

# Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD33

**Product Code: NCL-L-CD33**

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



EN FR IT DE ES PT SV EL DA

## Instructions for Use

Please read before using this product.

## Mode d'emploi

À lire avant d'utiliser ce produit.

## Istruzioni per L'uso

Si prega di leggere, prima di usare il prodotto.

## Gebrauchsanweisung

Bitte vor der Verwendung dieses Produkts lesen.

## Instrucciones de Uso

Por favor, leer antes de utilizar este producto.

## Instruções de Utilização

Leia estas instruções antes de utilizar este produto.

## Instruktioner vid Användning

Var god läs innan ni använder produkten.

## Οδηγίες χρήσης

Παρακαλούμε διαβάστε τις οδηγίες πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν αυτό.

## Brugsanvisning

Læs venligst før produktet tages i brug.

## Check the integrity of the packaging before use.

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

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

Vor dem Gebrauch die Verpackung auf Unversehrtheit überprüfen.

Comprobar la integridad del envase, antes de usarlo.

Verifique a integridade da embalagem antes de utilizar o produto.

Kontrollera att paketet är obrutet innan användning.

Ελέγξτε την ακεραιότητα της συσκευασίας πριν από τη χρήση.

Kontroller, at pakken er ubeskadiget før brug.



# Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD33

## Product Code: NCL-L-CD33

### Intended Use

*For in vitro diagnostic use.*

NCL-L-CD33 is intended for the qualitative identification by light microscopy of CD33 molecules in paraffin sections. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

### Principle of Procedure

Immunohistochemical (IHC) staining techniques allow 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 and an enzyme complex with 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.

### Clone

PWS44

### Immunogen

Prokaryotic recombinant protein corresponding to a region of the C2 domain of the human CD33 molecule.

### Specificity

Human CD33.

### Reagent Composition

NCL-L-CD33 is a liquid tissue culture supernatant containing 15mM sodium azide as a preservative.

### Ig Class

IgG2b

### Total Protein Concentration

Total Protein

1.0–8.0 g/L. Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

### Antibody Concentration

Greater than or equal to 630 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

### Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:100 for 30 minutes at 25 °C. Heat induced epitope retrieval using Epitope Retrieval Solution pH 9.0 RE7119 or RE7122. Novolink™ Polymer Detection System RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests). This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

### Storage and Stability

Store at 2–8 °C. Do not freeze. Return to 2–8 °C immediately after use. Do not use after expiration date indicated on the vial label. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

### Specimen Preparation

The recommended fixative is 10% neutral-buffered formalin for paraffin-embedded tissue sections.

### Warnings and Precautions

This reagent has been prepared from the supernatant of cell culture. As it is a biological product, reasonable care should be taken when handling it.

The molarity of sodium azide in this reagent is 15 mM. A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available upon request for sodium azide. Consult federal, state or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

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 in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water. Seek medical advice.

Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur.

Incubation times or temperatures, other than those specified, may give erroneous results. Any such changes must be validated by the user.

### Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures.

Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

## Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

One positive tissue control should be included for each set of test conditions in each staining run.

A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.<sup>2</sup>

Recommended positive control tissue is bone marrow.

If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

## Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody. Recommended negative control tissue is skeletal muscle.

Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user.

Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.<sup>3</sup> False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin (eg. liver, breast, brain, kidney) depending on the type of immunostain used. To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate chromogen or enzyme complexes (avidin-biotin, streptavidin, labeled polymer) and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

## Negative Reagent Control

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

## Patient Tissue

Examine patient specimens stained with NCL-L-CD33 last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

## Results Expected

### Normal Tissues

Clone PWS44 detected the CD33 antigen on the membrane and in the cytoplasm of cells of myelomonocytic lineages. In normal bone marrow trephine biopsies (12/12), clone PWS44 stains myeloid and myelomonocytic hemopoiesis and mature macrophages; cells of the erythroid and megakaryocytic series are negative. Some reactivity was observed in cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts of placenta. Except for dendritic cells and infiltrating macrophages, no staining was observed in other normal tissues evaluated (n=54).

### Abnormal Tissues

Clone PWS44 stained (73/77) acute myeloid leukemias, (4/4) chronic myeloid leukemia, (5/5) granulocytic sarcomas and (11/11) cases of myeloid dysplasia and myeloproliferative diseases. PWS44 stained (0/74) cases of non-lymphoid tumors. In the lymphoid neoplasms tested CD33 staining was observed in (4/15) precursor B-lymphoblastic leukemias, (2/10) precursor T-lymphoblastic leukemias, (1/5) classical Hodgkin's lymphomas, (1/6) Burkitt lymphomas, (1/3) plasma cell neoplasms, (1/1) hematodermic lymphoid neoplasm, (0/1) anaplastic large cell lymphoma and (0/1) lymphoplasmacytic lymphoma.

**NCL-L-CD33 is useful as part of an antibody panel for the identification of cells of myeloid and monocytic lineage, and leukemias and myeloproliferative disorders derived from these cells.**

## General Limitations

Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.<sup>4</sup> Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Antibodies from Leica Biosystems Newcastle Ltd are for use, as indicated, on either frozen or paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

## **Bibliography - General**

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Freeman SD, Kelm S, Barber EK et al. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. *Blood* 85(8): 2005–2012 (1995)
6. Simmons D and Seed B. Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. *Journal of Immunology* 141: 2797–2800 (1988).

## **Amendments to Previous Issue**

The Reagent Composition has changed.

The Total Protein Concentration has changed.

The Antibody Concentration has changed.

## **Date of Issue**

16 April 2009 (NCL-L-CD33/CE/UK).

# Immunohistochemical Methodology For Novocastra™ Antibodies On Paraffin-Embedded Tissue Utilizing The Heat Induced Epitope Retrieval Technique.

## A. Reagents Required but not Supplied

1. Standard solvents used in immunohistochemistry.
2. 50 mM Tris-Buffered Saline (TBS) pH 7.6.
3. Epitope Retrieval Solution (see C. Epitope Retrieval Solutions).
4. Antibody diluent, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Visualization system, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests).
6. Mounting medium - use as recommended by manufacturer.

## B. Equipment Required but not Supplied

1. Incubator set to 25 °C.
2. Heating device for epitope retrieval: water bath, steamer, pressure cooker or other temperature controlled laboratory equipment.
3. General immunohistochemistry laboratory equipment.

## C. Epitope Retrieval Solutions (see Recommendations on Use for one of the following)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Citrate-based buffer containing surfactant   |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | EDTA-based buffer containing surfactant      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tris/EDTA-based buffer containing surfactant |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## D. Methodology

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

Users should determine optimal dilutions for antibodies. Unless indicated, all steps are performed at room temperature (25 °C).

### Epitope Retrieval

Please follow the instructions for use in Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 or RE7122.

### Visualization

Please follow the instructions for use in the Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests).

## E. Amendments to Previous Issue

Not applicable

## F. Date of Issue

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Anticorps Monoclonal liquide de Souris CD33

## Référence du Produit: NCL-L-CD33

### Utilisation Prévue

*Diagnostic in vitro.*

Le NCL-L-CD33 est destiné à l'identification qualitative par microscopie optique de la molécule CD33 sur des coupes en paraffine. L'interprétation clinique de tout marquage, ou absence de marquage, doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée par un pathologiste qualifié à la lumière des antécédents cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques.

### Principe de la Procédure

Les techniques de marquage immunohistochimique (IHC) permettent la visualisation des antigènes via l'application séquentielle d'un anticorps spécifique sur un antigène (anticorps primaire), d'un anticorps secondaire sur l'anticorps primaire et d'un complexe enzymatique comportant un substrat chromogène, avec des étapes de lavage intercalées. L'activation enzymatique du chromogène se traduit par la présence d'un produit de réaction visible au niveau du site de l'antigène. Le spécimen peut ensuite faire l'objet d'une coloration de contraste et être placé sous une lamelle. Les résultats sont interprétés à l'aide d'un microscope optique et participent au diagnostic différentiel des processus physiopathologiques, susceptibles, ou non, d'être associés à un antigène particulier.

### Clone

PWS44

### Immunogène

Protéine procaryote recombinante correspondant à une région du domaine C2 de la molécule de CD33 humain.

### Spécificité

CD33 humain.

### Composition du Réactif

Le NCL-L-CD33 est un surnageant de culture tissulaire liquide contenant une solution d'azide de sodium 15 mM comme conservateur.

### Classe d'Ig

IgG2b

### Concentration Totale en Protéines

Total Protein

1,0–8,0 g/l. La concentration totale en protéines, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

### Concentration en Anticorps

Supérieure ou égale à 630 mg/l, déterminée par la méthode ELISA. La concentration totale en Ig, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

### Recommandations d'utilisation

Immunohistochimie (voir **D. Méthodologie**) sur des coupes en paraffine. Dilution préconisée : 1:100 pendant 30 minutes à 25 °C. Restauration de l'épitope induite par la chaleur à l'aide de Epitope Retrieval Solution pH 9,0 RE7119 ou RE7122. Novolink™ Polymer Detection System RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests). Ceci n'est donné qu'à titre indicatif et les utilisateurs doivent déterminer leurs propres dilutions de travail optimales.

### Conservation et Stabilité

Conserver à 2–8 °C. Ne pas congeler. Remettre immédiatement à 2–8 °C après utilisation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du récipient. Les conditions de conservation autres que celles qui sont spécifiées ci-dessus doivent faire l'objet d'une vérification par l'utilisateur.

### Préparation des Spécimens

Le fixateur recommandé est le formol à 10%, tamponné, neutre, pour coupes tissulaires incluses en paraffine.

### Mises en Garde et Précautions

Ce réactif a été préparé à partir du surnageant d'une culture cellulaire. Du fait de sa nature de produit biologique, sa manipulation doit faire l'objet du plus grand soin.

Dans ce réactif, la molarité de l'azide de sodium est de 15 mM. Une fiche toxicologique (MSDS) relative à l'azide de sodium est disponible sur demande.

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

Les spécimens, avant et après fixation, ainsi que toutes les matières ayant été en contact avec eux, doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et être éliminés en respectant les précautions appropriées<sup>1</sup>. Ne jamais pipeter les réactifs avec la bouche et éviter tout contact des réactifs et des spécimens avec la peau et les membranes muqueuses. Rincer avec de grandes quantités d'eau en cas de contact des réactifs ou des spécimens avec des zones sensibles. Consulter un médecin.

Minimiser la contamination microbienne des réactifs sinon un accroissement du marquage non spécifique est susceptible de se produire.

Des durées et des températures d'incubation différentes de celles qui ont été spécifiées sont susceptibles de conduire à des résultats erronés. Toutes les modifications doivent être validées par l'utilisateur.

## Contrôle de Qualité

Des différences de traitement des tissus et de procédures techniques du laboratoire de l'utilisateur sont susceptibles de conduire à une variabilité significative des résultats, ce qui rend nécessaire la mise en œuvre de contrôles en interne en plus des procédures suivantes.

Les contrôles doivent être des spécimens frais provenant d'autopsies, de biopsies ou d'interventions chirurgicales, fixés au formol, traités et inclus en cire de paraffine dès que possible, de la même façon que le(s) échantillon(s) de patient.

## Tissu de Contrôle Positif

Il est utilisé pour indiquer que les tissus ont été préparés correctement et que les techniques de marquage étaient appropriées.

Un contrôle tissulaire positif doit être inclus dans toute opération de marquage pour chaque ensemble de conditions d'analyse.

Un tissu présentant un marquage faiblement positif est plus adapté à un contrôle de qualité optimal qu'un tissu présentant un marquage fortement positif et il permet de détecter de moindres niveaux de dégradation du réactif.<sup>2</sup>

Le tissu de contrôle positif recommandé est la moelle osseuse.

Si le tissu de contrôle positif ne présente pas de marquage positif, les résultats des spécimens analysés doivent être considérés comme invalides.

## Tissu de Contrôle Négatif

Il doit être examiné après le tissu de contrôle positif afin de vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire.

Les muscles squelettiques constituent le tissu de contrôle négatif recommandé.

Si non, la diversité des types cellulaires présents dans la plupart des tissus permet de disposer fréquemment de sites de contrôle négatif, mais ils doivent être vérifiés par l'utilisateur.

S'il est présent, le marquage non spécifique prend habituellement une apparence diffuse. Un marquage sporadique du tissu conjonctif peut également être observé sur des coupes de tissus qui ont été fixées par un excès de formol. Utiliser des cellules intactes pour l'interprétation des résultats du marquage. Les cellules nécrotiques ou dégénérées sont souvent marquées de façon non spécifique.<sup>3</sup> Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique à des protéines ou à des produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être provoqués par des enzymes endogènes comme la pseudoperoxydase (érythrocytes), la peroxydase endogène (cytochrome C), ou la biotine endogène (foie, sein, cerveau, rein, par exemple) selon le type d'immunomarquage utilisé. Pour différencier l'activité des enzymes endogènes ou la liaison non spécifique d'enzymes de l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être marqués exclusivement avec le substrat chromogène ou par des complexes enzymatiques (avidine-biotine, streptavidine, polymère marqué) et le substrat chromogène respectivement. Si un marquage spécifique se produit dans le tissu de contrôle négatif, les résultats des spécimens de patient doivent être considérés comme invalides.

## Réactif de Contrôle Négatif

Utiliser un réactif de contrôle négatif non spécifique à la place de l'anticorps primaire avec une coupe de chaque spécimen du patient afin d'évaluer le marquage non spécifique et de permettre une meilleure interprétation du marquage spécifique au niveau du site antigénique.

