



Kit ihcDirect® Cytokeratin 8/18 Anticytokératine 8/18 humaine (clone C94)

K41001-010 100 colorations tissulaires*

K41001-005 50 colorations tissulaires*

Usage prévu : diagnostic in vitro

L'anticorps anticytokératine 8/18 humaine (CK 8/18) marqué à la peroxydase de raifort polymérisée (pHRP) (anticytokératine 8/18 pHRP) est conçu à l'intention des laboratoires pour permettre la détection qualitative par microscopie optique de la présence de CK 8/18 dans des coupes de tissu fixé dans le formol et inclus dans la paraffine (FFIP) ou dans des coupes de tissu congelé en utilisant des techniques d'analyse immunohistochimiques (IHC). L'interprétation clinique de la présence ou de l'absence d'une coloration doit être complétée par des études morphologiques à l'aide de contrôles appropriés et doit tenir compte des antécédents cliniques du patient, ainsi que d'autres tests diagnostiques réalisés par un pathologiste/médecin qualifié. Ce conjugué a été pré-dilué et optimisé pour une utilisation en IHC sans nécessiter davantage de dilution.

Résumé et explication :

L'anticorps anticytokératine 8/18 reconnaît les protéines des filaments intermédiaires de bas poids moléculaire (52,5 kDa et 45 kDa), respectivement les cytokératines 8 et 18. Les cytokératines 8 et 18 sont exprimées dans les épithéliums simples et glandulaires, tels que la thyroïde, le tissu mammaire féminin, le tractus gastro-intestinal et les voies respiratoires. Parmi les tissus tumoraux, les adénocarcinomes expriment ces protéines, tandis que les carcinomes épidermoïdes kératinisants ne les expriment pas. Les anticorps dirigés contre CK 8 et CK 18 peuvent servir à la classification des tumeurs épithéliales (Cimpean et al., 2008 ; Reisenblichler 2013). Le principal composant de ce kit est l'anticorps de souris anticytokératine 8/18 humaine marqué à la peroxydase de raifort polymérisée (pHRP) (clone C94). L'inhibiteur immunohistochimique ihc Blocker fourni dans le kit, utilisé avant d'appliquer le conjugué d'anticorps anti-CK 8/18 marqué à la pHRP, permet de réduire la coloration de fond non spécifique. Le chromogène utilisé dans ce kit est la 3,3'-diaminobenzidine (DAB).

Principe de la procédure :

Le conjugué anticorps anticytokératine 8/18 et pHRP prêt à l'emploi ihcDirect est directement appliqué sur des coupes de tissu prétraité, sur lesquelles il se lie à la cytokératine 8/18 humaine. Une solution de travail DAB est ensuite appliquée sur le tissu. La pHRP fixée à l'anticorps anticytokératine 8/18 catalyse la DAB pour former un précipité visible de couleur marron au site de localisation de la CK 8/18 humaine. L'échantillon peut ensuite être contre-coloré à l'hématoxyline et recouvert d'une lamelle. Les résultats sont visualisés et interprétés au microscope optique. Les volumes sont basés sur 100 µl d'anticorps par échantillon tissulaire. Ce kit pour l'IHC permet de réaliser des tests manuellement ou sur un système de coloration IHC automatique ouvert.

Réactifs fournis :

Réf. du kit	Σ	Description
K41001-005*	50*	Conjugué d'anticorps anti-CK 8/18 prêt à l'emploi ihcDirect 5 ml, ihc Blocker et volumes équivalents d'ihc DAB et d'ihc DAB Diluent.
K41001-010*	100*	Conjugué d'anticorps anti-CK 8/18 prêt à l'emploi ihcDirect 10 ml, ihc Blocker et volumes équivalents d'ihc DAB et d'ihc DAB Diluent.

* Au volume estimé de 100 µl de conjugué d'anticorps par échantillon tissulaire

Immunogène	Clone	Espèce	Classe Ig	Concentration totale en protéines
Cytokératine 8/18 humaine	C94	Souris	IgG	10 mg/ml

L'anticorps anti-CK 8/18 est un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la cytokératine 8/18 humaine, purifié à partir de liquide d'ascite. La HRP est extraite du raifort. L'inhibiteur ihc Blocker contient du sérum de chèvre normal et 1 % de sérumalbumine bovine (BSA) dans un tampon propriétaire contenant 0,01 % de thiomersal comme conservateur.

