zahajte barvení.

Roztoky xylenu a alkoholu je nutno měnit každý týden nebo po maximálně 200 podložních sklech. Místo xylenu lze používat substituty toluenu nebo xylenu, například Histoclear; možná bude nutno prodloužit inkubační doby a častěji měnit roztok.

V případě potřeby lze rehydratované tkáně před použitím uchovávat v pufové roztoku při teplotě 2–8 °C po dobu až 18 hodin. Před barvením nechejte tkáně zahřát na pokojovou teplotu (20–25 °C).

#### *Proteolytické trávení a vyhledávání cíle*

Je známo, že formaldehyd vyvolává tvorbou intermolekulárních příčných vazeb konformační změny v molekulách antigenu. Přílišná fixace ve formalínu může maskovat oblasti antigenu a snižovat specifické zabarvení. Tyto oblasti však lze před imunohistochemickým barvením odhalit zpracováním podložních skel s tkáněmi proteolytickým trávením nebo vyhledáváním cíle. Chcete-li zjistit, zda je některé z těchto zpracování tkáně zaručeno, přečtěte si specifičák list dodávaný s každou primární protilátkou.

Předběžné zpracování tkáně proteolytickými enzymy lze provádět před barvením u vzorků, ze kterých byl odstraněn parafín a které byly rehydratovány. Lze používat proteolytické enzymy, například Dako Proteinase K, RTU (kód S3020), Pepsin (kód S3002), Proteolytic Enzyme nebo RTU (kód S3007). Obvyklá doba trávení je 6 minut. Používejte doporučenou dobu uvedenou v příbalovém letáku enzymu. **UPOZORNĚNÍ: Přetrávení může způsobit nespecifické barvení nebo nepřijatelnou morfolonii.** Důkladně opláchněte destilovanou vodou a pokračujte v barvení podle pokynů pro detekční systém.

Tepelné vyhledávání epitopu (HIER / vyhledávání cíle) před IHC barvením způsobuje u mnoha primárních protilátek zvýšení intenzity zabarvení. U některých protilátek je tento postup nezbytný. Doporučenou metodu vyhledávání naleznete ve specifičák listu protilátky. Vyhledávání cíle se provádí ponořením řezů tkání do předehřátého pufového roztoku a udržováním teploty, buď v PT Link, ve vodní lázni, v páře (95–99 °C), v tlakovém hrnci (121 °C) nebo pomocí jiného laboratorního zařízení s ovládním teploty. Pro dosažení optimálních výsledků s PT Link použijte roztok pro vyhledávání cíle ze souprav EnVision™ FLEX a FLEX+ (kódy K8000, K8002, K8010 a K8012) nebo volitelně roztoky pro vyhledávání cíle EnVision™ FLEX (kódy K8004 a K8005). Mezi další roztoky pro vyhledávání cíle od společnosti Dako patří roztok pro vyhledávání cíle TRS pH 9 (10x), (3-v-1)<sup>a</sup> (kód S2375), roztok pro vyhledávání cíle TRS (kód S1699 a S1700) a roztok pro vyhledávání cíle, citrát TRS pH 6,0 (kód S2369 a S2031). Přečtěte si konkrétní návod k použití.

Pokud použijete PT Link společně s roztokem pro vyhledávání cíle TRS ze souprav EnVision™ FLEX a FLEX+ nebo K8004, K8005, S2375, S1699, odstranění parafínu, rehydrataci a vyhledání cíle lze provést v jednom kroku. Provedení PT Link by mělo být následováno postupem rychlého namočení pomocí promývacího pufru ze souprav EnVision™ FLEX a FLEX+, volitelně promývacího pufru EnVision™ FLEX (20x) (kód K8007) nebo promývacího pufru Dako 10x (kód S3006).

Při použití systému Dako EnVision™+ System, metody s využitím tlakového hrnce nebo jiného laboratorního zařízení s ovládním teploty je zabarvení silnější než při metodě vodní lázně. Přečtěte si návod dodávaný s roztokem Target Retrieval Solution nebo referenci 12.

Pokud pro vyhledávání používáte metodu vodní lázně, mohou některé antigeny vyžadovat před zahříváním další zpracování proteolytickými enzymy. Řezy tkání lze trávit enzymem Dako Proteinase K (kód S3004) zředěným 1:500 v Tris-HCl pufru, pH 7,2–7,6 po dobu 10 minut při pokojové teplotě (20–25 °C).