## Tissu du Patient

Examiner les échantillons du patient marqués au NCL-L-CD33 en dernier lieu. L'intensité du marquage positif doit être évaluée à la lumière du bruit de fond du marquage non spécifique du réactif de contrôle négatif. Comme pour toutes les analyses immunohistochimiques, un résultat négatif signifie que l'antigène n'a pas été détecté mais ne signifie pas qu'il est absent des cellules/tissus testés. Si nécessaire, employer un panel d'anticorps pour identifier les réactions faussement négatives.

## Résultats Attendus

### Tissus normaux

Le clone PWS44 a détecté l'antigène CD33 sur la membrane et dans le cytoplasme de cellules des lignées myélomonocytaires. Dans les biopsies au trépan de la moelle osseuse normale (12/12), le clone PWS44 a marqué les cellules hématopoïétiques myéloïdes et myélomonocytaires et les macrophages matures; les cellules des lignées érythroïdes et mégacaryocytaires sont négatives. Une certaine réactivité a été observée dans les cytotrophoblastes et les syncytiotrophoblastes du placenta. À l'exception des cellules dendritiques et des macrophages infiltrants, aucun marquage n'a été observé dans les autres tissus normaux évalués (n=54).

### Tissus tumoraux

Le clone PWS44 a marqué les leucémies myéloïdes aiguës (73/77), les leucémies myéloïdes chroniques (4/4), les sarcomes granulocytaires (5/5) et les cas de dysplasies myéloïdes et de maladies myéloprolifératives (11/11). Le clone PWS44 n'a marqué aucun cas de tumeurs non lymphoïdes (0/74). Pour les néoplasmes lymphoïdes testés, le marquage du CD33 a été observé chez les précurseurs de leucémies lymphoblastiques B (4/15), les précurseurs de leucémies lymphoblastiques T (2/10), les lymphomes de Hodgkin classique (1/5), les lymphomes de Burkitt (1/6), les néoplasmes des plasmocytes (1/3), les néoplasmes lymphoïdes hémato-dermiques (1/1), aucun lymphome à grandes cellules anaplasiques (0/1), aucun lymphome lymphoplasmocytaire (0/1).

**Le NCL-L-CD33 est utilisé dans le cadre d'un panel d'anticorps pour l'identification des cellules des lignées myéloïdes et monocytaires ainsi que des leucémies et troubles myéloprolifératifs dérivés de ces cellules.**



## Limites Générales

L'immunohistochimie est un processus diagnostique constitué de plusieurs étapes qui nécessite une formation spécialisée relative au choix des réactifs appropriés ; au choix, à la fixation et au traitement des tissus ; à la préparation des lames IHC ; et à l'interprétation des résultats du marquage.

Le marquage des tissus dépend de leur manipulation et de leur traitement avant le marquage. Une fixation, une congélation, une décongélation, un lavage, un séchage, un chauffage, une coupe, incorrects ou une contamination par d'autres tissus ou d'autres liquides sont susceptibles de conduire à la production d'artefacts, au piégeage de l'anticorps ou à des résultats faussement négatifs. Des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités propres au tissu, peuvent conduire à des résultats incohérents.<sup>4</sup>

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

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

Les anticorps de Leica Biosystems Newcastle Ltd sont destinés, selon les besoins, à être utilisés sur des coupes incluses en paraffine ou des coupes congelées, et conformément à des exigences particulières en matière de fixation. Une expression antigénique inattendue est susceptible de se produire, en particulier au niveau des néoplasmes. L'interprétation clinique de toute coupe tissulaire marquée doit comporter une analyse morphologique et l'évaluation des contrôles appropriés.

## Bibliographie Générale

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Freeman SD, Kelm S, Barber EK et al. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. *Blood* 85(8): 2005–2012 (1995)
6. Simmons D and Seed B. Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. *Journal of Immunology* 141: 2797–2800 (1988).

## Amendements Apportés à la Version Précédente

La Composition du Réactif a été modifiée.

La Concentration Totale en Protéines a été modifiée.

La Concentration en Anticorps a été modifiée.

## Date de Publication

16 Avril 2009 (NCL-L-CD33/CE/UK)

# Méthodologie immunohistochimique d'utilisation des anticorps Novocastra™ sur les tissus inclus en paraffine à l'aide de la technique de restauration de l'épitope par la chaleur.

## A. Réactifs nécessaires mais non fournis

1. Solvants standard utilisés en immunohistochimie.
2. Solution saline tamponnée de Tris (TBS) 50 mM, pH 7,6.
3. Solution de restauration de l'épitope (voir section C Solutions de restauration de l'épitope).
4. Diluant anticorps, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Système de révélation, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ou RE7290-K (50 tests).
6. Milieu de montage - utiliser selon les recommandations du fabricant.

## B. Equipements nécessaires mais non fournis

1. Incubateur réglé à 25 °C.
2. Dispositif de chauffage pour restauration de l'épitope : bain-marie ou four à vapeur, autocuiseur ou tout autre appareil de laboratoire à température contrôlée.
3. Équipements généraux de laboratoire d'immunohistochimie..

## C. Solutions de restauration de l'épitope (voir Recommandations d'utilisation pour l'une des solutions suivantes)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampon citrate contenant un surfactant   |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampon EDTA contenant un surfactant      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampon Tris/EDTA contenant un surfactant |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## D. Méthodologie

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

Les utilisateurs doivent déterminer les dilutions optimales des anticorps. Sauf mention contraire, toutes les étapes sont réalisées à température ambiante (25 °C).

#### Restauration de l'épitope

Veuillez respecter le mode d'emploi des Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

#### Révélation

Veuillez respecter le mode d'emploi de Novolink™ Polymer Detection Systems , RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ou RE7290-K (50 tests).

## E. Amendements apportés à la version précédente

Non applicable.

## F. Date de publication

23 avril 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Anticorpo Monoclonale Murino Liquido CD33

## Codice Del Prodotto: NCL-L-CD33

### Uso Previsto

Per uso diagnostico in vitro.

NCL-L-CD33 è destinato all'identificazione qualitativa in microscopia ottica della molecole CD33, in sezioni incluse in paraffina. L'interpretazione clinica di ogni colorazione o della sua assenza va integrata da studi morfologici che utilizzino i controlli appropriati e deve essere valutata da un patologo qualificato, nel contesto della storia clinica del paziente e delle altre metodiche diagnostiche adoperate.

### Principio Della Procedura

Le tecniche di colorazione immunostochimica (IHC) consentono la visualizzazione degli antigeni mediante l'applicazione sequenziale di un anticorpo specifico per l'antigene (anticorpo primario), di un anticorpo secondario che lega l'anticorpo primario e di un complesso enzimatico con un substrato cromogeno; l'applicazione dei tre reagenti è intervallata da fasi di lavaggio. L'attivazione enzimatica del cromogeno produce una reazione visibile in corrispondenza del sito antigenico. Il campione biologico può, quindi, essere controcolorato e montato. I risultati vengono interpretati mediante un microscopio ottico e sono utili nella diagnosi differenziale di processi fisiopatologici, che possono essere più o meno associati ad un particolare antigene.

### Clone

PWS44

### Immunogeno

Proteina ricombinante procariotica, corrispondente a una regione del dominio C2 della molecola CD33 umana.

### Specificità

CD33 umano.

### Composizione Del Reagente

NCL-L-CD33 è un supernatante liquido di coltura tissutale, contenente 15 mM di sodio azide come conservante.

### Classe Ig

IgG2b

### Concentrazione Proteica Totale

Total Protein

1,0–8,0 g/l. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione proteica totale specifica del lotto.

### Concentrazione Anticorpale

Superiore o uguale a 630 mg/l, come determinato mediante test ELISA. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione di Ig specifica del lotto.

### Raccomandazioni Per L'uso

Immunostochimica (vedere **D. Metodologia**) sulle sezioni in paraffina. Diluizione raccomandata: 1:100 per 30 minuti a 25 °C. Smascheramento ad alta temperatura dell'epitopo mediante Epitope Retrieval Solution pH 9,0 RE7119 o RE7122. Novolink™ Polymer Detection System RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests). Queste raccomandazioni costituiscono delle semplici linee guida; spetta al singolo utente stabilire la diluizione di lavoro ottimale.

### Conservazione E Stabilità

Conservare a 2–8 °C. Non congelare. Immediatamente dopo l'uso, raffreddare di nuovo a 2–8 °C. Non usare dopo la data di scadenza, indicata sull'etichetta del flacone. Condizioni di conservazione diverse da quelle sopra specificate vanno verificate dall'utente.

### Preparazione Del Campione Biologico

Il fissativo raccomandato è la formalina tamponata neutra al 10% per sezioni tissutali incluse in paraffina.

### Avvertenze E Precauzioni

Questo reagente è stato preparato dal supernatante di coltura cellulare. Trattandosi di un prodotto biologico, va maneggiato con cautela.

La molarità della sodio azide nel reagente corrisponde a 15 mM. Su richiesta, è disponibile una scheda dei dati di sicurezza del materiale (MSDS) per la sodio azide.

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

Prima e dopo la fissazione, i campioni biologici e tutti i materiali ad essi esposti vanno trattati come potenzialmente infettanti e smaltiti con le appropriate precauzioni.<sup>1</sup> Non pipettare i reagenti con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni biologici con la pelle e con le mucose. Se i reagenti o i campioni biologici vengono a contatto con zone sensibili, sciacquare abbondantemente le parti interessate. Consultare il medico.

Ridurre al minimo la contaminazione microbica dei reagenti, allo scopo di evitare un aumento di colorazione aspecifica.

Tempi o temperature d'incubazione diversi da quelli specificati possono condurre a risultati non veritieri. Tali variazioni devono essere convalidate dall'utente.

## Controllo Qualità

Differenze nella processazione del tessuto e nelle tecniche in uso presso il laboratorio dell'utente possono produrre una discrepanza significativa nei risultati, rendendo necessaria la regolare esecuzione di controlli interni, in aggiunta alle procedure descritte di seguito.

I controlli devono essere costituiti da campioni biologici freschi autoptici/bioptici/chirurgici e devono essere il più rapidamente possibile fissati in formalina, processati ed inclusi in paraffina, allo stesso modo dei campioni biologici ottenuti dal paziente.

## Controllo Positivo Del Tessuto

È usato per indicare tessuti correttamente preparati e tecniche di colorazione appropriate.

Per ogni gruppo di condizioni del test e ogni volta che viene eseguita la colorazione, deve essere incluso un controllo positivo del tessuto.

Un tessuto a debole colorazione positiva è più adatto di uno a colorazione positiva intensa per un ottimale controllo qualità e per mettere in evidenza anche minimi livelli di degradazione del reagente.<sup>2</sup>

Il tessuto raccomandato per il controllo positivo è il midollo osseo.

Se il controllo positivo del tessuto non dimostra colorazione positiva, i risultati con i campioni biologici del test vanno considerati non validi.

## Controllo Negativo Del Tessuto

Va esaminato dopo il controllo positivo, per verificare la specificità nei confronti dell'antigene bersaglio da parte dell'anticorpo primario. Il tessuto raccomandato per il controllo negativo è il muscolo scheletrico.

In alternativa, la varietà dei tipi cellulari presenti nella maggior parte delle sezioni tissutali offre spesso siti di controllo negativo, ma questo va verificato dall'utente.

La colorazione aspecifica, se presente, assume di solito aspetto diffuso. La colorazione sporadica del tessuto connettivo può anche manifestarsi in seguito ad iperfissazione di sezioni di tessuto in formalina. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, usare cellule intatte. Le cellule necrotiche o degenerate si colorano spesso in maniera aspecifica<sup>3</sup>. Si possono osservare risultati falsamente positivi, dovuti a legame non immunologico delle proteine o a prodotti di reazione del substrato. Tali falsi positivi possono essere anche causati da enzimi endogeni quali la pseudoperossidasi (eritrociti), la perossidasi endogena (citocromo C) o la biotina endogena (es. fegato, mammella, cervello, rene), a seconda del tipo di immunocolorazione usato. Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame enzimatico aspecifico dall'immunoreattività specifica, possono essere colorati ulteriori tessuti del paziente esclusivamente con substrato cromogeno o con complessi enzimatici (avidina-biotina, streptavidina, polimero marcato) e substrato cromogeno. Se nel controllo negativo del tessuto compare una colorazione specifica, i risultati sui campioni biologici ottenuti dal paziente devono essere considerati non validi.

## Controllo Negativo Del Reagente

Usare un controllo negativo aspecifico del reagente in luogo dell'anticorpo primario, con una sezione di ogni campione biologico del paziente, per valutare la colorazione aspecifica e per consentire una migliore interpretazione della colorazione specifica in corrispondenza del sito antigenico.

## Tessuto Del Paziente

Successivamente, esaminare i campioni biologici del paziente colorati con NCL-L-CD33. L'intensità della colorazione positiva va analizzata nel contesto di qualsiasi colorazione aspecifica di fondo del controllo negativo del reagente. Come per tutti gli altri test immunistochimici, un risultato negativo significa che l'antigene non è stato determinato, ma non necessariamente che fosse assente dalle cellule o dal tessuto esaminato. Se necessario, usare un pannello di anticorpi per identificare reazioni falsamente negative.

## Risultati Attesi

### Tessuti normali

Il clone PWS44 ha messo in evidenza l'antigene CD33 sulla membrana cellulare e nel citoplasma delle cellule delle linee mielomonocitiche. In normali biopsie osteomidollari condotte mediante trapano (12/12), il clone PWS44 colora i precursori emopoietici mieloidi e mielomonocitici e i macrofagi maturi; le cellule delle serie eritroide e megacariocitica sono negative. È stato osservato un certo grado di reattività nei citotrofoblasti e nei sinciziotrofoblasti della placenta. Non è stata osservata alcuna ulteriore colorazione, a parte quella delle cellule dendritiche e dei macrofagi infiltranti, in altri tessuti normali esaminati (n=54).