Le diluant ihc DAB Diluent contient le substrat peroxyde tamponné. Le chromogène ihc DAB contient de la 3,3'-diaminobenzidine dissoute dans un tampon propriétaire sans produit chimique dangereux en concentration soumise à

déclaration. Ce réactif est photosensible. Pour des résultats optimaux, minimiser le temps d'ouverture du flacon. Conserver à l'abri de la lumière.

Composants du Cytokeratin 8/18 pHRP Kit pour les kits de test 5 ml et 10 ml :

Composants du kit	Réf. des composants	Tailles
CK8/18 pHRP	H31001-(R###) (005, 010)	5 ml, 10 ml
ihc Blocker	C30005-(###ML) (005, 010)	5 ml, 10 ml
ihc DAB Diluent	C30004-(###ML) (007, 013)	7 ml, 13 ml
ihc DAB	C30003-(###UL) (200, 375)	200 µl, 375 µl

Matériels nécessaires mais non fournis :

Les réactifs/fournitures ci-après peuvent être nécessaires pour la coloration, mais ne sont pas fournis :

- Fixateur pour coupe de tissu congelé (ihc Fixative) ou acétone de qualité réactif
- Tissus de contrôle positifs et négatifs
- Lames de microscope, chargées positivement (**nécessaire**)
- Cuves à coloration, bains ou outils de traitement
- Tampon de lavage ihc Wash Buffer (tampon PBS)
- Pipeteur et embouts de pipette
- Minuteur
- Tampon de récupération de l'antigène (pour les tissus FFIP)
- Inhibiteur au peroxyde d'hydrogène (facultatif)
- Instruments utilisés pour le prétraitement des tissus, p. ex. bain-marie, autoclave ou micro-ondes (pour les tissus FFIP)
- Hématoxyline
- Xylène ou substitut du xylène
- Éthanol
- Milieu de montage
- Lamelles
- Microscope optique (40 à 400x)

Préparations de réactifs en vrac Novodiox :

- Fixateur ihc Fixative, (375 ml de méthanol, 100 ml de formaldéhyde à 37 % et 25 ml d'acide acétique glacial).
- Tampon de lavage ihc Wash Buffer (tampon PBS), (10 mM de tampon phosphate, pH 7,2, 150 mM de NaCl, 0,05 % de Tween-20).
- Tampon de récupération de l'antigène ihc Antigen Retrieval Buffer (10 mM de tampon à l'acide citrique, pH 6,0, 0,02 % de Tween 20).

Conservation et manipulation :

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler. La solution de travail DAB doit être préparée juste avant emploi et elle sera stable toute la journée de préparation des réactifs entre 2 et 8 °C. Ce kit peut être utilisé jusqu'à la date de péremption lorsqu'il est conservé entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser le produit au-delà de la date de péremption figurant sur le flacon sauf si Novodiox fournit des informations concernant la prolongation du délai. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées dans la notice, ils doivent être inspectés par l'utilisateur.

Préparation des échantillons :

Coupes de tissu inclus dans la paraffine : les tissus traités selon les procédures habituelles, fixés dans le formol à 10 % neutre tamponné peuvent être utilisés avant leur inclusion dans la paraffine. Veuillez vous reporter aux références (Kiernan, 1981 ; Sheehan & Hrapchak, 1980). Des résultats variables peuvent être obtenus en raison d'une fixation prolongée. Chaque coupe doit avoir une épaisseur appropriée (de 4 ou 5 µm) et être placée sur une lame de verre chargée positivement. Les lames contenant une coupe de tissu peuvent être chauffées pendant au moins une heure, mais pas plus de 24 heures, dans une étuve à une température de 58 à 60 °C ±5 °C. Les tissus osseux doivent être décalcifiés avant traitement pour faciliter la coupe du tissu et prévenir l'endommagement des lames de microtome (Kiernan, 1981 ; Sheehan & Hrapchak, 1980).

