

Allgemeine Richtlinien

zur immunhistochemischen Färbung

Verwendungszweck	Zur In-vitro-Diagnostik. Diese Anweisungen gelten für immunhistochemische Reagenzien von Dako. Sie gelten nicht notwendigerweise für das/die in dieser Packung enthaltene(n) Produkt(e). Antikörper von Dako werden im Labor dazu verwendet, mit Lichtmikroskopie Antigene auf oder in Zellen aus Gewebeproben bzw. Zellpräparaten qualitativ nachzuweisen. Positive oder negative Ergebnisse unterstützen die Klassifizierung normaler und abnormaler Zellen bzw. Gewebe und ergänzen die konventionelle Histopathologie. Die klinische Auswertung vorhandener oder fehlender Färbungen sollte durch morphologische und histologische Untersuchungen mit entsprechenden Kontrollen ergänzt werden. Auswertungen müssen von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden. Bei allen ungewöhnlichen Färbungen den technischen Kundendienst von Dako verständigen.
Verfahrensprinzip	Antikörper von Dako können zum Nachweis von Antigenen in Gewebe- bzw. Zellproben in einer Vielzahl immunhistochemischer Verfahren als primäre Antikörper eingesetzt werden, so z. B. bei LSAB™+ und Dako LSAB™2 (labelled streptavidin-biotin), markierten Polymeren und erweiterten Polymeren wie EnVision™, EnVision™+, EnVision™ FLEX und FLEX+, EnVision™ GI2, EnVision™ GI2 Doublestain, ADVANCE™, Dako Real™ sowie CSA (catalyzed signal amplification). IHC-Färbeverfahren ermöglichen im Allgemeinen die Demaskierung und Darstellung von Antigenen, ggf. beginnend mit einer Vorbehandlung mit proteolytischen Enzymen oder Wärme-Demaskierung, gefolgt von der sequentiellen Anwendung eines spezifischen Antikörpers gegen das Antigen (primärer Antikörper), einem sekundären Antikörper gegen den primären Antikörper (Link-Antikörper oder markiertes Polymer), eines Enzymkomplexes und eines Chromogensubstrats mit zwischengeschalteten Waschschritten. Die enzymatische Aktivierung des Chromogens führt zur Ausbildung eines sichtbaren Reaktionsprodukts an der Antigenstelle. Danach können die Proben gegengefärbt und eingedeckt werden. Die Ergebnisse werden mit einem Lichtmikroskop betrachtet und von einem qualifizierten Pathologen ausgewertet, um die Diagnostik der möglicherweise mit einem bestimmten Antigen assoziierten pathophysiologischen Prozesse zu unterstützen. (1-4)
Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material	Färbereagenzien wie die mit den Dako EnVision™, EnVision™+, EnVision™ GI2, EnVision™ GI2 Doublestain, EnVision™ FLEX, Dako REAL™, LSAB (Peroxidase- und Alkalische-Phosphatase-Detektionssystemen), Dako LSAB™+, Dako LSAB™2 sowie den Artisan Staining Systems mitgelieferten, außerdem Dako Antibody Diluents und Negativkontrollen. Für bestimmte Antikörper ist ein empfindlicheres Detektionssystem wie EnVision™ FLEX+, ADVANCE™, CSA oder CSA II erforderlich. Informationen über Produktverfügbarkeit sind von Ihrem Händler erhältlich.
Aufbewahrung	Weitere erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien sind Geräte, Chemikalien sowie Hilfs- und Zusatzmittel. Zur Geräteausstattung gehören Lichtmikroskop, Färbeschalen oder ein automatisiertes immunhistochemisches Färbesystem von Dako, ein Zeitmesser, der Intervalle zwischen 3 und 40 Minuten anzeigen kann, sowie Waschflaschen. Benötigte Chemikalien sind beispielsweise 15 mol/L Ammoniumhydroxid, verdünnt auf 0,037 mol/L, Gegenfärbung wie Hämatoxylin, destilliertes Wasser, Ethanol (absolut und 95 %) sowie Xylool oder Xylosersatz. Zu den Hilfs- und Zusatzmitteln gehören u.a. absorbierende Tücher, (positives und negatives) Kontrollgewebe, Deckgläser, wässriges Fixiermittel bzw. nichtwässriges permanentes Fixiermittel und elektrostatisch geladene, mit Poly-L-Lysin beschichtete oder silanisierte Objekträger. Weitere Hilfsmittel wie Kontroll-Objekträger können erforderlich sein. Produkte von Dako sind unter anderem Demaskierungslösungen; Verdünnungsmittel für Antikörper; blockierende Substanzen; Gegenfärbemittel; proteolytische Enzyme; Chromogensubstrate für Peroxidase und alkalische Phosphatase; Waschpufferlösungen; PAP Pen; wässrige Fixiermittel; Silanized Slides und Kontroll-Objekträger. Informationen zu den jeweils aktuellen Produkten sind auf der Dako-Website, im Katalog von Dako oder direkt von Dako erhältlich.

Produkte nach Ablauf des Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien anders als entsprechend den in der Packungsbeilage angegebenen Bedingungen aufbewahrt, muss deren Verwendung vom Benutzer validiert werden. (5)

Trübungen und/oder Ausfällungen im Reagenz können auf Zersetzung durch Verlust des Antikörpertiters oder durch Bakterienwachstum hindeuten. Zur Feststellung eventueller Titer- bzw. Empfindlichkeitsverluste sollten positive und negative Gewebekontrollproben immer parallel zu den Patientenproben getestet werden. Falls eine unerwartete Färbung auftritt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Vorbereitung der Probe

Vor der IHC-Färbung muss das Gewebe fixiert und verarbeitet werden. Eine Fixierung schützt vor Autolyse und Zerfall des exzidierten Gewebes, erhält die Antigenität, verstärkt den Refraktionsindex der Gewebeteile und steigert die Resistenz der Zellelemente gegen Gewebeverarbeitung. Zur Gewebeverarbeitung gehört Dehydrierung, Abscheidung von Dehydrierungsmitteln, Infiltration des Einbettungsmediums, Einbetten und Schneiden des Gewebes. Die am häufigsten verwendeten Fixiermittel für IHC-Gewebepräparate werden unten erörtert.