### Tessuti tumorali

Il clone PWS44 ha colorato (73/77) leucemia mieloide acuta, (4/4) leucemia mieloide cronica, (5/5) sarcoma granulocitico e (11/11) casi di displasia mieloide e di malattia mieloproliferativa. PWS44 ha colorato (0/74) casi di tumori non linfoidi. Nelle neoplasie linfoidi esaminate, si è osservata una colorazione da CD33 in: (4/15) leucemia linfoblastica da precursori di cellule B, (2/10) leucemia linfoblastica da precursori di cellule T, (1/5) linfoma di Hodgkin classico, (1/6) linfoma di Burkitt, (1/3) neoplasia plasmacellulare, (1/1) neoplasia linfoide ematodermica, (0/1) linfoma anaplastico a grandi cellule, (0/1) linfoma linfoplasmacitico.

**NCL-L-CD33 è utile come parte di un pannello anticorpale nell'identificazione di cellule della linea mieloide e monocitica e delle leucemie e dei disordini mieloproliferativi derivati da queste cellule.**

## Limitazioni Generali

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

La colorazione del tessuto dipende dalle modalità di manipolazione e di processazione del tessuto stesso, adottate prima della colorazione. La fissazione, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento o la sezione condotti in modo non corretto, o la contaminazione con altri tessuti o liquidi, possono produrre artefatti, intrappolamento (trapping) anticorpale o risultati falsi negativi. Risultati incompatibili possono essere dovuti a modifiche dei metodi di fissazione e di inclusione o ad irregolarità intrinseche al tessuto.<sup>4</sup>

Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati.

L'interpretazione clinica di ogni colorazione o della sua assenza va integrata da studi morfologici che utilizzino i controlli appropriati e deve essere valutata da un patologo qualificato, nel contesto della storia clinica del paziente e delle altre metodiche diagnostiche adoperate.

Gli anticorpi di Leica Biosystems Newcastle Ltd. sono destinati all'uso, quando indicato, su sezioni congelate o incluse in paraffina, con specifici requisiti di fissazione. Un'espressione antigenica inattesa può manifestarsi in particolare nelle neoplasie. L'interpretazione clinica di ogni sezione tissutale colorata deve includere l'analisi morfologica e la valutazione dei controlli appropriati.

### **Riferimenti Bibliografici Di Base**

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Freeman SD, Kelm S, Barber EK et al. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. Blood 85(8): 2005–2012 (1995)
6. Simmons D and Seed B. Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. Journal of Immunology 141: 2797–2800 (1988).

### **Modifiche Alla Pubblicazione Precedente**

La Composizione Del Reagente è cambiata.

La Concentrazione Proteica Totale è cambiata.

La Concentrazione Anticorpale è cambiata.

### **Data Di Pubblicazione**

16 aprile 2009 (NCL-L-CD33/CE/UK)

# Metodologia immunocistochimica per l'uso di anticorpi Novocastra™ su tessuto incluso in paraffina, utilizzando la tecnica di smascheramento ad alta temperatura dell'epitopo.

## A. Reagenti necessari ma non forniti

1. Solventi standard utilizzati in immunocistochimica.
2. Tampone Tris salino (TBS) 50 mM a pH 7.6.
3. Soluzione di smascheramento dell'epitopo (vedere sezione C Soluzioni per lo smascheramento dell'epitopo).
4. Diluente per anticorpi, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Sistema di visualizzazione, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) o RE7290-K (50 tests).
6. Mezzogiorno di montaggio - usare secondo le raccomandazioni del produttore.

## B. Attrezzature necessarie ma non fornite

1. Set incubatore a 25 °C.
2. Dispositivo di riscaldamento per lo smascheramento dell'epitopo: bagno termostatico o vaporizzatore, autoclave o altre attrezzature termostatiche da laboratorio.
3. Attrezzatura di base del laboratorio di immunocistochimica. steamer vaporizer.

## C. Soluzioni per lo smascheramento dell'epitopo (vedere le Raccomandazioni per l'uso per uno dei seguenti prodotti)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampone citrato contenente surfattante   |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampone EDTA contenente surfattante      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampone Tris/EDTA contenente surfattante |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## D. Metodologia

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

Gli utenti devono determinare le diluizioni ottimali degli anticorpi. Se non indicato diversamente, tutte le fasi vanno condotte a temperatura ambiente (25 °C).

### Smascheramento dell'epitopo

Si prega di seguire le istruzioni per l'uso in Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

### Visualizzazione

Si prega di seguire le istruzioni per l'uso in Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) o RE7290-K (50 tests).

## E. Modifiche alla pubblicazione precedente

Non applicabile.

## F. Data di pubblicazione

23 aprile 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Flüssiger Monoklonaler Maus-Antikörper CD33

## Produkt-Nr.: NCL-L-CD33

### Verwendungszweck

Für *in-vitro*-Diagnostik.

NCL-L-CD33 ist für den qualitativen Nachweis der CD33-Moleküle in Paraffinschnitten mittels Lichtmikroskopie gedacht. Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

### Verfahrensgrundlage

Immunhistochemische (IHC) Färbetechniken gestatten die optische Darstellung von Antigenen mittels sequentieller Anwendung eines spezifischen Antikörpers zum Antigen (primärer Antikörper), eines sekundären Antikörpers zum primären Antikörper und eines Enzymkomplexes mit einem chromogenen Substrat, jeweils getrennt durch dazwischen liegende Waschschrte. Die enzymatische Aktivierung des Chromogens führt zu einem sichtbaren Reaktionsprodukt am Ort des Antigens. Die Probe kann dann gegengefärbt und mit einem Deckglas versehen werden. Die Ergebnisse werden mithilfe eines Lichtmikroskops interpretiert und unterstützen die Differentialdiagnose pathophysiologischer Prozesse, die mit einem bestimmten Antigen assoziiert sein könnten.

### Klon

PWS44

### Immunogen

Prokaryotisches rekombinantes Protein, das einer Region der C2-Domäne des humanen CD33-Moleküls entspricht.

### Spezifität

Humanes CD33.

### Reagenzzusammensetzung

NCL-L-CD33 ist ein liquider Gewebekulturüberstand, der 15 mmol/l Natriumazid als Konservierungsmittel enthält.

### Ig-Klasse

IgG2b

### Gesamtproteinkonzentration Total Protein

1,0–8,0 g/L. Siehe Angaben auf dem Produktetikett bezüglich der chargenspezifischen Gesamtproteinkonzentration.

### Antikörperkonzentration

Größer als oder gleich 630 mg/L laut ELISA-Bestimmung. Hinsichtlich der chargenspezifischen Ig-Konzentration siehe Angaben auf dem Produktetikett.

### Gebrauchsempfehlungen

Immunhistochemie (siehe **D. Vorgehensweise**) auf Paraffinschnitten. Empfohlene Verdünnung: 1:100 über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 25 °C. Hitzeinduzierte Antigendemaskierung mit Epitope Retrieval Solutions pH 9,0 RE7119 oder RE7122. Novolink™ Polymer Detection System RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) oder RE7290-K (50 tests). Dies ist nur eine Empfehlung, und die Benutzer sollten ihre eigenen optimalen Arbeitsverdünnungen bestimmen.

### Lagerung und Stabilität

Bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren. Nach Gebrauch sofort wieder bei 2–8 °C lagern. Nach Ablauf des Verfallsdatums (auf dem Behälteretikett) darf das Produkt nicht mehr verwendet werden. Lagerbedingungen, die von den oben genannten Bedingungen abweichen, müssen vom Benutzer verifiziert werden.

### Probenvorbereitung

Für paraffineingebettete Gewebeschnitte ist das empfohlene Fixativ 10% neutral gepuffertes Formalin.

### Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

Dieses Reagenz wurde aus Zellkulturüberstand zubereitet. Das Reagenz ist ein biologisches Produkt und sollte mit entsprechender Vorsicht gehandhabt werden.

Die Molarität des Natriumazids in diesem Reagenz beträgt 15 mmol/l. Ein Sicherheitsdatenblatt (MSDS) für Natriumazid ist auf Anfrage erhältlich.

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

Vor und nach der Fixierung sind die Proben sowie alle Materialien, die mit ihnen in Kontakt gekommen sind, als potentiell infektiös zu behandeln und daher mit entsprechender Vorsicht zu entsorgen.<sup>1</sup> Reagenzien dürfen niemals mit dem Mund pipettiert werden, und jeglicher Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden. Falls Reagenzien oder Proben mit empfindlichen Bereichen in Kontakt gekommen sind, müssen diese mit reichlich Wasser gespült werden. Ärztlichen Rat einholen.

Die mikrobielle Verunreinigung von Reagenzien ist zu minimieren, da ansonsten eine erhöhte unspezifische Färbung auftreten kann.

Falls die spezifizierten Inkubationszeiten oder –temperaturen nicht eingehalten werden, kann es zu fehlerhaften Ergebnissen kommen. Jegliche Abweichungen von den angegebenen Werten müssen vom Benutzer verifiziert werden.

## Qualitätskontrolle

Unterschiede bei der Gewebearbeitung und den technischen Verfahren im Labor des Benutzers können zu signifikanten Schwankungen bei den Ergebnissen führen. Daher ist es wichtig, zusätzlich zu den folgenden Verfahren regelmäßige laborinterne Kontrollen durchzuführen.

Die Kontrollen sollten mit frischen Autopsie-/Biopsie-/chirurgischen Proben vorgenommen werden, die so bald wie möglich und auf dieselbe Weise wie die Patientenprobe(n) in Formalin fixiert, behandelt und in Paraffin eingebettet worden sind.

## Positive Gewebekontrolle

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an.

In jedem Färbelauf sollte für jeden Satz Testbedingungen eine positive Gewebekontrolle durchgeführt werden.

Gewebe mit schwach positiver Färbung ist für die optimale Qualitätskontrolle und den Nachweis kleiner Minderungen in der Reagenzleistung besser geeignet als ein Gewebe mit stark positiver Färbung.<sup>2</sup>

Für die positive Gewebekontrolle wird Knochenmark empfohlen.

Falls das positive Kontrollgewebe keine positive Färbung nachweisen kann, sollten die mit den Testproben erzielten Ergebnisse als ungültig betrachtet werden.

## Negative Gewebekontrolle

Die negative Gewebekontrolle sollte nach der positiven Gewebekontrolle erfolgen, um die Spezifität der Zielantigenmarkierung durch den primären Antikörper zu verifizieren.

Für die negative Gewebekontrolle wird Skelettmuskelgewebe empfohlen.

Alternativ bietet die Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen, die in den meisten Gewebeschnitten vorliegen, häufig Stellen für eine negative Kontrolle. Jedoch sollte dies vom Benutzer verifiziert werden.

Liegt eine unspezifische Färbung vor, hat diese gewöhnlich ein diffuses Erscheinungsbild. Eine sporadische Färbung des Bindegewebes kann ebenfalls in Schnitten von übermäßig formalinfixierten Geweben beobachtet werden. Zur Bewertung der Färberegebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.<sup>3</sup> Falsch-positive Ergebnisse können aufgrund einer nichtimmunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten beobachtet werden. In Abhängigkeit von der Art der verwendeten Immunfärbung können solche Ergebnisse auch durch endogene Enzyme wie Pseudoperoxidase (Erythrozyten), endogene Peroxidase (Zytochrom C) oder endogenes Biotin (beispielsweise Leber, Mamma, Gehirn, Niere) hervorgerufen werden. Um eine endogene Enzymaktivität bzw. eine unspezifische Enzymbindung von einer spezifischen Immunreaktivität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substratchromogen bzw. mit Enzymkomplexen (Avidin-Biotin, Streptavidin, markiertes Polymer) plus Substratchromogen gefärbt werden. Falls im negativen Kontrollgewebe eine spezifische Färbung auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

## Negative Reagenzkontrolle

Zur Beurteilung einer unspezifischen Färbung und zur besseren Bewertung einer spezifischen Färbung an der Antigenstelle ist mit einem Schnitt jedes Patientenpräparates anstelle des primären Antikörpers eine unspezifische negative Reagenzkontrolle zu verwenden.

## Patientengewebe

Die mit NCL-L-CD33 gefärbten Patientenproben müssen zuletzt untersucht werden. Eine positive Färbintensität ist im Kontext einer unspezifischen Hintergrundfärbung der negativen Reagenzkontrolle zu bewerten. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis, dass das Antigen nicht nachgewiesen wurde. Ein negatives Ergebnis bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, dass das Antigen in den getesteten Zellen / im getesteten Gewebe nicht vorlag. Bei Bedarf sollte zur Identifizierung falsch-negativer Reaktionen eine Gruppe von Antikörpern verwendet werden.

## Erwartete Ergebnisse

### Normale Gewebe

Klon PWS44 wies das CD33-Antigen auf der Membran und im Zytoplasma von Zellen myelomonozytischer Zelllinien nach. Im normalen Knochenmark von Trepanationsbiopsien (12/12) färbt Klon PWS44 myeloide und myelomonozytische Hämatopoese und ausgereifte Makrophagen; Zellen der erythroiden und megakaryozytischen Reihen reagieren dagegen negativ. Bei Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten der Plazenta wurde eine gewisse Reaktivität beobachtet. Mit Ausnahme von dendritischen Zellen und infiltrierenden Makrophagen wurde bei sonstigen untersuchten, normalen Geweben keine Färbung beobachtet (n=54).