Coupes de tissu congelé : le tissu congelé est coupé à l'épaisseur appropriée (environ 5 µm) et placé sur une lame de verre chargée positivement. Les tissus doivent être fixés dans le fixateur ihc Fixative de Novodiox ou dans de l'acétone de qualité réactif pendant 30 secondes à 1 minute immédiatement après la coupe. L'acétone de qualité réactif peut être conservée au froid, c'est-à-dire à basse température ou à température ambiante. Une fois fixés, les tissus peuvent être conservés dans un tampon PBS pendant un jour au plus.



Traitement des tissus avant la coloration : le prétraitement dépend du tissu et doit être effectué en suivant les suggestions figurant dans les rubriques relatives à la procédure de coloration.

Mises en garde et précautions :

- Le conjugué anticorps anti-CK 8/18 et pHRP est prédilué. Une nouvelle dilution risque de réduire l'intensité du signal ou de produire des faux négatifs. Ces recommandations sont fournies à titre indicatif uniquement. Les directeurs de laboratoire doivent établir leurs propres procédures et règles de qualité.
- Prendre des précautions raisonnables lors de la manipulation des réactifs. Porter des équipements de protection individuelle, tels que des gants jetables et une blouse de laboratoire, lors de la manipulation de substances soupçonnées d'être cancérogènes ou toxiques. Lire les fiches de données de sécurité (FDS) avant utilisation.
 - Le thiomersal, utilisé comme conservateur dans cette solution, est classé comme substance toxique. Son inhalation peut entraîner des troubles respiratoires et du système nerveux central (SNC), ainsi qu'une neurotoxicité tardive sévère.
 - MISE EN GARDE !** Le produit DAB contient de la 3,3'-diaminobenzidine, qui peut causer des anomalies génétiques et/ou un cancer. En cas d'exposition avérée ou suspectée, consulter un médecin. Se reporter à la FDS sur la DAB pour plus d'informations.
- Éviter tout contact des réactifs avec les yeux et les muqueuses. Si des réactifs entrent en contact avec des zones sensibles, laver abondamment à l'eau.
- Utiliser des lames chargées pour garantir l'adhérence des tissus.
- Les échantillons de patients et tout le matériel entrant en contact avec ceux-ci doivent être manipulés comme des substances biologiques dangereuses et éliminés en prenant les précautions appropriées.
- Consulter les autorités locales ou régionales afin de connaître les méthodes recommandées pour éliminer les déchets biologiques et chimiques dangereux.
- Une durée et une température d'incubation autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés. L'utilisateur doit valider toute modification de ces paramètres.
- Utiliser des produits chimiques de qualité de laboratoire, tels que l'acétone, l'éthanol et l'eau, pour préparer les fixateurs et les tampons. Les utilisateurs doivent valider les performances, notamment la stabilité des réactifs préparés en laboratoire (à 1X).
- Éviter la contamination microbienne des réactifs.

Procédures de coloration :

Consignes générales :

- Amener tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Appliquer des rotations rapides ou agiter la solution d'anticorps marqué à la pHRP avant utilisation. **Ne pas passer au vortex.** Calculer la quantité de solution de travail DAB nécessaire (100 µl par tissu) et préparer une solution de travail DAB fraîche en ajoutant le ratio de 30 µl d'ihc DAB à 1,0 ml d'ihc DAB Diluent dans un tube de microcentrifugation.
- Veiller à ce que les lames ne se dessèchent pas pendant le processus de coloration pour éviter toute coloration de fond indésirable.
- Laver doucement et soigneusement les tissus pendant les étapes de lavage manuel. Éviter les jets de lavage à haute vitesse qui pourraient endommager ou sectionner les tissus délicats.
- Après chaque étape de test manuel, éliminer les liquides en excès sur les lames de tissu avec du papier absorbant. Une quantité excessive de solution résiduelle peut diluer les réactifs ultérieurs et entraîner des faux négatifs ou une coloration inégale.
- Pour les tissus caractérisés par un niveau élevé d'activité de l'oxydase (p. ex., tissus gastro-intestinaux ou rénaux), une étape supplémentaire d'inhibition par l'H₂O₂ est nécessaire afin de minimiser la coloration de fond.
- Le protocole suivant, conçu pour les tissus congelés, a été validé à des températures comprises entre 21 et 30 °C (70 et 86 °F) pour incuber ihc Blocker, l'anti-CK 8/18 marqué à la pHRP et la solution de travail DAB. Si la température de la pièce est inférieure à 21 °C, incuber l'anticorps marqué pendant une période plus longue (≥ 4 minutes selon la température). Des résultats uniformes ont été obtenus avec un chauffe-lames réglé sur 30 °C.