<sup>a</sup> V USA nejsou roztok pro vyhledávání cíle TRS Dako, S1699, (10x) a roztok pro vyhledávání cíle EnVision™ FLEX s nízkým pH, K8005 určeny pro prodej jako pufr "3-v-1" pro použití v postupu 3-v-1. Může se vyžadovat licence podle patentu USA č. 6,649,368 B1.  
(120806-001)

V určitých vyšších nadmořských výškách (nad 1372 m (4500 stop)) může docházet k varu cílového vyhledávacího roztoku před dosažením požadované optimální teploty. V takových situacích je doporučeným alternativním postupem zahřátí podložních skel na maximální dosažitelnou teplotu a prodloužení doby inkubace podložních skel v cílovém vyhledávacím roztoku až do dosažení požadované intenzity zabarvení. (11) Dalším možným řešením je použití uzavřeného tlakového systému, jako je například tlakový hrnec, pro dosažení teploty 121 °C. K aždá laboratoř však musí stanovit nejlepší metodu a dobu vyhledávání cíle pro své vlastní prostředí.

### Zmrazená tkáň

Zmrazené tkáně je nutno vyříznout z rychle zmrazených bločků tkání (přibližně 1,0 x 1,0 x 0,5 cm) a sušit na vzduchu po dobu 2–24 hodin. Usušené řezy lze fixovat v acetonu o pokojové teplotě (20–25 °C) po dobu 10 minut nebo v pufovaném formylacetonu po dobu 30 sekund. Nechejte řezy na vzduchu uschnout, dokud nebudou zcela dehydratovány. Pokračujte imunohistochemickým barvením nebo zabalte podložní skla do hliníkové fólie a skladujte při teplotě -20°C nebo nižší až šest měsíců. Před použitím nechejte zabalené, zmrazené řezy zahřát na pokojovou teplotu. Proveďte následnou fixaci řezů ve studeném acetonu (2–8 °C) po dobu 10 minut. Vložte podložní skla do lázně TBS. Opatrně vyměňte několikrát lázeň TBS, aby byl odstraněn zbývající aceton.

Pokud jsou řezy příliš tlusté (více než 4–6 µm), nesprávně fixované nebo nerovnoměrně vysušené, mohou vniknout artefakty, které budou narušovat interpretaci zabarvení. To zahrnuje rupturu buněčných membrán a chromatolýzu. Při barvení hematoxylinem se může zdát, že jsou jádra zvětšená a souvisle modrá.

### Jiné vzorky

Detekční systémy Dako lze také používat pro barvení antigenů v kostních řezech, kostní dřeni, krevních nátěrech, cytospinech a otiscích. Nátěry lze nechat schnout na vzduchu po dobu 2–24 hodin a zpracovat, fixovat pro okamžité barvení nebo zabalit do hliníkové fólie a skladovat při teplotě -20 °C nebo nižší po dobu šesti měsíců. Na vzduchu vysušené nebo rozmrazené nátěry lze fixovat po dobu 90 sekund ve směsi aceton-metanol (1:1). Přijatelná je také fixace v acetonu nebo ve směsi aceton-metanol-formalin (10:10:1).

Kostí tkáně je nutno před rozřezáním a zpracováním odvápnit a tím usnadnit řezání tkáně a zabránit poškození nožů mikrotomu. (1) Dekalcifikace může ovlivnit IHC barvení.

Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (Zákon o zdokonalení klinických laboratoř z roku 1998) (42 CFR 493.1259(b)) od profesionálních uživatelů ve Spojených státech vyžaduje: „Laboratoř musí uchovávat barvená podložní skla nejméně 10 let od data testu a bločky vzorků nejméně dva roky od data testu“.

Další informace o přípravě vzorků naleznete v publikaci *Education guide: Immunohistochemical Staining Methods* (6) od společnosti Dako nebo v referencích 1 a 2.

