

## Kit Completo EasyLink Duo, Polímero

EasyLink Duo Complete Kit, Polymer

<b>Código</b>	<b>EP-12-20494AM</b>	<b>5ml</b>
	<b>EP-12-20494</b>	<b>25ml</b>
	<b>EP-12-20495</b>	<b>125ml</b>

- Quantidade de teste : 5ml (50 testes) | 25ml (250 testes) | 125ml (1250 testes)\*
- Validade e lote do produto : ver frasco
- Temperatura de armazenamento : 2 à 8°C (não congelar)

### Conteúdo - Componentes do Kit

5ml (versão de teste)

Bloqueador de Peroxidase	(EP-11-20521AM)	– 5ml
Amplificador de Anticorpo*	(EP-12-20561AM)	– 5ml
Polímero PolyFusion-HRP*	(EP-12-20564AM)	– 5ml
Kit DAB Cromógeno	(EP-12-20541AM)	– 5ml
Potencializador de DAB	(EP-12-20546AM)	– 5ml

25ml

Bloqueador de Peroxidase	(EP-11-20521)	– 25ml
Amplificador de Anticorpo*	(EP-12-20561)	– 25ml
Polímero PolyFusion-HRP*	(EP-12-20564)	– 25ml
Kit DAB Cromógeno	(EP-12-20541)	– 25ml
Potencializador de DAB	(EP-12-20546)	– 25ml

125ml

Bloqueador de Peroxidase	(EP-11-20522)	– 125ml
Amplificador de Anticorpo*	(EP-12-20562)	– 125ml
Polímero PolyFusion-HRP*	(EP-12-20565)	– 125ml
Kit DAB Cromógeno	(EP-12-20542)	– 125ml
Potencializador de DAB	(EP-12-20547)	– 125ml

\* Não é vendido separadamente (amplificador de anticorpo e polímero PolyFusion-HRP)

Todos os componentes são fornecidos na forma líquida e no formato pronto a usar, exceto o DAB Cromógeno, que é fornecido na forma concentrada. Embora não sejam produtos esterilizados, a contaminação microbiológica é controlada, mas não monitorizada, uma vez que as soluções contêm azida de sódio como agente bacteriostático e bactericida. Este aditivo melhora o desempenho do produto sem afetar os resultados da medição.

### Finalidade

O Kit EasyLink Duo, polímero destina-se à utilização em laboratórios de patologia, para a detecção *in vitro* via imuno-histoquímica de anticorpos para antígenos específicos em tecidos humanos (a utilização em outras espécies não foi avaliada), fixados em formalina e embebidos com parafina (FFPE).

### Resumo e Explicação

O bloqueador de peroxidase é um peróxido de hidrogênio altamente estável desenvolvido para bloqueio da peroxidase endógena na técnica de imuno-histoquímica. É muito útil para bloquear colorações inespecíficas de células do sangue (glóbulos vermelhos).

O amplificador de anticorpo, amplifica o sinal dos anticorpos primários produzidos em camundongo ou coelho, possui inibidor de proteína. Aumenta a diluição dos anticorpos primários em 3 a 5 vezes aumentando a sensibilidade e bloqueando colorações inespecíficas conhecidas como “background”.

O EasyLink Duo, possui uma nova tecnologia de síntese que utiliza em conjunto um amplificador para potencializar a ligação de enzimas conjugadas ao anticorpo secundário, e um polímero PolyFusion-HRP de última geração, que contém inibidor de proteína, eliminando o uso de bloqueadores de proteína, e tamanho extremamente reduzido que proporciona uma melhor penetração na estrutura do tecido, resultando em uma melhora exponencial na ligação dos anticorpos primários.

O kit DAB cromógeno produzirá uma coloração marrom, devido a reação com a peroxidase do antígeno alvo. O DAB é largamente utilizado nas colorações de imuno-histoquímica, devido a sua estabilidade, permanência na coloração e facilidade de visualização e uso.

O potencializador do DAB é uma etapa opcional, altera a coloração amarronzada para uma coloração negra destacando a visualização do DAB.

#### **Descrição da molécula identificada pelo produto**

Produto reconhece o isótipo das imunoglobulinas correspondentes ao anticorpo primário. O analito a ser determinado dependerá do anticorpo primário utilizado. Consultar as Instruções de utilização do anticorpo primário específico a ser desenvolvido com o kit EasyLink Duo, polímero.

