

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Calcitonin

Product Code: NCL-L-CALCITONIN

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



[EN](#) [FR](#) [IT](#) [DE](#) [ES](#) [PT](#) [SV](#) [EL](#) [DA](#) [NL](#)
[NO](#) [TR](#) [BG](#) [HU](#) [RO](#) [RU](#) [PL](#) [SL](#) [CS](#) [SK](#)

Instructions for Use

Please read before using this product.

Mode d'emploi

À lire avant d'utiliser ce produit.

Istruzioni per L'uso

Si prega di leggere, prima di usare il prodotto.

Gebrauchsanweisung

Bitte vor der Verwendung dieses Produkts lesen.

Instrucciones de Uso

Por favor, leer antes de utilizar este producto.

Instruções de Utilização

Leia estas instruções antes de utilizar este produto.

Instruktioner vid Användning

Var god läs innan ni använder produkten.

Οδηγίες Χρήσης

Παρακαλούμε διαβάστε τις οδηγίες πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν αυτό.

Brugsanvisning

Læs venligst før produktet tages i brug.

Gebruiksaanwijzing

Lezen vóór gebruik van dit product.

Bruksanvisning

Vennligst les denne før du bruker produktet.

Kullanım Talimatları

Lütfen bu ürünü kullanmadan önce okuyunuz.

Инструкции за употреба

Моля, прочетете преди употреба на този продукт.

Használati utasítás

A termék használatba vétele előtt olvassa el.

Instruțiuni de utilizare

Citiți aceste instruțiuni înainte de a utiliza produsul.

Инструкция по применению

Прочтите перед применением этого продукта.

Instrukcja obsługi

Przed użyciem tego produktu należy przeczytać instrukcję.

Navodila za uporabo

Preberite pred uporabo tega izdelka.

Návod k použití

Čtěte před použitím tohoto výrobku.

Návod na použitie

Prosím, prečítajte si ho pred použitím produktov.

Check the integrity of the packaging before use.

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

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

Vor dem Gebrauch die Verpackung auf Unversehrtheit überprüfen.

Comprobar la integridad del envase, antes de usarlo. Verifique a integridade da embalagem antes de utilizar o produto.

Kontrollera att paketet är obrutet innan användning. Ελέγξτε την ακεραιότητα της συσκευασίας πριν από τη χρήση.

Kontroller, at pakken er ubeskadiget før brug.

Controleer de verpakking vóór gebruik.

Sjekk at pakningen er intakt før bruk.

Kullanmadan önce ambalajın bozulmamış olmasını kontrol edin.

Проверете целостта на опаковката преди употреба.

Használat előtt ellenőrizze a csomagolás épségét.

Verificați integritatea ambalajului înainte de a utiliza produsul.

Перед применением убедитесь в целостности упаковки.

Przed użyciem należy sprawdzić, czy opakowanie jest szczelne.

Pred uporabo preverite celovitost embalaže.

Před použitím zkontrolujte neporušenost obalu.

Pre použitím skontrolujte, či balenie nie je porušené.

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Calcitonin

Product Code: NCL-L-CALCITONIN

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

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

Principle of Procedure

Immunohistochemical (IHC) staining techniques allow for the visualization of antigens via the sequential application of a specific antibody to the antigen (primary antibody), a secondary antibody to the primary antibody and an enzyme complex with a chromogenic substrate with interposed washing steps. The enzymatic activation of the chromogen results in a visible reaction product at the antigen site. The specimen may then be counterstained and coverslipped. Results are interpreted using a light microscope and aid in the differential diagnosis of pathophysiological processes, which may or may not be associated with a particular antigen.

Clone

CL1948

Immunogen

Prokaryotic recombinant fusion protein containing 32 amino acids corresponding to the mature human calcitonin molecule.

Specificity

Human calcitonin.

Reagent Composition

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

Ig Class

IgG2b

Total Protein Concentration

Total Protein

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

Antibody Concentration

Greater than or equal to 29 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **D. Methodology**) on paraffin sections. Enzyme Induced Epitope Retrieval (EIER). Please follow the instructions for use in Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K. Suggested dilution: 1:200 for 30 minutes at 25 °C. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

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

Storage and Stability

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

Specimen Preparation

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

Warnings and Precautions

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

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

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.† Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.

Seek medical advice.

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

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

Quality Control

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

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

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques.

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

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

Recommended positive control tissue is thyroid (C cells).

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

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody.

Recommended negative control tissue is cerebellum.

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

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

Negative Reagent Control

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

Patient Tissue

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

Results Expected

Normal Tissues

Clone CL1948 detected the calcitonin protein in the cytoplasm of C cells of the thyroid gland. Expression was also weakly detected in tubules of the kidney. (Total number of cases = 33).

Abnormal Tissues

Clone CL1948 detected the calcitonin protein in 8/40 thyroid tumors evaluated, including 8/8 medullary thyroid tumors. No staining was detected in papillary carcinoma of the thyroid (0/13), follicular carcinoma of the thyroid (0/7), adenomatous hyperplasia (0/5), follicular adenoma (0/5) or anaplastic carcinoma of the thyroid (0/2). No staining was detected in any of the 42 non-thyroid malignancies which included squamous cell carcinomas (0/10), liver tumors (0/4), ovarian tumors (0/4), colorectal tumors (0/3), lymphomas (0/3), brain tumors (0/2), breast tumors (0/2), stomach tumors (0/2), pancreatic tumors (0/2), lung tumors (0/2), unspecified metastatic tumors (0/2), kidney tumors (0/2) and prostate tumors (0/4). (Total number of cases = 82).

NCL-L-CALCITONIN is recommended for use as part of a panel of antibodies for the characterization of thyroid malignancies.

General Limitations

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

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

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

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

Bibliography – General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology*. 2000; 81:405–422.

Amendments to Previous Issue

Not applicable

Date of Issue

15 July 2019

Immunohistochemistry methodology for using Novocastra™ antibodies on paraffin-embedded tissue utilizing Enzyme Proteinase K digestion.

A. Reagents required but not supplied

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

B. Equipment required but not supplied

1. Incubator set to 25 °C.
2. General immunohistochemistry laboratory equipment.

C. Enzyme solution (see Recommendations on Use)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K.

D. Methodology

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

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

1. Cut and mount sections on slides coated with a suitable tissue adhesive.
2. De-paraffinize sections in xylene or xylene substitutes.
3. Re-hydrate through graded alcohols.
4. Wash slides in running tap water.

Pretreat the sections as follows:

5. Wash slides in deionized water.
6. Incubate in Enzyme Proteinase K at 25 °C for 5 minutes (or alternative time if this is indicated in the **Recommendations on Use**).
7. Wash in TBS.
8. Proceed with IHC protocol according to manufacturers' Instructions for Use for the primary antibody and detection system.

E. Amendments to Previous Issue

Not applicable.

F. Date of Issue

17 November 2009 (CEprotocol/Proteinase K).

Novocastra™ Anticorps Monoclonal Liquide de Souris

Calcitonin

Référence du Produit: NCL-L-CALCITONIN

Utilisation Prévue

Diagnostic in vitro.

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

Principe de la Procédure

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

Clone

CL1948

Immunogène

Protéine procaryote de fusion recombinante contenant 32 acides aminés correspondant à la molécule de calcitonine mature humaine.

Spécificité

Calcitonine humaine.

Composition du Réactif

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

Classe d'Ig

IgG2b

Concentration Totale en Protéines Total Protein

1.0–8.0 g/L. La concentration totale en protéines, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

Concentration en Anticorps

Supérieure ou égale à 29 mg/L, déterminée par la méthode ELISA. La concentration totale en Ig, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

Recommandations d'utilisation

Immunohistochimie (voir **D. Méthodologie**) sur des coupes en paraffine. Restauration de l'épitope induite par des enzymes (EIER). Veuillez respecter le mode d'emploi de Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K. Dilution préconisée : 1:200 pendant 30 minutes à 25 °C. Cette recommandation n'est donnée qu'à titre indicatif et les utilisateurs doivent déterminer leurs propres dilutions de travail optimales.

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

Conservation et Stabilité

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

Préparation des Spécimens

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

Mises en Garde et Précautions

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

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

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

Les spécimens, avant et après fixation, ainsi que toutes les matières ayant été en contact avec eux, doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et être éliminés en respectant les précautions appropriées¹. Ne jamais pipeter les réactifs avec la bouche et éviter tout contact des réactifs et des spécimens avec la peau et les membranes muqueuses. Rincer avec de grandes quantités d'eau en cas de contact des réactifs ou des spécimens avec des zones sensibles. Consulter un médecin.

Minimiser la contamination microbienne des réactifs sinon un accroissement du marquage non spécifique est susceptible de se produire. Des durées et des températures d'incubation différentes de celles qui ont été spécifiées sont susceptibles de conduire à des résultats erronés. Toutes les modifications doivent être validées par l'utilisateur.

Contrôle de Qualité

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

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

Tissu de Contrôle Positif

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

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

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

La thyroïde (cellules C) constitue le tissu de contrôle positif recommandé.

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

Tissu de Contrôle Négatif

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

Le cervelet constitue le tissu de contrôle négatif recommandé.

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

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

Réactif de Contrôle Négatif

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

Tissu du Patient

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

Résultats Attendus

Tissus normaux

Le clone CL1948 a détecté la protéine calcitonine dans le cytoplasme des cellules C de la thyroïde. L'expression a également été faiblement détectée dans les tubules du rein. (Nombre total de cas = 33).

Tissus tumoraux

Le clone CL1948 a détecté la protéine calcitonine dans 8 des 40 tumeurs de la thyroïde évaluées, dont des tumeurs médullaires de la thyroïde (8/8). Aucun marquage n'a été détecté dans les carcinomes papillaires de la thyroïde (0/13), les carcinomes folliculaires de la thyroïde (0/7), les hyperplasies adénomateuses (0/5), les adénomes folliculaires (0/5) ou les carcinomes anaplasiques de la thyroïde (0/2). Aucun marquage n'a été détecté dans 42 affections malignes non-thyroïdiennes, dont des carcinomes à cellules squameuses (0/10), des tumeurs du foie (0/4), des tumeurs ovariennes (0/4), des tumeurs colorectales (0/3), des lymphomes (0/3), des tumeurs du cerveau (0/2), des tumeurs du sein (0/2), des tumeurs de l'estomac (0/2), des tumeurs pancréatiques (0/2), des tumeurs du poumon (0/2), des tumeurs métastatiques non spécifiées (0/2), des tumeurs du rein (0/2) et des tumeurs de la prostate (0/4). (Nombre total de cas = 82).

L'utilisation du NCL-L-CALCITONIN est recommandée dans le cadre d'un panel d'anticorps lors de la caractérisation des affections malignes de la thyroïde.

Limites Générales

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

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

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

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

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

Bibliography – General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology*. 2000; 81:405–422.

Amendements Apportés à la Version Précédente

Non applicable

Date de Publication

15 juillet 2019

Méthodologie immunohistochimique d'utilisation des anticorps Novocastra™ sur les tissus inclus en paraffine à l'aide de la technique de digestion par la Enzyme Proteinase K.

A. Réactifs nécessaires mais non fournis

8. Solvants standard utilisés en immunohistochimie.
9. Tampon Tris (TBS) 50 mM, pH 7,6.
10. Solution enzymatique (voir C. **Solutions enzymatique**)
11. Diluant anticorps – Novocastra IHC Diluent RE7133.
12. Système de visualisation, Novolink Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) or RE7290–K (50 tests).
13. Milieu de montage – utiliser selon les recommandations du fabricant.

B. Équipements nécessaires mais non fournis

1. Incubateur réglé à 25 °C.
2. Équipements généraux d'un laboratoire d'immunohistochimie.

C. Solution enzymatique (voir **Recommandations d'utilisation**)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K.

D. Méthodologie

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

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

1. Couper et monter les coupes sur des lames revêtues d'un adhésif approprié aux tissus.
2. Déparaffiner les coupes dans le xylène ou des équivalents de xylène.
3. Réhydrater par l'intermédiaire d'alcool de degré décroissant.
4. Laver les lames à l'eau du robinet.

Prétraiter les coupes comme suit :

5. Laver les lames à l'eau désionisée.
6. Incuber dans la Enzyme Proteinase K à 25 °C pendant 5 minutes (ou une autre durée selon les indications des **Recommandations d'utilisation**).
7. Laver dans du TBS.
8. Mettre en oeuvre le protocole IHC conformément aux Mode d'emploi fourni par le fabricant pour l'anticorps primaire et le système de détection.

E. Amendements apportés à la version précédente

Sans objet.

F. Date de publication

17 novembre 2009 (CEprotocol/Proteinase K)

Novocastra™ Anticorpo Monoclonale Murino Liquido

Calcitonin

Codice Del Prodotto: NCL-L-CALCITONIN

Uso Previsto

Per uso diagnostico in vitro.

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

Principio Della Procedura

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

Clone

CL1948

Immunogeno

Proteina di fusione ricombinante procariotica contenente 32 aminoacidi corrispondente alla molecola di calcitonina matura umana.

Specificità

Calcitonina umana

Composizione Del Reagente

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

Classe Ig

IgG2b

Concentrazione Proteica Totale

Total Protein

1.0–8.0 g/L. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione proteica totale specifica del lotto.

Concentrazione Anticorpale

Superiore o uguale a 29 mg/L, come determinato mediante test ELISA. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione di Ig specifica del lotto.

Raccomandazioni Per L'uso

Immunostochimica (vedere **D. Metodologia**) sulle sezioni in paraffina. Smascheramento antigenico enzimatico (EIER). Si raccomanda di seguire le istruzioni per l'uso di Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K. Diluizione raccomandata: 1:200 per 30 minuti a 25 °C. Queste raccomandazioni costituiscono delle semplici linee guida; spetta al singolo utente stabilire la diluizione di lavoro ottimale. Visualizzazione. Si raccomanda di seguire le istruzioni per l'uso dei Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) o RE7290-K (50 tests).

Conservazione E Stabilità

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

Preparazione Del Campione Biologico

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

Avvertenze E Precauzioni

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

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

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

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

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

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

Controllo Qualità

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

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

Controllo Positivo Del Tessuto

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

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

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

Il tessuto raccomandato per il controllo positivo è la tiroide (cellule C).

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

Controllo Negativo Del Tessuto

Va esaminato dopo il controllo positivo, per verificare la specificità nei confronti dell'antigene bersaglio da parte dell'anticorpo primario.

Il tessuto raccomandato per il controllo negativo è il cervello.

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

La colorazione aspecifica, se presente, assume di solito aspetto diffuso. La colorazione sporadica del tessuto connettivo può anche manifestarsi in seguito ad iperfissazione di sezioni di tessuto in formalina. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, usare cellule intatte. Le cellule necrotiche o degenerate si colorano spesso in maniera aspecifica³. Si possono osservare risultati falsamente positivi, dovuti a legame non immunologico delle proteine o a prodotti di reazione del substrato. Tali falsi positivi possono essere anche causati da enzimi endogeni quali la pseudoperossidasi (eritrociti), la perossidasi endogena (citocromo C) o la biotina endogena (es. fegato, mammella, cervello, rene), a seconda del tipo di immunocolorazione usato. Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame enzimatico aspecifico dall'immunoreattività specifica, possono essere colorati ulteriori tessuti del paziente esclusivamente con substrato cromogeno o con complessi enzimatici (avidina-biotina, streptavidina, polimero marcato) e substrato cromogeno. Se nel controllo negativo del tessuto compare una colorazione specifica, i risultati sui campioni biologici ottenuti dal paziente devono essere considerati non validi.

Controllo Negativo Del Reagente

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

Tessuto Del Paziente

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

Risultati Attesi

Tessuti normali

Il clone CL1948 ha rilevato la proteina calcitonina nel citoplasma delle cellule C della ghiandola tiroidea. L'espressione è stata rilevata debolmente anche nei tubuli del rene. (Numero totale di casi = 33).

Tessuti tumorali

Il clone CL1938 ha rilevato la proteina calcitonina in 8/40 tumori della tiroide valutati inclusi 8/8 tumori midollari della tiroide. Non è stata osservata alcuna colorazione in carcinomi papillari della tiroide (0/13), carcinomi follicolari della tiroide (0/7), iperplasia adenomatosa (0/5), adenomi follicolari (0/5) o in carcinomi anaplastici della tiroide (0/2). Non è stata osservata colorazione in nessuna delle 42 affezioni maligne non tiroidee che includono carcinomi a cellule squamose (0/10), tumori del fegato (0/4), tumori ovarici (0/4), tumori coloretali (0/3), linfomi (0/3), tumori del cervello (0/2), tumori della mammella (0/2), tumori dello stomaco (0/2), tumori pancreatici (0/2), tumori del polmone (0/2), tumori metastatici non specificati (0/2), tumori del rene (0/2) e tumori della prostata (0/4). (Numero totale di casi = 82).

Si raccomanda l'uso di NCL-L-CALCITONIN come parte di un pannello anticorpale per la caratterizzazione delle affezioni maligne della tiroide.

Limitazioni Generali

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

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

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

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

adoperate.
CALCITONIN-L-CE

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

Riferimenti Bibliografici Di Base

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. Clinical Endocrinology. 2004; 61:299-310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2001; 1(4):299-305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. International Journal of Experimental Pathology. 2000; 81:405-422.

Modifiche Alla Pubblicazione Precedente

Non applicabile.

Data Di Pubblicazione

15 luglio 2019

Metodologia immunoistochimica per l'uso di anticorpi Novocastra™ su tessuto incluso in paraffina, mediante digestione con Enzyme Proteinase K.

A. Reagenti necessari ma non forniti

1. Solventi standard utilizzati in immunoistochimica.
2. Soluzione salina di tampone Tris salino (TBS) 50 mM a pH 7,6.
3. Soluzione enzimatica (vedi C. **Soluzioni enzimatica**)
4. Diluente per anticorpi – Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Sistema di visualizzazione, Novolink Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) o RE7290–K (50 tests).
6. Mezzi di montaggio – usare secondo le raccomandazioni del fabbricante.

B. Attrezzature necessarie ma non fornite

1. Incubatore impostato a 25 °C.
2. Attrezzature di base per laboratorio di immunoistochimica.

C. Soluzione enzimatica (vedi Raccomandazioni per l'uso)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K.

D. Metodologia

Prima di intraprendere questa metodologia, l'utente deve aver acquisito esperienza con le tecniche immunoistochimiche. Gli utenti devono determinare le diluizioni ottimali per gli anticorpi. Se non indicato diversamente, tutte le fasi vanno condotte a temperatura ambiente (25 °C).

1. Tagliare e montare le sezioni sui vetrini rivestiti con un adesivo tissutale adatto.
2. Deparaffinare le sezioni mediante xilene o un sostituto dello xilene.
3. Reidratare tramite passaggi in alcol a gradazione decrescente.
4. Lavare i vetrini con acqua corrente.
Pretrattare le sezioni come segue:
5. Lavare i vetrini con acqua deionizzata.
6. Incubare in Enzyme Proteinase K a 25 °C per 5 minuti (oppure per un tempo diverso, se indicato nelle **Raccomandazioni per l'uso**).
7. Lavare in TBS.
8. Procedere con il protocollo IHC, seguendo le istruzioni per l'uso del fabbricante per l'anticorpo primario e per il sistema di rilevazione.

E. Modifiche alla pubblicazione precedente

Non applicabile.

F. Data di pubblicazione

17 novembre 2009 (CEprotocol/Proteinase K).

Novocastra™ Flüssiger Maus Monoklonal–Antikörper Calcitonin Produkt–Nr.: NCL-L-CALCITONIN

Verwendungszweck

Für *in-vitro*-Diagnostik.

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

Verfahrensgrundlage

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

Klon

CL1948

Immunogen

Prokaryotisches rekombinantes Fusionsprotein mit 32 Aminosäuren, die dem reifen humanen Calcitoninmolekül entsprechen.

Spezifität

Humanes Calcitonin.

Reagenzzusammensetzung

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

Ig-Klasse

IgG2b

Gesamtproteinkonzentration Total Protein

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

Antikörperkonzentration

Größer als oder gleich 29 mg/L laut ELISA–Bestimmung. Hinsichtlich der chargenspezifischen Ig–Konzentration siehe Angaben auf dem Produktetikett.