### Tumorgewebe

Klon PWS44 färbte (73/77) akuten myeloiden Leukämien, (4/4) chronischen myeloiden Leukämien, (5/5) granulozytischen Sarkomen und (11/11) Fällen von myeloider Dysplasie und myeloproliferativer Erkrankung. PWS44 färbte (0/74) Fällen von nicht lymphoiden Tumoren. Bei den getesteten lymphoiden Neoplasmen wurde eine CD33-Färbung bei (4/15) lymphoblastischen Leukämien der Vorläufer-B-Zellen, (2/10) lymphoblastischen Leukämien der Vorläufer-T-Zellen, (1/5) klassischen Hodgkin-Lymphomen, (1/6) Burkitt-Lymphomen, (1/3) Plasmazellneoplasmen, (1/1) hämatodermalen lymphoiden Neoplasma, (0/1) anaplastischen großzelligen Lymphom und (0/1) lymphoplasmazytischen Lymphom beobachtet.

**NCL-L-CD33 ist als Teil eines Antikörper-Panels zum Nachweis von Zellen myeloider und monozytischer Zelllinien sowie von diesen Zellen abgeleiteter Leukämien und myeloproliferativer Erkrankungen von Nutzen.**

## Allgemeine Beschränkungen

Die Immunhistochemie ist ein mehrstufiger diagnostischer Prozess, der eine spezialisierte Ausbildung auf den folgenden Gebieten erfordert: Auswahl der entsprechenden Reagenzien; Gewebeauswahl, -fixierung und -verarbeitung; Vorbereitung des IHC-Objekträgers sowie Bewertung der Färberegebnisse.



Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor dem Färben ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder eine Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper-Trapping oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Abweichende Ergebnisse können aufgrund von Unterschieden bei der Fixierung und Einbettung oder intrinsischen Unregelmäßigkeiten im Gewebe selbst entstehen.<sup>4</sup>

Eine exzessive oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Bewertung von Ergebnissen gefährden.

Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Antikörper von Leica Biosystems Newcastle Ltd sind wie angezeigt für die Verwendung entweder auf gefrorenen oder in Paraffin eingebetteten Schnitten mit spezifischen Fixierungsanforderungen bestimmt. Es kann insbesondere bei Neoplasmen zu einer unerwarteten Antigenexpression kommen. Die klinische Bewertung eines gefärbten Gewebeschnitts muss eine morphologische Analyse und die Auswertung der entsprechenden Kontrollen einschließen.

### **Literatur - Allgemein**

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Freeman SD, Kelm S, Barber EK et al. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. Blood 85(8): 2005–2012 (1995)
6. Simmons D and Seed B. Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. Journal of Immunology 141: 2797–2800 (1988).

### **Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe**

Die Reagenzzusammensetzung wurde geändert.

Die Gesamtproteinkonzentration wurde geändert.

Die Antikörperkonzentration wurde geändert.

### **Ausgabedatum**

16 April 2009 (NCL-L-CD33/CE/UK)

# Immunhistochemische Vorgehensweise für die Anwendung von Novocastra™-Antikörpern auf in Paraffin eingebettetes Gewebe mit Hilfe des wärmeinduzierten Epitopdemaskierungsverfahrens.

## A. Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Reagenzien

1. In der Immunhistochemie gebräuchliche Standardlösungsmittel
2. 50 mM Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) mit pH-Wert 7,6.
3. Epitop-Retrieval-Lösung (siehe Abschnitt C Epitopdemaskierungslösung)
4. Antikörperverdünnungsmittel, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133..
5. Visualisierungssystem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) oder RE7290-K (50 tests).
6. Fixativ – gemäß Herstellerempfehlungen verwenden.

## B. Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Ausrüstung

1. Auf 25 °C eingestellter Inkubator.
2. Erwärmungsgerät für das Epitopdemaskierungsverfahren: Wasserbad oder Dampfbad, Dampfdrucktopf oder andere temperaturgesteuerte Laboranlage.
3. Allgemeine immunhistochemische Laborausrüstung.

## C. Epitopdemaskierungslösungen (siehe Gebrauchsempfehlungen für eines der folgenden Produkte)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Zitratbasierter Puffer mit Detergens     |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | EDTA-basierter Puffer mit Detergens      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tris-/EDTA-basierter Puffer mit Detergen |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## D. Vorgehensweise

**Vor der Durchführung dieser Methode müssen die Anwender in immunhistochemischen Verfahren ausgebildet werden.**

Die Kunden müssen die optimalen Verdünnungen für Antikörper bestimmen. Wenn nicht anders angegeben, werden alle Schritte bei Raumtemperatur (25 °C) durchgeführt.

### Epitopdemaskierungsverfahren

Bitte befolgen Sie die Gebrauchsanweisungen für die Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

### Visualisierung

Bitte befolgen Sie die Gebrauchsanweisungen der Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) oder RE7290-K (50 tests).

## E. Änderungen zur vorherigen Ausgabe

Keine.

## F. Ausgabedatum

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Anticuerpo Monoclonal Líquido de Ratón CD33

## Código De Producto: NCL-L-CD33

### Indicaciones De Uso

*Para uso diagnóstico in vitro.*

NCL-L-CD33 está indicado para la identificación cualitativa en secciones de parafina, mediante microscopía óptica, de moléculas de CD33. La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia debe complementarse con estudios morfológicos, con el uso de los controles adecuados, y un anatomopatólogo cualificado debe evaluarla en el contexto del historial clínico del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

### Principio Del Procedimiento

Las técnicas de tinción inmunohistoquímica (IHQ) permiten la visualización de antígenos mediante la aplicación secuencial de un anticuerpo específico dirigido contra el antígeno (anticuerpo primario), un anticuerpo secundario dirigido contra el anticuerpo primario y un complejo enzimático con un sustrato cromogénico, con pasos de lavado intercalados. La activación enzimática del cromógeno produce una reacción visible en el lugar en que se encuentra el antígeno. Luego se puede contrateñir la muestra y cubrirla con un cubreobjeto. Los resultados se interpretan utilizando un microscopio óptico y son de ayuda en el diagnóstico diferencial de los procesos fisiopatológicos, que pueden estar o no vinculados a un determinado antígeno.

### Clon

PWS44

### Inmunógeno

Proteína de fusión recombinante procariótica correspondiente a una porción del dominio C2 de la molécula de CD33 humano.

### Especificidad

CD33 humano.

### Composición Del Reactivo

NCL-L-CD33 es un sobrenadante de cultivo tisular líquido, que contiene azida sódica 15mM como conservante.

### Clase de Ig

IgG2b

### Concentración Total De Proteína Total Protein

1,0–8,0 g/L. Consulte la etiqueta del vial para ver la concentración total de proteína específica del lote.

### Concentración De Anticuerpo

Igual o superior a 630 mg/L según se ha determinado mediante ELISA. Consulte en la etiqueta del vial la concentración de Ig específica del lote.

### Recomendaciones De Uso

Inmunohistoquímica (ver **D. Metodología**) con secciones de parafina. Dilución sugerida: 1:100 durante 30 minutos a 25 °C. Recuperación de epitopos inducida por calor con Epitope Retrieval Solution pH 9,0 RE7119 o RE7122. Novolink™ Polymer Detection System RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests). Ésta es tan solo una pauta y cada usuario debe determinar sus propias diluciones de trabajo óptimas.

### Almacenamiento Y Estabilidad

Almacénelo a una temperatura de 2–8 °C. No lo congele. Devuélvalo a 2–8 °C inmediatamente después de su uso. No lo utilice después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. Cualesquiera condiciones de almacenamiento que no sean las arriba especificadas deben ser verificadas por el usuario.

### Preparación De Las Muestras

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

### Advertencias Y Precauciones

Este reactivo se ha preparado a partir del sobrenadante de un cultivo celular. Como se trata de un producto de origen biológico, debe manipularse con precaución.

La molaridad de la azida sódica en este reactivo es 15 mM. Si la solicita, existe una hoja de información sobre la seguridad del material (MSDS) azida sódica a su disposición.

Consulte las normativas nacionales, estatales, provinciales o municipales acerca de cómo desechar cualquier componente potencialmente tóxico.

Las muestras, antes y después de ser fijadas, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como susceptibles de transmitir una infección, y se deben desechar tomando las precauciones adecuadas.<sup>1</sup> No pipeteo nunca los reactivos con la boca, y evite el contacto de la piel y de las membranas mucosas con los reactivos y las muestras. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas delicadas, lave éstas con abundante agua. Acuda inmediatamente al médico.

Reduzca al mínimo la contaminación microbiana de los reactivos; de lo contrario, podría producirse un aumento de la tinción no específica.

Cualquier tiempo o temperatura de incubación que no sean los aquí especificados pueden conducir a resultados erróneos. Cualquier cambio de tal naturaleza debe ser validado por el usuario.

## Control De Calidad

Las diferencias en el procesamiento de los tejidos y en los procedimientos técnicos del laboratorio del usuario pueden producir una variabilidad significativa en los resultados; por ello, es necesario que éste lleve a cabo regularmente los controles de su propio laboratorio, además de los siguientes procedimientos.

Los controles deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o quirúrgicas fijadas en formol, procesadas e incluidas en parafina, lo antes posible, de manera idéntica a la utilizada para la muestra o muestras del paciente o pacientes.

## Control Tisular Positivo

Se utiliza para indicar la preparación correcta de los tejidos y las técnicas de tinción adecuadas.

Debe incluirse un control tisular positivo por cada conjunto de condiciones de ensayo en cada tinción o serie de tinciones realizada.

Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado que un tejido con una tinción positiva intensa para lograr un control de calidad óptimo y para detectar niveles bajos de degradación del reactivo.<sup>2</sup>

El tejido de control positivo recomendado es médula ósea.

Si el tejido de control positivo no muestra tinción positiva, los resultados de las muestras analizadas deben considerarse no válidos.

## Control Tisular Negativo

Debe examinarse después del control de tejido positivo, a fin de verificar la especificidad del marcado del antígeno diana por el anticuerpo primario.

El tejido de control negativo recomendado es músculo esquelético.

O bien, la variedad de diferentes tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejido ofrece con frecuencia lugares de control negativo, pero esto debe ser verificado por el usuario.

Si aparece una tinción no específica, ésta tiene generalmente aspecto difuso. En cortes de tejido fijados excesivamente con formol puede observarse también una tinción esporádica del tejido conectivo. Utilice células intactas para la interpretación de los resultados de la tinción. A menudo, las células necróticas o degeneradas quedan teñidas de forma no específica.<sup>3</sup> También pueden observarse falsos positivos causados por la unión no inmunológica a proteínas o a productos de reacción del sustrato. Estos falsos positivos pueden estar causados también por enzimas endógenas tales como la pseudoperoxidasa (eritrocitos), la peroxidasa endógena (citocromo C), o la biotina endógena (por ejemplo, de hígado, mama, cerebro, riñón), en función del tipo de inmunotinción utilizada. Para diferenciar la actividad de las enzimas endógenas o los enlaces no específicos de las enzimas de la inmunorreactividad específica, pueden teñirse otros tejidos del paciente exclusivamente con cromógeno sustrato o con complejos enzimáticos (avidina-biotina, estreptavidina, polímeros marcados) y cromógeno sustrato respectivamente. Si se produce una tinción específica del control tisular negativo, los resultados de las muestras de los pacientes deben considerarse no válidos.

## Control De Reactivo Negativo

Utilice un control de reactivo negativo no específico en lugar del anticuerpo primario con un corte de cada muestra del paciente a fin de evaluar la tinción no específica y obtener una mejor interpretación de la tinción específica en el lugar en que se encuentra el antígeno.

## Tejido Del Paciente

Examine las muestras del paciente o pacientes teñidas con NCL-L-CD33 al final. La intensidad de la tinción positiva debe valorarse en el contexto de cualquier tinción de fondo no específica del control de reactivo negativo. Como con cualquier prueba inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que no se ha detectado antígeno, y no que el antígeno esté ausente en las células o tejido probados. Si es necesario, use un panel de anticuerpos para identificar falsas reacciones negativas.

## Resultados esperados

### Tejidos normales

El clon PWS44 detectó el antígeno CD33 en la membrana y en el citoplasma de células de linajes mielomonocíticos. En biopsias de trépano de médula ósea (12 de 12), el clon PWS44 tiñe hemopoiesis mieloide y mielomonocítica y macrófagos maduros, las células de las series eritroides y megacariocíticas son negativas. Se ha observado alguna reactividad en citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos de placenta. Salvo en células dendríticas y macrófagos de infiltración, no se observó tinción en otros tejidos normales evaluados (n=54).

### Tejidos tumorales

El clon PWS44 tiñó (73 de 77) leucemias mieloides agudas, (4 de 4) leucemia mieloide crónica, (5 de 5) sarcomas granulocíticos y (11 de 11) casos de displasia mieloide y enfermedades mieloproliferativas. PWS44 tiñó (0 de 74) casos de tumores no linfoides. En los neoplasmas linfoides ensayados, se observó tinción por el CD33 en 4 de 15 leucemias linfoblásticas de precursor B, 2 de 10 leucemias linfoblásticas de precursor T, 1 de 5 linfomas de Hodgkin clásicas, 1 de 6 linfomas de Burkitt, 1 de 3 neoplasmas de células de plasma, 1 de 1 neoplasmas de linfoides hematodérmicos, 0 de 1 linfoma de célula grande anaplásica, 0 de 1 linfoma linfoplasmácico.

**NCL-L-CD33 es útil como parte de un panel de anticuerpos para la identificación de células de linajes de mieloides y monocíticos, y leucemias y desórdenes mieloproliferativos derivados de esas células.**

## Limitaciones Generales

La inmunohistoquímica es un proceso de diagnóstico en varias fases que abarca: la formación especializada en la selección de los reactivos apropiados, la selección, fijación y procesamiento de tejidos, la preparación del portaobjeto para IHC, y la interpretación de los resultados de la tinción.

