

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «БиоЛайн»
Семенов А.В.

2011 г.
М.П.



ИНСТРУКЦИЯ

к применению Реагентов in vitro для иммуногистохимических исследований
Товокастра», производства Лейка Микросистем Вертриеб Гмбх (Германия, Leica
mikrosysteme Vertrieb GmbH)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

2. ХАРАКТЕРИСТИКА

1. Принцип действия

2. Состав

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

1. Назначение

Реагенты *in vitro* для иммуногистохимических исследований «Новокастра», производства Лейка Микросистем Вертриеб Гмбх (Германия, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH), предназначены для улучшения качества иммуногистохимического окрашивания, которое в свою очередь используют для качественного определения локализации, а также идентификации клеточных и тканевых антигенов. Эти реагенты предназначены для демаскировки антигенов, усиления окрашивания с использованием дополнительных объемов отдельных реагентов, которые входят в состав систем детекции, и получения достоверных воспроизводимых результатов.

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

Принцип иммуногисто- и цитохимического метода исследования основан на окраске биологического материала (образцов ткани - гистологических препаратов, биопсий (для гистохимии) и цитологических препаратов, мазков, для цитохимии, в условиях сохранения морфологии клеток, позволяющий определить локализацию искомого антигена в различных тканях, типах клеток, клеточных структурах с помощью специфических антител и чувствительных компонентов системы детекции. В фиксированных формалином тканях антигенные детерминанты маскированы по причине образования метилированных мостиков, что изменяет структуру молекулы белка. Демаскировочный раствор убирает метилированные мостики, обеспечивая доступ антитела к антигену. Существует несколько форм антител: лиофилизированные (сухие) антитела и жидкие антитела, которые требуют разведения специальным раствором – буфером для разведения антител. Реагенты *in vitro* для иммуногистохимических исследований «Новокастра», производства Лейка Микросистем Вертриеб Гмбх (Германия, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) позволяют подготовить препараты и первичные концентрированные антитела перед проведением исследования, провести высокотемпературную и ферментативную демаскировку антигенов (буферы для демаскировки, протеиназа К, буфер для разведения антител, буфер для депарафинизации). Данные реагенты помогают ускорить и улучшить качество окрашивания, применяются на разных этапах (пероксидазный блок, протеиновый блок, биотинилированные вторичные антитела, стрептавидин, гематоксилин, ДАБ, полимер, конъюгированный с пероксидазой). Позволяют правильно оценить полученные результаты (контроли).

2.2 Состав

Реагенты *in vitro* для иммуногистохимических исследований «Новокастра», производства Лейка Микросистем Вертриеб Гмбх (Германия, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH):

1. РНК отрицательный контроль, 4.75 мл — Bond RNA Negative Control Probe, 4.75 ml.
2. РНК положительный контроль, 4.75 мл — Bond RNA Positive Control Probe, 4.75 ml.
3. Пероксидазный блок - Peroxidase Block 25ml.
4. Протеиновый блок - Protein Block 25ml.
5. Биотинилированные вторичные антитела - Biotinylated Secondary 25ml.
6. Стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой – Streptavidin-HRP 25ml.
7. Гематоксилин – Hematoxylin 25ml.
8. Буфер для демаскировки pH 6 - Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Conc) 1L.
9. Буфер для демаскировки pH 8 - Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Conc) 1L.
10. Буфер для демаскировки pH 9 - Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Conc) 1L.
11. DAB усилитель - DAB Enhancer.
12. Буфер для разведения антител - IHC Diluent.
13. Фермент протеиназа К - Enzyme Proteinase K (IHC).
14. DAB (250 исследований) - DAB (250 tests).
15. NovoLink Polymer (полимер, конъюгированный с пероксидазой) (250 тестов) – NovoLink Polymer (250 tests).
16. NovoLink Max Polymer (полимер, конъюгированный с пероксидазой) (1250 тестов) –

NovoLink Max Polymer (1250 tests).