### Bezpečnostní opatření

1. Určeno pro profesionální uživatele.
2. Výrobky mohou obsahovat azid sodný (NaN<sub>3</sub>), který je v čisté formě vysoce toxický. Přestože se koncentrace azidu sodného ve výrobcích neklasifikuje jako nebezpečná, může NaN<sub>3</sub> reagovat s olovem a mědí v odpadním potrubí a vytvářet vysoce explozivní koncentrace azidů těchto kovů. Při likvidaci splachujte dostatečným množstvím vody, aby nedocházelo k usazování azidů kovů v potrubí. (12)
3. S biologickými vzorky před a po fixaci a se všemi ostatními materiály, které s nimi přijdou do styku, je nutno manipulovat jako s potenciálně infekčním materiálem a je nutno je likvidovat v souladu s řádnými bezpečnostními opatřeními. (14) Nikdy nepipetujte reagenty ústy a zabraňte kontaktu kůže a sliznice s reagenty a vzorky. Jestliže se reagenty dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je dostatečným množstvím vody. Při manipulaci s jakýmkoli biologickým materiálem a při barvení používejte osobní ochranné prostředky. Minimalizujte mikrobiální kontaminaci reagentů, jinak by mohlo dojít k zvýšení nespecifického zabarvení.
4. Bezpečnostní listy pro profesionální uživatele jsou k dispozici na vyžádání.
5. Nedodržení specifikované inkubační doby nebo teploty může vést k chybným výsledkům. Jakékoli takové změny musí uživatel ověřit.
6. Nespoteřované roztoky je nutno likvidovat v souladu s místními a celostátními předpisy.

### Postup barvení

Pro špičkové výsledky při barvení používejte protilátky k okamžitému použití FLEX. Při optimalizaci s vizualizačními systémy EnVision™ FLEX a FLEX+ tyto protilátky poskytují požadované konečné výsledky, když se používají pro PT Link a nástroje Autostainer Link nebo Dako Autostainer.

Při použití koncentrovaných (neředěných) protilátek si přečtěte příslušný příbalový leták pro ředění primární protilátky a specifické pokyny k detekčnímu systému pro doporučené postupy.

Při použití protilátek řady N k okamžitému použití si přečtěte příbalový leták pro daný výrobek a část Postup barvení v pokynech pro Dako EnVision™+, EnVision™ G|2 Doublestain, LSAB™2 a LSAB™+.

### Kontrola kvality

Rozdíly ve zpracování tkáně a technických postupech v laboratoři uživatele mohou způsobit výraznou variabilitu výsledků; kromě následujících postupů je nutno provádět pravidelné kontroly v souladu s místními předpisy pro akreditaci. Profesionální uživatelé ve Spojených státech se musí seznámit se směrnici pro kontrolu kvality College of American Pathologists (CAP) Accreditation Program for Immunohistochemistry, NCCLS Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (15) a dalšími informacemi uvedenými v referenci 7.

### Tkáň pro pozitivní kontrolu

Kontrolní vzorky by měly být čerstvě fixované vzorky z pitvy / biopsie / operace zpracované a zalité stejným způsobem jako vzorek (vzorky) pacienta. Tkáň pro pozitivní kontrolu jsou známkou správně připravených tkání a správných metod barvení. Pro každou sadu testovacích podmínek by měla být v každém cyklu barvení použita jedna tkáň pro pozitivní kontrolu.

Tkáň použité pro pozitivní kontrolní testy by měly způsobovat slabé pozitivní zabarvení, aby bylo možné detekovat mírné změny v citlivosti primární protilátky. Komerčně dostupná podložní skla s tkáněmi nebo vzorky zpracované jiným způsobem než vzorek (vzorky) pacienta slouží pouze k ověření účinnosti reagentu a neověřují přípravu tkáně. Informace o vzorcích normální tkáně, které lze použít, naleznete v příbalovém letáku výrobku, v části Charakteristiky účinnosti.

Znamé tkáň pro pozitivní kontrolu by měly být používány pouze ke sledování správné funkce zpracovaných tkání a testovacích reagentů, **NIKOLIV** jako pomůcka k formulaci specifické diagnózy vzorků pacienta. Pokud se u tkání pro pozitivní kontrolu neprojeví pozitivní zabarvení, je nutno považovat výsledky testovacího vzorku za neplatné.

### Tkáň pro negativní kontrolu

V každém cyklu barvení používejte k ověření specifity primární protilátky a k indikaci specifického zabarvení pozadí normální tkáň, o které víte, že je negativní na testovaný antigen (přečtěte si příbalový leták výrobku, část Charakteristiky účinnosti), která je fixovaná, zpracovaná a zalitá identickým způsobem jako vzorky pacienta. Rozmanitost různých typů buněk, které se nacházejí ve většině řezů tkání, nabízí vnitřní oblasti pro negativní kontrolu (to by měl ověřit uživatel).