Gebrauchsempfehlungen

Immunhistochemie (siehe **D. Vorgehensweise**) auf Paraffinschnitten. Dies ist nur eine Empfehlung, und die Benutzer sollten ihre eigenen optimalen Arbeitsverdünnungen bestimmen. Enzyminduzierte Epitopdemaskierung (EIER). Beachten Sie bitte die Gebrauchsanweisung in Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K. Empfohlene Verdünnung: 1:200 für 30 Minuten bei 25 °C. Dies ist lediglich als Vorschlag anzusehen, und die Benutzer sollten ihre eigenen optimalen Arbeitsverdünnungen bestimmen.

Visualisierung. Beachten Sie bitte die Gebrauchsanweisungen in den Novolink^{KT} Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) oder RE7290–K (50 tests).

Lagerung und Stabilität

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

Probenvorbereitung

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

Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

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

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

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

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

Die mikrobielle Verunreinigung von Reagenzien ist zu minimieren, da ansonsten eine erhöhte unspezifische Färbung auftreten kann. Falls die spezifizierten Inkubationszeiten oder –temperaturen nicht eingehalten werden, kann es zu fehlerhaften Ergebnissen kommen. Jegliche Abweichungen von den angegebenen Werten müssen vom Benutzer verifiziert werden.

Qualitätskontrolle

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

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

Positive Gewebekontrolle

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an.

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

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

Für die positive Gewebekontrolle wird die Schilddrüse (C-Zellen) empfohlen.

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

Negative Gewebekontrolle

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

Für die negative Gewebekontrolle wird Kleinhirngewebe empfohlen.

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

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

Negative Reagenzkontrolle

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

Patientengewebe

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

Erwartete Ergebnisse

Normale Gewebe

Klon CL1948 wies das Calcitoninprotein im Cytoplasma von C-Zellen der Schilddrüse nach. Außerdem wurde eine schwache Expression in den Nierentubuli nachgewiesen. (Gesamtzahl der Fälle = 33).

Tumorgewebe

Klon CL1948 wies das Calcitoninprotein in 8/40 untersuchten Schilddrüsentumoren nach, einschließlich 8/8 medullären Schilddrüsentumoren. Bei Papillenkarcinom der Schilddrüse (0/13), follikulärem Karzinom der Schilddrüse (0/7), adenomatöser Hyperplasie (0/5), follikulärem Adenom (0/5) oder anaplastischem Karzinom der Schilddrüse (0/2) wurde keine Färbung nachgewiesen. Bei keiner der 42 Nicht-Schilddrüsen-Malignitäten, wie unter anderem bei Plattenepithelkarzinomen (0/10), Lebertumoren (0/4), Ovarialtumoren (0/4), kolorektalen Tumoren (0/3), Lymphomen (0/3), Gehirntumoren (0/2), Brusttumoren (0/2), Magentumoren (0/2), Pankreastumoren (0/2), Lungentumoren (0/2), unspezifizierten metastatischen Tumoren (0/2), Nierentumoren (0/2) und Prostatatumoren (0/4) wurde eine Färbung nachgewiesen. (Gesamtzahl der Fälle = 82).

NCL-L-CALCITONIN wird als Teil eines Antikörper-Panels zur Charakterisierung von Schilddrüsentumoren empfohlen.

Allgemeine Beschränkungen

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

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

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

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

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

Literatur – Allgemein

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travaglini J et al. Medullary thyroid carcinoma. Clinical Endocrinology. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. International Journal of Experimental Pathology. 2000; 81:405–422.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Nicht zutreffend

Ausgabedatum

15 Juli 2019

Immunhistochemisches Vorgehen für den Einsatz von Novocastra™ Antikörpern bei Enzyme Proteinase K-vorbehandelten Paraffinschnitten.

A. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Reagenzien

1. In der Immunhistochemie übliche Standardlösungsmittel.
2. 50 mM Tris–gepufferte physiologische Kochsalzlösung (Tris–Buffered Saline, TBS) pH 7,6.
3. Enzymlösung (siehe C. **Enzymlösung**).
4. Antikörper–Verdünnungsmittel, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Visualisierungssystem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) oder RE7290–K (50 tests).
6. Einschlussmedium – gemäß den Empfehlungen des Herstellers zu verwenden.

B. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Ausrüstung

1. Inkubator, auf 25 °C eingestellt.
2. Übliche immunhistochemische Laborausstattung.

C. Enzymlösung (siehe **Gebrauchsempfehlungen**)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K.

D. Vorgehensweise

Vor Anwendung dieser Methodik müssen die Benutzer mit immunhistochemischen Techniken vertraut sein.

Die Benutzer sollten die optimale Verdünnung für die Antikörper bestimmen. Sofern nicht anderweitig vorgegeben, werden alle Schritte bei Raumtemperatur (25 °C) durchgeführt.

1. Das Präparat schneiden und auf Objektträger aufbringen, die mit einem geeigneten Gewebekleber beschichtet sind.
2. Schnitte mit Xylol oder Xylolersatzstoffen von Paraffin säubern.
3. Mit Alkoholgradienten rehydratisieren.
4. Die Objektträger unter laufendem Leitungswasser abspülen.
Die Schnitte wie folgt vorbehandeln:
5. Die Objektträger unter deionisiertem Wasser abspülen.
6. 5 Minuten lang bei 25 °C in Enzyme Proteinase K inkubieren (bzw. für einen anderen Zeitraum, falls dies in den **Gebrauchsempfehlungen** so festgelegt ist).
7. In TBS waschen.
8. Anschließend mit dem IHC–Protokoll gemäß den Gebrauchsanweisungen des Herstellers für den primären Antikörper und das Nachweissystem fortfahren.

E. Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Nicht zutreffend.

F. Ausgabedatum

17 November 2009 (CEprotocol/Proteinase K).

Novocastra™ Anticuerpos Monoclonal Murino Líquidos

Calcitonin

Código De Producto: NCL-L-CALCITONIN

Indicaciones De Uso

Para uso diagnóstico in vitro.

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

Principio Del Procedimiento

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

Clon

CL1948

Inmunógeno

Proteína de fusión recombinante procarciática que contiene 32 aminoácidos correspondientes a la molécula de calcitonina humana madura.

Especificidad

Calcitonina humana.

Composición Del Reactivo

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

Clase de Ig

IgG2b

Concentración Total De Proteína Total Protein

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

Concentración De Anticuerpo

Igual o superior a 29 mg/L según se ha determinado mediante ELISA. Consulte en la etiqueta del vial la concentración de Ig específica del lote.

Recomendaciones De Uso

Inmunohistoquímica (ver **D. Metodología**) con secciones de parafina. Recuperación de epítomos inducida por enzimas (EIER). Siga las instrucciones de uso de Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K. Dilución sugerida: 1:200 durante 30 minutos a 25 °C. Ésta es tan sólo una pauta y cada usuario debe determinar sus propias diluciones de trabajo óptimas.

Visualización. Por favor, siga las instrucciones de uso de Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) o RE7290–K (50 tests).

Almacenamiento Y Estabilidad

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

Preparación De Las Muestras

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

Advertencias Y Precauciones

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

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

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

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

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

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

Control De Calidad

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

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

Control Tisular Positivo

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

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

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

El tejido de control positivo recomendado es glándula tiroidea (células C).

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

Control Tisular Negativo

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

El tejido de control negativo recomendado es cerebelo.

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

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

Control De Reactivo Negativo

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

Tejido Del Paciente

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

Resultados esperados

Tejidos normales

El clon CL1948 detectó la proteína calcitonina en el citoplasma de células C de la glándula tiroidea. Se detectó también una expresión débil en los túbulos renales. (Número total de casos = 33).

Tejidos tumorales

El clon CL1948 detectó la proteína calcitonina en 8 de 40 tumores tiroideos evaluados, incluidos 8 de 8 tumores tiroideos medulares. No se detectó tinción en carcinomas papilares de la glándula tiroidea (0 de 13), carcinomas foliculares de la glándula tiroidea (0 de 7), hiperplasias adenomatosas (0 de 5), adenomas foliculares (0 de 5) ni en carcinomas anaplásicos de la glándula tiroidea (0 de 2). No se detectó tinción en ninguna de las 42 enfermedades malignas que no son de la glándula tiroidea, entre las cuales se contaban carcinomas de células escamosas (0 de 10), tumores de hígado (0 de 4), tumores de ovario (0 de 4), tumores colorrectales (0 de 3), linfomas (0 de 3), tumores cerebrales (0 de 2), tumores de mama (0 de 2), tumores de estómago (0 de 2), tumores de páncreas (0 de 2), tumores de pulmón (0 de 2), tumores metastásicos no especificados (0 de 2), tumores de riñón (0 de 2) y tumores de próstata (0 de 4). (Número total de casos = 82).

El NCL-L-CALCITONIN está recomendado para utilizarse como parte de un panel de anticuerpos en la caracterización de las enfermedades malignas de la glándula tiroidea.

Limitaciones Generales

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

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

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

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

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

Bibliografía – General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. Clinical Endocrinology. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. International Journal of Experimental Pathology. 2000; 81:405–422.

Correcciones A La Publicación Anterior

No aplicable.

Fecha De Publicación

15 de julio de 2019

Metodología inmunohistoquímica para utilizar anticuerpos Novocastra™ sobre tejido encastrado en parafina, mediante la digestión con Enzyme Proteinase K.

A. Reactivos necesarios que no se suministran

1. Disolventes estándar utilizados en inmunohistoquímica.
2. Solución salina tamponada con Tris (TBS) 50 mM pH 7,6.
3. Solución enzimática (vea C. **Solución enzimática**).
4. Diluyente para anticuerpos – Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Sistema de visualización , Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests).
6. Medio de montaje – utilizar según la recomendación del fabricante.

B. Equipo necesario, que no se suministra

1. Incubadora ajustada a 25 °C.
2. Equipo general para laboratorio de inmunohistoquímica.

C. Solución enzimática (vea las **Recomendaciones de Uso**)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K.

D. Metodología

Antes de utilizar esta metodología, los usuarios deben haber recibido formación en técnicas de inmunohistoquímica. Los Usuario deberán determinar las diluciones óptimas para los anticuerpos. A menos que se indique de otra manera, todos los pasos se efectúan a temperatura ambiente (25 °C).

1. Corte y monte las secciones sobre portaobjetos tratados con un adhesivo adecuado para tejidos.
2. Desparafine las secciones en xileno o en sustitutos del xileno.
3. Rehidrate en alcoholes de gradación decreciente.
4. Lavar los portaobjetos con agua corriente del grifo.
Pretratar las secciones como se describe a continuación:
5. Lave los portaobjetos con agua desionizada.
6. Incube en la Enzyme Proteinase K a 25 °C, durante 5 minutos (o el tiempo alternativo, si así se indica en las **Recomendaciones de Uso**).
7. Lave con TBS.
8. Proceda con el protocolo de IHC conforme a las Instrucciones de uso del fabricante para el anticuerpo primario y del sistema de detección.

E. Correcciones a la Publicación Anterior

No corresponde.

F. Fecha de Publicación

17 de noviembre de 2009 (CEprotocol/Proteinase K).

Novocastra™ Anticorpo Monoclonal Líquido de Ratinho

Calcitonin

Código Do Produto: NCL-L-CALCITONIN

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos in vitro.

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

Princípio Do Procedimento

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

Clone

CL1948

Imunogénio

Proteína de fusão recombinante procariótica contendo 32 aminoácidos que correspondem à molécula de calcitonina humana madura.

Especificidade

Calcitonina humana.

Composição Do Reagente

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

Classe De Ig

IgG2b

Concentração Total De Proteína Total Protein

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

Concentração De Anticorpo

Maior que ou igual a 29 mg/L, conforme determinado por ELISA. Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração de Ig do lote específico.

Recomendações Sobre A Utilização

Imunohistoquímica (ver **D. Metodologia**) em secções de parafina. Recuperação de epítomos induzida por enzimas (EIER). Queira seguir as instruções de utilização de Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K. Diluição sugerida: 1:200 durante 30 minutos a 25 °C. Esta recomendação serve apenas de orientação e os utilizadores devem determinar as suas diluições óptimas de trabalho.

Visualização. Queira seguir as instruções de utilização de Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) ou RE7290–K (50 tests).

Armazenamento E Estabilidade

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

Preparação Das Amostras

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

Avisos E Precauções

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

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

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

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

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

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

Controlo Da Qualidade

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

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

Controlo De Tecido Positivo

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

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

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

O tecido de controlo positivo recomendado é a tiróide (células C).

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

Controlo De Tecido Negativo

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

O controlo de tecido negativo recomendado é o cerebelo.

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

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

Controlo De Reagente Negativo

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

Tecido Do Doente

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

Resultados Previstos

Tecidos normais

O clone CL1948 detectou a proteína calcitonina no citoplasma de células C da glândula tiróide. A expressão também foi fracamente detectada em túbulos do rim. (Número total de casos = 33).

Tecidos tumorais

O clone CL1948 detectou a proteína calcitonina em 8 dos 40 tumores tireóides avaliados, incluindo 8/8 tumores medulares da tiróide. Não foi detectada nenhuma coloração em carcinomas papilares da tiróide (0/13), carcinomas foliculares da tiróide (0/7), hiperplasias adenomatosas (0/5), adenomas foliculares (0/5) ou em carcinomas anaplásicos da tiróide (0/2). Não foi detectada coloração em nenhuma das 42 neoplasias malignas não tireóideas que incluíram carcinomas de células pavimentosas (0/10), tumores hepáticos (0/4), tumores do ovário (0/4), tumores colo-rectais (0/3), linfomas (0/3), tumores do cérebro (0/2), tumores da mama (0/2), tumores do estômago (0/2), tumores pancreáticos (0/2), tumores do pulmão (0/2), tumores metastáticos não especificados (0/2), tumores renais (0/2) e tumores da próstata (0/4). (Número total de casos = 82).

Recomenda-se a utilização de NCL-L-CALCITONIN como parte de um painel de anticorpos para a caracterização de neoplasias malignas da tiróide.

Limitações Gerais

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

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

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

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

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

Bibliografia – Geral

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology*. 2000; 81:405–422.

Emendas Da Edição Anterior

Não aplicável.

Data De Emissão

15 de Julho de 2019

Metodologia de imunohistoquímica para utilização de anticorpos Novocastra™ em tecido embebido em parafina por meio de digestão com Enzyme Proteinase K.

A. Reagentes necessários mas não fornecidos

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

B. Equipamento necessário mas não fornecido

1. Incubador regulado para 25 °C.
2. Equipamento geral de laboratório de imunohistoquímica.

C. Soluções de enzima (ver as **Recomendações sobre a Utilização**)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K.

D. Metodologia

Antes de intentar esta metodologia, o utilizador deve ter recebido a devida formação em técnicas de imunohistoquímica. O **Utilizador** deve determinar quais as fórmulas de diluição óptimas para os anticorpos. A não ser que haja indicação em contrário, todas as etapas devem ser efectuadas à temperatura ambiente (25 °C).

1. Cortar e montar secções em lâminas revestidas de um adesivo tecidular apropriado.
 2. Desparafinizar as secções em xileno ou substitutos de xileno.
 3. Re-hidratar utilizando uma série decrescente de álcoois graduados.
 4. Lavar as lâminas em água corrente de torneira.
- Pré-tratar as secções da seguinte maneira:
5. Lavar as lâminas em água desionizada.
 6. Incubar em Enzyme Proteinase K a 25 °C durante 5 minutos (ou um período de tempo alternativo, caso seja indicado nas **Recomendações sobre a Utilização**).

7. Lavar em TBS.

8. Prosseguir com o protocolo IHQ em conformidade com as instruções de utilização emitidas pelo fabricante para o anticorpo primário e para o sistema de detecção.

E. Emendas da Edição Anterior

Não é aplicável.

F. Data de Emissão

17 de Novembro de 2009 (CEprotocol/Proteinase K).

Novocastra™ Flytande Monoklonal Musantikropp

Calcitonin

Produktkod: NCL-L-CALCITONIN

Avsedd Användning

För in vitro diagnostisk användning.

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

Metodens Princip

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

Klon

CL1948

Immunogen

Prokaryotiskt rekombinant fusionsprotein som innehåller 32 aminosyror som motsvarar den mogna humana kalcitoninmolekylen

Specifitet

Humant kalcitonin.

Reagensinnehåll

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

Ig-klass

IgG2b

Total Proteinkoncentration Total Protein

1.0–8.0 g/L. Se flaskans etikett för total specifik proteinkoncentration för satsen.

Antikropps-koncentration

Större än eller lika med 29 mg/L fastställt genom ELISA. Se flaskans etikett för specifik Ig-koncentration för satsen.

Rekommendationer Vid Användning

Immunhistokemi (se **D. Metodologi**) på paraffinsnitt. Enzyminducerad epitopätavringning (EIER). Vänligen följ instruktionerna för användning i Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K. Föreslagen spädning: 1:200 i 30 minuter vid 25 °C. Detta är endast en riktlinje och användare bör själva fastställa den optimala bruksspädningen. Visualisering. Vänligen följ instruktionerna för användning i Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) eller RE7290-K (50 tests).

Förvaring Och Stabilitet

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

Preparation Av Prov

Rekommenderat fixeringsmedel för paraffinbäddade vävnadssnitt är 10% neutralbuffrat formalin.

Varningar Och Försiktighetsåtgärder

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

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

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

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

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

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

Kvalitetskontroll

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

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

Positiv Vävnadskontroll

Används för att ange korrekt förberedda vävnader och rätt färgningstekniker.

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

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

Sköldkörteln (C-celler) rekommenderas som positiv kontrollvävnad.

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

Negativ Vävnadskontroll

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

Lillhjärnan rekommenderades som negativ kontrollvävnad.

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

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

Negativ Reagenskontroll

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

Patientvävnad

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

Förväntade Resultat

Normal vävnad

Klon CL1948 upptäckte kalcitoninproteinet i cytoplasmat hos C-celler i sköldkörteln. Ett svagt uttryck upptäcktes också i njurkanaler. (Totalt antal fall = 33).

Tumörvävnader

Klon CL1948 upptäckte kalcitoninproteinet i 8/40 sköldkörteltumörer som utvärderades, inklusive 8/8 medullära sköldkörteltumörer. Ingen färgning upptäcktes i papillära sköldkörtelkarcinom (0/13), follikulära sköldkörtelkarcinom (0/7), adenomatös hyperplasi (0/5), follikulära adenom (0/5) eller anaplastiska sköldkörtelkarcinom (0/2). Ingen färgning upptäcktes i någon av de 42 icke-tyroidea maligniteter som inkluderade skvamösa cellkarcinom (0/10), levertumörer (0/4), äggstockstumörer (0/4), kolorektala tumörer (0/3), lymfom (0/3), hjärttumörer (0/2), brösttumörer (0/2), magsäckstumörer (0/2), tumörer i bukspottskörtel (0/2), lungtumörer (0/2), ospecificerade metastatiska tumörer (0/2), njurtumörer (0/2) och prostatatumörer (0/4). (Totalt antal fall = 82).

NCL-L-CALCITONIN rekommenderas för användning som en del av en antikroppspanel vid karakterisering av tyroidea maligniteter.

Allmänna Begränsningar

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

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

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

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

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

Bibliografi – Allmän

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and its pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. Clinical Endocrinology. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. International Journal of Experimental Pathology. 2000; 81:405–422.

Rättelser Av Tidigare Utgivning

Gäller inte

Utgivningsdatum

15 juli 2019

Immunhistokemisk metodologi för användning av Novocastra™ antikroppar på paraffinbäddad vävnad som förbehandlas genom spjälkning med Enzyme Proteinase K.

A. Reagens som krävs men ej tillhandahålls

1. Standard lösningar som används inom immunhistokemi.
2. 50mM Trisbuffrad saltlösning (TBS) pH 7,6.
3. Enzymlösning (se C. Enzymlösning).
4. Antikroppsutspädningsmedel – Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Visualiseringssystem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) or RE7290–K (50 tests).
6. Monteringsmedel – används enligt tillverkarens rekommendationer.