La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento del tejido previos a la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o seccionamiento incorrectos, o la contaminación con otros tejidos o líquidos pueden generar artefactos, atrapamiento del anticuerpo o falsos negativos. La aparición de resultados incoherentes puede deberse a variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, o a irregularidades inherentes al tejido.<sup>4</sup>

Una contratinción excesiva o incompleta puede poner en peligro la interpretación correcta de los resultados.

La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia debe complementarse con estudios morfológicos, con el uso de los controles adecuados, y un anatomopatólogo cualificado debe evaluarla en el contexto del historial clínico del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Los anticuerpos de Leica Biosystems Newcastle Ltd son para utilizarlos, según se indique, con secciones congeladas o incluidas en parafina, con requisitos de fijación específicos. Puede producirse una expresión inesperada del antígeno, especialmente en las neoplasias. La interpretación clínica de cualquier sección de tejido teñida debe incluir un análisis morfológico y la evaluación de los controles apropiados.

### **Bibliografía - General**

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Freeman SD, Kelm S, Barber EK et al. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules, Blood 85(8): 2005–2012 (1995)
6. Simmons D and Seed B. Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. Journal of Immunology 141: 2797–2800 (1988).

### **Correcciones A La Publicación Anterior**

La Composición Del Reactivo ha cambiado.

La Concentración Total De Proteína ha cambiado.

La Concentración De Anticuerpo ha cambiado.

### **Fecha De Publicación**

16 de abril de 2009 (NCL-L-CD33/CE/UK)

# Metodología inmunohistoquímica para la utilización de anticuerpos Novocastra™, en tejidos incluidos en parafina, con la aplicación de la técnica de recuperación de epítomos inducida por calor.

## A. Reactivos necesarios que no se suministran

1. Disolventes estándar utilizados en inmunohistoquímica.
2. Solución salina tamponada con Tris 50 mM (TBS), pH 7,6.
3. Solución para la recuperación de epítomos (véase la sección C Soluciones para la recuperación de epítomos).
4. Diluyente del anticuerpo, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Sistema de visualización, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) o RE7290-K (50 tests).
6. Medio de montaje; utilizado de la forma recomendada por el fabricante.

## B. Equipo necesario que no se suministra

1. Incubador ajustado a 25 °C.
2. Dispositivo de calentamiento para la recuperación de epítomos: baño de agua o de vapor, olla de presión u otro equipo de laboratorio con temperatura controlada.
3. Equipo de laboratorio utilizado generalmente para inmunohistoquímica.

## C. Soluciones para la recuperación de epítomos (véanse las Recomendaciones de uso de alguna de las siguientes)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampón basado en citrato, que contiene agente tensioactivo   |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampón basado en EDTA, que contiene agente tensioactivo      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampón basado en Tris/EDTA, que contiene agente tensioactivo |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## D. Metodología

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

Los clientes deben determinar las diluciones óptimas de los anticuerpos. A menos que se indique otra cosa, todos los pasos se llevan a cabo a temperatura ambiente (25 °C).

### Recuperación de epítomos

Siga las instrucciones de uso de las Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

### Visualización

Siga las instrucciones de uso de los sistemas de detección de polímeros Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) o RE7290-K (50 tests).

## E. Correcciones con respecto a la publicación anterior

No aplicable.

## F. Fecha de publicación

23 de abril de 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Anticorpo Monoclonal líquido de Ratinho CD33

## Código Do Produto: NCL-L-CD33

### Utilização prevista

*Para utilização em diagnósticos in vitro.*

NCL-L-CD33 foi concebido para efectuar a identificação qualitativa da moléculas de CD33 por microscopia óptica, em secções parafinizadas. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos empregando os devidos controlos e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico.

### Princípio Do Procedimento

As técnicas de coloração imunohistoquímica (IHQ) permitem que se faça a visualização de antígenos por meio da aplicação sequencial de um anticorpo específico do antígeno (o anticorpo primário), de um anticorpo secundário ao anticorpo primário, e de um complexo enzimático com um substrato cromogénico e etapas de lavagem de permeio. A activação enzimática do cromogénio resulta num produto de reacção visível no local do antígeno. A amostra pode então ser contrastada e coberta com uma lamela. Os resultados são interpretados por meio de um microscópio óptico, e ajudam a formular o diagnóstico diferencial dos processos fisiopatológicos, os quais podem ou não estar associados a antígenos específicos.

### Clone

PWS44

### Imunogénio

Proteína de fusão recombinante procarciótica correspondendo a uma região do C2 da molécula CD33 humana.

### Especificidade

CD33 humana.

### Composição Do Reagente

NCL-L-CD33 é o sobrenadante líquido da cultura de um tecido contendo 15 mM de azida de sódio como produto conservante.

### Classe De Ig

IgG2b

### Concentração Total De Proteína Total Protein

1,0–8,0 g/L. Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração total de proteína do lote específico.

### Concentração De Anticorpo

Maior que ou igual a 630 mg/L, conforme determinado por ELISA. Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração de Ig do lote específico.

### Recomendações Sobre A Utilização

Imunohistoquímica (ver **D. Metodologia**) em secções de parafina. Diluição sugerida: 1:100 durante 30 minutos a 25 °C. Recuperação de epítomos induzida por calor, utilizando Epitope Retrieval Solution pH 9,0 RE7119 ou RE7122. Novolink™ Polymer Detection System RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests). Esta recomendação é apenas uma directriz e o utilizador deve determinar qual a diluição ideal para o trabalho específico.

### Armazenamento E Estabilidade

Armazenar a 2–8 °C. Não congelar. Retornar à temperatura de 2–8 °C imediatamente após a utilização. Não utilizar após o prazo de validade indicado no rótulo do recipiente. As condições de armazenamento que diferirem das que se encontram especificadas acima devem ser verificadas pelo utilizador.

### Preparação Das Amostras

O fixador recomendado é formol tamponado neutro a 10% para secções de tecido envolvidas em parafina.

### Avisos E Precauções

Este reagente foi preparado a partir do sobrenadante de cultura celular. Visto ser um produto biológico, deve ser manuseado com o devido cuidado.

A molaridade da azida de sódio neste reagente é de 15 mM. Encontra-se disponível, mediante pedido, uma folha de dados de segurança de materiais (MSDS) sobre a azida de sódio.

Consultar a legislação aplicável em relação ao descarte de quaisquer componentes potencialmente tóxicos.

As amostras, antes e depois da sua fixação, bem como todos os materiais expostos às mesmas, devem ser manipulados como se tivessem a capacidade de transmitir infecções e devem ser descartados com as devidas precauções.<sup>1</sup> Não pipetar nunca os reagentes com a boca e evitar o contacto entre a pele e membranas mucosas e os reagentes e amostras. Caso os reagentes ou amostras entrem em contacto com áreas sensíveis, lavar com grandes quantidades de água. Consultar um médico.

Minimizar a contaminação microbiana dos reagentes para evitar a possibilidade do aumento da coloração não específica.

Os períodos de incubação ou temperaturas diferentes dos que foram especificados poderão dar azo a resultados errados. Todas as alterações desse tipo devem ser validadas pelo utilizador.

## Controlo Da Qualidade

As diferenças entre os diferentes métodos e técnicas de processamento de tecidos no laboratório do utilizador podem causar uma grande variabilidade de resultados, requerendo a realização frequente de controlos internos suplementares aos procedimentos que se seguem.

Os controlos devem ser amostras de autópsia/biopsia/cirurgia frescas, fixadas em formol, processadas e envolvidas em cera parafínica logo que possível, da mesma maneira que a(s) amostra(s) do(s) doente(s).

## Controlo De Tecido Positivo

Usado para assinalar os tecidos correctamente preparados e as técnicas de coloração indicadas.

Cada conjunto de condições de testes, em cada processo de coloração, deve incluir um controlo de tecido positivo.

Os tecidos com uma coloração positiva fraca são mais indicados do que os têm uma coloração positiva forte para proporcionarem um controlo de qualidade óptimo, bem como para detectar níveis reduzidos de degradação dos reagentes.<sup>2</sup>

O tecido de controlo positivo recomendado é medula óssea.

Se o controlo de tecido positivo não demonstrar uma coloração positiva, os resultados obtidos com as amostras de testes devem ser considerados inválidos.

## Controlo De Tecido Negativo

Este deve ser examinado depois do controlo de tecido positivo para verificar a especificidade da marcação do antígeno objectivado pelo anticorpo primário.

O controlo de tecido negativo recomendado é músculo esquelético.

Alternativamente, a variedade de diferentes tipos de células presentes na maioria das secções de tecidos oferece muitas vezes locais de controlo negativo, mas isto deve ser verificado pelo utilizador.

A coloração não específica, caso ocorra, tem geralmente um aspecto difuso. A coloração esporádica do tecido conjuntivo pode também ter lugar em secções de tecido excessivamente fixado em formol. Devem utilizar-se células intactas para a interpretação dos resultados da coloração. As células necróticas ou degeneradas causam muitas vezes uma coloração não específica.<sup>3</sup> Podem verificar-se resultados positivos falsos devido à ligação não imunológica de proteínas ou de produtos da reacção do substrato. Esses resultados podem também ser causados por enzimas endógenas tais como a pseudoperoxidase (eritrócitos), a peroxidase endógena (citocromo C), ou a biotina endógena (ex. no fígado, mama, cérebro ou rim) dependendo do tipo de imunocoloração utilizado. Para diferenciar entre a actividade das enzimas endógenas e as ligações não específicas de enzimas de imunoreactividade específica, podem colorir-se tecidos adicionais dos doentes exclusivamente com substrato cromogénio ou com complexos de enzimas (avidina-biotina, estreptavidina, polímero marcado) e substrato-cromogénio, respectivamente. Se ocorrer a coloração específica no controlo de tecido negativo, os resultados dos testes feitos com as amostras do doente devem ser considerados inválidos.

## Controlo De Reagente Negativo

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

## Tecido Do Doente

Examinar as amostras do doente coloridas com NCL-L-CD33 em último lugar. A intensidade da coloração positiva deve ser avaliada dentro do contexto de qualquer coloração não específica de fundo do controlo de reagente negativo. Tal como com qualquer teste imunohistoquímico, um resultado negativo significa que o antígeno não foi detectado, e não que o antígeno se encontrava ausente das células ou tecido analisados. Se necessário, deve utilizar-se um painel de anticorpos para identificar reacções falso-negativas.

## Resultados Previstos

### Tecidos normais

O clone PWS44 detectou o antígeno CD33 na membrana e no citoplasma de células de linhagens mielomonocíticas. Em biopsias de medula óssea normais, com trefinas (12/12), o clone PWS44 cora hemopoieses mielóides e mielomonocíticas e macrófagos maduros; as células das séries eritróide e megacariocítica são negativas. Observou-se um certo nível de reactividade em citotrofoblastos e sincitiotrofoblastos da placenta. Com excepção das células dendríticas e macrófagos de infiltração, não se observou nenhuma coloração nos outros tecidos normais examinados (n=54).

### Tecidos tumorais

O clone PWS44 corou (73/77) leucemias mielóides agudas, (4/4) leucemia mielóide crónica, (5/5) sarcomas granulocíticos e (11/11) casos de displasia mielóide e doenças mieloproliferativas. O PWS44 corou (0/74) casos de tumores não linfóides. Nos neoplasmas linfóides analisados, observou-se coloração com CD33 em (4/15) leucemias B-linfoblásticas precursoras, (2/10) leucemias T-linfoblásticas precursoras, (1/5) linfomas de Hodgkin clássicos, (1/6) linfomas de Burkitt, (1/3) neoplasmas das células plasmáticas, (1/1) neoplasma linfóide hematodérmico, (0/1) linfoma anaplástico das células grandes e (0/1) linfoma linfoplasmático.

**O produto NCL-L-CD33 tem utilidade como parte de um painel de anticorpos para a identificação de células das linhagens mielóide e monocítica, bem como leucemias e anomalias mieloproliferativas derivadas destas células.**

## Limitações Gerais

A imunohistoquímica é um processo diagnóstico em múltiplas etapas que consta de: uma formação especializada na selecção dos reagentes apropriados, selecção, fixação e processamento de tecidos, preparação das lâminas de IHQ e interpretação dos resultados das colorações.

A coloração de tecidos depende do seu manuseamento e processamento antes da sua coloração. A fixação, congelação, descongelação, lavagem, secagem, aquecimento ou corte incorrectos das amostras, ou a sua contaminação com outros tecidos ou fluidos, podem produzir artefactos, retenção de anticorpos, ou resultados falso-negativos. Os resultados inconsistentes podem dever-se a variações nos métodos de fixação e envolvimento ou a irregularidades inerentes ao tecido.<sup>4</sup>

Uma contrastação excessiva ou incompleta pode comprometer a correcta interpretação dos resultados.



A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos empregando os devidos controles e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico.

Os anticorpos da Leica Biosystems Newcastle Ltd destinam-se a serem utilizados, conforme indicado, em secções de tecido ou congeladas ou envolvidas em parafina, com requisitos de fixação específicos. Pode ocorrer uma expressão inesperada de antígeno, especialmente em neoplasmas. A interpretação clínica de qualquer secção de tecido colorido deverá incluir a análise morfológica e a avaliação de controlos apropriados.

### **Bibliografia - Geral**

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Freeman SD, Kelm S, Barber EK et al. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules, Blood 85(8): 2005–2012 (1995)
6. Simmons D and Seed B. Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. Journal of Immunology 141: 2797–2800 (1988).

### **Emendas Da Edição Anterior**

A Composição Do Reagente foi alterada.