Pokud se projeví specifické zabarvení ve tkáni pro negativní kontrolu, je nutno považovat výsledky vzorků pacienta za neplatné.

### Reagens pro negativní kontrolu

S každým vzorkem použijte reagens pro negativní kontrolu, aby bylo možné vyhodnotit nespecifické nebo nežádoucí zabarvení a umožnit lepší interpretaci specifického zabarvení v místě antigenu. Ideálně obsahuje reagens pro negativní kontrolu protilátku, která nevykazuje žádnou specifickou reaktivitu s lidskými tkáněmi (nereagující s lidskými tkáněmi) ve stejném pojivu / roztoku jako naředěná primární protilátka. Protilátka nereagující s lidskými tkáněmi by měla patřit ke stejnému izotypu a živočišnému druhu jako primární protilátka, naředěná na stejnou koncentraci imunoglobulinu nebo proteinu jako naředěná primární protilátka. Normální / neimunní sérum ze stejného druhu jako primární protilátka, při koncentraci proteinu odpovídající naředěné primární protilátce ve stejném pojivu / roztoku může být vhodné pro použití v závislosti na typu použité primární protilátky. Specifická doporučení naleznete v příbalových letácích jednotlivých primárních protilátek a v tabulce 1. Jako méně vhodnou alternativu uvedených reagentů pro negativní kontrolu lze použít samostatný ředící roztok. Inkubační doba reagentu pro negativní kontrolu by měla odpovídat inkubační době primární protilátky.

**Tabulka 1. Příklady reagentů pro negativní kontrolu pro koncentrované protilátky**

<i>Typ primární protilátky</i>	<i>Doporučené reagens pro negativní kontrolu</i>
Monoklonální myší protilátka FLEX, k okamžitému použití.	Univerzální negativní kontrola pro primární myší protilátky, kód IR750 (pro nástroje Autostainer Link) a IS750 (pro nástroje Dako Autostainer)
Polyklonální nebo monoklonální králičí protilátka FLEX, k okamžitému použití	Univerzální negativní kontrola pro primární králičí protilátky, kód IR600 (pro nástroje Autostainer Link) a IS600 (pro nástroje Dako Autostainer) *
Monoklonální myší protilátka vytvořená v ascites	Monoklonální protilátka nereagující s lidskou tkání vytvořená v ascites. Tato protilátka pro negativní kontrolu by měla mít stejný izotyp jako primární protilátka. Lze také používat normální / neimunní myší sérum, kód X0910
Monoklonální myší protilátka, vytvořená v tkáňové kultuře.	Monoklonální myší protilátka nereagující s lidskou tkání vytvořená v tkáňové kultuře. Tato protilátka pro negativní kontrolu by měla mít stejný izotyp jako primární protilátka. Dako kódy X0931 (IgG1), X0943 (IgG2 <sub>a</sub> ), X0944 (IgG2 <sub>b</sub> ), X0942 (IgM). Lze také použít fetální telecí sérum.*
Polyklonální králičí protilátka, imunoglobulinová frakce.	Králičí imunoglobulinová frakce (normální), kód Dako X0903.
Polyklonální králičí protilátka absorbovaná na pevné fázi, imunoglobulinová frakce.	Králičí imunoglobulinová frakce (absorbovaná na pevné fázi), kód Dako X0936.
Polyklonální králičí protilátka, celé sérum.	Normální / neimunní králičím sérum, celé sérum, Dako kód X0902.

\* Fetální telecí sérum je vhodné k použití, pokud je po zpracování uchováváno v primární protilátce.

Pokud se panely protilátek používají se sériovými řezy tkání, mohou oblasti negativního zabarvení na jednom podložním skle sloužit jako negativní kontrola / kontrola nespecifické vazby pozadí pro jiné protilátky, pokud jsou jejich ředění podobná a pokud pocházejí z podobných živočišných zdrojů.

Pro rozlišení endogenní aktivity enzymu nebo nespecifické vazby enzymů od specifické imunoreaktivity lze

další vzorky pacienta barvit výhradně substrát-chromogenem nebo komplexy enzymů (avidin-biotin, streptavidin, značený polymer) a substrát-chromogenem. S dotazem na konkrétní postupy se obraťte na technickou podporu společnosti Dako.