Diese Angaben sind nur Richtlinien. Optimale Verfahren müssen vom Anwender selbst ermittelt und verifiziert werden. Spezielle Angaben zur Gewebefixierung und -verarbeitung bitte den Literaturhinweisen 1 und 6 entnehmen. Örtliche Sicherheitsbestimmungen beachten.

Paraffineingebettete Gewebe

Allgemeine Bemerkungen

Neutral phosphatgepuffertes Formalin in einer Konzentration von 10 % (v/v) (in der EU im Allgemeinen als 4 %iges w/v gepuffertes Formalin bezeichnet) ist zwar das gebräuchlichste Fixiermittel, allerdings sind die Detektionssysteme von Dako (wie unter „Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien“ aufgeführt) erfolgreich mit Geweben verwendet worden, die mit verschiedenen anderen Fixiermitteln verarbeitet wurden. Infolgedessen sollte das Fixiermittel unter Berücksichtigung der Beschränkungen des primären Antikörpers und der institutionellen bzw. labortechnischen Gegebenheiten des Anwenders gewählt werden.

Art und Konzentration des Fixiermittels sowie Fixierdauer und Größe des zu fixierenden Gewebechnitts beeinflussen die Erhaltung der Gewebeantigene für die Immunfärbung. (7) Für eine reproduzierbare Färbung ist es daher wichtig, möglichst immer unter optimalen standardisierten Fixierbedingungen zu arbeiten. Empfohlen werden möglichst dünne Probschnitte und kurze Fixierzeiten. Eine zu lange Einwirkzeit von Fixiermitteln kann zur Abschwächung der Färbung durch Antigenmaskierung, -beeinträchtigung oder -zerstörung führen. Als alternative Fixiermittel zur Erhaltung der gegen eine routinemäßige Formalinfixierung (10 %iges neutral gepuffertes Formalin) empfindlichen Gewebeantigene werden oft Zenker'sche Lösung, B-5 und Fixiergemisch nach Bouin empfohlen. (8,9) Weitere Informationen zur Gewebefixierung den Literaturhinweisen 1 und 6, den Packungsbeilagen des/der primären Antikörper(s) und den Protokollen der Fixiermittel entnehmen.

Gewebefixierung auf Formalinbasis (Neutral gepuffertes Formalin und Fixiergemisch nach Bouin)
Die meisten Fixiermittel auf Formalinbasis enthalten 10 % Formalin, ein neutrales Salz zur Tonizitätserhaltung und ein gepuffertes System zur pH-Stabilisierung. Diese Fixiermittel werden von Geweben gut toleriert und zeigen eine gute histologische Penetration. Bei schlecht fixierten bzw. eingebetteten Gewebeproben kann es allerdings zu Schrumpfungen oder Verformungen kommen. Kleine Gewebeblöcke (10,0 x 10,0 x 3,0 mm) in 5–10 mL neutral gepuffertem Formalin pro Block bis zu 24 Stunden fixieren. Das Fixiergemisch nach Bouin ist ein alternatives Fixiermittel auf Formalinbasis. Es enthält Pikrinsäure und ist für alle Gewebe außer Nierengewebe geeignet. Je nach Gewebestärke können die Proben für eine Dauer von 1 bis 12 Stunden fixiert werden. Übermäßige Fixierung macht die Gewebe spröde und wirkt sich negativ auf Aussehen und Quantität von Lipiden aus. Vor den Waschschritten mit Wasser die Fixierung mit einem Bad in 70 %igem Ethanol abschließen, um lösliche Pikrate auszufällen.

Quecksilberchloridhaltige Fixiermittel (B-5 und Zenker'sche Lösung)

Quecksilberchloridhaltige Fixiermittel wie B-5 und Zenker'sche Lösung enthalten häufig ein neutrales Salz zur Tonizitätserhaltung; sie sind mit anderen Fixiermitteln mischbar. Die histologische Eindringfähigkeit von Quecksilberchlorid-Fixiermitteln ist generell schlecht, auch werden sie von Gewebeproben nicht gut toleriert. Aus diesem Grund werden kleine Gewebeblöcke (7,0 x 7,0 x 2,5 mm) und kurze Fixierzeiten (1 bis 6 Stunden für B-5 und 2 bis 15 Stunden für Zenker'sche Lösung) empfohlen. Nach dem Fixieren sollten die Gewebeblöcke gründlich mit Wasser gespült und in 70 %igem Ethanol nass aufbewahrt bzw. so lange gelagert werden, bis die Gewebeverarbeitung abgeschlossen werden kann. Die Fixierung mit Gewebeverarbeitung und Paraffineinbettung abschließen (siehe Abschnitt „Verarbeitung und Paraffineinbettung“). Vor der Immunfärbung Quecksilberablagerungen mit einer Jod/Ethanol/Natriumthiosulfat-Lösung entfernen. (10) Die entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen für den Umgang mit Reagenzien beachten, die Quecksilberverbindungen enthalten.

Gewebefixierung in Ethanol

Aufgrund seiner geringen Eindringfähigkeit ist Ethanol als Fixiermittel für routinemäßige histologische Verfahren nicht weit verbreitet. Allerdings lassen sich kleine Gewebestücke schnell fixieren und zeigen eine gute zytologische Konservierung. Gewebeblöcke (5,0 x 5,0 x 2,0 mm) 48 Stunden bei Raumtemperatur (20–25 °C) in absolutem Alkohol fixieren, anschließend zweimal je eine Stunde in frisches Xylol und zweimal nacheinander je eine Stunde in flüssiges Paraffin eintauchen. Die Paraffininfiltation mit der Einbettung abschließen.