17. ДАБ адаптированный для системы визуализации NovoLink (250 тестов) - NovoLink DAB (Polymer) (250 tests).
18. ДАБ адаптированный для системы визуализации NovoLink (1250 тестов) - NovoLink Max DAB (Polymer) (1250 tests).
19. Анти-биотиновые антитела, 7.5 мл – Anti-Biotin Antibody , 7.5 ml.
20. Анти-флуоресцентные антитела, 3.75 мл – Bond Anti-Fluorescein Antibody, 3.75 ml.
21. Раствор для депарафинизации Бонд - Bond Dewax Solution.
22. Антитела Бонд, 500 мл - Bond Primary Antibody Diluent, 500 ml.
23. Усилитель ДАБ Бонд - Bond DAB Enhancer 30ml.
24. Отмывочный раствор Бонд, 1 л - Bond Wash Solution 10X Concentrate, 1 L.
25. Раствор Бонд для высокотемпературной демаскировки 2 - Bond Epitope Retrieval 2.
26. Раствор Бонд для высокотемпературной демаскировки 1 - Bond Epitope Retrieval 1.
27. Реагент Бонд, полимер - Bond Polymer Intense Detection.
28. ДНК положительный контроль, 6.25 мл - DNA Positive Control, 6.25 ml.
29. ДНК отрицательный контроль, 6.25 мл - DNA Negative Control, 6.25 ml.

Настоящие реагенты представлены в жидкой концентрированной и готовой к использованию формах. Фасовки: 4,75 мл, 25 мл, 1 л, 7,5 мл, 3,75, 500 мл, 30 мл, 6,25 мл. Количество тестов: 250, 1250.

Буферы для демаскировки разводят дистиллированной водой в соотношении 1:10 для получения готового раствора.

Все остальные реагенты в готовом разведении и не требуют предварительного смешивания, титрования или разведения.

3. Аналитические и диагностические характеристики

Данные реагенты необходимы для улучшения качества иммуногистохимического окрашивания, которое в свою очередь широко используют в клинической практике для диагностики *in vitro* различных заболеваний и, главным образом, в дифференциальной диагностике опухолей, так и в научно-исследовательской работе.

4. Меры предосторожности

- Этот продукт предназначен для диагностики *in vitro*.
- Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта кожи и слизистых мембран с реагентами или образцами. Если реагенты или образцы соприкоснулись с чувствительными участками, промойте их обильным количеством воды и обратитесь к врачу.
- С образцами тканей и материалами, контактировавшими с ними, следует обращаться как с потенциально инфекционными и обеззараживать в соответствии с федеральными, государственными и местными инструкциями.
- Минимизируйте загрязнение реагентов микробами, иначе может произойти неспецифическое окрашивание.
- Изменения внешнего вида реагентов, такие как выпадение осадка или обесцвечивание указывают на нестабильность и непригодность. В таких случаях реагент не должен использоваться.
- Реагенты антител содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия вреден при попадании внутрь. Храните вне досягаемости детей. Храните отдельно от пищевых продуктов, спиртных напитков и кормов для животных. Азид натрия следует смывать большими количествами воды.
- ДАВ хромоген вреден при попадании внутрь. Храните вне досягаемости детей. Храните отдельно от пищевых продуктов, спиртных напитков и кормов для животных.

5. Оборудование и материалы

Для приготовления гистологических препаратов необходимы следующее оборудование и материалы:

- 1) лабораторная посуда
- 2) буферные растворы
- 3) батарея для депарафинизации и регидратации
- 4) микротом или микротом-криостат для нарезания гистологических срезов
- 5) термостол для расправления парафиновых срезов
- 6) предметные и покровные стекла
- 7) адгезивы (для прилипания гистологического среза к стеклу)
- 8) влажная камера
- 9) первичные немеченые антитела
- 10) системы детекции и наборы визуализации, в состав которых входят вторичные меченые антитела
- 11) термостаты 37°C, 56°C (для инкубации образца ткани с антителами)
- 12) гистологические красители
- 13) среды для заключения гистологических препаратов
- 14) световой микроскоп (для визуализации результатов окрашивания)

6. Анализируемые образцы

Образцы тканей, биопсии, участки органов.

7. Проведение анализа

- 1) Разместить срезы на стеклах, покрытых адгезивом.
 - 2) Провести депарафинизацию в ксилоле или его заменителях.
 - 3) Регидратировать через серию спиртов.
 - 4) Промыть текущей водопроводной водой.
 - 5) Провести процедуры демаскировки антигена, если это требуется (см. инструкцию, приложенную к первичным антителам).
 - 6) Промыть де-ионизированной водой.
 - 7) Нейтрализовать эндогенную пероксидазу, используя пероксидазный блок, 5 мин.
 - 8) Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
 - 9) Инкубировать срезы 5 минут с протеиновым блоком.
 - 10) Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
 - 11) Обвести срезы гидрофобным карандашом
 - 12) Инкубировать срезы с оптимально разведенными первичными антителами (время инкубации см. в инструкции, приложенной к первичным антителам).
 - 13) Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
 - 14) Инкубировать срезы 30 минут с усилителем проникновения полимера.
 - 15) Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
 - 16) Инкубировать срезы 30 минут с вторичными антителами, конъюгированными с полимером сцепленным с пероксидазой или с биотинилированными вторичными антителами.
 - 17) Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
 - 18) Инкубировать срезы с рабочим разведением DAB 5 мин.
 - 19) Промыть водой.
 - 20) Докрасить гематоксилином.
 - 21) Промыть водой 5 минут.
 - 22) Провести дегидратацию, очищение, затем покрыть заключающим раствором.