A Concentração Total De Proteína foi alterada.

A Concentração De Anticorpo foi alterada.

### **Data De Emissão**

16 de abril de 2009 (NCL-L-CD33/CE/UK)

# Metodologia de imunohistoquímica para utilização de anticorpos Novocastra™ em tecidos envolvidos em parafina através da técnica de recuperação de epítomos por indução térmica.

## A. Reagentes necessários mas não fornecidos

1. Solventes comuns utilizados em imunohistoquímica.
2. Solução salina a 50 mM com tampão Tris (TBS) pH 7,6.
3. Solução de recuperação de epítomos (ver a secção C Soluções de recuperação de epítomos).
4. Diluente de anticorpos, Novocastra™ IHC Diluent RE7133.
5. Sistema de visualização, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ou RE7290-K (50 tests).
6. Meio de montagem – usar conforme recomendado pelo fabricante.

## B. Equipamento necessário mas não fornecido

1. Incubador regulado para 25 °C.
2. Dispositivo de aquecimento para a recuperação de epítomos: banho-maria ou vaporizador, panela de pressão ou outro equipamento de laboratório com controlo da temperatura.
3. Equipamento geral de laboratório de imunohistoquímica.

## C. Soluções de recuperação de epítomos (ver as Recomendações sobre a utilização de um dos seguintes produtos)

|   |   |
|---|---|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampão à base de citrato contendo um surfactante    |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |   |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |   |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampão à base de EDTA contendo um surfactante       |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |   |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampão à base de Tris/EDTA contendo um tenso-activo |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |   |

## D. Metodologia

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

O cliente deve determinar quais as fórmulas de diluição ideais para os anticorpos. A não ser indicação em contrário, todas as etapas devem ser efectuadas à temperatura ambiente (25 °C).

### Recuperação de epítomos

Aderir às instruções de utilização aplicáveis às Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 e RE7122.

### Visualização

Aderir às instruções de utilização dos Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ou RE7290-K (50 tests).

## E. Emendas da edição anterior

Não é aplicável.

## F. Data de emissão

23 de abril de 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Flytande Monoklonal Musantikropp

## CD33

### Produktkod: NCL-L-CD33

#### **Avsedd Användning**

*För in vitro diagnostisk användning.*

NCL-L-CD33 är avsedd för kvalitativ identifiering med ljusmikroskopi av CD33-molekyler i paraffinsnitt. Den kliniska tolkningen av all färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar som använder korrekta kontroller och utvärderas av kvalificerad patolog inom ramen för patientens kliniska anamnes och andra diagnostiska tester.

#### **Metodens Princip**

Immunhistokemiska (IHC) färgningstekniker tillåter visualisering av antigener genom sekvenstillämpning av en specifik antikropp till antigenet (primär antikropp), en sekundär antikropp till den primära antikroppen och ett enzymkomplex med ett kromogent substrat med inlagda tvättsteg. Den enzymatiska aktiveringen av kromogenet resulterar i en synlig reaktionsprodukt på antigenområdet. Proverna kan då kontrastfärgas och förses med täckglas. Resultaten tolkas med ljusmikroskop och bidrar till differentialdiagnosen av patofysiologiska processer som eventuellt kan associeras till ett särskilt antigen.

#### **Klon**

PWS44

#### **Immunogen**

Prokaryotiskt rekombinant protein motsvarande en portion av den C2-domänen av den humana CD33-molekylen.

#### **Specificitet**

Human CD33.

#### **Reagensinnehåll**

NCL-L-CD33 är en flytande supernatant från vävnadsodling som innehåller 15 mM natriumazid som konserveringsmedel.

#### **Ig-klass**

IgG2b

#### **Total Proteinkoncentration** Total Protein

1,0–8,0 g/l. Se flaskans etikett för total specifik proteinkoncentration för satsen.

#### **Antikropps-koncentration**

Större än eller lika med 630 mg/l fastställt genom ELISA. Se flaskans etikett för specifik Ig-koncentration för satsen.

#### **Rekommendationer Vid Användning**

Immunhistokemi (se **D. Metodologi**) på paraffinsnitt. Föreslagen spädning: 1:100 i 30 minuter vid 25 °C. Värmeinducerad epitopåtervinning med Epitope Retrieval Solution pH 9,0 RE7119 eller RE7122. Novolink™ Polymer Detection System RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests). Detta är endast en riktlinje och användare bör själva fastställa den optimala bruksspädningen.

#### **Förvaring Och Stabilitet**

Förvara vid 2–8 °C. Frys ej. Återgå till 2–8 °C direkt efter användning. Använd ej efter det utgångsdatum som anges på flaskans etikett. Förvaringsförhållanden som skiljer sig från de ovannämnda måste kontrolleras av användaren.

#### **Preparation Av Prov**

Rekommenderat fixeringsmedel för paraffininbäddade vävnadssnitt är 10% neutralbuffrat formalin.

#### **Varningar Och Försiktighetsåtgärder**

Reagenset har förberetts från supernatanten av vävnadsodlingar. Eftersom det är en biologisk produkt bör skälig försiktighet iaktas vid hantering.

Natriumazidens molaritet i reagenset är 15 mM. Varuinformationsblad (MSDS) för natriumazid finns att få på begäran.

För kassering av potentiellt toxiska komponenter hänvisas till nationella eller lokala bestämmelser.

Före och efter fixering bör prover och alla material som har varit utsatta för dem hanteras som om det finns risk för att de kan överföra infektioner och kasseras med iakttagande av försiktighet.<sup>1</sup> Pipettera aldrig reagenser med munnen och se till att huden och slemhinnorna inte kommer i kontakt med reagens och prover. Om reagens eller prover kommer i kontakt med känsliga områden, tvätta med rikliga mängder vatten. Rådgör med läkare.

Minimera mikrobisk kontaminering av reagens annars kan en ökning av ospecifik färgning ske.

Inkubationstider eller temperaturer som skiljer sig från dem som specificeras kan ge felaktiga resultat. Alla sådana förändringar måste kontrolleras av användaren.

#### **Kvalitetskontroll**

Skilnader i vävnadsbehandling och tekniska metoder i användarens laboratorium kan ge stor variation i resultaten vilket kan göra det nödvändigt att genomföra regelbundna interna kontroller utöver följande metoder.

Kontroller bör vara färska obduktions-/biopsi-/kirurgi prover som snarast möjligt formalinfixeras, bearbetas och paraffinbäddas på samma sätt som patientprover.

### Positiv Vävnadskontroll

Används för att ange korrekt förberedda vävnader och rätt färgningstekniker.

En positiv vävnadskontroll bör ingå i varje uppsättning av testförhållanden vid varje färgningskörning.

En vävnad med svag positiv färgning är mer lämplig för optimal kvalitetskontroll och för att upptäcka låga nivåer av reagensdegradering än en vävnad med stark positiv färgning.<sup>2</sup>

Benmärg rekommenderas som positiv kontrollvävnad.

Om den positiva vävnadskontrollen inte uppvisar positiv färgning bör resultat med testproverna anses vara ogiltiga.

### Negativ Vävnadskontroll

Bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen för att fastställa specificiteten för märkningen av målantigenet med den primära antikroppen.

Skelettmuskel rekommenderades som negativ kontrollvävnad.

Alternativt ger ofta en mängd olika celltyper som finns i de flesta vävnadssnitt negativa kontrollområden men detta bör kontrolleras av användaren.

Ospecifik färgning, om det förekommer, har ofta ett diffust utseende. Sporadisk färgning av bindväv kan också observeras i snitt från överflödigt formalinfixerade vävnader. Använd intakta celler för tolkning av färgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler färgar ofta ospecifikt.<sup>3</sup> Falskt positiva resultat kan uppstå p.g.a. icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erythrocyter), endogent peroxidas (cytokrom C) eller endogent biotin (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure) beroende på typ av immunfärgning som används. För att skilja endogen enzymaktivitet eller ospecifik enzymbindning från specifik immunreaktivitet kan ytterligare patientvävnader färgas exklusivt med respektive substratkromogen eller enzymkomplex (avidin-biotin, streptavidin, märkt polymer) och substrat-kromogen. Om specifik färgning sker i den negativa vävnadskontrollen bör resultat med patientprover anses vara ogiltiga.

### Negativ Reagenskontroll

Använd en ospecifik negativ reagenskontroll istället för den primära antikroppen med ett snitt från varje patientprov för att utvärdera ospecifik färgning och tillåta bättre tolkning av specifik färgning på antigenområdet.

### Patientvävnad

Undersök patientprover färgade med NCL-L-CD33 sist. Positiv färgningsintensitet bör utvärderas inom ramen för all ospecifik bakgrundsfärgning av den negativa reagenskontrollen. Som vid alla immunhistokemiska tester betyder ett negativt resultat att antigenet inte upptäcktes och inte att det inte förekom i de analyserade cellerna/vävnaderna. Använd vid behov en antikroppspanel för att identifiera falskt negativa reaktioner.

### Förväntade Resultat

#### Normal vävnad

Klon PWS44 detekterade CD33-antigenet på membran och i cytoplasma för celler med myelomonocytiskt ursprung. I normala trefinbiopsier på benmärg (12/12), färgar klon PWS44 myeloid och myelomonocytisk hemopoiesi och vuxna makrofager; celler i erytroid och megakaryocytiska serier är negativa. Viss reaktivitet observerades i cytotrofoblaster och placentans syncytiotrofoblaster. Med undantag av dendritiska celler och infiltrerande makrofager observerades ingen färgning i de normala vävnader som utvärderades (n=54).

#### Tumörvävnader

Klon PWS44 färgade (73/77) akut myeloid leukemi, (4/4) kronisk myeloid leukemi, (5/5) granulocytiska sarkom och (11/11) fall av myeloid dysplasi och myeloproliferativa sjukdomar. PWS44 färgade (0/74) fall av icke-lymfoida tumörer. I de lymfoida neoplasmer som testades, observerades CD33-färgning i (4/15) prekursor B-lymfoblastisk leukemi, (2/10) prekursor T-lymfoblastisk leukemi, (1/5) klassisk Hodgkins lymfom, (1/6) Burkitts lymfom, (1/3) plasmacellneoplasm, (1/1) hematodermisk lymfoid neoplasm, (0/1) anaplastisk storcellig lymfom, (0/1) lymfoplasmacytisk lymfom.

**NCL-L-CD33 är en användbar del av en antikroppspanel för identifikation av celler med myeloid eller monocytiskt ursprung samt leukemier och myeloproliferativa sjukdomar som härstammar från dessa celler.**

### Allmänna Begränsningar

Immunhistokemi är en diagnostisk process i flera steg som kräver specialiserad utbildning i urvalet av lämpliga reagens, val av vävnad, fixering och bearbetning, förberedelse av IHC-objektglaset samt tolkning av färgningsresultaten.

Vävnadsfärgning påverkas av hantering och bearbetning av vävnaden före färgningen. Felaktig fixering, nedfrysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering av andra vävnader eller vätskor kan framställa artefakter, infångande av antikroppar eller falskt negativa resultat. Motsägelsefulla resultat kan bero på variationer av fixerings- och inbäddningsmetoder eller på naturliga oregelbundenheter i vävnaden.<sup>4</sup>

Överflödigt eller ofullständig kontrastfärgning kan försvåra en korrekt tolkning av resultatet.

Den kliniska tolkningen av all färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar som använder korrekta kontroller och utvärderas av kvalificerad patolog inom ramen för patientens kliniska anamnes och andra diagnostiska tester.

Antikroppar från Leica Biosystems Newcastle Ltd är till för användning så som anges på antingen frysta eller paraffinbäddade snitt med specifika fixeringskrav. Övåntat antigenuttryck kan ske, speciellt i neoplasmer. Morfologisk analys och utvärdering av lämpliga kontroller måste ingå i den kliniska tolkningen av alla färgade vävnadssnitt.

## **Bibliografi - Allmän**

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Freeman SD, Kelm S, Barber EK et al. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules, Blood 85(8): 2005–2012 (1995)
6. Simmons D and Seed B. Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. Journal of Immunology 141: 2797–2800 (1988).

## **Rättelser Av Tidigare Utgivning**

Den Reagensinnehåll har ändrats.

Den Total Proteinkoncentration har ändrats.

Den Antikropps-koncentration har ändrats.

## **Utgivningsdatum**

16 april 2009 (NCL-L-CD33/CE/UK).

# Immunhistokemisk metodologi för användning av Novocastra™ antikroppar på paraffinbäddad vävnad med hög temperatur epitopåtervinningstekniken.

## A. Reagens som krävs men inte tillhandahålls

1. Standardlösningar som används inom immunhistokemi.
2. 50 mM tris-buffrad koksaltlösning (TBS) pH 7,6.
3. Epitopåtervinningslösning (se avsnitt C Epitopåtervinningslösningar).
4. Antikroppsutspädningsmedel, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Visualiseringssystem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) eller RE7290-K (50 tester).
6. Monteringsmedel – bered enligt tillverkarens rekommendationer.

## B. Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

1. Inkubator inställd på 25 °C.
2. Uppvärmningsapparat för epitopåtervinning: vattenbad eller förångare, tryckkokare eller annan temperaturkontrollerad laboratorieutrustning.
3. Allmän immunhistokemisk laboratorieutrustning.

## C. Epitopåtervinningslösningar (se Rekommendationer för användning för en av följande)

|   |   |
|---|---|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Citratbaserad buffert innehållande ytaktivt medel     |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |   |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |   |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | EDTA baserad buffert innehållande ytaktivt medel      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |   |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tris/EDTA baserad buffert innehållande ytaktivt medel |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |   |

## D. Metodologi

Innan metoden tillämpas måste användarna vara utbildade i immunhistokemiska tekniker.