B. Utrustning som krävs men ej tillhandahålls

1. Inkubator inställd på 25 °C.
2. Allmän immunhistokemisk laboratorieutrustning.

C. Enzymlösning (se Rekommendationer vid användning)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K.

D. Metodologi

Innan denna metodologi tillämpas måste användare utbildas i immunhistokemiska tekniker.

Användare bör fastställa optimal spädning för antikroppar. Alla steg utförs vid rumstemperatur (25°C) om inget annat anges.

1. Skär och montera snitten på objektglas belagda med lämpligt vävnadsklister.
 2. Avparaffinera snitten i xylen eller xylenersättningsmedel.
 3. Återhydratisera genom en fallande alkoholgradient.
 4. Tvätta objektglasen under rinnande kranvatten.
- Förbehandla snitten enligt följande:
5. Tvätta objektglasen under avjoniserat vatten.
 6. Inkubera i Enzyme Proteinase K vid 25 °C i 5 minuter (eller annan tid om det anges i **Rekommendationer vid användning**).
 7. Tvätta i TBS.
 8. Fortsätt med IHC-protokoll enligt tillverkarens instruktioner för användning av primär antikropp och detektionssystem.

Rättelser av tidigare utgivning

Gäller ej

Utgivningsdatum

17 november 2009 (CEprotokoll/Proteinase K).

Novocastra™ Υγρό Μονοκλωνικό Αντίσωμα Ποντικού Calcitonin Κωδικός είδους: NCL-L-CALCITONIN

Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

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

Αρχή Της Διαδικασίας

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

Κλώνος

CL1948

Ανοσογόνο

Προκαρμιακή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη τήξης που περιέχει 32 αμινοξέα που αντιστοιχούν στο μόριο της ώριμης ανθρώπινης καλσιτονίνης.

Ειδικότητα

Ανθρώπινη καλσιτονίνη

Σύνθεση Αντιδραστηρίου

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

Τάξη Ig

IgG2b

Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης

Total Protein

1.0–8.0 g/L. Για την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

Συγκέντρωση Αντισώματος

Μεγαλύτερη ή ίση με 29 mg/L, όπως προσδιορίζεται με ELISA. Για τη συγκέντρωση Ig που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

Συστάσεις Για Τη Χρήση

Ανοσοϊστοχημία (δείτε την ενότητα “**Δ. Μεθοδολογία**”) σε τομές παραφίνης. Ενζυμικά επαγόμενη ανάκτηση επιτόπου (EIER). Παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης στο Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K. Πρωτεϊνόμενη αραίωση: 1:200 επί 30 λεπτά στους 25 °C. Αυτό παρέχεται ως οδηγός και οι χρήστες θα πρέπει να προσδιορίζουν τις δικές τους βέλτιστες αραιώσεις εργασίας.

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

Φύλαξη Και Σταθερότητα

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

Παρασκευή Δείγματος

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

Προειδοποιήσεις Και Προφυλάξεις

Το αντιδραστήριο αυτό έχει παρασκευαστεί από το υπερκείμενο κυτταροκαλλιέργειας. Επειδή είναι βιολογικό προϊόν, θα πρέπει να δίνεται εύλογη προσοχή κατά το χειρισμό του.

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

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

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

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

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

Ποιοτικός Έλεγχος

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

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

Θετικός Μάρτυρας Ιστού

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

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

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

Ο συστατώμενος ιστός θετικού μάρτυρα είναι ο θυρεοειδής (κύτταρα C).

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

Αρνητικός Μάρτυρας Ιστού

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

Ο συστατώμενος ιστός αρνητικού μάρτυρα είναι η παρεγκεφαλίδα.

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

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

Αρνητικός Μάρτυρας Αντιδραστηρίου

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

Ιστός Ασθενούς

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

Αναμενόμενα Αποτελέσματα

Φυσιολογικοί Ιστοί

Ο κλώνος CL1948 ανίχνευσε την πρωτεΐνη καλσιτονίνη στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων C του θυρεοειδούς αδένος. Η έκφραση ανιχνεύτηκε επίσης ασθενώς σε νεφρικά σωληνάρια. (Συνολικός αριθμός περιπτώσεων = 33).

Καρκινικοί Ιστοί

Ο κλώνος CL1948 ανίχνευσε την πρωτεΐνη καλσιτονίνη σε 8/40 όγκους του θυρεοειδούς που αξιολογήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων 8/8 μυελοειδείς όγκους του θυρεοειδούς. Δεν ανιχνεύτηκε χρώση στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (0/13), το θυλακικό/θες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (0/7), την αδενωματώδη υπερπλασία (0/5), το θυλακικό/θες αδένωμα (0/5) ή το αναπλαστικό καρκίνωμα του θυρεοειδούς (0/2). Δεν ανιχνεύτηκε χρώση σε οποιαδήποτε από τις 42 μη θυρεοειδικές κακοήθειες, οι οποίες συμπεριλάμβαναν καρκινώματα εκ πλάκων κυττάρων (0/10), ηπατικούς όγκους (0/4), ωθητικούς όγκους (0/4), όγκους στο στήθος και το κόλον (0/3), λεμφώματα (0/3), όγκους εγκέφαλου (0/2), όγκους μαστού (0/2), όγκους στομάχου (0/2), παγκρεατικούς όγκους (0/2), πνευμονικούς όγκους (0/2), απροσδιόριστους μεταστατικούς όγκους (0/2), νεφρικούς όγκους (0/2) και όγκους προστάτη (0/4). (Συνολικός αριθμός περιπτώσεων = 82).

Το NCL-L-CALCITONIN συνιστάται για χρήση ως μέρος μιας σειράς αντισωμάτων για το χαρακτηρισμό κακοηθών του θυρεοειδή.

Γενικοί Περιορισμοί

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

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

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

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

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

Βιβλιογραφία – Γενική

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. Clinical Endocrinology. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. International Journal of Experimental Pathology. 2000; 81:405–422.

Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή

Ημερομηνία Έκδοσης

15 Ιουλίου 2019

Μεθοδολογία ανοσοϊστοχημείας για χρήση αντισωμάτων Novocastra™ σε ιστό εγκλεισμένο σε παραφίνη με χρήση πέψης Enzyme Proteinase K.

A. Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

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

B. Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

1. Θάλαμος επώασης ρυθμισμένος στους 25 °C.
2. Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός ανοσοϊστοχημείας.

Γ. Ενζυμικό διάλυμα (δείτε την ενότητα "Συστάσεις για τη χρήση")

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K.

Δ. Μεθοδολογία

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

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

1. Κόψτε και στερεώστε τις τομές σε αντικειμενοφόρους πλάκες επιστρωμένες με κατάλληλο μέσο συγκόλλησης ιστών.
2. Αφαιρέστε την παραφίνη από τις τομές σε ξυλένιο ή υποκατάστατα ξυλενίου.
3. Επανυδατώστε μέσω κατιούσας σειράς αλκοολών.
4. Πλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε τρεχούμενο νερό βρύσης. Υποβάλλετε σε προεπεξεργασία τις τομές ως εξής:
5. Πλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε απιονισμένο νερό.
6. Επώαστε σε Enzyme Proteinase K στους 25 °C επί 5 λεπτά (ή για εναλλακτικό χρονικό διάστημα, εάν αυτό υποδεικνύεται στην ενότητα "Συστάσεις για τη χρήση").
7. Πλύνετε σε TBS.
8. Προχωρήστε με το πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας (IHC) σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης των κατασκευαστών για το πρωτοταγές αντίσωμα και το σύστημα ανίχνευσης.

E. Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

Στ. Ημερομηνία έκδοσης

17 Νοεμβρίου 2009 (CEprotocol/Proteinase K).

Novocastra™ Væskeformigt Monoklonalt Museantistof Calcitonin

Produktkode: NCL-L-CALCITONIN

Tilsigtede Anvendelse

Til in vitro diagnostisk anvendelse.

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

Procedureprincip

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

Klon

CL1948

Immunogen

Prokaryot rekombinant fusionsprotein indeholdende 32 aminosyrer svarende til det mature, humane calcitoninmolekule.

Specificitet

Human calcitonin.

Reagenssammensætning

NCL-L-CALCITONIN er en flydende væskultursupernatant indeholdende 15 mM natriumazid som konserveringsmiddel.

Ig-klasse

IgG2b

Totalproteinkoncentration

Total Protein

1.0–8.0 g/L. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik totalproteinkoncentration.

Antistofkoncentration

Større end eller lig med 29 mg/L som bestemt ved ELISA. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik Ig-koncentration.

Anbefalinger Vedrørende Anvendelse

Immunhistokemi (se **D. Metodologi**) på paraffinsnit. Enzymeinduceret epitopgenfinding (EIER). Følg venligst vejledningen i Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K. Foreslået fortynding: 1:200 i 30 minutter ved 25 °C. Disse retningslinier er vejledende, og brugeren bør selv bestemme egne optimale brugsopløsninger.

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

Opbevaring Og Holdbarhed

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

Prøveklargøring

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

Advarsler Og Forholdsregler

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

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

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

Prøver skal før og efter fiksering, lige som alle materialer eksponeret mod prøverne, håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under iagttagelse af passende forholdsregler¹. Pipetter aldrig reagenser med munden og undgå, at reagenser og prøver kommer i kontakt med huden eller slimhinder. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skal der skylles efter med rigelige mængder vand. Søg læge.

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

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

Kvalitetskontrol

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

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

Positiv Vævskontrol

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

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

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

Anbefalet positivt kontrolvæv er thyroidea (C-celler).

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

Negativ Vævskontrol

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

Anbefalet negativt kontrolvæv er cerebellum.

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

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

Negativ Reagenskontrol

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

Patientvæv

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

Forventede Resultater

Normalt væv

Klon CL1948 påviste calcitoninproteinet i cytoplasmaet af skjoldbruskkirtlens C-celler. Ekspressionen blev ligeledes svagt påvist i nyrens tubuli. (Antal tilfælde i alt = 33).

Tumorvæv

Klon CL1948 påviste calcitoninproteinet i 8/40 evaluerede thyroideatumorer inklusive 8/8 medullære thyroideatumorer. Der blev ikke påvist farvning i papillære thyroideacarcinomer (0/13), follikulære thyroideacarcinomer (0/7), adenomatøs hyperplasi (0/5), follikulære adenomer (0/5) eller anaplastiske thyroideacarcinomer (0/2). Der blev ikke påvist farvning nogen af de 42 ikke-thyroideamaligniteter, der inkluderede pladecellecarcinomer (0/10), levertumorer (0/4), ovarietumorer (0/4), colorektale tumorer (0/3), lymfomer (0/3), hjernetumorer (0/2), brysttumorer (0/2), mavetumorer (0/2), pankreastumorer (0/2), lungetumorer (0/2), uspecificerede metastaserende tumorer (0/2), nyretumorer (0/2) og prostatatumorer (0/4). (Antal tilfælde i alt = 82).

NCL-L-CALCITONIN anbefales anvendt som ét ud af et panel af antistoffer til karakterisering af thyroide maligniteter.

Generelle Begrænsninger

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

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

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

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

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

Udgivelsesdato

November 2009 (NCL–L–CALCITONIN/CE/UK)Bibliografi – Generelt

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology*. 2000; 81:405–422.

Rettelser Til Tidligere Udgave

Ingen rettelser.

Udgivelsesdato

15 juli 2019

Metodik for immunohistokemi ved anvendelse af Novocastra™ antistoffer på paraffinindstøbte væv vha Enzyme Proteinase K.

A. Nødvendige reagenser, som ikke er inkluderet

1. Standard opløsningsmidler, der anvendes i immunohistokemi.
2. 50 mm Tris-bufferet saltvand (TBS) pH 7,6.
3. Enzymopløsning – (se C. **Enzymopløsning**).
4. Antistofopløsningsmiddel – Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Visualiseringssystem, Novolink® Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) or RE7290-K (50 tests).
6. Monteringsmedium – anvendes ifølge producentens anbefalinger.

B. Nødvendigt udstyr, som ikke er inkluderet

1. Inkubator, der sættes til 25 °C.
2. Almindeligt laboratorieudstyr til immunohistokemi.

C. Enzymopløsning (se Anbefalinger vedr. anvendelse)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K.

D. Metodik

Før denne metodik tages i brug, skal brugere være oplært i immunohistokemiteknikker.

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

1. Snittene skæres og monteres på objektglas coatet med en passende vævsadhæsiv.
2. Snittene deparaffineres i xylol og xylensurrogater.
3. Rehydreres med en faldende alkoholgradient.
4. Objektglassene vaskes under rindende vand fra hanen.

Snittene forbehandles på følgende måde:

5. Objektglassene vaskes i deioniseret vand.
6. Inkuberes i Enzyme Proteinase K ved 25 °C i 5 minutter (eller andet tidsrum, hvis det står anført i **Anbefalinger vedr. anvendelse**).
7. Vask i TBS.
8. Fortsæt ved IHC-protokollen i henhold til producentens Brugsanvisning for det primære antistof og detekteringsystemet.

E. Rettelser til tidligere udgave

Ingen rettelser.

F. Udgivelsesdato

17 november 2009 (CEprotocol/Proteinase K).

Novocastra™ vloeibaar monoklonaal muisantilichaam Calcitonin

Productcode: NCL-L-CALCITONIN

Beoogd gebruik

Voor diagnostisch gebruik *in vitro*.

NCL-L-CALCITONIN is bedoeld voor de kwalitatieve identificatie van calcitonine-moleculen in paraffinecoupes door middel van lichtmicroscopie.

De klinische interpretatie van elke kleuring of het ontbreken hiervan moet worden aangevuld door morfologische studies met de juiste controles en moet binnen de context van de klinische voorgeschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests worden geëvalueerd door een bevoegd patholoog.

Principe van de procedure

Immunohistochemische (IHC) kleuringstechnieken maken het mogelijk om antigenen te visualiseren via de sequentiële toepassing van een specifiek antilichaam op het antigeen (primaair antilichaam), een secundair antilichaam op het primaire antilichaam en een enzymcomplex met een chromogeen substraat met ingevoegde wasstappen. De enzymatische activering van het chromogeen resulteert in een zichtbaar reactieproduct op de antigeenplaats.

Het monster kan dan worden tegengekleurd en met een dekglasje worden bedekt. De resultaten worden geïnterpreteerd met behulp van een lichtmicroscop en helpen bij de differentiële diagnose van pathofysiologische processen, die al dan niet met een bepaald antigeen kunnen worden geassocieerd.

Kloon

CL1948

Immunogeen

Prokaryotisch recombinant fusie-eiwit bevat 32 aminozuren die overeenkomen met het rijpe humane calcitonine-molecule.

Specificiteit

Humaan calcitonine.

Reagensamenstelling

NCL-L-CALCITONIN is een vloeibaar supernatant van weefselweek dat 15 mM natriumazide bevat als conserveringsmiddel.

Ig-klasse

IgG2b

Totale eiwitconcentratie

Total Protein

1,0–8,0 g/l. Zie het etiket van de flacon voor de totale eiwitconcentratie van de partij.

Antilichaamconcentratie

Groter dan of gelijk aan 29 mg/l zoals bepaald door ELISA. Zie het flaconlabel voor specifieke Ig-concentratie van de partij.

Aanbevelingen voor het gebruik

Immunohistochemie (zie **D. Methodologie**) op paraffinecoupes. Door enzymen geïnduceerd epitoopherstel (EIER: Enzyme Induced Epitope Retrieval): Volg de aanwijzingen voor gebruik in Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K. Voorgestelde verdunning: 1:200 gedurende 30 minuten bij 25 °C.

Dit is een richtsnoer en gebruikers moeten zelf de voor hen optimale werkverdunding bepalen.

Visualisatie. Volg de instructies voor gebruik in de Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) of RE7290–K (50 tests).

Opslag en stabiliteit

Bewaren bij 2–8 °C. Niet invriezen. Direct na gebruik weer bij 2–8 °C opslaan. Niet gebruiken na de vervaldatum die op het etiket van de flacon staat. Andere dan de hierboven genoemde opslagcondities moeten door de gebruiker worden geverifieerd.

Specimenpreparatie

Het aanbevolen fixeremiddel is 10% neutraal gebufferde formaline voor in paraffine ingebedde weefselcoupes.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Dit reagens is bereid uit het supernatant van celweek. Aangezien dit een biologisch product is, moet redelijke voorzichtigheid worden betracht bij het hanteren ervan.

De molariteit van natriumazide in dit reagens is 15 mM. Er is op verzoek een veiligheidsinformatieblad (VIB) beschikbaar voor natriumazide.

Raadpleeg de nationale, regionale en plaatselijke voorschriften voor het afvoeren van potentieel giftige componenten.

Specimens, zowel voor als na de fixatie, en alle materialen die eraan worden blootgesteld, moeten worden behandeld als potentiële overdragers van infecties en met inachtneming van de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd.¹ Pipetteer reagentia nooit met de mond en vermijd dat de huid en slijmvliezen in aanraking komen met reagentia en specimens. Indien reagentia of monsters in aanraking komen met gevoelige gebieden, moet u deze wassen met een overvloedige hoeveelheid water.

Raadpleeg een arts.

Minimaliseer de kans op microbiële contaminatie van reagentia omdat hierdoor de niet-specifieke kleuring kan toenemen.

Andere incubatietijden of temperaturen dan hierin vermeld, kunnen onjuiste resultaten opleveren. Dergelijke wijzigingen moeten door de gebruiker worden gevalideerd.

Kwaliteitscontrole

Verschillen in weefselbewerking en technische procedures in het laboratorium van de gebruiker kunnen tot aanzienlijke variabiliteit in de resultaten leiden, waardoor het nodig is om regelmatig interne controles uit te voeren als aanvulling op de volgende procedures. Controles zijn verse autopsie-/biopsie-/chirurgische specimens die zo snel mogelijk en op dezelfde manier als het monster of de monsters van de patiënt zijn gefixeerd in formaline, bewerkt en ingebed in paraffinewas.

Positieve weefselcontrole

Wordt gebruikt om aan te geven dat weefsels correct geprepareerd zijn en dat passende kleuringstechnieken zijn gebruikt.

Voor elke set testvoorwaarden in elke kleuringrun moet één positieve weefselcontrole worden opgenomen.

Voor optimale kwaliteitscontrole en detectie van lichte degeneratie van het reagens is een weefsel met zwakke positieve kleuring meer geschikt dan een weefsel met sterke positieve kleuring.²

Aanbevolen positief controleweefsel is schildklier (C-cellen).

Als de positieve weefselcontrole geen positieve kleuring vertoont, moeten de resultaten die met testmonsters zijn verkregen als ongeldig worden beschouwd.

Negatieve weefselcontrole

De negatieve weefselcontrole moet na de positieve weefselcontrole worden onderzocht om de specificiteit van de labeling van het doelantigeen door het primaire antilichaam te verifiëren.

Aanbevolen negatief controleweefsel is cerebellum.

Aan de andere kant levert de verscheidenheid aan diverse celtypen die in de meeste weefselcoupes aanwezig zijn, vaak negatieve controlelocaties op, maar dit moet wel worden geverifieerd door de gebruiker.

Niet-specifieke kleuring, indien aanwezig, ziet er doorgaans diffuus uit. Een sporadische kleuring van bindweefsel kan ook worden waargenomen in coupes van overmatig in formaline gefixeerde weefsels. Gebruik intacte cellen voor het interpreteren van kleuringresultaten. Necrotische of gedegenererde cellen kleuren vaak niet-specifiek.³ Fout-positieve resultaten kunnen optreden als gevolg van niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten. Ze kunnen ook worden veroorzaakt door endogene enzymen zoals pseudoperoxidase (erythrocyten), endogene peroxidase (cytochroom c) of endogeen biotine (bv. lever, borst, hersenen, nier), afhankelijk van het gebruikte type immunokleuring. Om activiteit van endogene enzymen of niet-specifieke binding van enzymen te onderscheiden van specifieke immunoreactiviteit, kunnen aanvullende patiëntweefsels worden gekleurd met respectievelijk uitsluitend substraatchromogeen of enzymcomplexen (avidine-biotine, streptavidine, gelabeld polymeer) en substraatchromogeen. Als er specifieke kleuring optreedt in de negatieve weefselcontrole, moeten resultaten met de patiëntmonsters als ongeldig worden beschouwd.