Coupes de tissu congelé :

- Placer les coupes de tissu congelé dans une solution de fixation immédiatement après la coupe. **Une exposition prolongée à des températures ambiantes ou de congélation peut altérer les épitopes ciblés.**

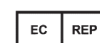
- La solution de travail DAB doit incuber entre 1 et 3 minutes. Les utilisateurs doivent déterminer la durée d'incubation optimale pour leur environnement de laboratoire. La formation d'un précipité marron doit être visible pendant l'incubation.

Durée du test estimée (protocole IHC de 10 minutes pour les coupes de tissu congelé) :

Protocole pour tissus congelés	Durée en minutes
Fixation, utiliser l'acétone ou le fixateur ihc Fixative	0:30-1:00
- Laver avec ihc Wash	0:15
Inhiber avec ihc Blocker	1
- Tapoter et sécher pour éliminer l'excès d'inhibiteur	---
CK 8/18 pHRP	3
ihc Wash	0:15
- Tapoter et sécher pour éliminer l'excès de tampon de lavage	---
Solution de travail DAB	1-3
ihc Wash	0:15
Contre-colorer à l'hématoxyline	0:20
ihc Wash	0:15
Déshydrater, monter le milieu et recouvrir d'une lamelle	0:45
Total	10

Tissus inclus dans la paraffine :

- Déparaffinage : laisser tremper les lames dans du xylène (3 trempages de 5 minutes chacun). Puis, effectuer des trempages de 3 minutes dans de l'éthanol à 100 %, à 95 % et à 75 %. Laver ensuite les lames à l'eau du robinet dans une cuve prévue à cet effet (2 lavages de 2 minutes chacun).
- Récupération de l'antigène : dans un bain-marie, mettre en incubation les lames dans un tampon de récupération d'antigène dans une cuve à 96 °C pendant 30 minutes, puis laisser les lames refroidir pendant 30 minutes pour les ramener à température ambiante. Rincer les lames à l'eau du robinet (2 rinçages de 2 minutes chacun).
- (Facultatif) Inhibition du tissu par l'H₂O₂ : laisser tremper les lames dans de l'H₂O₂ à 3 % dans une cuve prévue à cet effet, puis laisser reposer pendant 10 minutes. Effectuer 2 rinçages des lames à l'eau du robinet, puis 1 lavage au tampon PBS dans la cuve pendant 2 minutes.
- Appliquer 100 µl de l'inhibiteur ihc Blocker de manière à couvrir entièrement le tissu et mettre en incubation à température ambiante pendant 15 minutes. Éliminer autant que possible les résidus de l'inhibiteur ihc Blocker, mais ne pas rincer les lames au tampon PBS ou à l'eau.
- Appliquer 100 µl d'anticorps anti-CK 8/18 humaine marqué à la pHRP sur les lames de manière à recouvrir entièrement le tissu, puis mettre en incubation pendant 15 à 30 minutes à température ambiante. Rincer les lames au tampon PBS dans la cuve (3 rinçages de 2 minutes chacun). Remarque : placer les lames dans une chambre humide pour prévenir l'évaporation si des durées d'incubation plus longues sont utilisées.
- Appliquer 100 µl de solution de travail DAB de manière à recouvrir entièrement le tissu, puis mettre en incubation pendant 3 à 10 minutes à température ambiante. Rincer les lames à l'eau du robinet dans une cuve (2 rinçages de 2 minutes chacun).
- Contre-coloration : ajouter l'hématoxyline et mettre en incubation pendant 1 minute à température ambiante. Effectuer 2 rinçages à l'eau courante de 2 minutes chacun.
- Déshydratation : laisser tremper les lames dans l'ordre suivant : éthanol à 75 % pendant 3 minutes, éthanol à 95 % pendant 3 minutes, éthanol à 100 % pendant 3 minutes, puis xylène (2 trempages de 5 minutes chacun).
- Pose de la lamelle : ajouter une goutte de milieu de montage permanent sur la lame et sur la lamelle, puis recouvrir avec la lamelle.