8. Регистрация результатов

Продукт иммуногистохимических реакций может иметь в клетке различную локализацию: мембранную, цитоплазматическую, ядерную, в области аппарата Гольджи. Результаты иммуногистохимической реакции могут оцениваться полуколичественным или количественным способом, с помощью световой микроскопии, а в ряде случаев только качественной оценкой реакции.

9. Учет результатов реакции

При использовании этого метода необходима постановка контролей, под контролем иммуногистохимической реакции подразумевается проверка специфичности взаимодействия антител и, следовательно реальность полученной картины. Отрицательный контроль, свидетельствует о том, что исследуемый антиген в ткани не присутствует, положительный- наоборот, свидетельствует о наличии исследуемого антигена. Вместе с тем этот метод наиболее специфичен и чувствителен, чем рутинное гистологическое исследование и позволяет снизить количество ошибок и неверифицируемых диагнозов, произвести иммунофенотипирование опухолей лимфоидной и гематopoэтической системы, новообразований мягких тканей и т.д.

10. Условия хранения и эксплуатации набора

Реагенты для визуализации, раствор для разведения антител, растворы для демаскировки хранят при температуре +2+8°C, не замораживают, после применения их необходимо немедленно вернуть в холодильник (t° +2 +8 C). Знаками, указывающими на загрязнение и/или нестабильность, являются мутность раствора, появление запаха и наличие осадка. Реагенты не следует применять после истечения срока годности, указанного на этикетке.

Генеральный директор ООО «БиоЛайн» / Александр Владимирович Семенов/

«26» августа 2011г.



М.П.



Семенов А.В.

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «БиоЛайн»
Семенов А.В.



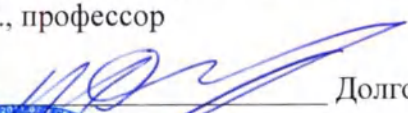
2011 г.
М.П

ИНСТРУКЦИЯ

по применению **Реагентов in vitro для иммуногистохимических исследований**
«Новокастра», производства Лейка Микросистем Вертриеб Гмбх (Германия, Leica
Mikrosysteme Vertrieb GmbH)

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава»,
д.м.н., профессор

 Долгов В.В.

 2011 г.



2011 г.

СОДЕРЖАНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКА
1. Принцип действия
2. Состав
АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ
АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ
ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА
РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ
УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ
3. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Назначение

Реагенты *in vitro* для иммуногистохимических исследований «Новокастра», производства Лейка Микросистем Вертриеб Гмбх (Германия, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH), предназначены для улучшения качества иммуногистохимического окрашивания, которое в свою очередь используют для качественного определения локализации, а также идентификации клеточных и тканевых антигенов. Эти реагенты предназначены для демаскировки антигенов, усиления окрашивания с использованием дополнительных объемов дополнительных реагентов, которые входят в состав систем детекции, и получения достоверных воспроизводимых результатов.

Характеристика набора

1 Принцип действия

Принцип иммуногисто- и цитохимического метода исследования основан на окраске цитологического материала (образцов ткани - гистологических препаратов, биопсий (для цитохимии) и цитологических препаратов, мазков, для цитохимии, в условиях сохранения морфологии клеток, позволяющий определить локализацию искомого антигена в различных тканях, типах клеток, клеточных структурах с помощью специфических антител и чувствительных компонентов системы детекции. В фиксированных формалином тканях антигенные детерминанты маскированы по причине образования метилированных мостиков, что изменяет структуру молекулы белка. Демаскировочный раствор убирает метилированные мостики, обеспечивая доступ антитела к антигену. Существует несколько форм антител: лиофилизированные (сухие) антитела и жидкие антитела, которые требуют разведения специальным раствором – буфером для разведения антител. Реагенты *in vitro* для иммуногистохимических исследований «Новокастра», производства Лейка Микросистем Вертриеб Гмбх (Германия, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) позволяют подготовить препараты и первичные концентрированные антитела перед проведением исследования, провести высокотемпературную и ферментативную демаскировку антигенов (буферы для демаскировки, протеиназа К, буфер для разведения антител, буфер для депарафинизации). Данные реагенты помогают ускорить и улучшить качество окрашивания, применяются на разных этапах (пероксидазный блок, протеиновый блок, биотинилированные вторичные антитела, стрептавидин, гематоксилин, ДАБ, полимер, конъюгированный с пероксидазой). Позволяют правильно оценить полученные результаты (контроли).