Verarbeitung und Paraffineinbettung

Nach der Fixierung kann die Verarbeitung mit einem automatisierten Gewebeprozessor abgeschlossen werden. Die Gewebeproben werden mit Alkohol in verschiedenen Verdünnungsstufen dehydriert, mit Xylol oder Xylofersatz gereinigt und in Paraffin getränkt. Anschließend wird das Gewebe zur Erleichterung des Schneidens in Formen oder Kassetten in Paraffin eingebettet. Um die Antigendeneraturierung zu minimieren, die Gewebe während der Verarbeitung keinen Temperaturen über 60 °C aussetzen. Gewebeblöcke können nach dem Einbetten gelagert oder geschnitten werden. Korrekt fixierte und einbettete Gewebe sind bei Aufbewahrung an einem kühlen Ort unbegrenzt haltbar.

Objektträger mit paraffineingegebetteten Geweben können bei Temperaturen zwischen 2–8 °C je nach Antigen 1 bis 3 Jahre aufbewahrt werden. (11)

Haftung paraffineingegebetteter Gewebeschnitte an Objektträger

Aus paraffineingegebetteten Blöcken entnommene Gewebeschnitte auf saubere Objektträger aus Glas aufbringen. Eine Stunde lang in einem Brutschrank bei höchstens 60 °C dehydrieren. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte während des IHC-Färbeverfahrens werden FLEX IHC Slides (Code K8020), elektrostatisch geladene oder mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger bzw. Silanized Slides (Code S3003) empfohlen. Bei Verwendung elektrostatisch geladener, mit Poly-L-Lysin beschichteter oder silanisierter Objektträger auf jeden Fall Haftmittel wie Gelatine, Klebstoff und/oder kommerzielle proteinhaltige Produkte in der Fixierflüssigkeit vermeiden. Für Färbeverfahren, die eine proteolytische Andauung oder wärmeinduzierte Epitopdemaskierung (Demaskierung) erfordern, werden beschichtete Objektträger ausdrücklich empfohlen.

Entparaffinierung und Rehydrierung

Zur Entfernung des Einbettungsmediums müssen die Gewebeschnitte vor der Färbung entparaffiniert und anschließend rehydriert werden. Eine unvollständige Entfernung von Paraffin ist zu vermeiden. Reste des Einbettungsmediums können eine unspezifische oder verminderte Färbung zur Folge haben.

1. Die Objektträger in ein Xylolbad stellen und 5 (±1) Minuten inkubieren. Den Vorgang in einem frischen Bad wiederholen.
2. Überschüssige Flüssigkeit durch Abklopfen entfernen und die Objektträger 3 (±1) Minuten in absolutes Ethanol eintauchen. Den Vorgang in einem frischen Bad wiederholen.
3. Überschüssige Flüssigkeit durch Abklopfen entfernen und die Objektträger 3 (±1) Minuten in 95 %iges Ethanol eintauchen. Den Vorgang in einem frischen Bad wiederholen.
4. Überschüssige Flüssigkeit durch Abklopfen entfernen und Objektträger mindestens 30 Sekunden in destilliertes oder entionisiertes Wasser eintauchen. Wenn weder proteolytische Andauung noch Demaskierung erforderlich sind, mit dem Färbeverfahren beginnen.

Xylol und Alkohollösungen wöchentlich oder spätestens nach 200 Objektträgern auswechseln. Anstelle von Xylol kann Toluol oder ein Xylofersatz wie Histoclear verwendet werden; in diesem Fall können längere Inkubationszeiten und häufigeres Wechseln der Lösung erforderlich sein.

Gegebenenfalls können die rehydrierten Gewebe bis zu 18 Stunden vor Verwendung bei 2–8 °C in Pufferlösung aufbewahrt werden. Die Gewebe vor dem Färben Raumtemperatur (20–25 °C) annehmen lassen.

Proteolytische Andauung und Demaskierung

Es ist bekannt, dass Formaldehyd durch Bildung intermolekularer Vernetzungen konformative Veränderungen an den Antigenmolekülen auslöst. Zu starke Formalinfixierung kann Antigenerkennungsstellen maskieren und die spezifische Färbung vermindern. Diese Stellen können allerdings vor der Immunfärbung durch proteolytische Gewebeandauung oder „Target Retrieval“ der Gewebeschnitte demaskiert werden. Das jedem primären Antikörper beiliegende Sicherheitsdatenblatt enthält Informationen über die Eignung einer dieser Gewebevorbehandlungen.

Vor dem Färben können entparaffinierte und rehydrierte Gewebeschnitte mit proteolytischen Enzymen vorbehandelt werden. Dazu eignen sich proteolytische Enzyme wie Dako Proteinase K, RTU (Code S3020), Pepsin (Code S3002) oder Proteolytic Enzyme, RTU (Code S3007). Die Dauer der Andauung beträgt normalerweise 6 Minuten. Die empfohlene Zeit der jeweiligen Packungsbeilage des Enzyms entnehmen. ACHTUNG: Eine zu lange Andauung kann zu unspezifischer Färbung und/oder inakzeptabler Morphologie führen. Gründlich mit destilliertem Wasser abspülen, dann das Färbeverfahren nach den Anweisungen des Detektionssystems durchführen.

Wärmeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER/Target Retrieval) vor IHC-Färbeverfahren verstärkt bei vielen primären Antikörpern die Färbungsintensität. Bei einigen Antikörpern ist dieses Verfahren erforderlich. Die empfohlene Demaskierungsmethode dem Sicherheitsdatenblatt des Antikörpers entnehmen. Zur wärmeinduzierten Epitopdemaskierung gehört ein Eintauchen der Gewebeschnitte in eine vorgewärmte Pufferlösung, deren Temperatur in einem PT Link, Wasser- bzw. Dampfbad (95–99 °C), einem Dampfdrucktopf (121 °C) oder einem anderen Laborgerät mit kontrollierbarer Temperatur beibehalten wird. Für optimale Ergebnisse mit einem PT Link entweder Demaskierungslösung von EnVision™ FLEX und FLEX+ Kits (Codes K8000, K8002, K8010, und K8012) verwenden, oder Optional EnVision™ FLEX Target Retrieval Solutions (Codes K8004 und K8005). Weitere Demaskierungslösungen von Dako sind Target Retrieval Solution, pH 9 (10x), (3-in-1)^a (Code S2375), Target Retrieval Solution (Code S1699 und S1700) und Target Retrieval Solution, Citrate pH 6 (Code S2369 und S2031). Die jeweiligen Bedienungsanleitungen beachten.

Wird ein PT Link entweder zusammen mit Target Retrieval Solution von EnVision™ FLEX and FLEX+ Kits oder mit K8004, K8005, S2375, S1699 verwendet, können Entparaffinierung, Rehydrierung und Demaskierung in einem Schritt durchgeführt werden. Nach dem PT Link-Durchlauf ein Quick Dip-Verfahren durchführen und dazu Waschpuffer von EnVision™ FLEX and FLEX+ Kits, Optional EnVision™ FLEX Waschpuffer (20x) (Code K8007), oder Dako Waschpuffer 10x (Code S3006) verwenden.

Mit dem Dako EnVision™+ System, dem Dampfdrucktopfverfahren oder anderen Laborgeräten mit kontrollierbarer Temperatur werden stärkere Färbungen erzielt als mit der Wasserbadmethode. Die Gebrauchsanleitung der Target Retrieval Solution oder Literaturhinweis 12 beachten.

Wird für die Demaskierung ein Wasserbad verwendet, kann bei manchen Antigenen vor der Erwärmung eine zusätzliche Vorbehandlung mit proteolytischen Enzymen erforderlich sein. Gewebeschnitte können 10 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C) mit Dako Proteinase K (Code S3004), verdünnt im Verhältnis 1:500 in Tris-HCl Puffer, pH 7,2–7,6, angedaut werden.

In bestimmten Höhenlagen (oberhalb 1372 m [4500 Fuß]) kann die Demaskierungslösung kochen, noch ehe die gewünschte Optimaltemperatur erreicht ist. Unter diesen Umständen wird als Alternative die Erwärmung der Objekträger auf die höchste erreichbare Temperatur und eine längere Inkubationszeit der Objekträger in der Demaskierungslösung empfohlen, bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht ist. (11) Wahlweise kann auch ein geschlossenes Drucksystem wie ein Dampfdrucktopf verwendet werden, um 121 °C zu erzielen. Es liegt allerdings in der Zuständigkeit jedes einzelnen Labors, das beste Verfahren und die optimale Demaskierungszeit für die jeweiligen Bedingungen zu ermitteln.

Gefrierschnitte

Gefrierschnitte sollten von schockgefrorenen Gewebeblöcken (etwa 1,0 x 1,0 x 0,5 cm) entnommen und 2 bis 24 Stunden an der Luft getrocknet werden. Getrocknete Schnitte können 10 Minuten in raumtemperiertem (20–25 °C) Azeton oder 30 Sekunden in gepuffertem Formylazeton fixiert werden. Die Schnitte an der Luft trocknen lassen, bis sie vollständig dehydriert sind. Mit der Immunfärbung fortfahren oder die Objekträger in Aluminiumfolie eingewickeln und bis zu sechs Monate bei -20 °C aufbewahren. Vor der Verwendung die eingewickelten Gefrierschnitte Raumtemperatur annehmen lassen. Schnitte 10 Minuten in kaltem Azeton (2–8 °C) nachfixieren. Objekträger in ein TBS-Bad einlegen. Das TBS-Bad mehrmals vorsichtig wechseln, um Azetonreste zu entfernen.

Sind die Schnitte zu dick (mehr als 4–6 µm), nicht korrekt fixiert oder ungleichmäßig getrocknet, können Artefakte auftreten, die die Auswertung der Färbung beeinflussen. Es kann beispielsweise zur Zerstörung der Zellmembran und zur Chromatolyse kommen. Bei einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin können die Zellkerne ein angeschwollenes Aussehen haben und einheitlich blau gefärbt sein.

Weitere Proben

Dako Detektionssysteme eignen sich auch für die Antigenfärbung bei Knochenschnitten und Proben von Knochenmark, Blutausstrichen, Cytospins und Imprints. Ausstriche können 2–24 Stunden an der Luft getrocknet und dann für die sofortige Färbung verarbeitet und fixiert bzw. in Aluminiumfolie eingewickelt und bei höchstens -20 °C bis zu sechs Monate aufbewahrt werden. Luftgetrocknete oder aufgetaute Ausstriche können 90 Sekunden in Azeton-Methanol (1:1) fixiert werden. Zulässig ist auch die Fixierung in Azeton oder Azeton-Methanol-Formalin (10:10:1).

Knochengewebe müssen vor dem Schneiden und der Weiterverarbeitung entkalkt werden, um das Schneiden des Gewebes zu erleichtern und Schäden an den Mikrotomklingen zu vermeiden. (1) Die Entkalkung kann sich auf die IHC-Färbung auswirken.

Für Fachpersonal in den USA gilt laut Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA von 1988)(42 CFR 493.1259(b)), „dass das Labor gefärbte Objekträger mindestens 10 Jahre und Probenblöcke mindestens zwei Jahre ab Untersuchungsdatum aufbewahren muss.“

Weitere Details zur Vorbereitung der Proben sind dem Dako Hochschulführer: *Immunhistochemical Staining Methods* (6) oder den Literaturangaben 1 und 2 zu entnehmen.