**Tabulka 2. Účel každodenní kontroly kvality**

<i>Tkáň: Fixovaná a zpracovaná, podobná vzorku pacienta</i>	<i>Specifická protilátka a detekční systém</i>	<i>Reagens pro negativní kontrolu* nebo pufr plus stejný detekční systém jako systém použitý se specifickou protilátkou</i>
Pozitivní kontrola: Tkáň nebo buňky, u kterých je známa přítomnost detekovaného cílového antigenu (může se nacházet ve tkáni pacienta). Tkáň, která vykazuje slabé pozitivní zbarvení, je nejcitlivější na protilátku nebo degradaci detekčního systému.	Řídí všechny kroky analýzy. Ověřuje reagens a imunohistochemické postupy.	Detekce nespecifického zbarvení pozadí.
Negativní kontrola: Tkáň nebo buňky, které by měly být negativní (mohou se nacházet ve tkáni pacienta nebo tkáni pro pozitivní kontrolu).	Detekce neplánované křížové reaktivity protilátky s buňkami nebo buněčnými složkami.	Detekce nespecifického zbarvení pozadí.
Tkáň pacienta.	Detekce specifického zbarvení.	Detekce nespecifického zbarvení pozadí.

\* Stejný druh a izotyp jako specifická protilátka, není však zaměřeno proti stejnému cílovému antigenu. K detekci nespecifické vazby protilátky, např. vazby Fc části protilátky ke tkáni.

#### **Ověření testu**

Před prvním použitím protilátky nebo systému pro imunohistochemické barvení v diagnostické metodě by měl uživatel ověřit specifitu protilátky tak, že ji vyzkouší u několika v laboratoři dostupných tkání se známou IHC charakteristikou, které představují známé pozitivní a negativní tkáně. Přečtěte si postupy pro kontrolu kvality popsané v této části Obecných pokynů a v případě profesionálních uživatelů v USA také požadavky pro kontrolu kvality programu CAP Accreditation Program for Immunohistochemistry a směrnice NCCLS Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline. (15) Tyto kontroly kvality je nutno opakovat vždy při použití nové šarže protilátek nebo vždy při změně parametrů testu. Pro ověření testu jsou vhodné tkáně uvedené v příbalovém letáku k výrobku, v části Charakteristiky účinnosti.

#### **Řešení problémů**

Další informace o řešení naleznete v části o řešení problémů v publikaci Dako *Education guide: Immunohistochemical Staining Methods, 4th Edition* (6) (*Příručka: Metody imunohistochemického barvení, 3. vydání*) od společnosti Dako nebo se obraťte na technickou podporu společnosti Dako nebo na webové stránky na adrese [www.dako.com](http://www.dako.com) a nahlaste neobvyklé zbarvení.

#### **Interpretace zbarvení**

##### **Tkáň pro pozitivní kontrolu**

Nejprve je nutné provést test tkáně pro pozitivní kontrolu a ověřit tak správnost funkce všech reagentů. Pozitivní reaktivitu naznačuje přítomnost červeného produktu (3-amino-9-etylkarbazol, AEC), světle růžového produktu (nový fuchsin nebo Fast Red) nebo hnědého produktu (3, 3'-diaminobenzidin-tetrahydrochlorid, DAB) reakce v oblasti cílového antigenu. Specifické vzory zbarvení naleznete v částech Interpretace zbarvení a Charakteristiky účinnosti příbalového letáku pro daný výrobek. Pokud se u tkáni pro pozitivní kontrolu neprojeví očekávaný vzor zbarvení, je nutno považovat všechny výsledky s testovacím vzorkem za neplatné.

*POZNÁMKA: Barva produktu reakce se může lišit, pokud jsou použity jiné než uvedené substrát-chromogeny. Očekávané barevné reakce nalezete v příbalovém letáku k substrátu. Metachromaticnost lze také pozorovat při obměnách metody barvení. (16)*

V závislosti na inkubační době a potenci použitého hematoxylinu způsobí kontrastní barvivo modré zbarvení buněčných jader. Přílišné nebo neúplné kontrastní zbarvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků.