2 Состав

Реагенты *in vitro* для иммуногистохимических исследований «Новокастра», производства Лейка Микросистем Вертриеб Гмбх (Германия, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH):

1. РНК отрицательный контроль, 4.75 мл — Bond RNA Negative Control Probe, 4.75 ml.
2. РНК положительный контроль, 4.75 мл — Bond RNA Positive Control Probe, 4.75 ml.
3. Пероксидазный блок - Peroxidase Block 25ml.
4. Протеиновый блок - Protein Block 25ml.
5. Биотинилированные вторичные антитела - Biotinylated Secondary 25ml.
6. Стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой – Streptavidin-HRP 25ml.
7. Гематоксилин – Hematoxylin 25ml.
8. Буфер для демаскировки pH 6 - Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Conc) 1L.
9. Буфер для демаскировки pH 8 - Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Conc) 1L.
10. Буфер для демаскировки pH 9 - Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Conc) 1L.
11. DAB усилитель - DAB Enhancer.
12. Буфер для разведения антител - IHC Diluent.
13. Фермент протеиназа К - Enzyme Proteinase K (IHC).
14. DAB (250 исследований) - DAB (250 tests).
15. NovoLink Polymer (полимер, конъюгированный с пероксидазой) (250 тестов) – NovoLink Polymer (250 tests).

16. NovoLink Max Polymer (полимер, конъюгированный с пероксидазой) (1250 тестов) – NovoLink Max Polymer (1250 tests).
17. ДАБ адаптированный для системы визуализации NovoLink (250 тестов) - NovoLink DAB (Polymer) (250 tests).
18. ДАБ адаптированный для системы визуализации NovoLink (1250 тестов) - NovoLink Max DAB (Polymer) (1250 tests).
19. Анти-биотиновые антитела, 7.5 мл – Anti-Biotin Antibody , 7.5 ml.
20. Анти-флуоресцентные антитела, 3.75 мл – Bond Anti-Fluorescein Antibody, 3.75 ml.
21. Раствор для депарафинизации Бонд - Bond Dewax Solution.
22. Антитела Бонд, 500 мл - Bond Primary Antibody Diluent, 500 ml.
23. Усилитель ДАБ Бонд - Bond DAB Enhancer 30ml.
24. Отмывочный раствор Бонд, 1 л - Bond Wash Solution 10X Concentrate, 1 L.
25. Раствор Бонд для высокотемпературной демаскировки 2 - Bond Epitope Retrieval 2.
26. Раствор Бонд для высокотемпературной демаскировки 1 - Bond Epitope Retrieval 1.
27. Реагент Бонд, полимер - Bond Polymer Intense Detection.
28. ДНК положительный контроль, 6.25 мл - DNA Positive Control, 6.25 ml.
29. ДНК отрицательный контроль, 6.25 мл - DNA Negative Control, 6.25 ml.

стоящие реагенты представлены в жидкой концентрированной и готовой к использованию формах. Фасовки: 4,75 мл, 25 мл, 1 л, 7,5 мл, 3,75, 500 мл, 30 мл, 6,25 мл. Количество тестов: 0, 1250.

растворы для демаскировки разводят дистиллированной водой в соотношении 1:10 для получения готового раствора.

Все остальные реагенты в готовом разведении и не требуют предварительного смешивания, разведения или разведения.

Аналитические и диагностические характеристики

Все реагенты необходимы для улучшения качества иммуногистохимического окрашивания, которое в свою очередь широко используют в клинической практике для диагностики *in vitro* различных заболеваний и, главным образом, в дифференциальной диагностике опухолей, так и в научно-исследовательской работе.

Меры предосторожности

- Этот продукт предназначен для диагностики *in vitro*.
- Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта кожи и слизистых мембран с реагентами или образцами. Если реагенты или образцы соприкоснулись с чувствительными участками, промойте их обильным количеством воды и обратитесь к врачу.
- С образцами тканей и материалами, контактировавшими с ними, следует обращаться как с потенциально инфекционными и обеззараживать в соответствии с федеральными, государственными и местными инструкциями.
- Минимизируйте загрязнение реагентов микробами, иначе может произойти неспецифическое окрашивание.
- Изменения внешнего вида реагентов, такие как выпадение осадка или обесцвечивание указывают на нестабильность и непригодность. В таких случаях реагент не должен использоваться.
- Реагенты антител содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия вреден при попадании внутрь. Храните вне досягаемости детей. Храните отдельно от пищевых продуктов, спиртных напитков и кормов для животных. Азид натрия следует смывать большими количествами воды.
- DAB хромоген вреден при попадании внутрь. Храните вне досягаемости детей. Храните отдельно от пищевых продуктов, спиртных напитков и кормов для животных.