^a In den USA sind die Dako Target Retrieval Solution, S1699, (10x) und EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution Low pH, K8005 nicht für den Verkauf als „3-in-1“-Puffer zur Verwendung bei „3-in-1“-Verfahren erhältlich. Möglicherweise ist eine Lizenzierung unter US-Patent Nr. 6,649,368 B1 erforderlich.

Vorsichtsmaßnahmen	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nur für Fachpersonal bestimmt. 2. Die Produkte können Natriumazid (NaN_3) enthalten, eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. NaN_3 kann auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Ansammlungen von Metallaziden bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Ansammlungen von Metallaziden in den Leitungen vorzubeugen. (12) 3. Mit biologischen Proben, sowohl vor als auch nach der Fixierung, und allen Materialien, die damit in Berührung gekommen sind, ist so umzugehen, als könnten sie Krankheiten übertragen. Bei der Entsorgung sind angemessene Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. (14) Reagenzien nie mit dem Mund pipettieren und Haut- bzw. Schleimhautkontakt mit Reagenzien und Proben vermeiden. Empfindliche Bereiche nach Kontakt mit den Reagenzien mit reichlich Wasser waschen. Bei der Handhabung biologischen Materials von Patienten und während des Färbevorgangs Schutzkleidung tragen. 4. Auf Anfrage sind für Fachpersonal Sicherheitsdatenblätter erhältlich. 5. Andere als die angegebenen Inkubationszeiten bzw. -temperaturen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Jede derartige Abänderung ist vom Anwender zu validieren. 6. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.
Färbeverfahren	<p>Für hochmoderne Färbeverfahren FLEX gebrauchsfertige Antikörper verwenden. Wenn sie mit EnVision™ FLEX und FLEX+ Visualisierungssystemen optimiert wurden, liefern diese Antikörper bei Anwendung auf PT Link und Autostainer Link oder Dako Autostainer-Instrumenten die gewünschten Ergebnisse.</p> <p>Angaben zur Verwendung konzentrierter (unverdünnter) Antikörper der jeweiligen Packungsbeilage, und Hinweise zum empfohlenen Vorgehen den Anweisungen des Detektionssystems entnehmen.</p> <p>Für gebrauchsfertige Antikörper der N-Serie die produktsspezifischen Packungsbeilagen und den Abschnitt „Färbeverfahren“ der Anweisungen für die Dako Detektionssysteme EnVision™+, EnVision™ GI2, Doublestain, LSAB™2 und LSAB™+ beachten.</p>
Qualitätskontrolle	<p>Unterschiede in der Gewebeverarbeitung und den technischen Verfahren im Labor des Anwenders können zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen, daher sind zusätzlich zu den folgenden Verfahren regelmäßige Leistungskontrollen entsprechend den geltenden Richtlinien vorzunehmen. Für Fachpersonal in den USA sind weitere Informationen den Richtlinien zur Qualitätskontrolle des College of American Pathologists (CAP) Accreditation Program for Immunohistochemistry, NCCLS Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline (15), und Literaturhinweis 7 zu entnehmen.</p> <p>Positives Kontrollgewebe Als Kontrollen dienen frische, durch Autopsie, Biopsie oder einen operativen Eingriff gewonnene Proben, die in der gleichen Weise fixiert, verarbeitet und eingebettet werden wie die Patientenprobe(n). Positive Kontrollgewebe zeigen sachgemäß vorbereite Gewebe und geeignete Färbetechniken an. In jedem Färbedurchlauf sollte für jedes Set von Testbedingungen ein positives Kontrollgewebe mitgeführt werden.</p> <p>Die als Positivkontrolle verwendeten Gewebe sollten eine schwach positive Färbung aufweisen, damit feine Veränderungen der primären Antikörpersensitivität nachweisbar sind. Im Handel erhältliche Gewebeschnitte oder Proben, die anders als die Patientenprobe(n) verarbeitet werden, validieren zwar die Leistung der Reagenzien, bestätigen jedoch nicht die Gewebevorbereitung. Angaben zu normalen Gewebeschnitten, die als positive Gewebekontrollen verwendbar sind, dem Abschnitt „Leistungsmerkmale“ der produktsspezifischen Packungsbeilage entnehmen.</p> <p>Bekanntermaßen positive Kontrollgewebe sollten nur zur Überprüfung der korrekten Funktionsweise der verarbeiteten Geweben und Testreagenzien verwendet werden, NICHT aber zur Unterstützung der spezifischen Diagnose anhand von Patientenproben. Weisen die positiven Kontrollgewebe keine Färbung auf, so müssen die Ergebnisse der Testprobe für ungültig erklärt werden.</p> <p>Negative Kontrollgewebe Um die Spezifität des primären Antikörpers zu verifizieren und Hinweise auf eine spezifische Hintergrundfärbung zu erhalten, ist bei jedem Färbedurchlauf eine bekanntermaßen gegen das getestete Antigen negative (siehe Abschnitt „Leistungsmerkmale“ der produktsspezifischen Packungsbeilage), normale Gewebeprobe, die in der gleichen Weise wie die Patientenprobe fixiert, verarbeitet und eingebettet wurde, einzusetzen. Aufgrund der in den meisten Gewebeschnitten anzutreffenden Vielzahl verschiedener Zelltypen existieren interne negative Kontrollstellen (dieses ist vom Benutzer zu verifizieren).</p> <p>Falls das negative Kontrollgewebe Färbungen aufweist, sollten die Ergebnisse der Patientenprobe für ungültig erklärt werden.</p>