### Tkáň pro negativní kontrolu

Tkáň pro negativní kontrolu je nutno otestovat po tkáni pro pozitivní kontrolu, abychom ověřili specifickost značení cílového antigenu primární protilátkou. Nepřítomnost specifického zbarvení v tkáni pro negativní kontrolu potvrzuje nepřítomnost křížové reaktivity s buňkami / částmi buněk. Pokud se ve tkáni pro negativní kontrolu projeví jiné než výše uvedené specifické zbarvení, je nutno považovat výsledky vzorků pacienta za neplatné. Co se týče negativních tkání, měly by mít v případě použití hematoxylinu modronachovou barvu.

Pokud se vyskytne nespecifické zbarvení, bude difúzní. Sporadické zbarvení pojivové tkáně lze také pozorovat v řezech z tkání příliš fixovaných formalínem. K interpretaci výsledků barvení používejte pouze intaktní buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky mohou vykazovat nespecifické zbarvení. (7)

Falešně pozitivní výsledky se mohou vyskytovat v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce se substrátem. Také mohou být způsobeny endogenními enzymy, například myeloperoxidázou, leukocytární alkalickou fosfatázou a hemoglobin-pseudoperoxidázou, zejména ve zmrazených tkáních a v závislosti na typu enzymového značení použitého k vizualizaci reakce. (17)

### Tkáň pacienta

Vzorky pacienta je nutno testovat jako poslední. Intenzitu pozitivního zbarvení je nutno posuzovat v kontextu jakéhokoli nespecifického zbarvení pozadí reagentem pro negativní kontrolu. Jako u každého IHC testu, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl detekován, nikoli, že antigen není v testovaných buňkách / tkáni přítomen. V případě potřeby použijte k identifikaci falešně negativních reakcí panel protilátek.

Informace o imunoreaktivitě primární protilátky naleznete v příbalovém letáku pro daný výrobek.

### Všeobecná omezení

1. IHC je diagnostický proces obsahující více kroků, který vyžaduje specializované vyškolení ve výběru, fixaci a zpracování tkání, výběru reagentů; přípravě IHC podložního skla a interpretaci výsledků zbarvení.
2. Zbarvení tkáně závisí na manipulaci s tkání a na jejím zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, promývání, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými tkáněmi nebo tekutinami může vést ke vzniku artefaktů, zachycení protilátky nebo falešně negativním výsledkům. Výsledky mohou být nekonzistentní v důsledku použití různých metod fixace a zalití nebo v důsledku vnitřních nepravidlostí v tkáni.
3. Přílišné nebo neúplné kontrastní zbarvení může ohrozit správnou interpretaci výsledků.
4. Klinická interpretace jakéhokoli zbarvení nebo jeho nepřítomnosti musí být doplněna morfologickými studii a řádnými kontrolami a také dalšími diagnostickými vyšetřeními. Za interpretaci barveného preparátu zodpovídá kvalifikovaný patolog, který zná použité protilátky, reagenty a použité metody. Barvení se musí provádět v certifikované laboratoři s příslušným oprávněním a pod dohledem patologa zodpovědného za hodnocení barvených podložních skel a zaručení adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
5. Neočekávané výsledky reakcí ve špatně diferencovaných neoplazmatech mohou být způsobeny ztrátou nebo výrazným poklesem exprese antigenu nebo ztrátou nebo mutacemi v genovém kódování pro antigen. Neočekávané pozitivní zbarvení nádorů může být způsobeno expresí antigenu, který není obvykle exprimován v morfologicky podobných normálních buňkách, nebo v důsledku přetrvávání nebo získávání antigenu v neoplazmatu, u kterého se rozvíjejí morfologické a IHC rysy související s jinou buněčnou linií (divergentní diferenciací). Histopatologická klasifikace nádorů není exaktní věda a některé zprávy o neočekávaném zbarvení uváděné v odborné literatuře mohou být protichůdné.
6. Tkáně osob infikovaných virem hepatitidy B, které obsahují povrchový antigen hepatitidy B (HBsAg), mohou s křenovou peroxidázou vykazovat nespecifické zbarvení. (18)
7. Reagenty mohou vykazovat neočekávané reakce v dřívě netestovaných tkáních. V důsledku biologické variability exprese antigenu v neoplazmatech nebo jiných patologických tkáních nelze zcela vyloučit možnost neočekávaných reakcí ani v testovaných skupinách tkání. (19) S jakoukoli zdokumentovanou neočekávanou reakcí se obraťte na technickou podporu společnosti Dako.
8. Normální / neimunní séra ze stejného živočišného druhu jako sekundární antiséra použitá v blokovacích krocích mohou v důsledku přítomnosti autoprotilátek nebo přirozených protilátek způsobovat falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky.
9. Falešně pozitivní výsledky se mohou vyskytovat v důsledku neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakce se substrátem. Také mohou být způsobeny endogenním biotinem nebo enzymy, například myeloperoxidázou, leukocytární alkalickou fosfatázou a hemoglobin-pseudoperoxidázou, zejména ve zmrazených tkáních a v závislosti na typu použitého imunohistochemického barviva. (17)
10. Tepelné vyhledávání epitopu (vyhledávání cíle) může způsobovat HIER lipofuscinové artefakty. Vyhledávání cíle může způsobit demaskování neočekávaných nebo nechtěných oblastí.
11. S falešně negativními výsledky barvení, s pozadím nebo bez něj, se lze setkat v případě, že byla v daném barvicím systému použita příliš vysoká koncentrace primární protilátky.
12. Primární protilátky k okamžitému použití jsou předem naředěny a optimalizovány pro použití s určitými barvicími systémy. Při použití s jinými detekčními systémy od společnosti Dako nebo jiného výrobce již nejsou určeny k okamžitému použití a je nutno je znovu optimalizovat a ověřit podle IHC protokolu klinické laboratoře.
13. Pokud není v pokynech uvedeno jinak, nebyly charakteristiky účinnosti protilátek používaných pro IHC určeny pro jiné laboratorní metody.