Оборудование и материалы

Для приготовления гистологических препаратов необходимы следующее оборудование и материалы:

- 1) лабораторная посуда
- 2) буферные растворы
- 3) батарея для депарафинизации и регидратации
- 4) микротом или микротом-криостат для нарезания гистологических срезов
- 5) термостол для расправления парафиновых срезов
- 6) предметные и покровные стекла
- 7) адгезивы (для прилипания гистологического среза к стеклу)
- 8) влажная камера
- 9) первичные немеченые антитела
- 10) системы детекции и наборы визуализации, в состав которых входят вторичные меченые антитела
- 11) термостаты 37°C, 56°C (для инкубации образца ткани с антителами)
- 12) гистологические красители
- 13) среды для заключения гистологических препаратов
- 14) световой микроскоп (для визуализации результатов окрашивания)

Анализируемые образцы

образцы тканей, биопсии, участки органов.

Проведение анализа

Разместить срезы на стеклах, покрытых адгезивом.

- 2) Провести депарафинизацию в ксилоле или его заменителях.
- 3) Регидратировать через серию спиртов.
- 4) Промыть текущей водопроводной водой.
- 5) Провести процедуры демаскировки антигена, если это требуется (см. инструкцию, приложенную к первичным антителам).
- 6) Промыть де-ионизированной водой.
- 7) Нейтрализовать эндогенную пероксидазу, используя пероксидазный блок, 5 мин.
- 8) Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
- 9) Инкубировать срезы 5 минут с протеиновым блоком.
- 10) Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
- 11) Обвести срезы гидрофобным карандашом
- 12) Инкубировать срезы с оптимально разведенными первичными антителами (время инкубации см. в инструкции, приложенной к первичным антителам).
- 13) Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
- 14) Инкубировать срезы 30 минут с усилителем проникновения полимера.
- 15) Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
- 16) Инкубировать срезы 30 минут с вторичными антителами, конъюгированными с полимером сцепленным с пероксидазой или с биотинилированными вторичными антителами.
- 17) Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
- 18) Инкубировать срезы с рабочим разведением DAB 5 мин.
- 19) Промыть водой.
- 20) Докрасить гематоксилином.
- 21) Промыть водой 5 минут.
- 22) Провести дегидратацию, очищение, затем покрыть заключающим раствором.

Регистрация результатов

продукт иммуногистохимических реакций может иметь в клетке различную локализацию: мембранную, цитоплазматическую, ядерную, в области аппарата Гольджи.

Результаты иммуногистохимической реакции могут оцениваться полуколичественным или количественным способом, с помощью световой микроскопии, а в ряде случаев только качественной оценкой реакции.

Учет результатов реакции

При использовании этого метода необходима постановка контролей, под контролем иммуногистохимической реакции подразумевается проверка специфичности взаимодействия антител и, следовательно реальность полученной картины. Отрицательный контроль, свидетельствует о том, что исследуемый антиген в ткани не присутствует, положительный- наоборот, свидетельствует о наличии исследуемого антигена. Вместе с тем этот метод наиболее специфичен и чувствителен, чем рутинное гистологическое исследование и позволяет снизить количество ошибок и неверифицируемых диагнозов, произвести иммунофенотипирование опухолей лимфоидной и гематопоетической системы, новообразований мягких тканей и т.д.

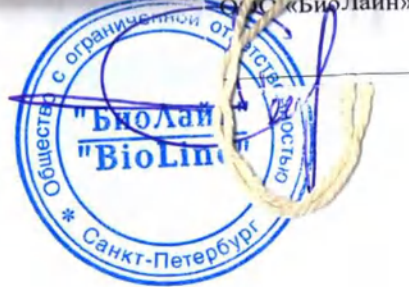
Условия хранения и эксплуатации набора

Агенты для визуализации, раствор для разведения антител, растворы для демаскировки тканей хранят при температуре +2+8°C, не замораживают, после применения их необходимо медленно вернуть в холодильник (t° +2 +8 C). Знаками, указывающими на загрязнение или нестабильность, являются мутность раствора, появление запаха и наличие осадка. Агенты не следует применять после истечения срока годности, указанного на этикетке.

Генеральный директор ООО «БиоЛайн» / Александр Владимирович Семенов/



28 сентября 2011г.



Семенов А.В.