Kunder bör fastställa optimal spädning för antikroppar. Om inte annat anges utförs alla steg vid rumstemperatur (25 °C).

### Epitopåtervinning

Vänligen följ instruktionerna för användning i Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

### Visualisering

Vänligen följ instruktionerna för användning i Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) eller RE7290-K (50 tests).

## E. Rättelser av tidigare utgivning

Inte tillämpligt.

## F. Utgivningsdatum

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink)

# Novocstra™ Υγρό μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού CD33

## Κωδικός είδους: NCL-L-CD33

### Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Το NCL-L-CD33 προορίζεται για την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός της ανθρώπινης Μόρια CD33 σε τομές παραφίνης. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν σωματίου μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογοανατόμο.

### Αρχή Της Διαδικασίας

Οι τεχνικές ανοσοϊστοχημικής (IHC) χρώσης επιτρέπουν την οπτικοποίηση των αντιγόνων μέσω της διαδοχικής εφαρμογής ενός ειδικού αντισώματος στο αντιγόνο (πρωτοταγές αντίσωμα), ενός δευτεροταγούς αντισώματος στο πρωτοταγές αντίσωμα και ενός ενζυμικού συμπλόκου με χρωμογόνο υπόστρωμα με παρεμβαλλόμενα βήματα πλύσης. Η ενζυμική ενεργοποίηση του χρωμογόνου έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ορατού προϊόντος αντίδρασης στη θέση του αντιγόνου. Το δείγμα μπορεί κατόπιν να υποβληθεί σε αντίχρωση και να καλυφθεί με καλυπτήρια. Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται με χρήση μικροσκοπίου φωτός και βοηθούν στη διαφορική διάγνωση παθοφυσιολογικών εξεργασιών, οι οποίες ενδέχεται ή όχι να σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο.

### Κλώνος

PWS44

### Ανοσογόνο

Προκαρνωτική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που αντιστοιχεί σε μια περιοχή του τομέα C2 του μορίου ανθρώπινου CD33.

### Ειδικότητα

Ανθρώπινο CD33.

### Σύνθεση Αντιδραστήριου

Το NCL-L-CD33 είναι ένα υγρό υπερκεκλιμένο ιστοκαλλιέργειας που περιέχει 15 mM αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.

### Τάξη Ig

IgG2b

### Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης

Total Protein

1,0–8,0 g/L. Για την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

### Συγκέντρωση Αντισώματος

Μεγαλύτερη ή ίση με 630 mg/L, όπως προσδιορίζεται με ELISA. Για τη συγκέντρωση Ig που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

### Συστάσεις Για Τη Χρήση

Ανοσοϊστοχημεία (δείτε την ενότητα “**Δ. Μεθοδολογία**”) σε τομές παραφίνης. Προτεινόμενη αραιώση: 1:100 επί 30 λεπτά στους 25 °C. Θερμικά επαγόμενη ανάκτηση επιτόπου με χρήση των Epitope Retrieval Solution pH 9,0 RE7119 ή RE7122. Novolink™ Polymer Detection System RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests). Αυτό παρέχεται ως οδηγός και οι χρήστες θα πρέπει να προσδιορίζουν τις δικές τους βέλτιστες αραιώσεις εργασίας.

### Φύλαξη Και Σταθερότητα

Φυλάσσετε στους 2–8 °C. Μην καταψύχετε. Επαναφέρετε στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Μη χρησιμοποιείτε μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Τυχόν συνθήκες φύλαξης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται παραπάνω πρέπει να επαληθεύονται από το χρήστη.

### Παρασκευή Δείγματος

Το συνιστάσιμο μονιμοποιητικό είναι ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10% για τομές ιστού εγκλεισμένες σε παραφίνη.

### Προεidoποιήσεις Και Προφυλάξεις

Το αντιδραστήριο αυτό έχει παρασκευαστεί από το υπερκεκλιμένο κυτταροκαλλιέργειας. Επειδή είναι βιολογικό προϊόν, θα πρέπει να γίνεται ειδική προσοχή κατά το χειρισμό του.

Η μοριακότητα του αζιδίου του νατρίου στο αντιδραστήριο αυτό είναι 15 mM. Κατόπιν αιτήματος, διατίθεται ένα δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού (MSDS) για το αζίδιο του νατρίου.

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

Ο χειρισμός δειγμάτων, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, καθώς και όλων των υλικών που έχουν εκτεθεί σε αυτά, θα πρέπει να γίνεται ως εάν ήταν δυνητικά μετάδοσης λοίμωξης και η απόρριψή τους να πραγματοποιείται λαμβάνοντας τις σωστές προφυλάξεις.<sup>1</sup> Μην αναρροφάτε ποτέ με πιπέτα αντιδραστήρια με το στόμα και αποφύγετε την επαφή του δέρματος και των βλεννογόνων με αντιδραστήρια και δείγματα. Εάν τα αντιδραστήρια ή τα δείγματα έλθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, πλύνετε με αφθονίες ποσότητες νερού. Ζητήστε τη συμβουλή ιατρού.

Ελαχιστοποιήστε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διότι ενδέχεται να συμβεί αύξηση μη ειδικής χρώσης.

Χρόνοι ή θερμοκρασίες επώασης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται ενδέχεται να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τυχόν τέτοιες μεταβολές πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη.

## Ποιοτικός Έλεγχος

Τυχόν διαφορές στην επεξεργασία των ιστών και τις τεχνικές διαδικασίες στο εργαστήριο του χρήστη ενδέχεται να προκαλέσουν σημαντική μεταβλητότητα στα αποτελέσματα, καθιστώντας αναγκαία την τακτική εκτέλεση εσωτερικών ελέγχων επιπλέον των ακόλουθων διαδικασιών.

Οι μάρτυρες θα πρέπει να είναι φρέσκα δείγματα νεκροψίας/βιοψίας/χειρουργικά δείγματα, τα οποία είναι μονιμοποιημένα σε φορμόλη, επεξεργασμένα και εγκλεισμένα σε κηρό παραφίνης, το συντομότερο δυνατό με τον ίδιο τρόπο με το(α) δείγμα(τα) του ασθενούς.

## Θετικός Μάρτυρας Ιστού

Χρησιμοποιείται για να υποδεικνύει σωστά παρασκευασμένους ιστούς και σωστές τεχνικές χρώσης.

Θα πρέπει να περιλαμβάνεται ένας θετικός μάρτυρας ιστού για κάθε σύνολο συνθηκών εξέτασης σε κάθε εκτέλεση χρώσης.

Ένας ιστός με ασθενή θετική χρώση είναι πιο κατάλληλος από έναν ιστό με ισχυρή εξετική χρώση για βέλτιστο έλεγχο ποιότητας και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόμησης των αντιδραστηρίων.<sup>2</sup>

Συνιστώμενος ιστός θετικού μάρτυρα είναι ο μυελός των οστών.

Εάν ο θετικός μάρτυρας ιστού δεν παρουσιάζει θετική χρώση, τα αποτελέσματα με τα δείγματα της εξέτασης θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

## Αρνητικός Μάρτυρας Ιστού

Θα πρέπει να εξετάζεται μετά τον θετικό μάρτυρα ιστού για την επαλήθευση της ειδικότητας της επίσημησης του αντιγόνου-στόχου από το πρωτοταγές αντισώμα.

Συνιστώμενος ιστός αρνητικού μάρτυρα είναι ο σκελετικός μυς.

Εναλλακτικά, η ποικιλία διαφόρων κυτταρικών τύπων που υπάρχουν στις περισσότερες τομές ιστών παρέχει συχνά θέσεις αρνητικού μάρτυρα, αλλά αυτό πρέπει να επαληθεύεται από το χρήστη.

Μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, έχει συνήθως διάχυτη εμφάνιση. Ενδέχεται επίσης να παρατηρηθεί σποραδική χρώση του συνδεδετικού ιστού σε τομές από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με υπερβολική ποσότητα φορμόλης. Χρησιμοποιείτε άθικτα κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης. Νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα παρουσιάζουν συχνά μη ειδική χρώση.<sup>3</sup> Ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ανοσολογικής δέσμευσης των πρωτεϊνών ή των πρωθρονικών αντιδράσεων του υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδουπεροξειδάση (ερυθρόκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιτίνη (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός) ανάλογα με τον τύπο ανοσοχρώσης που χρησιμοποιείται. Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμευσης των ενζύμων από ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπλέον ιστού ασθενών με χρωμόνια του υποστρώματος ή ενζυμικά σύμπλοκα (αβιδίνη-βιοτίνη, στρεπταβιδίνη, σημασμένο πολυμερές) και υπόστρωμα-χρωμόγιο, αντίστοιχα. Εάν παρουσιαστεί ειδική χρώση στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενούς θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

## Αρνητικός Μάρτυρας Αντιδραστηρίου

Χρησιμοποιείτε έναν μη ειδικό αρνητικό μάρτυρα αντιδραστηρίου αντί του πρωτοταγούς αντισώματος με μια τομή κάθε δείγματος ασθενούς για την αξιολόγηση μη ειδικής χρώσης και για να επιτρέπεται καλύτερη ερμηνεία της ειδικής χρώσης στη θέση του αντιγόνου.

## Ιστός Ασθενούς

Εξετάστε τελευταία τα δείγματα ασθενούς που έχουν χρωματιστεί με το NCL-L-CD33. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκτιμάται στα πλαίσια τυχόν μη ειδικής χρώσης υποβάθρου του αρνητικού μάρτυρα αντιδραστηρίου. Όπως συμβαίνει με οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική εξέταση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύτηκε, όχι ότι το αντιγόνο δεν υπήρχε στα κύτταρα/τον ιστό που εξετάστηκε. Εάν είναι απαραίτητο, χρησιμοποιήστε μια σειρά αντισωμάτων για την αναγνώριση ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων.

## Αναμενόμενα Αποτελέσματα

### Φυσιολογικοί ιστοί

Ο κλώνος PWS44 ανίχνευσε το αντιγόνο CD33 στη μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων μυελομονοκυτταρικών γενεαλογιών. Σε βιοψίες με οστεοτρίπανο φυσιολογικού μυελού των οστών (12/12), ο κλώνος PWS44 χρωματίζει τη μυελοειδή και μυελομονοκυτταρική αιμοποίηση και τα ώριμα μακροφάγα. Τα κύτταρα της ερυθροειδούς και μεγακαρυοκυτταρικής σειράς είναι αρνητικά. Κάποια αντιδραστικότητα παρατηρήθηκε σε κυτταροτροφοβλάστες και συγκυτοτροφοβλάστες του πλακούντα. Εκτός από τα δενδριτικά κύτταρα και τα διηθητικά μακροφάγα, δεν παρατηρήθηκε καμία χρώση στους άλλους φυσιολογικούς ιστούς που αξιολογήθηκαν (n=54).

### Καρκινικοί ιστοί

Με τον κλώνο PWS44 χρωματίστηκαν (73/77) οξείες μυελοειδείς λευχαιμίες, (4/4) χρόνιες μυελοειδείς λευχαιμίες, (5/5) κοκκιοκυτταρικά σαρκώματα και (11/11) περιπτώσεις μυελοειδούς δυσπλασίας και μυελοπολλαπλασιαστικών νόσων. Με τον κλώνο PWS44 χρωματίστηκαν (0/74) περιπτώσεις μη λεμφοειδών όγκων. Στα λεμφοειδή νεοπλασμάτα που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε χρώση του CD33 σε (4/15) πρόδρομους B-λεμφοβλαστικές λευχαιμίες, (2/10) πρόδρομους T-λεμφοβλαστικές λευχαιμίες, (1/5) κλασικά λεμφώματα Hodgkin, (1/6) λεμφώματα Burkitt, (1/3) νεοπλασμάτα πλασματοκυττάρων, (1/1) αιματοδερματικά λεμφοειδή νεοπλασμάτα, (0/1) αναπλαστικό μεγαλοκυτταρικό λέμφωμα, (0/1) λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα.

**Το NCL-L-CD33 είναι χρήσιμο ως μέρος μιας σειράς αντισωμάτων για την ταυτοποίηση κυττάρων μυελοειδούς και μονοκυτταρικής γενεαλογίας, καθώς και λευχαιμιών και μυελοπολλαπλασιαστικών διαταραχών που προέρχονται από τα κύτταρα αυτά.**

## Γενικοί Περιορισμοί

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια διαγνωστική διεργασία πολλαπλών βημάτων, η οποία αποτελείται από ειδικευμένη εκπαίδευση στην επιλογή των κατάλληλων αντιδραστηρίων, επιλογή ιστού, μονιμοποίηση και επεξεργασία, προετοιμασία της πλάκας IHC και ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης.

Η χρώση του ιστού εξαρτάται από το χειρισμό και την επεξεργασία του ιστού πριν από τη χρώση. Τυχόν εσφαλμένη μονιμοποίηση, κατάψυξη, απόψυξη, πλύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να παράγει μορφώματα, παγίδευση αντισώματος ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τυχόν ασυνεπή αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται σε παραλλαγές των μεθόδων μονιμοποίησης και εγκλεισμού ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.<sup>4</sup>

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

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



Τα αντισώματα που παρέχονται από την Leica Biosystems Newcastle Ltd προορίζονται για χρήση, όπως υποδεικνύεται, είτε σε κατεψυγμένες είτε σε εγκλεισμένες σε παραφίνη τομές, με ειδικές απαιτήσεις μονιμοποίησης. Ενδέχεται να παρουσιαστεί μη αναμενόμενη έκφραση αντιγόνου, ειδικά σε νεοπλάσματα. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρωματισμένης τομής ιστού πρέπει να περιλαμβάνει μορφολογική ανάλυση και την αξιολόγηση των κατάλληλων μαρτύρων.