Negatieve reagenscontrole

Gebruik een niet-specifieke negatieve reagenscontrole van het primaire antilichaam met een coupe van elk patiëntspecimen om niet-specifieke kleuring te evalueren en specifieke kleuring op de antigeenlocatie beter te kunnen interpreteren.

Patiëntweefsel

Onderzoek de patiëntmonsters die met NCL-L-CALCITONIN zijn gekleurd als laatste. De intensiteit van de positieve kleuring moet worden geëvalueerd binnen de context van niet-specifieke achtergrondkleuring van de negatieve reagenscontrole. Zoals bij elke immunohistochemische test betekent een negatief resultaat dat het antigeen niet is gedetecteerd. Het betekent niet dat het antigeen afwezig was in de onderzochte cellen of het onderzochte weefsel. Gebruik zo nodig een panel antilichamen om fout-negatieve reacties te identificeren.

Verwachte resultaten

Normale weefsels

Kloon CL1948 detecteerde het calcitonine-eiwit in het cytoplasma van C-cellen van de schildklier. Expressie werd ook zwak gedetecteerd in nierbuisjes. (Totaal aantal gevallen = 33).

Abnormale weefsels

Kloon CL1948 detecteerde het calcitonine-eiwit in 8/40 geëvalueerde schildkliertumoren, inclusief 8/8 medullaire schildkliertumoren. Er werd geen kleuring gedetecteerd in papillair carcinoom van de schildklier (0/13), folliculair carcinoom van de schildklier (0/7), adenomateuze hyperplasie (0/5), folliculair adenoom (0/5) of anaplastisch carcinoom van de schildklier (0/2). Er werd geen kleuring gedetecteerd in enige van de 42 niet-schildkliermaligniteiten, inclusief plaveiselcarcinomen (0/10), levertumoren (0/4), eierstoktumoren (0/4), colorectale tumoren (0/3), lymfomen (0/3), hersentumoren (0/2), borsttumoren (0/2), maagtumoren (0/2), pancreastumoren (0/2), longtumoren (0/2), niet-gespecificeerde metastatische tumoren (0/2), niertumoren (0/2) en prostaattumoren (0/4). (Totaal aantal gevallen = 82).

NCL-L-CALCITONIN wordt aanbevolen voor gebruik als onderdeel van een panel antilichamen bij de identificatie van schildklier-maligniteiten.

Algemene beperkingen

Immunohistochemie (IHC) is een diagnostisch meerstapsproces waarvoor een gespecialiseerde opleiding nodig is in het kiezen van de juiste reagentia, het selecteren, fixeren en bewerken van weefsel, het prepareren van IHC-objectglasjes en het interpreteren van de kleuringresultaten.

Weefselkleuring is afhankelijk van de manier waarop het weefsel vóór de kleuring wordt behandeld en bewerkt. Verkeerd fixeren, invriezen, ontdoeien, wassen, drogen, verwarmen, snijden of contaminatie met andere weefsels of vloeistoffen kan tot artefacten, insluiting van antilichamen of fout-negatieve resultaten leiden. Inconsistente resultaten kunnen te wijten zijn aan variaties in de fixatie- en inbeddingsmethodes, of aan intrinsieke onregelmatigheden in het weefsel.⁴

Een te sterke of onvolledige tegenkleuring kan een juiste interpretatie van de resultaten bemoeilijken of onmogelijk maken.

De klinische interpretatie van een kleuring of de afwezigheid hiervan moet worden aangevuld met morfologische studies en de juiste controles. Ook moeten er evaluaties worden uitgevoerd binnen de context van de klinische voorgeschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests uitgevoerd door een bevoegd patholoog.

Antilichamen van Leica Biosystems Newcastle Ltd zijn bedoeld voor gebruik, zoals aangegeven, op bevroren of in paraffine ingebedde coupes die een specifieke fixatie vereisen. Er kan onverwachte antigenexpressie optreden, met name bij neoplasmata. De klinische interpretatie van gekleurde weefselcoupes moet een morfologische analyse en de evaluatie van overeenkomstige controles bevatten.

Literatuurlijst – algemeen

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology*. 2000; 81:405–422.

Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave

Niet van toepassing

Datum uitgave

15 juli 2019

Immunohistochemische methodologie voor het gebruik van Novocastra™ antilichamen bij in paraffine ingebed weefsel met gebruik van Enzyme Proteinase K-vertering.

A. Benodigde, maar niet inbegrepen reagentia

1. Standaard oplosmiddelen gebruikt in de immunohistochemie.
2. 50 mM Tris-gebufferde zoutoplossing (TBS), pH 7,6.
3. Enzyme-oplossing (zie C. **Enzymoplossing**).
4. Antilichaam-verdunningsmiddel, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Visualisatiesysteem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) of RE7290-K (50 tests).
6. Insluitmiddel - gebruiken volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

B. Benodigde, maar niet inbegrepen apparatuur

1. Incubator ingesteld op 25 °C.
2. Algemene immunohistochemische laboratoriumuitrusting.

C. Enzymhersteloplossingen (zie Aanbevelingen voor het gebruik)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K.

D. Methodologie

Gebruikers moeten vóór het ondernemen van deze methodologie worden opgeleid in immunohistochemische technieken.

Gebruikers moeten de optimale verdunning voor antilichamen bepalen. Tenzij anders vermeld worden alle stappen uitgevoerd bij kamertemperatuur (25 °C).

1. Snij coupes en breng ze aan op objectglasjes waarop een geschikt weefselhechtmiddel is aangebracht.
2. Verwijder de paraffine uit de coupes met xyleen of een xyleensubstituut.
3. Re-hydrateer met alcohol van aflopende sterkte.
4. Spoel de objectglasjes onder stromend leidingwater.
Voer de volgende voorbehandeling van de coupes uit:
5. Spoel de objectglasjes in gedeïoniseerd water.
6. Incubeer op 25 °C gedurende 5 minuten in Enzyme Proteinase K (of een andere duur indien dit is aangegeven in de **Aanbevelingen voor het gebruik**).
7. Was in TBS-bufferoplossing.
8. Ga door met IHC-protocol voor het primaire antilichaam- en detectiesysteem volgens de gebruiksaanwijzing van de fabrikant.

E. Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave

Niet van toepassing.

F. Datum uitgave

17 November 2009 (CEprotocol/Proteinase K).

Novocastra™ Flytende murint monoklonalt antistoff Calcitonin

Produktkode: NCL-L-CALCITONIN

Tiltenkt bruk

Til in vitro-diagnostisk bruk.

NCL-L-CALCITONIN skal brukes til kvalitativ identifikasjon av kalsitoninmolekyl i parafinsnitt ved lysmikroskopi. Den kliniske tolkningen av en farging eller uteblitt farging skal suppleres av morfologiske studier ved bruk av riktige kontroller og skal evalueres av en kvalifisert patolog innenfor sammenhengen av pasientens sykehistorie og andre diagnostiske tester.

Prinsipp for prosedyren

Teknikker for immunhistokjemisk (IHC) farging muliggjør visualisering av antigener via sekvensiell applikasjon av et spesifikt antistoff på antigenet (primært antistoff), et sekundært antistoff på det primære antistoffet og et enzymkompleks med et kromogensubstrat med mellomliggende vasketrinn. Den enzymatiske aktiveringen av kromogenet resulterer i et synlig reaksjonsprodukt på antigenstedet. Prøven kan deretter kontrastfarges og påføres dekkglass. Resultatene tolkes ved hjelp av et lysmikroskop og bidrar til differensialdiagnosen for patofysiologiske prosesser, som kan være tilknyttet et spesielt antigen eller ikke.

Klon

CL1948

Immunogen

Prokaryotisk rekombinant fusjonsprotein som inneholder 32 aminosyrer som svarer til modent humant kalsitoninmolekyl.

Spesifisitet

Humant kalsitonin.

Reagenssammensetning

NCL-L-CALCITONIN er flytende vevskultur supernatant med 15 mM natriumazid som et konserveringsmiddel.

Ig-klasse

IgG2b

Total proteinkonsentrasjon Total Protein

1,0–8,0 g/l. Se etiketten på hetteglasset for partispesifikk totalproteinkonsentrasjon.

Antistoffkonsentrasjon

Større enn eller lik 29 mg/l som fastslått av ELISA. Se etiketten på hetteglasset for batchspesifikk Ig-konsentrasjon.

Anbefalinger for bruk

Immunhistokjemi (se **D. Metode**) på parafinsnitt. Enzymindusert epitopgjenfinning (EIER). Følg bruksanvisningen for Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K. Foreslått fortykning: 1:200 i 30 minutter ved 25 °C.

Delte er kun veiledende, og brukerne bør fastslå egne optimale fortykninger for sitt arbeid.

Visualisering. Følg bruksanvisningen for Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tester), RE7150-K (500 tester), RE7140-K (250 tester) eller RE7290-K (50 tester).

Oppbevaring og stabilitet

Oppbevar ved 2–8 °C. Må ikke fryses. Returner til 2–8 °C umiddelbart etter bruk. Må ikke brukes etter utløpsdatoen som er angitt på etiketten på hetteglasset. Andre oppbevaringsforhold enn de som er angitt ovenfor, må verifiseres av brukeren.

Prøveklargjøring

Anbefalt fiksativ er 10 % nøytralbufret formalin for parafininnstøpte vevsnitt.

Advarsler og forholdsregler

Delte reagenset ble fremstilt fra supernatanten fra cellekultur. Ettersom det er et biologisk produkt, må det utvises rimelig forsiktighet når det håndteres.

Molariteten av natriumazid er 15 mM. Et sikkerhetsdatablad (SDS) er tilgjengelig på forespørsel for natriumazid.

Se lokale, regionale eller statlige forskrifter for avfallshåndtering av potensielt toksiske komponenter.

Prøver, før og etter fiksering, og alle materialer som utsettes for dem, skal håndteres som smittefarlige og avhendes etter egnede forholdsregler.¹ Pipetter aldri reagenser via munnen og unngå kontakt med hud og slimhinner med reagenser og prøver. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skyl med rikelige mengder vann.

Kontakt lege.

Minimer mikrobiell kontaminering av reagenser, ellers kan det forekomme en økning i uspesifikk farging.

Andre inkuberingsstider eller temperaturer enn de som er spesifisert, kan gi feilaktige resultater. Enhver slik endring må valideres av brukeren.

Kvalitetskontroll

Forskjeller i vevprosessering og tekniske prosedyrer i brukerens laboratorium kan frembringe signifikant variasjon i resultatene og gjør det påkrevd med regelmessige interne ytelseskontroller i tillegg til følgende prosedyrer.

Kontroller skal være ferske prøver fra obduksjon/biopsi/kirurgi, som er formalinfixert, behandlet og parafinvoxsinnstøpt så snart som mulig på samme måte som pasientprøven(e).

Positivt kontrollvev

Brukes for å indikere riktig klargjorte vev og riktige fargingsteknikker.

Ett positivt kontrollvev bør inkluderes for hvert sett med testbetingelser i hver fargerunde.

Svakt positivt farget vev er mer egnet enn kraftig positivt farget vev til optimal kvalitetskontroll og påvisning av små nivåer reagensnedbrytning.²

Anbefalt positivt kontrollvev er skjoldbruskkjertel (C-celler).

Hvis den positive vevkontrollen ikke gir positiv farging, skal resultater med testprøvene betraktes som ugyldige.

Negativt kontrollvev

Skal undersøkes etter det positive kontrollvevet for å verifisere spesifisiteten i merkingen av målantigenet med det primære antistoffet.

Anbefalt negativt kontrollvev er cerebellumvev.

Alternativt gir variasjonen av forskjellige celletyper som kan finnes i de fleste vevsnitt ofte rom for negativ kontroll, men dette må verifiseres av brukeren.

Uspesifikk farging, hvis dette forekommer, har vanligvis et diffus utseende. Sporadisk farging av bindevev vil også kunne observeres i vevsnett som er fiksert i for mye formalin. Bruk intakte celler til tolkning av fargingsresultater. Nekrotiske eller degenererte celler farger ofte ikke-spesifikt.³ Falske positive resultater kan sees på grunn av ikke-immunologisk binding av proteiner eller substratreaksjonsprodukter. De kan også forårsakes av endogene enzymer slik som pseudoperoksidase (erytrocytter), endogen peroksidase (cytokrom C) eller endogen biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre) avhengig av type immunfarging som brukes. For å differensiere endogen enzymaktivitet eller ikke-spesifikk binding av enzymer fra spesifikk immunreaktivitet kan ekstra pasientvev farges eksklusivt med henholdsvis substratromogen eller enzymkomplekser (avidin-biotin, streptavidin, merket polymer) og substratromogen. Hvis det forekommer spesifikk farging i de negative vevkontrollene, skal resultater med pasientprøvene betraktes som ugyldige.

Negativ reagenskontroll

Bruk en uspesifikk negativ reagenskontroll i stedet for det primære antistoffet med et snitt av hver pasientprøve for å evaluere uspesifikk farging og gi bedre mulighet for tolkning av den spesifikke fargingen på antigenstedet.

Pasientvev

Undersøk pasientprøver farget med NCL-L-CALCITONIN sist. Positiv fargingsintensitet skal vurderes i lys av eventuell ikke-spesifikk bakgrunnsfarging i den negative reagenskontrollen. På samme måte som for alle andre immunhistokjemiske tester betyr et negativt resultat at antigenet ikke ble påvist, ikke at antigenet ikke var til stede i cellene / det analyserte vevet. Om nødvendig, skal det brukes et panel med antistoffer til å identifisere falske negative reaksjoner.

Forventede resultater

Normale vev

Klone CL1948 oppdaget kalsitoninproteinet i cytoplasma fra skjoldbruskkjertelceller. Ekspressjonen ble også svakt oppdaget i nyrerør. (Totalt antall tilfeller = 33).

Unormale vev

Klone CL1948 oppdaget kalsitoninproteinet i 8/40 evaluerte skjoldbrusktumorer, inkludert 8/8 medullære skjoldbruskkjerteltumorer. Ingen flekker ble påvist i papillær karsinom i skjoldbruskkjertelen (0/13), follikulært karsinom i skjoldbruskkjertelen (0/7), adenomatøs hyperplasi (0/5), follikulær adenom (0/5) eller anaplastisk karsinom i skjoldbruskkjertelen (0/2). Ingen farging ble oppdaget i noen av de 42 ikke-skjoldbruskkjertelmalignitetene, inkludert karsinom i skvamøse celler (0/10), levertumorer (0/4), eggstokkumorer (0/4), kolorektale svulster (0/3), lymfomer (0/3), hjernesvulster (0/2), brysttumorer (0/2), magesvulster (0/2), bukspyttkjertelumorer (0/2), lungtumorer (0/2), uspesifiserte metastaserende tumorer (0/2), nyretumorer (0/2) og prostatatumorer (0/4). (Totalt antall tilfeller = 82).

NCL-L-CALCITONIN anbefales brukt som en del av et antistoffpanel for å bistå med karakterisering av svulster i skjoldbruskkjertel.

Generelle begrensninger

Immunhistokjemi er en flertrinns diagnostisk prosess som krever spesialisert opplæring i valg av egnede reagenser, valg, fiksering og behandling av vev, klargjøring av IHC-objektglass og tolkning av fargingsresultater.

Vevfargingen er avhengig av håndteringen og behandlingen av vevet før det farges. Uriktig fiksering, dypfrysing, opptining, vasking, tørking, oppvarming, snitting eller kontaminering med annet vev eller væsker kan frembringe artefakter, fanging av antistoff eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpsmetoder eller uregelmessigheter i vevet.⁴ Overdreven eller ufullstendig kontrastfarging kan hindre riktig tolkning av resultater.

Den kliniske tolkningen av en farging eller uteblitt farging skal suppleres av morfologiske studier ved bruk av riktige kontroller og skal evalueres av en kvalifisert patolog innenfor sammenhengen av pasientens sykehistorie og andre diagnostiske tester.

Antistoffer fra Leica Biosystems Newcastle Ltd er til bruk, som indisert, på enten frosne eller paraffinnestøpte snitt med spesifikke fikseringskrav. Det kan forekomme uventet antigenuttrykk, spesielt i neoplasmer. Den kliniske tolkningen av ethvert farget vevsnett må inkludere morfologisk analyse og evaluering av egnede kontroller.

Bibliografi – generell

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology*. 2000; 81:405–422.

Endringer på tidligere utgave

Ikke relevant

Utstedelsesdato

15 juli 2019

Immunohistokjemimetodikk for bruk av Novocastra™-antistoffer på paraffinnstøpt vev med enzymproteinase K-fordøyelse.

A. Nødvendige reagenser som ikke følger med

1. Standard løsemidler som brukes innen immunhistokjemi.
2. 50 mM tris-bufret saltvann (TBS) pH 7,6.
3. Enzymløsning (se **Enzymløsning**).
4. Antistofffortynner, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Visualiseringssystem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tester), RE7150-K (500 tester), RE7140-K (250 tester) eller RE7290-K (50 tester).
6. Monteringsmedium – bruk som anbefalt av produsenten.

B. Nødvendig utstyr som ikke følger med

1. Inkubator stilt til 25 °C.
2. Generelt immunhistokjemisk laboratorieutstyr.

C. Enzymløsninger (se Anbefalinger for bruk)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K.

D. Metodikk

Før bruk av denne metoden må brukerne være opplært i immunhistokjemiske teknikker.

Brukerne skal fastslå optimale fortynninger for antistoffer. Med mindre annet er angitt, utføres alle trinn ved romtemperatur (25 °C).

1. Kutt og monter snitt på objektglass belagt med et egnet vevlim.
2. Deparafiner snitt i xylene eller xylensubstitutter.
3. Rehydrer gjennom graderte alkoholer.
4. Vask objektglassene i rennende vann fra springen.

Forvarm snittene som følger:

5. Vask objektglassene i avoinisert vann.
6. Inkuber i enzymproteinase K ved 25 °C i 5 minutter (eller alternativ tid hvis dette er angitt i **Anbefalinger for bruk**).
7. Vask i TBS.
8. Fortsett med IHC-protokollen i henhold til produsentens bruksanvisning for det primære antistoffet og deteksjonssystemet.

E. Endringer på tidligere utgave

Ikke relevant.

F. Utstedelsesdato

17. november 2009 (CEprotocol/Proteinase K).

Novocastra™ Likit Monoklonal Fare Antikor Calcitonin

Ürün Kodu: NCL-L-CALCITONIN

Kullanım Amacı

In vitro diagnostik kullanım içindir.

NCL-L-CALCITONIN, parafin bölümlerindeki kalsitonin moleküllerinin ışık mikroskopisi ile kalitatif tanımlanması için öngörülmüştür. Herhangi bir boyamanın veya boyama yokluğunun klinik yorumu, morfolojik çalışmalar ve uygun kontrollerle tamamlanmalıdır ve nitelikli bir patolog tarafından hastanın klinik öyküsü ve diğer tanı testleri bağlamında değerlendirilmelidir.

Prosedür İlikesi

İmmünohistokimyasal (IHC) boyama teknikleri, antijene ardışık olarak belirli bir antikorun uygulanması (birincil antikor), birincil antikora ikincil bir antikorun uygulanması ve aralaradaki yıkama adımları ile, antijenlerin kromojenik substratlı bir enzim kompleksi yoluyla görselleştirilmesine olanak tanır. Kromojenin enzimle etkinleştirilmesi, antijen alanında gözle görülür bir tepkiye yol açar. Örnek daha sonra karşıt boyanabilir ve lamelle örtülebilir. Sonuçlar bir ışık mikroskobu kullanılarak yorumlanır ve belirli bir antijen ile ilişkili olabilecek veya olmayabilecek patofizyolojik süreçlerin ayırıcı tanısına yardımcı olur.

Clone

CL1948

İmmünojen

Matür insan kalsitonin molekülüne karşılık gelen ve 32 aminoasit içeren prokaryotik rekombinant füzyon proteini.

Özgüllük

Human calcitonin.

Reaktif Bileşimi

NCL-L-CALCITONIN, prezervatif olarak 15 mM sodyum azid içeren bir sıvı doku kültürü supernatantıdır.