Negativkontrolle

Zur Beurteilung unspezifischer oder unerwünschter Färbung und im Hinblick auf eine bessere Interpretation der spezifischen Färbung an der Antigenstelle für jede Patientenprobe eine Negativkontrolle mitführen.
Ein negatives Kontrollreagenz enthält im Idealfall entweder einen Antikörper, der keine spezifische Reaktivität mit menschlichen Geweben aufweist (nicht-reaktiv mit Humangewebe) in der gleichen Grundsubstanz/Lösung wie der verdünnte primäre Antikörper. Bei dem mit Humangewebe nicht-reaktiven Antikörper sollte es sich um denselben Isotyp handeln und er sollte derselben Tierart entstammen wie der primäre Antikörper. Er ist auf dieselbe Immunglobulin- oder Proteinkonzentration wie dieser zu verdünnen. Geeignet ist je nach Typ des verwendeten primären Antikörpers normales/nichtimmunes Serum desselben tierischen Ursprungs wie der primäre Antikörper in einer dem verdünnten primären Antikörper äquivalenten Proteinkonzentration in der gleichen Grundsubstanz/Lösung. Spezielle Empfehlungen der Packungsbeilage jedes primären Antikörpers und Tabelle 1 entnehmen. Das Verdünnungsmittel allein kann ebenfalls verwendet werden, ist aber eine weniger wünschenswerte Alternative als die oben beschriebenen Negativkontrollen. Die Inkubationszeit für die Negativkontrolle sollte mit der für den primären Antikörper übereinstimmen.

Tabelle 1. Beispiele für Negativkontrollreagenzien für konzentrierte Antikörper

<i>Typ des primären Antikörpers</i>	<i>Empfohlene Negativkontrolle</i>
Monoklonaler FLEX gebrauchsfertiger Maus-Antikörper.	Universelle Negativkontrolle für primäre Maus-Antikörper, Code IR750 (für Autostainer Link-Instrumente) und IS750 (für Dako Autostainer-Instrumente).
Polyklonaler oder monoklonaler FLEX gebrauchsfertiger Kaninchen-Antikörper.	Universelle Negativkontrolle für primäre Kaninchen-Antikörper, Code IR600 (für Autostainer Link-Instrumente) und IS600 (für Dako Autostainer-Instrumente).*
In Aszites erzeugter monoklonaler Maus-Antikörper.	In Aszites erzeugter, mit Humangewebe nicht-reaktiver monoklonaler Antikörper. Dieser Antikörper zur Negativkontrolle sollte demselben Isotyp angehören wie der primäre Antikörper. Wahlweise kann normales/nichtimmunes Mausserum, Code X0910, verwendet werden.
In Gewebekultur erzeugter monoklonaler Maus-Antikörper.	In Gewebekultur erzeugter, mit Humangewebe nicht-reaktiver monoklonaler Maus-Antikörper. Dieser Antikörper zur Negativkontrolle sollte demselben Isotyp angehören wie der primäre Antikörper. Dako Codes X0931 (IgG1), X0943 (IgG2 _a), X0944 (IgG2 _b), X0942 (IgM). Wahlweise kann fötales Rinderserum verwendet werden.*
Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, Immunglobulinfraktion.	Kaninchen-Immunglobulinfraktion (normal), Dako Code X0903.
Festphasengebundener, polyclonaler Kaninchen-Antikörper, Immunglobulinfraktion.	Kaninchen-Immunglobulinfraktion (festphasengebunden), Dako Code X0936.
Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, Vollserum.	Normales/nichtimmunes Kaninchen-Serum, Vollserum, Dako Code X0902.

* Fötales Rinderserum eignet sich, wenn es nach der Verarbeitung noch im primären Antikörper erhalten bleibt.

Bei Verwendung von Antikörper-Panels an seriellen Gewebeschnitten können die Bereiche eines Objekträgers, die eine negative Färbung aufweisen, für andere Antikörper als Negativkontrolle bzw. Kontrolle einer unspezifischen Hintergrundbindung dienen, sofern sie in gleicher Verdünnung vorliegen und gleichen tierischen Ursprungs sind.

Zur Unterscheidung zwischen endogener Enzymaktivität bzw. unspezifischer Enzymsbindung und einer spezifischen Immunreakтивität können weitere Patientengewebe nur mit Substratchromogenen oder einer Kombination aus Enzymkomplexen (Avidin-Biotin, Streptavidin, markiertes Polymer) und Substratchromogenen gefärbt werden. Das genaue Vorgehen beim technischen Kundendienst von Dako erfragen.

Tabelle 2. Zweck der täglichen Qualitätskontrolle

Gewebe: Fixiert und verarbeitet wie die Patientenprobe	Spezifischer Antikörper & Detektionssystem	Negativkontrolle* oder Puffer mit demselben Detektionssystem wie beim spezifischen Antikörper
Positivkontrollen: Das nachzuweisende Zielantigen bekanntermaßen enthaltende Gewebe oder Zellen (möglicherweise im Patientengewebe). Gewebe, das eine schwach positive Färbung aufweist, ist am empfindlichsten gegenüber Antikörperabbau bzw. Fehlern am Detektionssystem.	Kontrolliert alle Analyseschritte. Validiert Reagenz und Immunfärbungsverfahren.	Nachweis unspezifischer Hintergrundfärbung.
Negativkontrolle: Vermutlich negative Gewebe oder Zellen (im Patientengewebe oder im Gewebe der positiven Kontrollprobe).	Nachweis unbeabsichtigter Antikörper-Kreuzreaktivität mit Zellen und Zellbestandteilen.	Nachweis unspezifischer Hintergrundfärbung.
Patientengewebe.	Nachweis spezifischer Färbung.	Nachweis unspezifischer Hintergrundfärbung.

* Gleiche Tierart und gleicher Isotyp wie der spezifische Antikörper, aber nicht gegen dasselbe Zielantigen gerichtet.
Zum Nachweis unspezifischer Bindung, z.B. Bindung des Fc-Fragments des Antikörpers an das Gewebe.