#### **Expressão em tecidos normais**

A expressão nos tecidos normais será determinada pelo anticorpo primário utilizado. Consultar as Instruções de Utilização do anticorpo primário específico a ser desenvolvido com o kit EasyLink Duo Polímero com DAB.

#### **Período de Validade**

Se for armazenado nas condições de indicadas, o produto pode ser utilizado até a data de validade indicada no rótulo, mesmo depois de aberto. Se o reagente tiver sido armazenado em condições diferentes das indicadas, deve-se primeiro verificar se está funcionando corretamente, tendo em conta que a garantia do produto já não é válida.

#### **Reatividade**

Camundongo e coelho.

#### **Limitações do Produto**

Devido à sensibilidade superior destes reagentes exclusivos, os tempos de incubação recomendados não são aplicáveis a outros sistemas de detecção, pois os resultados podem variar. Os protocolos ideais para uma aplicação específica podem variar. Esses incluem, mas não estão limitados à fixação, método de recuperação de calor, tempos de incubação, diluição de anticorpos, espessura da secção de tecido. As recomendações e protocolos da literatura são baseados em uso exclusivo de produtos EasyPath. Em última análise, é responsabilidade do investigador para determinar as condições ideais.

Este produto é apenas para uso profissional. A imuno-histoquímica é um processo de diagnóstico de múltiplas etapas que consiste em treinamento especializado na seleção dos reagentes apropriados, seleção de tecidos, fixação e em processamento, preparação da lâmina IHC e interpretação do resultado de coloração. A utilização em tecido congelado não foi validado.

#### **Notas técnicas importantes:**

1. Os reagentes são pronto para uso, não recomendamos que seja feita diluição ou mistura com outros reagentes.
2. O tempo de incubação deverá ser determinado pelo usuário, a princípio recomendamos incubação sugerida nesta literatura.
3. A solução DAB é sensível a luz. Antes de fazer a mistura, tenha certeza que não existe incidência de luz diretamente na solução. O tempo de estabilidade após o preparo da solução é de seis horas, tempo suficiente para utilização deste cromógeno em sistemas automatizados.
4. As diluições dos anticorpos primários podem ser excessivamente aumentadas ou o tempo de incubação reduzido com a utilização deste kit.

#### **Notas do protocolo**

Utilização antes do uso do anticorpo primário, recomendamos o uso de duas a três gotas, não é necessário a utilização de uma grande quantidade do reagente.

#### **Protocolo:**

- 1 - Desparafinização - Estufa 60-65° C por 1 hora, depois bateria de Xilol e diluições decrescentes de álcool e lavar em água destilada.
- 2 - Recuperação antigênica - Colocar 600ml de água destilada na câmara pressurizada (Muscae Plus / EasyPath) e a(s) lâmina(s) no recipiente com tampão universal de recuperação antigênica Diva (diluição 1:100), tampar a câmara e deixar 15 minutos em 110° C, conforme pré-programado, esfriar em temperatura ambiente por 20 minutos no próprio Diva.
- 3 - Bloqueador de Peroxidase EasyPath por 5 minutos, lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 4 - Anticorpo primário (Biocare ou EasyPath) por 30-60 minutos (Conforme padronização do laboratório), lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 5 - Amplificador do anticorpo EasyPath por 15 minutos, lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio.

6 – Polímero PolyFusion-HRP EasyPath por 30 minutos, lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio. Nota: O polímero é sensível à luz. Evitar a exposição desnecessária.

7 – Preparar o DAB EasyPath com 15 minutos de antecedência (Proporção: 1ml de DAB Substrato para 1 gota de DAB Cromógeno).

8 - DAB EasyPath por 5 minutos, lavar com TBS, depois com lavar com água deionizada e secar a lâmina com papel macio.

9 - Potencializador do DAB EasyPath (etapa não obrigatória) por 2 minutos, lavar com TBS, depois com lavar com água deionizada e secar a lâmina com papel macio.

10 - Hematoxilina EasyPath por 1 minuto e lavar em água corrente por 1 minuto.

11 - Bateria de álcool e xilol.

12 - Montar a(s) lâmina(s).