### **Βιβλιογραφία - Γενική**

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Freeman SD, Kelm S, Barber EK et al. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules, Blood 85(8): 2005–2012 (1995)
6. Simmons D and Seed B, Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. Journal of Immunology 141: 2797–2800 (1988).

### **Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση**

Η ενότητα “Σύνθεση Αντιδραστηρίου” έχει αλλάξει.

Η ενότητα “Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης” έχει αλλάξει.

Η ενότητα “Συγκέντρωση Αντισώματος” έχει αλλάξει.

### **Ημερομηνία Έκδοσης**

16 Απρίλιος 2009 (NCL-L-CD33/CE/UK)

# Μεθοδολογία ανοσοϊστοχημείας για χρήση αντισωμάτων Novocastra™ σε ιστό εγκλεισμένο σε παραφίνη με χρήση της τεχνικής θερμικά επαγόμενης ανάκτησης επιτόπου.

## A. Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Πρότυποι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημεία
2. 50 mM αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος Tris (TBS) με pH 7,6.
3. Διάλυμα ανάκτησης επιτόπου (δείτε την ενότητα Γ)
4. Αραιωτικό αντισώματος, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Σύστημα απεικόνισης, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ή RE7290-K (50 tests).
6. Μέσο στερέωσης – χρησιμοποιείτε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

## B. Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

1. Θάλαμος επώασης ρυθμισμένος στους 25 °C.
2. Συσκευή θέρμανσης για ανάκτηση επιτόπου: υδατόλουτρο ή συσκευή ατμού, ατμοκλίβανος ή άλλος εργαστηριακός εξοπλισμός ελεγχόμενης θερμοκρασίας.
3. Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός ανοσοϊστοχημείας.

## Γ. Διαλύματα ανάκτησης επιτόπου (δείτε την ενότητα “Συστάσεις για τη χρήση” για ένα από τα ακόλουθα)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση κιτρικά που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα      |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       | Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση το EDTA που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα      |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    |  |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση το Tris/EDTA που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## Δ. Μεθοδολογία

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

Οι πελάτες θα πρέπει να προσδιορίσουν τις βέλτιστες αραιώσεις για αντισώματα. Εκτός εάν υποδεικνύεται διαφορετικά, όλα τα βήματα εκτελούνται σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C).

### Ανάκτηση επιτόπου

Παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης στα Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

### Απεικόνιση

Παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης στα Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ή RE7290-K (50 tests).

## E. Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

## Στ. Ημερομηνία έκδοσης

23 Απρίλιος 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Væskeformigt Monoklonalt Museantistof CD33

## Produktkode: NCL-L-CD33

### Tilsigtet Anvendelse

*Til in vitro diagnostisk anvendelse.*

NCL-L-CD33 er beregnet til kvalitativ identifikation af CD33-molekyler i paraffinsnit ved lysmikroskopi. Klinisk fortolkning af farvning eller mangel derpå skal suppleres med morfologiske undersøgelser under anvendelse af passende kontroller og bør evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests af en kvalificeret patolog.

### Procedureprincip

Immunhistokemiske (IHC) farvningsteknikker muliggør visualisering af antigener via sekventiel tilsætning af et specifikt antistof mod antigenet (primært antistof), et sekundært antistof mod det primære antistof og et enzym kompleksbundet til et kromogent substrat med indskudte vasketrin. Den enzymatiske aktivering af kromogenet resulterer i et synligt reaktionsprodukt på antigenstedet. Prøven kan derefter kontrastfarves og dækkes med et dækglas. Resultaterne fortolkes ved anvendelse af et lysmikroskop og medvirker til differential diagnose af patofysiologiske processer, som muligvis kan være associeret med et bestemt antigen.

### Klon

PWS44

### Immunogen

Prokaryot rekombinant protein svarende til en del af C2-domænet af det humane CD33-molekyle.

### Specifitet

Human CD33.

### Reagenssammensætning

NCL-L-CD33 er en flydende vævskultur supernatant indeholdende 15 mm natriumazid som konserveringsmiddel.

### Ig-klasse

IgG2b

### Totalproteinkoncentration Total Protein

1,0–8,0 g/l. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik totalproteinkoncentration.

### Antistofkoncentration

Større end eller lig med 630 mg/l som bestemt ved ELISA. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik Ig-koncentration.

### Anbefalinger Vedrørende Anvendelse

Immunhistokemi (se **D. Metodologi**) på paraffinsnit. Foreslået fortynding: 1:100 ved 30 minutter ved 25 °C. Varmeinduceret epitopenfindning ved brug af Epitope Retrieval Solution pH 9.0 RE7119 or RE7122. Novolink™ Polymer Detection System RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests). Disse retningslinier er vejledende, og brugeren bør selv bestemme egne optimale brugsoplysninger.

### Opbevaring Og Holdbarhed

Opbevares ved 2–8 °C. Må ikke fryses. Sættes tilbage til 2–8 °C umiddelbart efter brug. Må ikke anvendes efter udløbsdatoen angivet på hætteflaskens etikette. Andre opbevaringsbetingelser end de ovenfor angivne skal verificeres af brugeren.

### Prøveklargøring

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

### Advarsler Og Forholdsregler

Dette reagens er fremstillet ud fra supernatanten af en cellekultur. Da det er et biologisk produkt, skal der tages fornuftige sikkerhedsforanstaltninger ved dets håndtering.

Molariteten af natriumazid i dette reagens er 15 mM. Der kan efter anmodning leveres et datablad for materialesikkerhed (MSDS) for natriumazid.

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

Prøver skal før og efter fiksering, lige som alle materialer eksponeret mod prøverne, håndteres som potentielt smittefarligt og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler<sup>1</sup>. Pipetter aldrig reagenser med munden og undgå, at reagenser og prøver kommer i kontakt med huden eller slimhinder. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skal der skylles efter med rigelige mængder vand. Søg læge.

Minimer mikrobiel kontaminering af reagenserne, da der ellers kan forekomme øget uspecifik farvning.

Inkubationstider eller -temperaturer andre end de specificerede kan give fejlagtige resultater. Alle sådanne ændringer skal valideres af brugeren.

## Kvalitetskontrol

Forskelle i behandlingen af væv og forskelle i tekniske procedurer i brugerens laboratorium kan frembringe betydeligt varierende resultater og nødvendiggøre regelmæssig udførelse af kontroller på stedet ud over nedenstående procedurer.

Kontrollerne skal være friske autopsier/biopsier/kirurgiske prøver fikseret i formalin og behandlet og indstøbt i paraffin så hurtigt som muligt på samme måde som patientprøver.

## Positiv Vævskontrol

Anvendes til påvisning af, at vævet er fremstillet korrekt, og at der er anvendt korrekte farvningsteknikker.

Der bør inkluderes en positiv vævskontrol for hvert sæt testbetingelser i hver farvekørsel.

Svagt positivt farvet væv er mere egnet end kraftigt positivt farvet væv til optimal kvalitetskontrol og påvisning af små niveauer af reagensnedbrydning.<sup>2</sup>

Anbefalet positivt kontrolvæv er knoglemarv.

Hvis den positive vævskontrol ikke udviser positiv farvning, skal resultater af testprøverne kasseres.

## Negativ Vævskontrol

Skal undersøges efter den positive vævskontrol for at sikre, at det primære antistof mærker målantigenet specifikt.

Det anbefalede negative kontrolvæv er skeletmuskel.

Alternativt frembyder de mange forskellige celletyper, der er til stede i de fleste vævssnit, ofte negative kontrolsteder, men dette skal verificeres af brugeren.

Uspecifik farvning har, hvis til stede, ofte et diffus udseende. Sporadisk farvning af bindevæv kan ligeledes observeres i vævssnit af væv, der er fikseret for kraftigt i formalin. Anvend intakte celler til fortolkning af farvningsresultaterne. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte mere uspecifikt.<sup>3</sup> Der kan eventuelt ses falske positive resultater, der skyldes non-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. Dette kan ligeledes skyldes endogene enzymer, såsom pseudoperoxidase (erythrocytter), endogen peroxidase (cytochrom C) eller endogent biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre) afhængigt af den anvendte type immunfarve. For at differentiere mellem endogen enzymaktivitet eller uspecifik enzymbinding og specifik immunreaktivitet kan yderligere patientvæv eventuelt farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen eller enzymkomplekser (avidin-biotin, streptavidin, mærket polymer) og substratkromogen. Hvis der optræder specifik farvning i den negative vævskontrol, skal resultaterne af patientprøverne kasseres.

## Negativ Reagenskontrol

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

## Patientvæv

Eksaminer patientprøver farvet med NCL-L-CD33 sidst. Intensiteten af positiv farvning bør vurderes i sammenhæng med eventuel uspecifik baggrundsfarvning af den negative reagenskontrol. Som med alle immunhistokemiske tests betyder et negativt resultat, at antigenet ikke blev påvist. Ikke at antigenet var fraværende i de analyserede celler eller det analyserede væv. Om nødvendigt anvendes et panel af antistoffer til identifikation af falske negative reaktioner.

## Forventede Resultater

### Normalt væv

Klon PWS44 detekterede antigenet CD33 på membranen og i cytoplasmaen i celler af myelomonocytiske afstamminger. I trefine biopsier (12/12) af normal knoglemarv farver klon PWS44 myeloide og myelomonocytiske hemopoiesier og mature macrofager; celler i erythroide og megakaryocytiske serier er negative. Nogen reaktivitet observeredes i cytotrophoblaster og syncytiotrophoblaster af placenta. Bortset fra dendritiske celler og infiltrerende makrofager blev ingen farvning observeret i andre evaluerede vævsprøver (n=54).

### Tumorvæv

Klon PWS44 farvede (73/77) akut myeloide leukæmier, (4/4) kronisk myeloide leukæmier, (5/5) granulocytiske sarkomer og (11/11) forekomster af myeloid dysplasi og myeloproliferative sygdomme. PWS44 farvede (0/74) forekomster af ikke-lymfoide tumorer. I de testede lymfoide neoplasmer blev der observeret CD33-farvning i (4/15) forstadier til B-lymfoblastiske leukæmier, (2/10) forstadier til T-lymfoblastiske leukæmier, (1/5) klassisk Hodgkin's lymfomer, (1/6) Burkitt-lymfomer, (1/3) plasmacelle neoplasmer, (1/1) hematodermiske lymfoide neoplasmer, (0/1) anaplastisk storcellet lymfom, (0/1) lymphoplasmacytisk lymfom.

**NCL-L-CD33 er nyttigt som en del af antistofpanelet til identifikation af celler af myeloid og monocytisk afstamning, samt leukæmier og myeloproliferative forstyrrelser, afledt fra disse celler.**

## Generelle Begrænsninger

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

Vævsfarvning er afhængig af håndteringen og behandlingen af vævet inden farvning. Forkert fiksering, frysning, optøning, vask, tørring, opvarmning, sektionering eller kontaminering med andet væv eller andre væsker kan frembringe artefakter, indfangning af antistof eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variationer i fikserings- og indstøbningsmetoder eller irregularet indeholdt i vævet.<sup>4</sup>

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

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

Antistoffer fra Leica Biosystems Newcastle Ltd er som angivet beregnet til anvendelse på enten frosne eller paraffinindstøbte vævssnit med specifikke krav til fiksering. Der kan forekomme uventet antigenekspression, navnlig i neoplasmer. Den kliniske fortolkning af alle farvede vævssnit skal indbefatte morfologisk analyse og evaluering af passende kontroller.

## **Bibliografi - Generelt**

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Freeman SD, Kelm S, Barber EK et al. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules, Blood 85(8): 2005–2012 (1995)
6. Simmons D and Seed B. Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. Journal of Immunology 141: 2797–2800 (1988)..

## **Rettelser Til Tidligere Udgave**

Reagenssammensætning er ændret.  
Totalproteinkoncentrationen er ændret.  
Antistofkoncentration er ændret.

## **Udgivelsesdato**

16 April 2009 (NCL-L-CD33/CE/UK)

# Immunhistokemisk fremgangsmåde til anvendelse af Novocastra™ antistoffer på paraffinindstøbte væv ved anvendelse af varmeinduceret epitopgenfindingssteknik.

## A. Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

1. Standardopløsningsmidler anvendt i immunhistokemi
2. 50 mM tris-bufferjusteret saltvandsopløsning (TBS) pH 7,6
3. Epitopgenfindingsopløsning (se afsnit C Antigengendfindingsopløsninger).
4. Antistofdiluent, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Visualiseringssystem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) eller RE7290-K (50 tests).
6. Monteringsmedium – fremstilles ifølge producentens anbefalinger.

## B. Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

1. Inkubator sat til 25 °C.
2. Opvarmningsapparat til epitopgenfinding: vandbad eller dampbad, trykkoger eller andet temperaturkontrolleret laboratorieudstyr.
3. Almindeligt laboratorieudstyr til immunhistokemi.

## C. Antigengendfindingsopløsninger (se Anbefalinger vedrørende anvendelse for en af følgende)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Citratbaseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel     |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | EDTA-baseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tris/EDTA-baseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## D. Fremgangsmåde

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

Kunden skal fastlægge optimale fortyndinger for antistoffer. Med mindre andet er anført, skal alle trin udføres ved stuetemperatur (25 °C).

### Epitopgenfinding

Følg venligst vejledningen i Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

### Visualisering

Følg venligst vejledningen i Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) eller RE7290-K (50 tests).

## E. Rettelser til tidligere udgave

Ingen rettelser.

## F. Udgivelsesdato

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).



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