Ig Sınıfı

IgG2b

Toplam Protein Konsantrasyonu

Total Protein

1,0-8,0 g/l Lota özgü toplam protein konsantrasyonu için flakon etiketine başvurun.

Antikor Konsantrasyonu

ELISA tarafından belirlendiği gibi 29 mg/L'ye eşit veya bu değerden yüksek. Seriyeye özgü Ig konsantrasyonu için flakon etiketine bakın.

Kullanım Önerileri

Parafin kesitlerinde immünohistokimya (bkz. **D. Metodoloji**).parafin bölümü Enzim ile Endüklenen Epitop Alımı (EIER): Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K içinde kullanım için lütfen talimatları takip edin. Önerilen dilüsyon: 25°C'de 30 dakika boyunca 1:200.

Bu, kılavuz olarak verilmiştir ve kullanıcılar kendi optimal çalışma seyreltilerini belirlemelidir.

Görüntüleme. Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 test), RE7150-K (500 test), RE7140-K (250 test) veya RE7290-K'de (50 test) kullanım için lütfen talimatları izleyin.

Saklama ve Stabilite

2-8°C'de saklayın. Dondurmayın. Kullanımdan hemen sonra 2-8°C'ye geri alın. Flakon etiketinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın. Yukarıda belirtilenler dışında saklama koşulları kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Örnek Hazırlama

Önerilen fiksatif, parafine gömülmüş doku kesitleri için %10 nötr tamponlu formalindir.

Uyarılar ve Önlemler

Bu reaktif hücre kültürü supernatanından hazırlanmıştır. Biyolojik bir ürün olduğundan, elleçleme sırasında makul düzeyde dikkatli olunmalıdır.

Sodyum azitin molaritesi bu reaktifte 15 mM'dir. Sodyum azit için Malzeme Güvenlik Bilgileri Formu (MSDS), talep üzerine sağlanmaktadır.

Olası toksik bileşenlerin atılması ile ilgili yerel, bölgesel veya ulusal düzenlemelere başvurun.

Fiksasyondan önce ve sonra örnekler ve onlara maruz kalmış bütün materyaller, enfeksiyon yayabilecekmiş gibi işlem görmelidir ve gerekli önlemler alınarak atılmalıdır.¹ Reaktifleri hiçbir zaman ağızla pipetlemeyin. Cildin ve mukoz membranların reaktifler ve örneklerle temas etmesini önleyin. Reaktifler veya numuneler hassas bölgelere temas ederse bol miktarda suyla yıkayın.

Tıbbi yardım isteyin.

Reaktiflerin mikrobiyal kontaminasyonunu minimize edin, aksi takdirde spesifik olmayan boyamada bir artış meydana gelebilir.

Belirtilenler dışındaki inkübasyon süreleri veya sıcaklıklar hatalı sonuçlara yol açabilir. Bu tür değişiklikler kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Kalite Kontrol

Kullanıcı laboratuvarında doku işleme ve teknik prosedürlerdeki farklılıklar sonuçlarda, aşağıdaki prosedürlere ek olarak kurum içi kontrollerin düzenli performansını gerektiren anlamlı değişkenliğe yol açabilir.

Kontroller, hasta numunesinde/numunelerinde yapıldığı gibi mümkün olan en kısa sürede dondurulan formalinle fikse edilmiş, parafin mumuna gömülmüş, taze otopsi numuneleri/biyopsi numuneleri/cerrahi örnekler olmalıdır.

Pozitif Doku Kontrolü

Doğru hazırlanmış dokuları ve uygun boyama tekniklerini belirtmek için kullanılır.

Her boyama döngüsünde her test koşulu setine bir pozitif doku kontrolü dahil edilmelidir.

Zayıf pozitif boyama yapılmış doku, optimal kalite kontrolü ve minör reaktif bozunma düzeylerini saptamak için güçlü pozitif boyama yapılmış dokudan daha uygundur.²

Önerilen pozitif kontrol dokusu tiroiddir (C hücreleri).

Pozitif doku kontrolü pozitif boyama göstermezse test örneklerinin sonuçları geçersiz kabul edilmelidir.

Negatif Doku Kontrolü

Primer antikor tarafından hedef antijenin etiketlenmesinin spesifikliğini doğrulamak için, pozitif doku kontrolünden sonra incelenmelidir. Önerilen negatif kontrol dokusu beyinciktir.

Alternatif olarak, doku kesitlerinin çoğunda bulunan farklı hücre tipi çeşitleri sıklıkla negatif kontrol bölgeleri sunar ancak bu kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Olduğu durumda, spesifik olmayan boyamanın görünümü genelde diffüzdür. Aşırı formalin fiksasyonlu dokulardan kesitlerde bağ dokusunun sporadik boyanması da görülebilir. Boyama sonuçlarının yorumlanması için intakt hücreler kullanın. Nekrotik ve dejenere hücreler genellikle nonspesifik boyanır.³ Proteinlerin veya substrat reaksiyon ürünlerinin immünohistokimyasal olmayan bağlanması nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar görülebilir. Bu sonuçlar ayrıca, kullanılan immün-boyaya bağlı olarak psödo peroksidaz (eritrositler), endojen peroksidaz (sitokrom C) veya endojen biotin (örn. karaciğer, meme, beyin, böbrek) gibi endojen enzimlerden de kaynaklanabilir. Endojen enzim aktivitesini veya nonspesifik enzim bağlanmasını spesifik immünoreaktiveden ayırmak için ek hasta dokuları sırasıyla sadece substrat kromojen veya enzim kompleksleri (avidin-biotin, streptavidin, etiketli polimer) ve substrat kromojen ile boyanabilir. Negatif doku kontrolünde spesifik boyanma olursa hasta örneklerinin sonuçları geçersiz kabul edilmelidir.

Negatif Reaktif Kontrolü

Spesifik olmayan boyamayı değerlendirmek ve antijen bölgesinde spesifik boyanmayı daha iyi yorumlayabilmek için her hasta örneği kesitinde primer antikor yerine spesifik olmayan bir negatif reaktif kontrolü kullanın.

Hasta Dokusu

NCL-L-CALCITONIN ile boyanmış hasta numunelerini en son inceleyin. Pozitif boyama yoğunluğu, negatif reaktif kontrolünün spesifik olmayan herhangi bir arka plan boyanması bağlamında değerlendirilmelidir. Her immünohistokimyasal testte olduğu gibi negatif bir sonuç antijenin saptanmadığı anlamına gelir, antijenin miktar tayinine tabi tutulan hücrelerde/dokuda bulunmadığı anlamına gelmez. Gerekirse yanlış negatif reaksiyonların belirlenmesi için antikor paneli kullanın.

Öngörülen Sonuçlar

Normal Dokular

Klon CL1948, tiroid bezinin C hücrelerinin sitoplazmasında kalsitonin proteini tespit etti. Böbrek tübüllerinde ekspresyon da zayıf bir ekspresyonda tespit edildi. (Toplam vaka sayısı = 33).

Anormal Dokular

Klon CL1948, 8/8 medüller tiroid tümörü dahil olmak üzere değerlendirilen 8/40 tiroid tümöründe kalsitonin proteini tespit etti. Tiroid papiller karsinomu (0/13), tiroid foliküler karsinomu (0/7), adenomatöz hiperplazi (0/5), foliküler adenom (0/5) veya tiroid anaplastik karsinomunda (0/2) boyanma tespit edilmedi. Skuamöz hücreli karsinomlar (0/10), karaciğer tümörleri (0/4), yumurtalık tümörleri (0/4), kolorektal tümörler (0/3), lenfomalar (0/3), beyin tümörleri (0/2), meme tümörleri (0/2), mide tümörleri (0/2), pankreatik tümörler (0/2), akciğer tümörleri (0/2), tanımlanmamış metastatik tümörler (0/2), böbrek tümörleri (0/2) ve prostat tümörlerinin (0/4) de dahil olduğu 42 tiroid dışı malignitenin hiçbirinde boyanma tespit edilmedi. (Toplam vaka sayısı = 82).

NCL-L-CALCITONIN, tiroid malignitelerinin karakterizasyonu için bir antikor panelinin parçası olarak kullanılmak üzere tavsiye edilir.

Genel Sınırlamalar

İmmünohistokimya; uygun reaktiflerin seçimi, doku seçimi, fiksasyonu ve işlenmesi, IHC slaytının hazırlanması ve boyama sonuçlarının yorumlanması alanlarında özel eğitilmişten oluşan, çok adımlı bir diagnostik süreçtir.

Doku boyama, boyama öncesinde dokunun kullanımına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer dokular veya sıvılarla kontaminasyon artefaktlara, antikor tutulmasına veya yanlış negatif sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki değişikliklerden ya da dokunun yapısından kaynaklanan düzensizliklerden kaynaklanabilir.⁴

Aşırı ya da tam olmayan karşıt boyama, sonuçların düzgün yorumlanmasını olumsuz etkileyebilir.

Herhangi bir boyamanın veya boyama yokluğunun klinik yorumu, morfolojik çalışmalar ve uygun kontrollerle tamamlanmalıdır ve nitelikli bir patolog tarafından hastanın klinik öyküsü ve diğer tanı testleri bağlamında değerlendirilmelidir.

Leica Biosystems Newcastle Ltd'nin antikorları, belirtilen şekilde, özel fiksasyon gereklilikleriyle parafine gömülü veya dondurulmuş kesitler üzerinde kullanılır. Özellikle neoplazmlarda beklenmeyen antijen ekspresyonu oluşabilir. Boyanmış herhangi bir doku kesitinin klinik yorumu, morfolojik analizi ve uygun kontrollerin değerlendirilmesini içermelidir.

Kaynakça - Genel

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. Clinical Endocrinology. 2004; 61:299-310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2001; 1(4):299-305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. International Journal of Experimental Pathology. 2000; 81:405-422.

Önceki Sayıya Göre Değişiklikler

Geçerli değildir

Yayın Tarihi

15 Temmuz 2019

Enzyme Proteinase K'nın çürütülmesinden faydalanılarak parafine gömülmüş dokuda Novocastra™ antikorlarının kullanımı için immünohistokimya yöntemi.

A. Gereken ancak sağlanmayan reaktifler

1. İmmünohistokimya kullanılan standart çözücüler.
2. 50 mM Tris tamponlu salin (TBS) pH 7,6.
3. Enzim Solüsyonu (bkz C. **Enzim Solüsyonu**).
4. Antikor seyreltici, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Görüntüleme sistemi, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 test), RE7150-K (500 test), RE7140-K (250 test) veya RE7290-K (50 test).
6. Montaj ortamı - üreticinin önerdiği şekilde kullanın.

B. Gereken ancak sağlanmayan ekipman

1. 25°C'ye ayarlı inkübatör.
2. Genel immünohistokimya laboratuvar ekipmanı.

C. Enzim solüsyonu (bkz. Kullanım Önerileri)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K.

D. Metodoloji

Kullanıcılar, bu yöntemi uygulamadan önce, immünohistokimya teknikleri konusunda gerekli eğitimi almış olmalıdır. Antikorlar için optimal dilüsyonları kullanıcıların kendileri belirlemelidir. Aksi belirtilmedikçe tüm adımlar oda sıcaklığında (25 °C) yapılır.

1. Kesitleri kesin ve uygun doku yapışkısıyla kaplı lamlara monte edin.
2. Kesitleri ksilen veya ksilen yerini alan maddelerde deparafinize edin.
3. Derecelendirilmiş alkollerle rehidrate edin.
4. Lamları akan musluk suyunda yıkayın.
Kesitleri aşağıdaki gibi ön işlemden geçirin:
5. Lamları deiyonize suda yıkayın.
6. Enzyme Proteinase K'da 25° C'de 5 dakika (veya **Kullanım Önerilerinde** belirtilen alternatif bir süre) boyunca inkübe edin.
7. TBS'de yıkayın.
8. Primer antikoru ve saptama sistemini üreticinin Kullanım Talimatlarına göre IHC protokolüyle işleme alın.

E. Önceki Sayıya Göre Değişiklikler

Geçerli değildir.

F. Yayın Tarihi

17 Kasım 2009 (CEprotocol/Proteinase K).

Течно мише моноклонално антитяло Novocastra™ Calcitonin

Код на продукта: NCL-L-CALCITONIN

Предназначение

За употреба при *in vitro* диагностика.

Продуктът NCL-L-CALCITONIN е предназначен за качествено идентифициране посредством оптична микроскопия на молекули калцитонин в парафинови срези.

Клиничната интерпретация на всяко оцветяване или неговата липса следва да бъде допълнена от морфологични проучвания с помощта на подходящи контроли и трябва да се оценява в контекста на клиничната история на пациента и други диагностични изследвания от квалифициран патолог.

Принцип на процедурата

Техниките на имунохистохимично (ИHC) оцветяване позволяват визуализация на антигени чрез последователно приложение на специфично антитяло на антигена (първично антитяло), вторично антитяло на първичното антитяло и ензимен комплекс с хромогенен субстрат, с междинни стъпки на промиване. Ензимното активиране на хромогена води до видим реакционен продукт на мястото на антигена.

След това може да се направи контраоцветяване на спесимена и да се постави покривно стъкло. Резултатите се интерпретират с използване на оптичен микроскоп и са в помощ при диференциалната диагностика на патологични процеси, които може да са или да не са свързани с определен антиген.

Клонинг

CL1948

Имуноген

Прокариотен рекомбинантен фузионен протеин, съдържащ 32 аминокиселини, съответстващ на молекулата зрял човешки калцитонин.

Специфичност

Човешки калцитонин.

Състав на реагента

NCL-L-CALCITONIN е течен супернатант от тъканна култура, съдържащ 15 mM натриев азид като консервант.

Имуноглобулинов клас

IgG2b

Обща концентрация на протеин Total Protein

1,0 – 8,0 g/L. Вижте етикета на флакона относно специфичната за партидата концентрация на общ протеин.

Концентрация на антитела

По-висока или равна на 29 mg/L, както е определено от ELISA. Вижте етикета на флакона относно специфичната за партидата концентрация на имуноглобулин.

Препоръки за употреба

Имунохистохимия (вж. **D. Методология**) върху парафинови срези. Топлино индуцирано извличане на епитоп (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER): Моля, следвайте инструкциите за употреба в Novocastra Enzyme Proteinase K (ИHC), RE7160–K.

Препоръчително разреждане: 1:200 за 30 минути при температура 25 °C.

Това е дадено като указание, като потребителите трябва сами да определят техни собствени оптимални работни разреждания.

Визуализация. Моля, следвайте инструкциите за употреба в Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 теста), RE7150–K (500 теста), RE7140–K (250 теста) или RE7290–K (50 теста).

Съхранение и стабилност

Съхранявайте при температура 2 – 8°C. Не замразявайте. Да се върне на температура 2 – 8°C веднага след употреба. Да не се използва след срока на годност, отбелязан върху етикета на флакона. Други условия на съхранение, освен посочените по-горе, трябва да бъдат проверени от потребителя.

Подготовка на спесимени

Препоръчителният фиксиращ разтвор е неутрален буфериран формалин 10% за тъканни срези, вградени в парафин.

Предупреждения и предпазни мерки

Този реагент е приготвен от супернатант от клетъчна култура. Тъй като е биологичен продукт, необходимо е повишено внимание при работа с него.

Моларността на натриевия азид в този реагент е 15 mM. При поискване е налице информационен лист за безопасност на материалите (MSDS) за натриевия азид.

Консултирайте се с федералните, държавните или местните регламенти относно изхвърлянето на потенциално токсични компоненти.

Всички спесимени преди и след фиксация, както и всички материали, изложени на тях, трябва да се третират като възможни преносители на инфекция и да се извършват, като се вземат правилни предпазни мерки.¹ Никога не пипетирайте реагенти с уста и избягвайте контакт на кожата и лигавиците с реагенти и спесимени. При контакт на реагенти или спесимени с чувствителни зони измийте зоните с обилно количество вода.

Потърсете медицинска помощ.

Свеждайте до минимум микробната контаминация на реагентите, в противен случай може да се появи увеличаване на неспецифичното оцветяване.

Инкубационни времена или температури, различни от посочените, могат да доведат до грешни резултати. Всички подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя.

Качествен контрол

Различията в обработката на тъканите и техническите процедури в лабораторията на потребителя могат да доведат до значително вариране на резултатите, налагащо редовно извършване на вътрешен контрол в допълнение към следните процедури.

Контролите трябва да са свежи спесимени, взети по време на аутопсия/биопсия/операция, фиксирани във формалин, обработени и вградени в парафинов восък, възможно най-бързо, по същия начин като проба(та) на пациента(ите).

Позитивна тъканна контрола

Използва се, за да се покажат правилно приготвени тъкани и правилни техники на оцветяване.

Една позитивна тъканна контрола трябва да бъде включена за всеки сет с тестови условия при всяка серия проби за оцветяване.

Тъкан със слабо позитивно оцветяване е по-подходяща от тъкан със силно позитивно оцветяване за оптимален качествен контрол и за откриване на по-малки нива на деградация на реагента.²

Препоръчителната тъкан за позитивна контрола е щитовидна жлеза (С клетки).

Ако позитивната тъканна контрола не показва позитивно оцветяване, резултатите от спесимените, включени в теста, трябва да се считат за невалидни.

Негативна тъканна контрола

Трябва да се изследва след позитивната тъканна контрола, за да се провери специфичността на беляването на таргетния антиген от първичното антияло.

Препоръчителната тъкан за негативна контрола е малкият мозък.

Алтернативно, разнообразието от различни видове клетки, присъстващи в повечето тъканни срези, често предлага места за негативна контрола, но това трябва да се провери от потребителя.

Неспецифичното оцветяване, ако присъства, обикновено е дифузно на вид. Спорадично оцветяване на съединителна тъкан може да се наблюдава и в части от прекомерно фиксирани във формалин тъкани. Използвайте интактни клетки за интерпретация на резултатите от оцветяването. Некротичните или дегенериралите клетки често се оцветяват неспецифично.³ Може да се видят неверни позитивни резултати поради неимунологично свързване на протеини или реакционни продукти на субстрата. Те може да са причинени и от ендогенни ензими, като например псевдопероксидаза (еритроцити), ендогенна пероксидаза (цитохром С) или ендогенен биотин (напр. черен дроб, гърда, мозък, бъбрек) в зависимост от типа на използваното имуно оцветяване. За диференциране на ендогенна ензимна активност или неспецифично ензимно свързване от специфична имуна реактивност ексклузивно може да се оцветят допълнителни тъкани от пациента, съответно със субстрат-хромоген или с ензимни комплекси (авидин-биотин, стрептавидин, маркиран полимер) и субстрат-хромоген. Ако се появи специфично оцветяване в негативната тъканна контрола, резултатите от спесимените на пациентите трябва да се считат за невалидни.

Негативна контрола на реагента

Използвайте неспецифична негативна контрола на реагента, вместо първичното антияло, със срез от всеки спесимен на пациента, за да се направи оценка на неспецифичното оцветяване и да се даде по-добра интерпретация на специфичното оцветяване на мястото на антигена.

Тъкан от пациента

Спесимените на пациенти, оцветени с NCL-L-CALCITONIN, трябва да се изследват последни. Наситеността на позитивното оцветяване трябва да бъде оценена в контекста на всяко неспецифично фоново оцветяване на негативната контрола на реагента. Както при всеки имунохистохимичен тест, един отрицателен резултат означава, че антигенът не е открит, а не че антигенът отсъства в анализиранияте клетки/тъкан. Ако се налага, използвайте панел от антитела за идентифициране на фалшиво отрицателни реакции.

Очаквани резултати

Нормални тъкани

Клонинг CL1948 открива протеина калцитонин в цитоплазмата на С клетките на щитовидната жлеза. Слабо се открива експресия и в бъбречните каналчета. (Общ брой на случаите = 33).