Assayverifikation

Vor dem erstmaligen Gebrauch eines Antikörpers oder Immunfärbungssystems in einem diagnostischen Verfahren sollte der Anwender die Spezifität des Assays durch Tests an einer Reihe vorhandener Gewebe mit bekannten IHC-Leistungsmerkmalen, unter denen sich bekannt positive und negative Gewebe befinden, verifizieren. Siehe die zuvor in diesem Abschnitt der Allgemeinen Richtlinien erörterten Qualitätskontrollmaßnahmen und, für Anwender in den Vereinigten Staaten, die Qualitätskontrollanforderungen des CAP Certification Program for Immunohistochemistry und NCCLS Quality Assurance for Immunocytochemistry, Approved Guideline. (15) Diese Maßnahmen sind für jede neue Antikörpercharge bzw. immer dann zu wiederholen, wenn die Assayparameter verändert werden. Die in der produktsspezifischen Packungsbeilage, Abschnitt „Leistungsmerkmale“, aufgeführten Gewebe sind für die Assayverifikation geeignet.

Fehlersuche und -behebung

Bei ungewöhnlichen Färbungen zur Mängelbeseitigung im Abschnitt „Fehlersuche und -behebung“ im Dako Hochschulführer: *Immunohistochemical Staining Methods, Fourth Edition* (6) nachschlagen, den Technischen Kundendienst von Dako verständigen oder über unsere Website www.dako.com melden.

Auswertung der Färbung

Positives Kontrollgewebe

Zuerst sollte das Positivkontrollgewebe untersucht werden, damit gewährleistet ist, dass alle Reagenzien korrekt funktionieren. Positive Reaktivität wird durch ein rotes (3-Amino-9-Ethylkarbazol, AEC), leuchtend rosafarbenes (Neu-Fuchsin oder Fast Red) oder braunes (3, 3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, DAB) Reaktionsprodukt an der Zielantigenstelle angezeigt. Für spezifische Färbemuster siehe die Abschnitte „Auswertung der Färbung“ oder „Leistungsmerkmale“ der produktsspezifischen Packungsbeilagen. Weisen die positiven Kontrollgewebe nicht das erwartete Färbemuster auf, so müssen alle Ergebnisse der Testprobe für ungültig erklärt werden.

HINWEIS: Die Farbe des Reaktionsprodukts kann abweichen, wenn andere Substratchromogene als angegeben verwendet werden. Die erwartete Farbreaktion der Packungsbeilage des Substrats entnehmen. Bei Abweichungen vom Färbeverfahren kann Metachromie auftreten. (16)

Je nach Inkubationszeit und Stärke des Hämatoxylins ergibt die Gegenfärbung eine blaue Färbung der Zellkerne. Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbungen können die sachgemäße Auswertung der Ergebnisse beeinträchtigen.

Negative Kontrollgewebe

Zur Verifizierung der spezifischen Markierung des Zielantigens durch den primären Antikörper sollte die Negativkontrolle nach dem positiven Kontrollgewebe untersucht werden. Die Abwesenheit einer spezifischen Färbung in den Negativkontrollproben bestätigt das Fehlen einer Antikörper-Kreuzreaktivität mit Zellen und Zellkomponenten. Falls das negative Kontrollgewebe andere als die vorgenannten Färbungen aufweist, sollten die Ergebnisse der Patientenproben für ungültig erklärt werden. Bei negativen Geweben sollte Hämatoxylin eine blau-violette Färbung hervorrufen.

Eine eventuelle unspezifische Färbung erscheint diffus. Bei übermäßig formalinfixierten Gewebeschnitten kann es gelegentlich zur Einfärbung des Bindegewebes kommen. Für die Auswertung der Färbeergebnisse nur intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen können eine unspezifische Färbung aufweisen. (7)

Aufgrund nicht-immunologischer Bindung von Proteinen oder Substrat-Reaktionsprodukten können falsch-positive Resultate auftreten. Diese können auch, insbesondere bei Gefrierschnitten bzw. in Abhängigkeit vom Typ des zur Darstellung der Reaktion verwendeten Enzymmarkers, durch endogene Enzyme wie Myeloperoxidase, alkalische Leukozytenphosphatase und Hämoglobinpseudoperoxidase. (17)

Patientengewebe

Die Patientenproben sollte zuletzt untersucht werden. Die Intensität der positiven Färbung ist im Kontext einer eventuellen unspezifischen Hintergrundfärbung mit der Negativkontrolle zu bewerten. Wie bei allen IHC-Tests bedeutet ein negatives Ergebnis, dass das Antigen nicht nachgewiesen wurde, nicht aber, dass das Antigen in den getesteten Zellen/Geweben nicht vorhanden war. Gegebenenfalls ein Antikörper-Panel zum Nachweis falsch-negativer Reaktionen verwenden.

Angaben zur Immunreaktivität des primären Antikörpers der produktspezifischen Packungsbeilage entnehmen.