Procédures de contrôle qualité :

Les contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patients.

Tissu de contrôle positif : les tissus de contrôle positifs recommandés pour cet anticorps sont des tissus de cancer du sein et d'adénocarcinome pulmonaire traités de manière adéquate. La coloration apparaît dans le cytoplasme. Un tissu de contrôle positif pour chaque ensemble de conditions de test doit être inclus dans chaque cycle de coloration.

Les tissus de contrôle positifs doivent être prélevés sur des échantillons de patients présentant de faibles niveaux caractéristiques d'une activité positive dans les cellules cibles, qui engendre une faible coloration positive. Des tissus de contrôle positifs connus doivent être utilisés uniquement pour vérifier les bonnes performances des tissus traités et des réactifs de test, et non pour contribuer à établir un diagnostic spécifique sur des échantillons de patients. Si les tissus de contrôles positifs ne montrent pas de coloration positive, les résultats obtenus avec les échantillons de patients doivent être considérés comme non valides.

Tissu de contrôle négatif : il est possible d'utiliser le même tissu pour le contrôle négatif que pour le contrôle positif. La variété des cellules présentes dans la plupart des coupes de tissu offre des sites de contrôle négatif internes, mais cela reste à vérifier par l'utilisateur. Les composants ne présentant pas de coloration témoignent en principe de l'absence de coloration spécifique et fournissent une indication sur la coloration de fond non spécifique. En cas de coloration spécifique sur les sites du tissu de contrôle négatif, les résultats obtenus avec les échantillons de patients doivent être considérés comme non valides.

Problèmes et solutions :

En cas de signal de coloration inattendu sur des tissus de contrôle ou des échantillons de patients, prendre en compte les éléments suivants :

1. Absence de coloration : en l'absence de coloration sur une lame de contrôle positif, vérifier que (1) le chromogène a été préparé correctement et la solution était fraîche, (2) les réactifs ont été utilisés dans l'ordre spécifié, (3) l'anticorps marqué à la pHRP a été effectivement ajouté, et (4) pour le tissu FFIP, le déparaffinage et la récupération de l'antigène ont été effectués de manière adéquate. Prendre les mesures correctives nécessaires, puis renouveler la procédure.
2. Faible coloration : vérifier que (1) les réactifs n'étaient pas périmés, (2) la température ambiante était inférieure à 21 °C si un chauffe-lames à 30 °C n'a pas été utilisé, (3) la solution de chromogène était fraîche, (4) un excès de solution de lavage sur la lame n'a pas dilué le réactif suivant, et (5) pour le tissu FFIP, le déparaffinage et la récupération de l'antigène ont été effectués de manière adéquate. Prendre toutes les mesures correctives nécessaires et renouveler la procédure.
3. Signal de fond important : les causes peuvent être les suivantes : (1) lavages insuffisants, (2) inhibiteur non appliqué ou délavé après application, (3) échantillons déshydratés, (4) incubation prolongée avec le chromogène, (5) incubation prolongée avec l'anticorps à la pHRP et (6) concentration élevée de peroxydase endogène dans les échantillons nécessitant une étape d'inhibition supplémentaire (se reporter à l'étape « Inhibition du tissu par l'H₂O₂ », à la rubrique « Procédures de coloration », « Tissus inclus dans la paraffine »). Prendre toutes les mesures correctives nécessaires et renouveler la procédure.
4. Les volumes de chromogène ihc DAB fournis sont fonction de la taille du kit pour une utilisation dans des conditions normales. Les matériels peuvent adhérer occasionnellement à l'opercule ou aux parois du flacon. Pour récupérer tout le produit, il peut être nécessaire de centrifuger à basse vitesse ou de tapoter le flacon avec précaution avant utilisation.

Si un signal de coloration inattendu, qui ne peut s'expliquer par la variabilité des procédures de laboratoire, est observé sur les tissus de contrôle ou sur les échantillons de patients ou en cas de suspicion de problème avec le kit DAB, contacter immédiatement le service d'assistance technique de Novodiox ou votre revendeur local. Aux États-Unis et au Canada, composer le 1 (888) 439-2716, option 2 ou le 1 (510) 342-3043, option 2.