Абнормни тъкани

Клонинг CL1948 открива протеина калцитонин в 8/40 оценени тумора на щитовидната жлеза, включително 8/8 медуларни тумора на щитовидната жлеза. Не се открива оцветяване при папиларни карциноми на щитовидната жлеза (0/13), фоликуларни карциноми на щитовидната жлеза (0/7), аденоматозна хиперплазия (0/5), фоликуларен аденом (0/5) и анапластичен карцином на щитовидната жлеза (0/2). Не се открива оцветяване при никое от 42-те нещитовидни злокачествени образувания, включващи плоскочелюстни карциноми (0/10), чернодробни тумори (0/4), тумори на яйчниците (0/4), колоректални тумори (0/3), лимфони (0/3), мозъчни тумори (0/2), тумори на гърдата (0/2), тумори на стомаха (0/2), тумори на панкреаса (0/2), тумори на белия дроб (0/2), неуточнени метастатични тумори (0/2), тумори на бъбреците (0/2) и тумори на простатата (0/4). (Общ брой на случаите = 82).

Продуктът NCL-L-CALCITONIN се препоръчва за употреба като част от панел от антитела за характеризирането на злокачествени образувания на щитовидната жлеза.

Общи ограничения

Имунохистохимията е многостъпков диагностичен процес, който се състои от специализирано обучение за избор на подходящи реагенти, избор на тъкани, фиксация и обработка, подготовка на предметното стъкло за имунохистохимия и интерпретация на резултатите от оцветяването.

Тъканното оцветяване зависи от боравенето с тъканта и нейната обработка преди оцветяването. Неправилната фиксация, замразяване, размразяване, промиване, изсушаване, затопляне, сръзване или контаминацията с други тъкани или течности може да причини поява на артефакти, блокиране на антителата или фалшиво отрицателни резултати. Несъответстващите резултати може да се дължат на вариации в методите на фиксация и вграждане или на присъща нерегулярност в тъканта.⁴ Прекомерното или непълно контраоцветяване може да попречи на правилната интерпретация на резултатите.

Клиничната интерпретация на всяко оцветяване или неговата липса следва да бъде допълнена от морфологични проучвания с помощта на подходящи контроли и трябва да се оценява в контекста на клиничната история на пациента и други диагностични изследвания от квалифициран патолог.

Антителата от Leica Biosystems Newcastle Ltd са за употреба, както е указано, върху замразени или вградени в парафин срезове със специфични изисквания за фиксация. Възможно е да настъпи неочаквана антигенна експресия, особено при неоплазми. Клиничната интерпретация на всеки оцветен тъканен срез трябва да включва морфологичен анализ и оценката на подходящи контроли.

Библиография – обща

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. Clinical Endocrinology. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2001; 1(4):299–305.
7. Ponder M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. International Journal of Experimental Pathology. 2000; 81:405–422.

Изменения на предишно издание

Не е приложимо

Дата на издаване

15 Юли 2019

Имунохистохимична методология за използване на антитела Novocastra™ върху вградени в парафин тъкани чрез дигестия с Enzyme Proteinase K.

A. Необходими, но непредоставени реагенти

1. Стандартни разтворители, използвани с имунохистохимията.
2. 50 mM трометамин-буфериран физиологичен разтвор (TBS) pH 7,6.
3. Ензимен разтвор (вж. С. **Ензимен разтвор**).
4. Разределител за антитела, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Система за визуализация, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 теста), RE7150-K (500 теста), RE7140-K (250 теста) или RE7290-K (50 теста).
6. Микроскопски препарат – използвайте според препоръките на производителя.

B. Необходимо, но непредоставено оборудване

1. Инкубатор, настроен на температура 25°C.
2. Общо имунохистохимично лабораторно оборудване.

C. Ензимен разтвор (вж. Препоръки за употреба)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K.

D. Методология

Преди прилагането на тази методология потребителите трябва да бъдат обучени за имунохистохимичните техники.

Потребителите трябва да определят оптималните разтвори за антитела. Освен ако не е указано друго, всички стъпки се извършват при стайна температура (25 °C).

1. Срежете и поставете срезите на предметни стъкла, покрити със съответния тъканен адхезив.
 2. Делепарафинизирайте срезите в ксилен или ксиленови заместители.
 3. Рехидрирайте със степенувани алкохоли.
 4. Измийте предметните стъкла с течаща чешмяна вода.
- Предварително третирайте срезите както следва:
5. Измийте предметните стъкла с дейонизирана вода.
 6. Инкубирайте в Enzyme Proteinase K при температура от 25°C за 5 минути (или за друг период, ако такива са показанията в **Препоръки за употреба**).
 7. Направете промивка в TBS (триметамин-буфериран физиологичен разтвор).
 8. Продължете с имунохистохимичния протокол според Инструкциите за употреба на производителя за първичното антитяло и системата за откриване.

E. Изменения на предишно издание

Не е приложимо.

F. Дата на издаване

17 ноември 2009 г. (CEprotocol/Proteinase K).

Novocastra™ folyékony egér monoklonális antitest

Calcitonin

Termékkód: NCL-L-CALCITONIN

Alkalmazási terület

In vitro diagnosztikai használatra.

Az NCL-L-CALCITONIN a calcitonin molekulák fénymikroszkóppal végzett kvalitatív azonosítására szolgál paraffinos metszetekben. Minden festődés meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollokkal kell kiegészíteni, valamint az értékelést a beteg klinikai kórtörténete és egyéb diagnosztikai vizsgálatok figyelembevételével, képzett patológusnak kell elvégeznie.

Az eljárás elve

Az immunhisztokémiai (immunohistochemical, IHC) megfestési technikák az antigén elleni specifikus antitest (elsődleges antitest), az elsődleges antitest elleni másodlagos antitest és egy enzim kromogén szubsztráttal alkotott komplexének egymás után következő alkalmazásán keresztül, közbeiktatott mosási lépések mellett lehetővé teszik az antigének megjelenítését. A kromogén enzimaktiválása látható reakcióterméket eredményez az antigén helyén. Ezután a minta kontrasztfesthető és lefedhető. Az eredmények fénymikroszkóp használatával értelmezhetők, majd segítségül használhatók a patofiziológias folyamatok differenciáldiagnózisa során, amely folyamatok az esetek egy részében konkrét antigénhez kapcsolódnak.

Klón

CL1948

Immuno gén

Az érett humán calcitonin molekula 32 aminosavának megfelelő prokarióta eredetű rekombináns fúziós fehérje.

Specifititás

Humán calcitonin.

A reagens összetétele

Az NCL-L-CALCITONIN egy tartósítószerként 15 mM nátrium-azidot tartalmazó folyékony szövetkultúra felülülőszó.

Ig-osztály

IgG2b

Összfehérje-koncentráció

Total Protein

1,0–8,0 g/l. A sarzsspecifikus összfehérje-koncentrációt lásd az üveg címkéjén.

Antitest-koncentráció

Legalább 29 mg/l, ELISA módszerrel meghatározva. A sarzsspecifikus Ig-koncentrációt lásd az üveg címkéjén.

Felhasználási javaslatok

Immunhisztokémia (lásd **D. Módszer**) paraffinos metszeteken. Enzimindukált epitópfeltárás (enzyme induced epitope retrieval, EIER). Kövesse a Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K használati útmutatóját. Ajánlott hígítás: 1:200, 30 percen át, 25 °C-on. Az adatok csak útmutatásul szolgálnak, a felhasználóknak kell meghatározniuk saját optimális munkadadataikat.

Megjelenítés. Kövesse a Novolink™ Polymer Detection System, RE7280–K (1250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests), illetve RE7290–K (50 tests) használati útmutatóját.

Tárolás és stabilitás

2–8 °C-on tárolandó. Tilos fagyasztani. Felhasználás után azonnal tegye vissza 2–8 °C közötti hőmérsékletre. Ne használja az üveg címkéjén feltüntetett lejáratú dátum után. A fentiekben előírtaktól eltérő tárolási feltételeket a felhasználónak ellenőriznie kell.

A minták előkészítése

A javasolt fixálószer a paraffinba ágyazott szövetmetszeteknél 10%-os, semleges pufferolású formalin.

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Ez a reagens a sejtkultúra felülülőszóijából készült. Mivel biológiai termék, kezelésekor észszerű körültekintéssel kell eljárni. A reagensben lévő nátrium-azid molaritása 15 mM. A nátrium-azidra vonatkozó anyagbiztonsági adatlapot (Material Safety Data Sheet, MSDS) igény esetén rendelkezésre bocsátjuk.

Minden potenciálisan toxikus összetevő ártalmatlanításával kapcsolatban kövesse a szövetségi, állami és helyi előírásokat.

A mintákat fixálás előtt és után, valamint a velük érintkező összes anyagot fertőzések terjesztésére képes anyagként kell kezelni, és megfelelő körültekintéssel kell ártalmatlanítani.¹ Soha ne pipettázza szájjal a reagenseket, továbbá kerülje a bőr és a nyálkahártyák érintkezését a reagensekkel és a mintákkal. Ha a reagensek vagy minták érzékeny területtel érintkeznek, bő vízzel mossa le az érintett területet.

Forduljon orvoshoz.

Minimálisan kell csökkenteni a reagensek mikrobiális szennyeződését, különben megnövekedhet a nem specifikus festődés.

A megadottaktól eltérő inkubációs idők és hőmérsékletek hibás eredményekhez vezethetnek. A felhasználónak minden ilyen jellegű változtatást validálnia kell.

Minőség-ellenőrzés

A felhasználó laboratóriumában alkalmazott szövETFeldolgozási és technikai eljárások eltérései jelentős különbséget okozhatnak az eredményekben, ami az alábbi eljárásokon túl belső kontrollok rendszeres futtatását teszi szükségessé.

Kontrollként friss boncolási/biopsziás/sebészeti mintákat kell használni, amelyekkel a lehető leghamarabb a betegmintákkal megegyező módon kell formailanban fixálni, feldolgozni és paraffiniaszba ágyazni.

Posztív szövETFkontroll

A megfelelő szövETF-előkészítés és festési technikák ellenőrzésére használatos.

Minden tesztelési körülményegüttes esetében és minden megfestési sorozatban kell alkalmazni egy pozitív szövETFkontrollt.

A gyengén pozitív festődésű szövETF alkalmasabb az erősebben pozitív festődésű szövETFnél az optimális minőség-ellenőrzéshez, valamint a kismértékű reagensbomlás észleléséhez.²

A javasolt pozitív kontrollszövet a pajzsmirigy (C-sejtek).

Ha a pozitív szövETFkontroll nem mutat pozitív festődést, a vizsgált minták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Negatív szövETFkontroll

A pozitív szövETFkontroll után azért kell megvizsgálni, hogy a vizsgált antigén elsődleges antitest segítségével történő jelölésének specificitását ellenőrizni lehessen.

A javasolt negatív kontrollszövet a kisagy.

Ezenkívül a legtöbb szövETFmetszetben jelen lévő különböző sejttypusok gyakran használhatók negatív kontrollként, de ezeket a felhasználónak kell ellenőriznie.

Ha van nem specifikus festődés, az rendszerint diffúz megjelenésű. A formailan túlfixált szövETFekből származó metszeteknél a kötőszövet szórványos festődése is megfigyelhető. A festési eredmények értelmezésére ép sejteket használjon. A nekrotizált vagy degenerálódott sejtek gyakran nem specifikusan festődnek meg.³ A fehérvérj vagy a szubsztrát reakciótermékeinek nem immunológiai kötődése miatt álpozitív eredmények jelentkezhetnek. Az alkalmazott immunfestés típusától függően álpozitív eredményeket okozhatnak olyan endogén enzimek is, mint a pszeudoperoxidáz (vörösvérsejtek), endogén peroxidáz (citokrórn C), illetve endogén biotin (pl. máj, emlő, agy, vese). Az endogén enzim aktivitásának vagy az enzim nem specifikus kötődésének a specifikus immunreakciótól való megkülönböztetésére további betegszövetek festhetők kizárólag szubsztrát–kromogén oldattal vagy enzimkomplexekkel (avidin-biotin, sztreptavidin, jelölt polimer) és szubsztrát–kromogénnel. Ha a negatív szövETFkontroll specifikus festődést mutat, a betegminták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Negatív reagenskontroll

A nem specifikus festődés kiértékeléséhez és az antigén helyén létrejövő specifikus festődés jobb értelmezéséhez minden betegminta esetén egy metszeten alkalmazzon az elsődleges antitest helyett nem specifikus negatív reagenskontrollt.

Betegszövet

Az NCL-L-CALCITONIN reagenssel festett betegmintákat vizsgálja meg utolsóként. A pozitív festődés intenzitását a negatív reagenskontroll esetleges nem specifikus háttérfestődésének viszonylatában értékelje. Mint minden immunhisztokémiai vizsgálatnál, a negatív eredmény azt jelenti, hogy az antigén nem volt kimutatható, nem pedig azt, hogy az antigén nem volt jelen a vizsgált sejtekben/szövetben. Szükség esetén az álnegatív reakciók azonosítására használjon antitestpanelt.

Várható eredmények

Normál szövetek

A CL1948 klon kimutatta a kalcitonin fehérjét a pajzsmirigy C-sejtjeinek citoplazmájában. Enyhe expresszió volt észlelhető a vesetubulusokban is. (Összesített esetszám = 33).

Kóros szövetek

A CL1948 klon kimutatta a kalcitonin fehérjét 8/40 kiértékelt pajzsmirigydaganatban, köztük 8/8 medulláris pajzsmirigy-daganatban. Nem volt festődés megfigyelhető a papilláris pajzsmirigy-karcinóma (0/13), follikuláris pajzsmirigy-karcinóma (0/7), adenomás hiperplázia (0/5), follikuláris adenóma (0/5) és anaplasztikus pajzsmirigy-karcinóma (0/2). Nem volt festődés megfigyelhető a 42 nem pajzsmirigy eredetű malignitás egyikében sem, köztük laphámsejtes karcinóma (0/10), májdaganatok (0/4), petefészek-daganatok (0/4), kolorektális daganatok (0/3), limfómák (0/3), agydaganatok (0/2), emlődaganatok (0/2), gyomordaganatok (0/2), hasnyálmirigy-daganatok (0/2), tüdődaganatok (0/2), nem meghatározott áttétes daganatok (0/2), vesedaganatok (0/2) és prosztatadaganatok (0/4). (Összesített esetszám = 82).

Az NCL-L-CALCITONIN alkalmazása a pajzsmirigy eredetű rosszindulatú betegségek jellemzésére szolgáló antitestpanel részeként javasolt.

Általános korlátozások

Az immunhisztokémia több lépésből álló diagnosztikai folyamat, amely a következőket foglalja magában: speciális képzés alapján a megfelelő reagens kiválasztása; a szövetek kiválasztása, fixálása és feldolgozása; az IHC tárgylemez előkészítése; és a festési eredmények értelmezése.

A szövet festődése függ a szövet festés előtti kezelésétől és feldolgozásától. A nem megfelelő fixálás, a fagyasztás, olvasztás, mosás, szárítás, melegítés, metszetkészítés, illetve a más szövetekkel vagy folyadékokkal történő szennyezés műtermékeket, az antitestek befogását, illetve álnegatív eredményeket okozhat. Ellenmondó eredményekhez vezethetnek a fixálási vagy beágyazási módszerek eltérései, illetve a szövet eredendő rendellenességei.⁴

A túlzott vagy hiányos kontrasztfestés ronthatja az eredmények megfelelő értelmezését.

Minden festődés meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollokkal kell kiegészíteni, valamint az értékelést a beteg klinikai kórtörténete és egyéb diagnosztikai vizsgálatok figyelembevételével, képzett patológusnak kell elvégeznie.

A Leica Biosystems Newcastle Ltd által biztosított antitestek specifikus fixálási követelmények mellett, az utasításoknak megfelelően fagyasztott vagy paraffinba ágyazott metszeteken történő felhasználásra szolgálnak. Időnként váratlan antigén-expresszió fordulhat elő, különösen daganatok esetében. Bármely festett szövETFmetszet klinikai értelmezéséhez morfológiai elemzést is kell végezni, és ki kell értékelni a megfelelő kontrollokat.

Bibliográfia – általános

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. Clinical Endocrinology. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. International Journal of Experimental Pathology. 2000; 81:405–422.

Módosítások az előző változathoz képest

Nem alkalmazható

Kiadás dátuma

15 július 2019

A Novocastra™ antitestek paraffinba ágyazott szöveten történő felhasználásának immunhisztokémiai módszere, az Enzyme Proteinase K emésztés alkalmazásával.

A. Szükséges, de nem biztosított reagensek

1. Az immunhisztokémiában alkalmazott standard oldószerek.
2. 50 mM tris-pufferelt sóoldat (Tris-buffered saline, TBS), pH 7,6.
3. Enzimoldat (lásd C. **Enzimoldat**).
4. Antitesthígító, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Megjelenítő rendszer: Novolink® Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests), illetve RE7290-K (50 tests).
6. Fedőanyag – a gyártó javaslatának megfelelően használandó.

B. Szükséges, de nem biztosított felszerelés

1. 25 °C-ra beállított inkubátor.
2. Általános immunhisztokémiai laboratóriumi felszerelés.

C. Enzimoldat (lásd Felhasználási javaslatok)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K.

D. Módszertan

A módszer végrehajtása előtt a felhasználóknak képzésben kell részesülniük az immunhisztokémiai módszerekkel kapcsolatban.

A felhasználóknak kell meghatározniuk az optimális antitesthígításokat. Ha nincs másként feltüntetve, minden lépést szobahőmérsékleten (25 °C) kell végrehajtani.

1. Vágja le és helyezze megfelelő szövetragasztóval bevont tárgylemezre a metszeteket.
 2. Xilolban vagy xilolszubsztituensekben paraffinmentesítse a metszeteket.
 3. Felszálló alkoholsorban végezze el a rehidratálást.
 4. Mossa le a tárgylemezeket folyó csapvíz alatt.
- A metszeteket a következőképpen kell előkezelni:
5. Mossa le a tárgylemezeket ionmentes vízben.
 6. Inkubálja az Enzyme Proteinase K oldatot 25 °C-on 5 percig (vagy ettől eltérő ideig, ha ezt a **Felhasználási javaslatok** című fejezet előírja).
 7. Mossa át TBS-ben.
 8. Az elsődleges antitest és a detektáló rendszer gyártói használati útmutatójának megfelelően végezze el az IHC-protokollt.

E. Előző kiadás módosításai

Nem alkalmazható.

F. Kiadás időpontja

2009. november 17. (CEprotocol/Proteinase K).

Novocastra™ Anticorp monoclonal lichid de șoarece Calcitonin

Cod produs: NCL-L-CALCITONIN

Utilizare prevăzută

Pentru diagnosticare in vitro.

NCL-L-CALCITONIN este destinat identificării calitative, prin intermediul microscopiei optice, a moleculelor de calcitonină în secțiunile de parafină.

Interpretarea clinică a oricărei colorări sau a absenței acesteia trebuie completată cu studii morfologice utilizând controale adecvate și trebuie evaluată în contextul antecedentelor clinice ale pacientului, precum și al altor teste de diagnosticare efectuate de către un patolog calificat.

Principiul de procedură

Tehnicele de colorare imunohistochimică (IHC) permit vizualizarea antigenilor prin aplicarea secvențială a unui anumit anticorp pe antigen (anticorp primar), a unui anticorp secundar pe anticorpii primari și a unui complex enzimatic cu un substrat cromogen, cu etape de spălare intercalate. Activarea enzimatică a cromogenului duce la un produs de reacție vizibil la locul aplicării antigenului. Specimenul poate fi apoi contracolorat și acoperit cu lamelă. Rezultatele sunt interpretate folosind un microscop optic și ajută la diagnosticul diferențial al proceselor patofiziologice, care pot sau nu să fie asociate cu un anumit antigen.

Clonă

CL1948

Imunogen

Proteină procariotică recombinantă de fuziune conținând 32 aminoacizi corespunzând moleculei de calcitonină umană matură.

Specificitate

Calcitonină umană.

Compoziția reactivului

NCL-L-CALCITONIN este un supernatant de cultură tisulară lichid, care conține azidă de sodiu 15 mM drept conservant.

Clasa Ig

IgG2b

Concentrație proteină totală

Total Protein

1,0–8,0 g/l. Consultați eticheta flaconului pentru concentrația proteinelor totale specifică lotului.

Concentrație anticorpi

Mai mare sau egală cu 29 mg/L, așa cum este determinată prin ELISA. Consultați eticheta flaconului pentru concentrația Ig specifică lotului.