## INSTRUÇÕES GERAIS

Para a obtenção de um melhor resultado da metodologia e uma completa compreensão da terminologia utilizada, nós recomendamos as seguintes indicações:

### Número de testes realizados \*

O número mínimo de testes é calculado com 100µl gotas de reagente.

### Equipamento básico

Bandeja de incubação comercializada pelo Grupo Erviegas, código EP-51-05022.

Câmara pressurizada Muscae Plus (EasyPath) para recuperação antigênica com controle de pressão, temperatura e tempo.

Duas séries de solventes, conforme metodologia de cada kit:

- DESCEDENTE: para desparafinizar e levar os cortes das seções para água destilada, composta de: xilol (x2), etanol absoluto (x2), etanol a 96%, etanol a 70% e água destilada.
- ASCENDENTE: para desidratar e limpar, composta de: etanol a 70%, etanol a 96%, etanol absoluto (x2) e xilol (x2).

Aconselhamos o uso do meio de montagem ERV-MOUNT, comercializado pela Grupo Erviegas código EP-51-05042 frasco com 500ml e EP-51-05041 frasco com 100ml.

### Causas de imunomarcção excessiva

1. Falha no bloqueio da peroxidase endógena.
2. Desparafinação incompleta das seções.
3. Aderência excessiva de tecido nas lâminas.
4. Diluição incorreta do anticorpo primário.
5. Água de má qualidade ou contendo hipocloritos.
6. Utilização de DAB impuro.

### Causas que provocam ausência de imunomarcção

1. Não aplicar anticorpos primários ou o amplificador de anticorpos primários (Primary Antibodies Amplifier).
2. Fixação inadequada com recuperação antigênica excessiva.
3. Erros na preparação da solução DAB.

### Garantia Grupo Erviegas

O Grupo Erviegas garante o funcionamento do produto conforme especificado nesta literatura. Para mais informações sobre o produto ou detalhes sobre outras técnicas e produtos acesse nosso site [www.grupoerviegas.com.br](http://www.grupoerviegas.com.br).

### Bibliografia

1. Banks, P. M. Diagnostic applications of an immunoperoxidase method in hematopathology. J. Histochem Cytochem 27( 8): 1192- 1194, 1979.
2. DeLellis, R. A. Basic techniques of immunochemistry, In: Diagnostic Immunohistochemistry, R. A. DeLellis, ed., Masson Publishing USA, New York, 1981, pp. 7- 16.
3. Elias, J. Immunohistopathology: A Practical Approach to Diagnosis. 2nd Ed., ASCP Press, Chicago, USA, 2003.
4. Taylor & Cote, Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for The Surgical Pathologist, 2nd Ed. Philadelphia, WB. Saunders Co. 1994.
5. Shi SR, Guo S, Cote RJ, Young L, Hawes D, Shi Y, Thu S, Taylor CR, Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, vol 7, 201-08, 1999.
6. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry and molecular morphology in the year 2001. Appl Immunohistochem Mol Morphol. (2): 107-16. 2001.

7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Internal quality control testing: principles and definitions; approved guideline. Villanova, PA 1991; Order Code C24-A:4.
8. Escribano LM, et al. Endogenous peroxidase activity in human cutaneous and adenoidal mast cells. *J Histochem Cytochem* 1987; 35:213.
9. Omata M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: A possible source of error in immunohistochemistry. *Amer J Pathol* 1980; 73:626.
10. Tubbs RR, et al. *Atlas of Immunohistology*. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press 1986.
11. Nadji M and Morales AR. *Immunoperoxidase techniques, a practical approach to tumor diagnosis*. Chicago: Amer Soc Clin Pathol Press 1986.
12. Cartun RW. Immunohistochemistry of infectious diseases. *J Histotechnol* 1995; 18(3):195.
13. Heras A, et al. Enhanced labelled-polymer system for immunohistochemistry. XVth Eur Cong Pathol. Copenhagen, Denmark 1995; Sept 3-8.
14. Bisgaard K and Pluzek K-P. Use of polymer conjugates in immunohistochemistry: A comparative study of a traditional staining method to a staining method utilizing polymer conjugates. Abstract. XXI Intl Cong Intl Acad Pathol and 12th World Cong Acad Environ Pathol. Budapest, Hungary 1996; Oct 20-25

MS: 10039370003