## 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. Diamandis EP, Schwartz MK. *Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications*. Washington DC: AACCC Press 2002
4. Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry*. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier 2002
5. *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule*, 57 CFR 7163, February 28, 1992
6. Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH. *Handbook: Immunochemical Staining Methods*, 3rd Edition. Carpinteria: Dako Corporation 2001
7. Nadjji M and Morales AR. Immunoperoxidase. Part I: The technique and its pitfalls. *Lab Med* 1983; 14:767
8. Banks PM. Diagnostic applications of an immunoperoxidase method in hematopathology. *J Histochem Cytochem* 1979; 27:1192-94
9. Culling CFA, Reid PE, Sinnott NM. The effect of various fixatives and trypsin digestion upon the staining of routine paraffin-embedded sections by the peroxidase-antiperoxidase and immunofluorescent technique. *J Histotech* 1980; 3:10-19
10. Carson FL (ed.). *Histotechnology: A self-instructional text*. Chicago: ASCP Press 1990; 22
11. Grabau DA, Nielsen O, Hansen S, Nielsen MM, Lænkholm A-V, Knoop A, Pfeiffer P. Influence of storage temperature and high-temperature antigen retrieval buffers on results of immunohistochemical staining in sections stored for long periods. *Appl Immunohistochem* 1998; 6(4):209-13
12. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39:741-48
13. Koopal SA, Coma MI, Tibosch AMG, Surmeijer AJH. Low temperature heating overnight in Tris-HCl buffer pH 9 is a good alternative for antigen retrieval in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Appl Immunohistochem* 1998; 6:228-33
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Protection of laboratory workers from instrument biohazards and infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue; approved guideline*. Villanova, PA 1997: Order code M29-A
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Quality assurance for immunocytochemistry; approved guideline*. Villanova, PA, 1999; 19(26):Order code MM4-A
16. Koretz K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in immunoperoxidase techniques. *Histochem* 1987; 86:471-78
17. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, Battifora H, Brigati DJ. Special report: Quality control in immunohistochemistry. *Amer J Clin Pathol* 1989; 92:836-43
18. 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. *Amer J Clin Pathol* 1980; 73:626-32
19. Herman GE and Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: The new era of quality control. *Biotech Histochem* 1991; 66:194-99

---

Edition 11/09



DakoCytomation, Inc  
6392 Via Real  
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655  
Fax 805 566 6688  
Technical Support 800 424 0021  
Customer Service 800 235 5763



DakoCytomation Denmark A/S  
Produktionsvej 42  
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500  
Fax +45 4485 9595

[www.dakocytomation.com](http://www.dakocytomation.com)