Recomandări privind utilizarea

Imunohistochimie (a se vedea **D. Metodologie**) pe secțiuni în parafină. Recuperarea indusă de căldură a epitopilor (HIER): Urmați instrucțiunile de utilizare pentru Enzyme Proteinase K Novocastra (IHC), RE7160–K. Diluție recomandată: 1:200 timp de 30 de minute la 25 °C.

Aceste informații sunt furnizate cu rol de îndrumare, iar utilizatorii trebuie să-și stabilească singuri propriile diluții de lucru optime.

Vizualizare. Urmați instrucțiunile de utilizare pentru Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 teste), RE7150–K (500 teste), RE7140–K (250 teste) sau RE7290–K (50 teste).

Depozitare și stabilitate

A se depozita la 2–8 °C. A nu se congela. A se returna la 2–8 °C imediat după utilizare. A nu se utiliza după data expirării indicată pe eticheta flaconului. Alte condiții de depozitare decât cele specificate mai sus trebuie verificate de către utilizator.

Pregătirea specimenului

Fixativul recomandat este formalină tamponată neutră 10% pentru secțiunile de țesut încorporate în parafină.

Avertismente și precauții

Acest reactiv a fost pregătit din supernatantul culturii celulare. Întrucât este un produs biologic, trebuie să se acționeze cu prudență rezonabilă la manipularea sa.

Molaritatea azidei de sodiu din acest reactiv este 15 mM. Fișa tehnică de securitate a materialului (FTSM) referitoare la azida de sodiu este disponibilă la cerere.

Consultați reglementările naționale, județene sau locale pentru informații privind eliminarea la deșeurile a oricăror componente cu potențial toxic.

Probele, înainte și după fixare, precum și toate materialele expuse la acestea, trebuie manipulate ca și când ar avea potențialul de a transmite infecții și trebuie eliminate la deșeurile luând măsurile de precauție adecvate. Nu pipetați niciodată reactivii cu gura și evitați contactul reactivilor și probelor cu pielea și membranele mucoase. Dacă reactivii sau probele vin în contact cu suprafețele sensibile, spălați cu apă din abundență.

Solicitați asistență medicală.

Reduceți la minimum contaminarea microbiană a reactivilor, în caz contrar poate apărea o creștere a colorării nespecifice.

Timpii sau temperaturile de incubație care diferă de valorile specificate pot genera rezultate eronate. Orice astfel de modificări trebuie validate de către utilizator.

Controlul calității

Diferențele în ceea ce privește procesarea țesutului și procedurile tehnice în laboratorul utilizatorului pot cauza o variabilitate semnificativă a rezultatelor, necesitând efectuarea cu regularitate de controale interne, în plus față de următoarele proceduri. Probele de control trebuie să fie probe proaspete de autopsie/biopsie/chirurgicale, fixate în formalină, procesate și încorporate în ceară de parafină cât mai curând posibil și în aceeași manieră ca și probele pacientului.

Țesutul de control pozitiv

Folosit pentru a indica țesuturile pregătite corect și tehnicile de colorare adecvate.

O probă de țesut de control pozitiv trebuie să fie inclusă pentru fiecare set de condiții de testare în fiecare etapă de colorare.

Un țesut cu colorare pozitivă slabă este mai adecvat decât un țesut cu colorare pozitivă puternică în vederea unui control optim al calității și pentru a detecta nivelurile minore de degradare a reactivului.²

Țesutul de control pozitiv recomandat este tiroida (celule C).

Dacă țesutul de control pozitiv nu demonstrează colorația pozitivă, rezultatele obținute cu acele probe de testare trebuie considerate nevalide.

Țesutul de control negativ

Trebuie examinat după țesutul de control pozitiv pentru a verifica specificitatea informațiilor de etichetare ale antigenului țintă în funcție de anticorpul primar.

Țesutul de control negativ recomandat este creierul.

Ca alternativă, varietatea de tipuri diferite de celule prezente în majoritatea secțiunilor tisulare oferă frecvent locuri de control negativ, dar acest lucru trebuie verificat de către utilizator.

Colorația nespecifică, dacă este prezentă, are, de obicei, un aspect difuz. Colorația sporadică a țesutului conjunctiv poate fi observată, de asemenea, în secțiuni de țesuturi fixate în mod excesiv în formalină. Folosiți celule intacte pentru interpretarea rezultatelor de colorare. Celulele necrotice sau degenerate se colorează deseori într-un mod nespecific.³ Se pot observa rezultate fals pozitive ca urmare a legării non-immunologice a proteinelor sau produșilor de reacție ai substratului. Acestea pot fi cauzate, de asemenea, de enzimele endogene precum pseudoperoxidaza (eritrocite), peroxidaza endogenă (citocromul C) sau biotina endogenă (de exemplu, ficat, sân, encefal, rinichi), în funcție de tipul de imunocolorație folosit. Pentru a diferenția activitatea enzimelor endogene sau legarea nespecifică a enzimelor de imunoreactivitatea specifică, pot fi colorate țesuturi suplimentare de la pacient numai cu substrat-cromogen sau, respectiv, complexe enzimatic (avidină-biotină, streptavidină, polimer etichetat) și substrat-cromogen. În cazul în care colorația specifică are loc în țesutul de control negativ, rezultatele obținute pe probele pacientului trebuie să fie considerate nevalide.

Reactivul de control negativ

Folosiți un reactiv de control negativ non-specific în locul anticorpului primar cu o secțiune din fiecare specimen al pacientului pentru a evalua colorația nespecifică și a permite o mai bună interpretare a colorării specifice la situl antigenului.

Țesutul pacientului

Examinați speciimenele pacientului colorate cu NCL-L-CALCITONIN ultimele. Intensitatea colorației pozitive trebuie evaluată în contextul oricărei colorații de fond nespecifice a reactivului de control negativ. La fel ca în cazul oricărui test imunohistochimic, un rezultat negativ înseamnă că antigenul nu a fost detectat, și nu că antigenul a fost absent în celulele/țesuturile analizate. Dacă este necesar, folosiți un panel pentru anticorpi pentru identificarea reacțiilor fals negative.

Rezultate așteptate

Țesuturi normale

Clona CL1948 a detectat proteina calcitonină în citoplasma celulelor C din glanda tiroidă. Expresia a fost de asemenea detectată slab în tubulele renale. (Numărul total al cazurilor = 33).

Țesuturi anormale

Clona CL1948 a detectat proteina calcitonină în 8/40 tumori tiroidiene evaluate, incluzând 8/8 tumori tiroidiene medulare. Nu a fost detectată vreo colorare în carcinom papilar al tiroidei (0/13), carcinom folicular al tiroidei (0/7), hiperplazie adenomatoasă (0/5), adenom folicular (0/5) sau carcinom anaplastic al tiroidei (0/2). Nu a fost detectată vreo colorare în oricare din cele 42 malignități non-tiroidiene care au inclus carcinoame cu celule scuamoase (0/10), tumori hepatice (0/4), tumori ovariene (0/4), tumori colorectale (0/3), limfoame (0/3), tumori cerebrale (0/2), tumori mamare (0/2), tumori gastrice (0/2), tumori pancreatice (0/2), tumori pulmonare (0/2), tumori metastatice nespecifice (0/2), tumori renale (0/2) și tumori prostatice (0/4). (Numărul total al cazurilor = 82).

NCL-L-CALCITONIN este recomandat pentru utilizare ca parte a unui panel de anticorpi pentru a ajuta la caracterizarea malignităților tiroidiene.

Limitări generale

Imunohistochimia este un proces de diagnostic cu mai multe etape, care constă din instruirea specializată în ceea ce privește alegerea reactivilor adecvați; alegerea, fixarea și procesarea țesutului; prepararea lamei IHC; și interpretarea rezultatelor de colorare.

Colorarea tisulară depinde de manipularea și procesarea țesutului înainte de colorare. Fixarea, congelarea, dezghețarea, spălarea, uscarea, încălzirea, secționarea necorespunzătoare sau contaminarea cu alte țesuturi ori fluide pot cauza artefacte, captura anticorpilor sau rezultate fals negative. Rezultatele inconsecvente pot fi atribuite diferențelor în ceea ce privește metodele de fixare și încorporare, ori nereglărilor inerente ale țesutului.⁴

Contracolorația excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea adecvată a rezultatelor.

Interpretarea clinică a oricărei colorări sau a absenței acesteia trebuie completată cu studii morfologice utilizând controale adecvate și trebuie evaluată în contextul antecedentelor clinice ale pacientului, precum și al altor teste de diagnosticare efectuate de către un patolog calificat.

Anticorpii de la Leica Biosystems Newcastle Ltd sunt destinați utilizării, conform indicațiilor, fie pe secțiuni congelate, fie pe secțiuni încorporate în parafină cu cerințe de fixare specifice. Poate apărea exprimarea neașteptată a antigenului, în special în neoplasme. Interpretarea clinică a oricărei secțiuni tisulare colorate trebuie să includă analiza morfologică și evaluarea probelor de control adecvate.

Bibliografie - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. Clinical Endocrinology. 2004; 61:299-310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2001; 1(4):299-305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. International Journal of Experimental Pathology. 2000; 81:405-422.

Amendamente la ediția anterioară

Nu este cazul

Data publicării

15 iulie 2019

Metodologie de imunohistochimie pentru utilizarea anticorpilor Novocastra™ pe țesut încorporat în parafină utilizând digestia cu Enzyme Proteinase K.

A. Reactivi necesari care nu sunt însă furnizați

1. Solvenți standard folosiți în imunohistochimie.
2. soluție salină tamponată cu trometamină (SSTT) 50 mM, pH 7,6.
3. Soluție enzimatică (vezi C. **Soluție enzimatică**).
4. Diluant pentru anticorpi, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Sistem de vizualizare, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 teste), RE7150–K (500 teste), RE7140–K (250 teste) sau RE7290–K (50 teste).
6. Mediu de montare - a se utiliza conform recomandărilor producătorului.

B. Echipamente necesare care nu sunt însă furnizate

1. Incubator setat la 25 °C.
2. Echipament de laborator general pentru imunohistochimie.

C. Soluție enzimatică (a se vedea Recomandări de utilizare)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K.

D. Metodologie

Înainte de a aplica această metodologie, utilizatorii trebuie să fie instruiți în ceea ce privește tehnicile imunohistochimice. Utilizatorii trebuie să stabilească diluțiile optime în funcție de anticorpi. Dacă nu se indică altfel, toate etapele se efectuează la temperatura camerei (25 °C).

1. Tăiați și montați secțiunile pe lame acoperite cu un adeziv tisular adecvat.
2. Deparafinizați secțiunile în xilen sau substitute de xilen.
3. Rehidratați cu ajutorul alcoolilor cu gradație descrescătoare.
4. Spălați lamele cu apă de la robinet.
Tratați în prealabil secțiunile după cum urmează:
5. Spălați lamelele în apă deionizată.
6. Incubați în Enzyme Proteinase K la 25 °C timp de 5 minute (sau un timp alternativ dacă este indicat în **Recomandări de utilizare**).
7. Spălați în SSTT.
8. Procedați cu protocolul IHC conform Instrucțiunilor de utilizare ale producătorului pentru anticorpii primari și sistemul de detecție.

E. Amendamente la ediția anterioară

Nu este cazul.

F. Data publicării

17 noiembrie 2009 (CEprotocol/Proteinase K).

Жидкая форма моноклональных антител мыши Novocastra™ Calcitonin

Код продукта: NCL-L-CALCITONIN

Назначение

Для диагностики in vitro

Препарат NCL-L-CALCITONIN предназначен для качественной идентификации молекул кальцитонина в парафиновых срезах методом световой микроскопии.

Клиническая интерпретация любого окрашивания или его отсутствия должна быть дополнена морфологическими исследованиями с надлежащими контролями и должна быть оценена квалифицированным патологом с учетом анамнеза пациента и других диагностических тестов.

Принцип метода

Иммуногистохимические (ИГХ) методы окрашивания позволяют визуализировать антигены путем последовательного связывания специфического антитела с антигеном (первичное антитело), вторичного антитела с первичным антителом и ферментного комплекса с хромогенным субстратом. Между этими этапами выполняется промежуточная промывка. Ферментная активация хромогена приводит к образованию видимого продукта реакции в месте расположения антигена.

После этого образцы можно подвергать контрастному окрашиванию и заключить под покровную пленку. Интерпретацию результатов выполняют под световым микроскопом и используют для дифференциальной диагностики патфизиологических процессов, которые могут быть связаны или не связаны с конкретным антигеном.

Клон

CL1948

Иммуноген

Рекомбинантный белок из прокариотических клеток, содержащий 32 аминокислоты, соответствующих молекулы кальцитонина взрослого человека.

Специфичность

Человеческий кальцитонин.

Состав реактива

NCL-L-CALCITONIN является супернатантом жидкой культуры тканей, содержащим азид натрия в концентрации 15 мМ в качестве консерванта.

Класс иммуноглобулинов

IgG2b

Общая концентрация белка Total Protein

1,0–8,0 г/л. Общая концентрация белка в каждой партии указана на этикетке флакона.

Концентрация антитела

Не менее 29 мг/л при измерении методом ИФА. Концентрация иммуноглобулина, соответствующая данной серии, указана на этикетке флакона.

Рекомендации по применению

Иммуногистохимия парафиновых срезов (смотрите раздел **D. Методология**). Ферментативное демаскирование антигенов (Enzyme Induced Epitope Retrieval (EIER)). Пожалуйста, следуйте инструкциям по применению фермента протеиназа K Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K. Предполагаемое разведение: 1: 200 в течение 30 минут при температуре 25 °С.

Данная информация носит рекомендательный характер, и пользователям следует самостоятельно определять оптимальные рабочие разведения.

Визуализация. Следуйте инструкциям по использованию систем для визуализации Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 исследований), RE7150–K (500 исследований), RE7140–K (250 исследований) или RE7290–K (50 исследований).

Хранение и стабильность

Хранить при температуре 2–8 °С. Не замораживать. После использования незамедлительно вернуть на хранение при температуре 2–8 °С. Не использовать после указанной на этикетке флакона даты истечения срока годности. Условия хранения, отличающиеся от указанных выше, должны быть проверены пользователем.

Подготовка образцов

Для подготовки залитых в парафин срезов тканей рекомендуется фиксация в 10 % нейтральном забуференном формалине.

Предупреждения и меры предосторожности

Этот реактив был изготовлен из супернатанта культуры клеток. При обращении с этим продуктом, как и с другими биологическими продуктами, следует соблюдать разумную осторожность.

Молярность азида натрия в данном реактиве составляет 15 мМ. Паспорт безопасности химической продукции, составленный на азид натрия, предоставляется по запросу.

По вопросам утилизации любых возможно токсических компонентов выполняйте требования федеральных, региональных или местных нормативных документов.

С образцами (до и после фиксации) и всеми материалами, которые находятся под их воздействием, следует обращаться как со способными к передаче инфекции и утилизировать, соблюдая соответствующие меры предосторожности.¹ Никогда не набирайте реактивы в пипетку ртом и не допускайте контакта реактивов и образцов с кожей и слизистыми оболочками. В случае контакта реактивов или образцов с чувствительными зонами промойте их большим количеством воды.

Обратитесь за медицинской помощью.

Сведите к минимуму микробное загрязнение реактивов во избежание усиления неспецифического окрашивания.

Инкубация при сроках и температурах, отличных от указанных в инструкции, может дать ошибочные результаты. Любые подобные изменения должны быть валидированы пользователем.

Контроль качества

Различия в методах обработки тканей и технических процедурах, выполняемых в лаборатории пользователя, могут привести к существенной вариабельности результатов, в связи с чем требуется регулярное выполнение внутрилaborаторных контролей в дополнение к указанным ниже процедурам.

В качестве контролей следует использовать свежие образцы, полученные при аутопсии, биопсии или хирургических процедурах, фиксированные в формалине, обработанные и как можно скорее залитые в парафин так же, как были обработаны полученные у пациентов образцы.

Положительный контроль ткани

Применяется для проверки правильности подготовки тканей и методов окрашивания.

В каждый набор условий теста при каждом цикле окрашивания следует включать один срез ткани для положительного контроля. Для оптимального контроля качества и обнаружения незначительных уровней деградации реактива более подходит ткань со слабым положительным окрашиванием, чем ткань с сильным положительным окрашиванием.²

В качестве положительного контроля рекомендуется использовать ткань щитовидной железы (С-клетки).

При отсутствии положительного окрашивания ткани, используемой в качестве положительного контроля, результаты, полученные с исследуемыми образцами, считаются недействительными.

Отрицательный контроль ткани

Этот тест необходимо выполнять после положительного контроля ткани для проверки специфичности меченя целевого антигена первичным антителом.

В качестве отрицательного контроля рекомендуется ткань мозжечка.

Кроме того, разнообразные типы клеток для отрицательного контроля можно часто найти в большинстве срезов тканей, однако такие препараты должны быть проверены пользователем.

Неспецифическое окрашивание, если оно присутствует, обычно выглядит диффузным. В срезах тканей, избыточно фиксированных формалином, можно также иногда увидеть окрашивание соединительной ткани. Для интерпретации результатов окрашивания используйте интактные клетки. Некротизированные или разрушенные клетки часто окрашиваются неспецифически.³ Неиммунное связывание белков или продуктов реакции с субстратом может привести к ложноположительным результатам. Такие же результаты могут быть связаны с эндогенными ферментами, например псевдопероксидазой (в эритроцитах), эндогенной пероксидазой (цитохром С) или эндогенным биотином (например, в печени, молочной железе, головном мозге или почке) в зависимости от типа использованного иммунного окрашивания. Чтобы отличить активность эндогенных ферментов или неспецифическое связывание ферментов от специфической иммуореактивности, можно выполнить окрашивание дополнительных тканей пациента исключительно хромогенным субстратом или ферментными комплексами (авидин-биотин, стрептавидин, меченый полимер) и хромогенным субстратом соответственно. При наличии специфического окрашивания в отрицательном контроле ткани результаты исследования полученных у пациентов образцов считаются недействительными.

Отрицательный контроль реактива

Для оценки неспецифического окрашивания и лучшей интерпретации специфического окрашивания в области связывания антигена, исследуя срезы каждого образца, взятого у пациента, вместо первичных антител используйте реактив, служащий в качестве неспецифического отрицательного контроля.

Ткань, полученная у пациента

Исследуйте полученные у пациентов образцы, окрашенные NCL-L-CALCITONIN, в последнюю очередь. Интенсивность положительного окрашивания следует оценивать с учетом любого неспецифического фонового окрашивания отрицательного контроля реактива. Как и при любом иммуногистохимическом исследовании, отрицательный результат означает необнаружение антигена, но не его отсутствие в исследованных клетках или ткани. При необходимости следует использовать панель антител для выявления ложноотрицательных реакций.

Ожидаемые результаты

Нормальные ткани

Клон CL1948 обнаружил белок кальцитонина в цитоплазме С-клеток щитовидной железы. Слабая экспрессия была обнаружена в каналах почек. (Общее число исследованных образцов = 33).

Патологически измененные ткани

Клон CL1948 обнаружил белок кальцитонина в 8/40 исследованных случаях опухолей щитовидной железы, включая 8/8 случаев медуллярной опухоли щитовидной железы. Окрашивание не было обнаружено в папиллярной карциноме щитовидной железы (0/13), фолликулярной карциноме щитовидной железы (0/7), аденоматозной гиперплазии (0/5), фолликулярной аденоме (0/5) или анапластической карциноме щитовидной железы (0/2). Окрашивание не было обнаружено в других 42 злокачественных образованиях тканей не щитовидной железы, включая плоскоклеточные карциномы (0/10), опухоли печени (0/4), опухоли яичников (0/4), колоректальные опухоли (0/3), лимфомы (0/3), опухоли мозга (0/2), опухоли молочной железы (0/2), опухоли желудка (0/2), опухоли поджелудочной железы (0/2), опухоли легких (0/2), неустановленные метастатические опухоли (0/2), опухоли почки (0/2) и опухоли простаты (0/4). (Общее число исследованных образцов = 82).

Реактив NCL-L-CALCITONIN рекомендуется использовать в составе панели антител для характеристики злокачественных образований тканей щитовидной железы.