Allgemeine Beschränkungen

1. IHC ist ein diagnostisches Mehrfachschritt-Verfahren, das hinsichtlich Auswahl, Fixierung und Verarbeitung von Geweben, Auswahl der geeigneten Reagenzien sowie Vorbereitung des IHC-Objektträgers und Auswertung der Färbungsergebnisse ein Spezialtraining erfordert.
2. Gewebefärbungen hängen von der sachgemäßen Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor der Färbung ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Verunreinigung durch andere Gewebe oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper-Trapping oder falsch negativen Ergebnissen führen. Widersprüchliche Ergebnisse können auf Unterschiede bei den Fixierungs- und Einbettungsmethoden oder auf Unregelmäßigkeiten innerhalb des Gewebes zurückzuführen sein.
3. Übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die sachgemäße Auswertung der Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Die klinische Auswertung einer Färbung oder deren Ausbleiben muss durch morphologische Studien und geeignete Kontrollen sowie durch andere diagnostische Tests ergänzt werden. Für die Auswertung der gefärbten Präparate ist ein qualifizierter Pathologe zuständig, der mit Antikörpern, Reagenzien und den zur Auswertung der gefärbten Präparate angewandten Methoden vertraut ist. Die Färbung muss in einem offiziell zugelassenen, lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen erfolgen, dessen Aufgabe es ist, die gefärbten Objektträger zu überprüfen und die Eignung der positiven und negativen Kontrollen zu gewährleisten.
5. Unerwartete negative Reaktionen bei schlecht differenzierten Neoplasien können durch Verlust oder deutliches Nachlassen der Antigenexpression bzw. durch Verluste oder Mutation(en) des Gens/der Gene, die das Antigen kodieren, hervorgerufen werden. Unerwartete positive Färbungen in Tumoren können durch die Expression eines normalerweise im morphologisch gleichen normalen Zellen nicht exprimierten Antigens, bzw. durch Persistenz oder Aneignung eines Antigens in einem Neoplasma, das mit einer unterschiedlichen Zellabstammung assoziierte morphologische und immunhistochemische Eigenschaften entwickelt (divergente Differenzierung), verursacht werden. Die histopathologische Klassifizierung von Tumoren ist keine exakte Wissenschaft, daher sind Angaben zu unerwarteten Färbungen in der Fachliteratur gelegentlich widersprüchlich.
6. Gewebe von mit dem Hepatitis-B-Virus infizierten Personen und Gewebe mit Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigen (HBsAg) können mit Meerrettichperoxidase eine unspezifische Färbung aufweisen. (18)
7. Reagenzien können in zuvor nicht getesteten Geweben unerwartete Reaktionen zeigen. Selbst in getesteten Gewebegruppen können unerwartete Reaktionen aufgrund biologischer Unterschiede bei der Antigen-Expression in Neoplasmen oder anderen pathologischen Geweben nicht völlig ausgeschlossen werden. (19) Bitte bei dokumentierten unerwarteten Reaktionen den technischen Kundendienst von Dako verständigen.
8. Normale/nichtimmune Sera, die von derselben Tierart stammen wie die in den Blockierungsschritten verwendeten sekundären Antiseren, können durch Auto-Antikörper oder natürliche Antikörper falsch-negative oder falsch-positive Ergebnisse auslösen.
9. Aufgrund der nicht-immunologischen Bindung von Proteinen oder Substrat-Reaktionsprodukten können falsch-positive Resultate auftreten. Diese können auch, insbesondere bei Gefrierschnitten bzw. in Abhängigkeit vom Typ des zur Immunfärbung verwendeten Markers, durch endogenes Biotin oder Enzyme wie Myeloperoxidase, alkalische Leukozytenphosphatase und Hämoglobinpseudoperoxidase hervorgerufen werden. (17)
10. Die wärmeinduzierte Epitopdemaskierung (Target Retrieval) kann zu HIER-Lipofuszin-Artefakten führen. Target Retrieval kann auch unerwartete oder unerwünschte Stellen demaskieren.
11. Werden primäre Antikörper mit einem bestimmten Färbesystem in zu hoher Konzentration verwendet, können falsch-negative Färbungsergebnisse mit oder ohne Hintergrund auftreten.
12. Gebrauchsfertige primäre Antikörper sind vorverdünnt und für die Verwendung mit einem speziellen Färbungssystem optimiert. Werden sie mit anderen Detektionssystemen von Dako oder anderen Herstellern verwendet, sind sie nicht gebrauchsfertig und müssen erneut optimiert und gemäß dem IHC-Protokoll des klinischen Labors validiert werden.
13. Sofern in den Anweisungen nicht spezifisch angegeben, sind die Leistungsmerkmale der zur IHC verwendeten Antikörper nicht für andere Laborverfahren vorgesehen.

Literaturangaben

1. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981
2. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980
3. Diamandis EP, Schwartz MK. Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications. Washington DC: AACR Press 2002
4. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier 2002
5. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57 CFR 7163, February 28, 1992
6. Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH. Handbook: Immunochemical Staining Methods, 3rd Edition. Carpinteria: Dako Corporation 2001
7. Nadji M and Morales AR. Immunoperoxidase. Part I: The technique and its pitfalls. Lab Med 1983; 14:767
8. Banks PM. Diagnostic applications of an immunoperoxidase method in hematopathology. J Histochem Cytochem 1979; 27:1192-94
9. Culling CFA, Reid PE, Sinnott NM. The effect of various fixatives and trypsin digestion upon the staining of routine paraffin-embedded sections by the peroxidase-antiperoxidase and immunofluorescent technique. J Histotech 1980; 3:10-19
10. Carson FL (ed.). Histotechnology: A self-instructional text. Chicago: ASCP Press 1990; 22
11. Grabau DA, Nielsen O, Hansen S, Nielsen MM, Lænholm A-V, Knoop A, Pfeiffer P. Influence of storage temperature and high-temperature antigen retrieval buffers on results of immunohistochemical staining in sections stored for long periods. Appl Immunohistochem 1998; 6(4):209-13
12. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J Histochem Cytochem 1991; 39:741-48
13. Koopal SA, Coma MI, Tibosch AMG, Surmeijer AJH. Low temperature heating overnight in Tris-HCl buffer pH 9 is a good alternative for antigen retrieval in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Appl Immunohistochem 1998; 6:228-33
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Protection of laboratory workers from instrument biohazards and infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue; approved guideline. Villanova, PA 1997: Order code M29-A
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Quality assurance for immunocytochemistry; approved guideline. Villanova, PA, 1999; 19(26):Order code MM4-A
16. Koretz K, Lemain ET, Brandt I, and Moller P. Metachromasia of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and its prevention in immunoperoxidase techniques. Histochem 1987; 86:471-78
17. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, Battifora H, Brigati DJ. Special report: Quality control in immunohistochemistry. Amer J Clin Pathol 1989; 92:836-43
18. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. Amer J Clin Pathol 1980; 73:626-32
19. Herman GE and Elfond EA. The taming of immunohistochemistry: The new era of quality control. Biotech Histochem 1991; 66:194-99

Edition 11/09



DakoCytomation, Inc
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

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

EC REP

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

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595
www.dakocytomation.com