Résultats attendus:

Précipité marron intense avec une coloration de fond nette en présence de cellules exprimant la cytokératine 8/18. Pas de précipité marron en l'absence de cellules exprimant la CK 8/18. L'interprétation du résultat de la coloration relève de

l'entière et unique responsabilité de l'utilisateur.


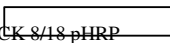

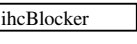

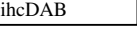

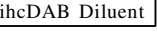

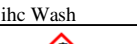






Limitations générales :

L'immunohistochimie est un processus de diagnostic multi-étapes qui requiert une formation spécialisée pour savoir choisir les réactifs appropriés, sélectionner, fixer et traiter les tissus, préparer les lames d'IHC et interpréter les résultats de la coloration. Toute erreur commise lors des étapes de fixation, congélation, décongélation, lavage, séchage, incubation ou coupe ou une contamination par d'autres tissus ou liquides peuvent engendrer des artefacts, un piégeage de l'anticorps ou des faux négatifs. Des résultats incohérents peuvent être dus à des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi qu'à des irrégularités inhérentes au tissu (Nadji M, Morales AR. 1983).

Les anticorps et réactifs fournis par le fabricant sont à la dilution optimale pour une utilisation conforme aux instructions pour l'IHC sur des coupes de tissu préparé. Tout écart par rapport aux procédures de test recommandées peut invalider les résultats attendus. Des contrôles appropriés doivent être utilisés et documentés. Les utilisateurs qui s'écartent des procédures de test recommandées doivent accepter la responsabilité de l'interprétation des résultats dans ces circonstances.

Caractéristiques de performance :

Les performances du kit de test ihcDirect Cytokeratin 8/18 Kit ont été déterminées à l'aide de coupes de tissu congelé et FFIP. Novodiox a mené des études pour évaluer les performances des conjugués d'anticorps, des réactifs fournis dans le kit et des autres consommables. Les anticorps et les systèmes se sont avérés sensibles et capables de se lier spécifiquement à l'antigène d'intérêt avec une liaison minimale, voire nulle, aux tissus ou cellules non spécifiques. Les anticorps et les kits de réactifs de Novodiox ont montré une uniformité et une reproductibilité intratest, intertests et interlots des résultats. Ces produits se sont avérés stables pendant les durées indiquées sur les étiquettes, que ce soit avec les méthodes standard en temps réel et/ou les méthodes accélérées. Pour s'assurer de la qualité de ses produits, Novodiox teste chaque lot, ainsi que les substances à intervalles réguliers et par le biais de programmes de surveillance.

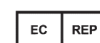
Légende des symboles			
 IVD	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>	 CK 8/18 pHRP	Conjugué d'anticorps anti-CK 8/18 marqué à la pHRP
 REF	Code produit	 ihcBlocker	Réactif inhibiteur
	Date de péremption : AAAA-MM-JJ	 ihcDAB	Réactif chromogène DAB
	Lire le mode d'emploi	 ihcDAB Diluent	Réactif DAB Diluent
 LOT	Numéro de lot	 ihc Wash	Tampon de lavage
	Permet de réaliser < n > tests		Danger pour la santé
	Limite de température		Fabricant
	Représentant européen agréé		Marquage CE

Accès aux modes d'emploi :

Pour obtenir une traduction ou la version électronique la plus récente d'un mode d'emploi, veuillez vous rendre sur notre site web à l'adresse <https://www.novodiox.com/support/literature/> (ihcDirect IFU). Vous pouvez obtenir des exemplaires imprimés d'un mode d'emploi en contactant le support technique Novodiox ou votre distributeur local.

Références :

1. Cimpean AM et al. Relevance of the immunohistochemical expression of cytokeratin 8/18 for the diagnosis and classification of breast cancer. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2008; 49(4):479-483.
2. Reisenblichler ES et al. The predicative ability of a CK5/p63/CK8/18 antibody cocktail in stratifying breast papillary lesions on needle biopsy. *Am J Clin Pathol*. 2013; 140:767-779.



3. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. New York: Pergamon Press 1981.
4. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1980.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Lab Med, 1983; 14:767-771.