Общие ограничения

Иммуногистохимическое исследование является многостадийным диагностическим процессом, требующим специальных навыков в выборе надлежащих реактивов; выборе, фиксации и обработке тканей; приготовлении среза с ИГХ препаратом; интерпретации результатов окрашивания.

Окрашивание тканей зависит от обращения с тканями и их обработкой перед окрашиванием. Неправильные процедуры фиксации, замораживания, оттаивания, промывки, сушки, нагрева, приготовления срезов, а также загрязнение другими тканями или жидкостями могут приводить к артефактам, захвату антител или ложноотрицательным результатам. Противоречивые результаты могут быть обусловлены различиями методов фиксации и заливки препарата или присущей тканям внутренней неравномерностью структуры.⁴

Чрезмерное или неполное контрастирование может негативно отразиться на точности интерпретации результатов.

Клиническая интерпретация любого окрашивания или его отсутствия должна быть дополнена морфологическими исследованиями с надлежащими контролями и должна быть оценена квалифицированным патологом с учетом анамнеза пациента и других диагностических тестов.

Изготовленные компанией Leica Biosystems Newcastle Ltd антитела предназначены, как указано выше, для применения на замороженных или залитых в парафин срезах и требуют выполнения конкретных требований по фиксации. Возможна непредвиденная экспрессия антигена, особенно в опухолях. Клиническая интерпретация любого окрашенного среза ткани должна включать морфологический анализ и оценку соответствующих контролей.

Библиография — общая

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travaglini J et al. Medullary thyroid carcinoma. Clinical Endocrinology. 2004; 61:299-310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2001; 1(4):299-305.
7. Ponderl M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. International Journal of Experimental Pathology. 2000; 81:405-422.

Дополнения к предыдущему выпуску

не применимо

Дата выпуска

15 Июль 2019

Методика иммуногистохимического исследования антител Novocastra™ в залитых в парафин тканях с использованием метода расщепления при помощи фермента Enzyme Proteinase K.

A. Необходимые реактивы, не входящие в комплект поставки

1. Стандартные растворители, используемые в иммуногистохимических исследованиях.
2. 50 мМ трис-буферный солевой раствор (Tris-buffered saline (TBS)), pH 7,6.
3. Ферментный раствор (см. раздел С. Ферментный раствор).
4. Разбавитель антител, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Система визуализации, предназначенная для детекции полимеров, Novolink™ Polymer Detection Systems RE7280-K (1250 исследований), RE7150-K (500 исследований), RE7140-K (250 исследований) или RE7290-K (50 исследований).
6. Среда для заливки препаратов: используйте в соответствии с рекомендациями производителя.

B. Необходимое оборудование, не входящее в комплект поставки

1. Термостат, установленный на 25 °С.
2. Стандартное лабораторное оборудование для иммуногистохимических исследований.

C. Ферментный раствор (смотрите Рекомендации по использованию)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K.

D. Методика

Прежде чем применять эту методику, пользователи должны научиться проводить иммуногистохимические исследования.

Пользователи должны определить оптимальные разведения препаратов антител. Если не указано иное, выполняйте все этапы при комнатной температуре (25 °С).

1. Сделайте срезы и закрепите их на предметных стеклах, покрытых клеем, предназначенным для ткани.
 2. Депарафинизируйте срезы, используя ксилол или его заменители.
 3. Регидратируйте, используя спирты определенной степени очистки.
 4. Промойте препараты проточной водой.
- Проведите предварительную обработку срезов следующим образом:
5. Промойте предметные стекла деионизированной водой.
 6. Инкубируйте Enzyme Proteinase K при температуре 25 °С в течение 5 минут (или другого промежутка времени, если это указано в **Рекомендациях по использованию**).
 7. Промойте в растворе TBS (Трис-буферном солевом растворе).
 8. Следуйте ИГХ протоколу в соответствии с Инструкциями по использованию первичных антител и системы детекции, подготовленными их производителями.

E. Дополнения к предыдущему выпуску

Не применимо.

F. Дата выпуска

17 ноября 2009 г. (CEprotocol/Proteinase K).

Płynne mysie przeciwciało monoklonalne Novocastra™

Calcitonin

Kod produktu: NCL-L-CALCITONIN

Przeznaczenie

Do diagnostyki *in vitro*.

Produkt NCL-L-CALCITONIN jest przeznaczony do badań laboratoryjnych, w celu identyfikacji jakościowej w mikroskopie świetlnym cząsteczek kalcytoniny w skrawkach parafinowych.

Kliniczną interpretację barwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. Ocena powinna przeprowadzić wykwalifikowany patolog w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych.

Zasady postępowania

Metody barwienia immunohistochemicznego (IHC) umożliwiają wizualizację antygenów dzięki zastosowaniu – po kolei – swoistego przeciwciała przeciwko antygenowi (przeciwciała pierwszorzędowego), przeciwciała drugorzędowego przeciwko przeciwciału pierwszorzędowemu i kompleksu enzymu z substratem chromogennym z etapami przemycania. Aktywacja enzymatyczna chromogenu prowadzi do wytworzenia widocznego produktu reakcji w miejscu antygenu.

Następnie można wykonać barwienie kontrastowe próbki i zakryć ją szkiełkiem nakrywkowym. Wyniki są interpretowane przy użyciu mikroskopu świetlnego i pomagają w diagnostyce różnicowej procesów patofizjologicznych, które mogą mieć związek z określonym antygenem.

Klon

CL1948

Immunogen

Prokariotyczne rekombinowane białko fuzyjne zawierające 32 aminokwasy odpowiadające dojrzałej ludzkiej cząsteczce kalcytoniny.

Swoistość

Ludzka kalcytonina.

Skład odczynnika

NCL-L-LANGERIN jest płynnym supernatantem hodowli tkankowej konserwowanym 15 mM azydkiem sodu.

Klasa Ig

IgG2b

Calkowite stężenia białka

Total Protein

1,0–8,0 g/L. Calkowite stężenie białka w danej serii podano na etykiecie fiołki.

Stężenie przeciwciał

Większe lub równe 29 mg/L oznaczone za pomocą testu ELISA. Stężenie Ig w danej serii podano na etykiecie fiołki.

Zalecenia dotyczące stosowania

Badanie immunohistochemiczne (zob. **D. Metodologia**) skrawków parafinowych. Enzymatyczne odmaskowywanie epitopu (HIER):

Należy postępować zgodnie z instrukcją stosowania dołączonej do Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K. Sugerowane rozcieńczenie: 1:200 przez 30 minut w temperaturze 25 °C.

Te informacje stanowią jedynie wskazówkę – użytkownicy powinni sami określić swoje optymalne rozcieńczenie robocze.

Wizualizacja. Należy postępować zgodnie z instrukcją stosowania dołączonej do Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 testów), RE7150-K (500 testów), RE7140-K (250 testów) lub RE7290-K (50 testów).

Przechowywanie i trwałość

Przechowywać w temperaturze 2–8 °C. Nie zamrażać. Niezwłocznie po użyciu ponownie umieścić w temperaturze 2–8°C. Nie używać po upływie daty ważności podanej na etykiecie fiołki. Przechowywanie w warunkach innych od wskazanych powyżej wymaga weryfikacji użytkownika.

Przygotowanie próbek

Zalecany utrwalaczem jest 10-procentowa obojętna buforowana formalina do tkanek zatopionych w parafinie.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Odczynnik został przygotowany z supernatantu hodowli tkankowej. Ponieważ jest to produkt biologiczny, podczas jego używania należy zachować odpowiednie środki ostrożności.

Stężenie molarne azydki sodu w tym odczynniku wynosi 15 mM. Karta charakterystyki azydki sodu jest udostępniana na żądanie.

Wszelkie potencjalnie toksyczne składniki należy utylizować zgodnie z krajowymi lub lokalnymi przepisami.

Próbki przed i po utrwaleniu oraz wszelkie materiały narażone na kontakt z nimi należy traktować jak materiały potencjalnie zakaźne i należy je utylizować z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności.¹ Podczas pobierania pipetą nie wolno zasysać odczynników ustami i należy unikać kontaktu odczynników i preparatów ze skórą oraz błonami śluzowymi. W razie kontaktu odczynników lub próbek ze szczególnie narażonymi miejscami przemyć miejsce kontaktu dużą ilością wody.

Należy zasięgnąć porady lekarza.

Chronić odczynniki przed skażeniem drobnoustrojami, ponieważ może ono doprowadzić do zwiększonego barwienia niespecyficznego.

Zastosowanie okresów inkubacji i temperatur innych niż te podane w instrukcji może spowodować błędne wyniki. Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zeweryfikowane przez użytkownika.

Kontrola jakości

Różnice w przetwarzaniu tkanek i procedurach technicznych w laboratorium użytkownika mogą doprowadzić do znacznej zmienności wyników, co oznacza konieczność dodatkowego przeprowadzania regularnych kontroli jakości wewnątrznych.

Kontrolę należy przeprowadzać jak najszybciej na świeżych próbkach z autopsji/biopsji/operacji chirurgicznej utrwalonych, przetworzonych i zatopionych w parafinie, taką samą metodą, jaką badane są pobrane tkanki.

Tkankowa kontrola pozytywna

Stosowana w celu wskazania prawidłowo przygotowanych tkanek i prawidłowych technik barwienia.

W każdej serii barwienia każdy zestaw warunków testowych powinien uwzględniać jedną tkankową kontrolę pozytywną.

Do optymalnej kontroli jakości i do wykrywania niewielkich poziomów degradacji odczynników bardziej nadaje się tkanka o słabym barwieniu pozytywnym niż tkanka o silnym barwieniu pozytywnym.²

Tkankowa kontrola pozytywna powinna obejmować tarczycę (komórki C).

Jeśli tkankowa kontrola pozytywna nie wykaże odpowiedniego barwienia pozytywnego, wyniki testu przeprowadzonego na próbkach pobranych od pacjenta należy uznać za nieważne.

Tkankowa kontrola negatywna

Należy ją wykonać po tkankowej kontroli pozytywnej, aby sprawdzić swoistość znakowania docelowego antygeny przez przeciwciała pierwszorzędowe.

Tkankowa kontrola negatywna powinna obejmować mózdzek.

Ewentualnie tkankowa kontrola negatywna może obejmować różne typy komórek obecne w większości skrawków tkankowych, jednak powinno to zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Barwienie niespecyficzne, jeżeli jest obecne, zwykle ma charakter rozproszony. Na skrawkach wykonanych z materiału tkankowego nadmiernie utrwalonego w formalinie można również zaobserwować sporadyczne barwienie tkanki łącznej. Do interpretacji wyników barwienia należy używać nieuszkodzonych komórek. Komórki martwicze lub zdegenerowane często powodują barwienie niespecyficzne.³ Wyniki fałszywie pozytywne mogą pojawić się w następstwie nieimmunologicznego wiązania białek lub występowania produktów reakcji substratów. Mogą być również spowodowane przez endogenne enzymy, takie jak pseudoperoksydaza (erytrocyty), endogenna peroksydaza (cytochrom C) lub endogenna biotylna (np. wątroba, piersi, mózg, nerki), w zależności od zastosowanego barwnika immunohistochemicznego. Aby odróżnić endogenną aktywność enzymatyczną lub niespecyficzne wiązanie enzymów od swoistej immunoreaktywności, dodatkowe tkanki pacjenta mogą być barwione wyłącznie substratem chromogenem lub kompleksem enzymatycznym (awidyna-biotyna, streptawidyna, znakowany polimer) i substratem-chromogenem. Jeśli w trakcie tkankowej kontroli negatywnej nastąpi barwienie specyficzne, wyniki testu przeprowadzonego na próbkach pobranych od pacjenta należy uznać za nieważne.

Negatywna kontrola odczynnika

Aby przeprowadzić ocenę barwienia niespecyficznego oraz umożliwić lepszą interpretację barwienia specyficznego na każdym skrawku z próbki pobranej od pacjenta należy przeprowadzić nieswoistą kontrolę negatywną odczynnika w miejscu wiązania przeciwciała pierwszorzędowego.

Tkanka pacjenta

Próbki pacjenta wybarwione testem NCL-L-CALCITONIN należy badać jako ostatnie. Intensywność barwienia pozytywnego należy ocenić w kontekście ewentualnego niespecyficznego barwienia tkła podczas negatywnej kontroli odczynnika. Tak jak we wszystkich innych badaniach immunohistochemicznych wynik ujemny oznacza, że antygen nie został wykryty, co jednak nie oznacza, że jest on nieobecny w badanych komórkach/tkankach. W razie konieczności do identyfikacji reakcji fałszywie negatywnych należy wykorzystać panel przeciwciał.

Oczekiwane wyniki

Tkanki prawidłowe

Klon CL1948 wykrył białko kalcytoniny w cytoplazmie komórek C gruczołu tarczowego. Słaba ekspresja została również wykryta w kanalikach nerkowych. (Łączna liczba przypadków = 33).

Tkanki nieprawidłowe

Klon CL1948 wykrył białko kalcytoniny w 8/40 ocenianych nowotworach tarczycy, w tym 8/8 guzów rdzeniastych tarczycy. Nie wykryto barwienia raka brodawkowatego tarczycy (0/13), raka pęcherzykowego tarczycy (0/7), atypowego rozrostu gruczolakowatego pneumocytów (0/5), gruczolaka pęcherzykowego (0/5) ani raka anaplastycznego tarczycy (0/2). Nie wykryto barwienia żadnego z 42 nowotworów złośliwych, w tym raka płaskokomórkowego (0/10), guzów wątroby (0/4), guzów jajnika (0/4), guzów jelita grubego (0/3), chłoniaków (0/3), guzów mózgu (0/2), guzów sutka (0/2), guzów żołądka (0/2), guzów trzustki (0/2), guzów płuc (0/2), guzów przerzutowych nieokreślonego pochodzenia (0/2), guzów nerek (0/2) i guzów prostaty (0/4). (Łączna liczba przypadków = 82).

Zaleca się stosowanie NCL-L-CALCITONIN w ramach panelu przeciwciał pomocniczo do określenia złośliwych nowotworów tarczycy.

Ograniczenia ogólne

Badanie immunohistochemiczne to wieloetapowy proces diagnostyczny, który wymaga specjalistycznego szkolenia w zakresie doboru odpowiednich odczynników i tkanek, utrwalania i przetwarzania tkanek, przygotowywania preparatów immunohistochemicznych oraz interpretacji wyników barwienia.

Barwienie tkanek zależy od postępowania z tkanką i jej przetwarzania przed barwieniem. Nieprawidłowe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, podgrzewanie, ścinanie skrawków lub skażenie innymi tkankami lub płynami może powodować artefakty, zatrzymywanie przeciwciał lub wyniki fałszywie negatywne. Niespójne wyniki mogą wynikać z różnic w metodach utrwalania i zatapiania lub nieprawidłowości związanej z tkanką⁴

Nadmierne lub niepełne barwienie kontrastowe może negatywnie wpływać na właściwą interpretację wyników.

Kliniczną interpretację barwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. Ocenę powinien przeprowadzić wykwalifikowany patolog w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych.

Przeciwciała firmy Leica Biosystems Newcastle Ltd są przeznaczone do stosowania zgodnie z przeznaczeniem na skrawkach zamrożonych lub na skrawkach zatopionych w parafinie i po spełnieniu określonych wymagań utrwalaania. Może wystąpić nieoczekiwana ekspresja antygenu, szczególnie w przypadku nowotworów. Interpretacja kliniczna wybarwionych skrawków musi obejmować analizę morfologiczną oraz ocenę przeprowadzoną w ramach odpowiednich kontroli.

Piśmiennictwo - ogólne

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. Clinical Endocrinology. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. International Journal of Experimental Pathology. 2000; 81:405–422.

Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Nie dotyczy

Data publikacji

15 lipca 2019

Metodyka immunohistochemiczna do stosowania przeciwciał Novocastra™ w tkance zatopionej w parafinie z wykorzystaniem trawienia Enzyme Proteinase K.

A. Odczynniki wymagane, lecz niedostarczane

1. Standardowe rozpuszczalniki stosowane w immunohistochemii.
2. 50 mM roztworu soli fizjologicznej buforowanego odczynnikiem Tris (TBS) pH 7.6.
3. Roztwór enzymu (zob. C. **Roztwór enzymu**).
4. Rozcieńczalnik do przeciwciał, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. System wizualizacji, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 testów), RE7150-K (500 testów), RE7140-K (250 testów) lub RE7290-K (50 testów).
6. Środek do zamykania preparatów mikroskopowych - należy zastosować zgodnie z zaleceniami producenta.

B. Sprzęt wymagany, lecz niedostarczany

1. Inkubator ustawiony na 25°C.
2. Ogólne wyposażenie laboratorium immunohistochemicznego.

C. Roztwór enzymu (zob. Zalecenia dotyczące stosowania)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K.

D. Metodologia

Przed przystąpieniem do działań w ramach niniejszej metodologii użytkownik powinien zostać przeszkolony w zakresie technik immunohistochemicznych.

Użytkownicy powinni określić optymalne rozcieńczenia dla przeciwciał. O ile nie wskazano inaczej, wszystkie etapy należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej (25°C).

1. Ściąć i zamknąć skrawki na szkiełkach pokrytych odpowiednim klejem tkankowym.
2. Odparafinować skrawki w ksylenie lub zamiennikach ksylenu.
3. Ponownie nawodnić, używając malejącego szeregu alkoholi.
4. Wypłukać preparaty w bieżącej wodzie z kranu.

Przygotować skrawki w następujący sposób:

5. Przepłukać preparaty w dejonizowanej wodzie.
6. Inkubować w Enzyme Proteinase K w temperaturze 25°C przez 5 minut (lub inny czas określony w **Zaleceniach dotyczących stosowania**).
7. Przemycić w TBS.
8. Należy postępować zgodnie z protokołem IHC określonym w Instrukcji dołączonej przez producenta dotyczącej przeciwciała pierwszorzędowego i systemu wykrywania.

E. Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Nie dotyczy.

F. Data publikacji

17 listopada 2009 r. (CEprotocol/Proteinase K).

Tekoče mišje monoklonsko protitelo Novocastra™

Calcitonin

Koda izdelka: NCL-L-CALCITONIN

Predvidena uporaba

Za *diagnostično uporabo in vitro*.

Izdelek NCL-L-CALCITONIN je namenjen za kvalitativno identifikacijo molekul kalcitonina v parafinskih rezinah s pomočjo svetlobne mikroskopije.

Klinično razlago obarvanja ali odsotnosti le-tega morajo dopolnjevati morfološke študije ustreznih kontrolnih vzorcev, ki jih v okviru klinične anamneze bolnika in drugih diagnostičnih testov oceni usposobljen patolog.

Načelo postopka

Imunohistokemijske (IHC) tehnike barvanja omogočajo vizualizacijo antigenov z izvajanjem zaporednega nanosa - z vmesnimi koraki izpiranja - specifičnega protitelesa na antigen (primarno protitelo), sekundarnega protitelesa na primarno protitelo in encimskega kompleksa s kromogenim substratom. Encimska aktivacija kromogena povzroči vidno reakcijo izdelka na mestu antigena. Tak vzorec lahko nato nasprotno barvamo in pokrijemo s krovnim stekelcem. Rezultate nato obdelamo s pomočjo svetlobnega mikroskopa in jih uporabimo pri diferencialni diagnozi patološko-fizioloških procesov, ki so morda povezani z določenim antigenom ali pa tudi ne.

Klon

CL1948

Imunogen

Prokarionski rekombinantni fuzijski protein, ki vsebuje 32 aminokislin, ki ustrezajo molekuli zrelega človeškega kalcitonina.

Specifičnost

Človeški kalcitonin.

Sestava reagenta

NCL-L-CALCITONIN je tekočinski supernatant kulture tkiva in vsebuje 15 mM natrijev azid kot konzervans.

Razred Ig

IgG2b

Skupna koncentracija beljakovin

Total Protein

1,0–8,0 g/l. Skupna koncentracija beljakovin v določeni seriji je navedena na oznaki na viali.

Koncentracija protiteles

Višja ali enaka 29 mg/l, določena s testom ELISA. Za specifično koncentracijo Ig v seriji glejte oznako na viali.

Priporočila za uporabo

Imunohistokemija (glejte poglavje **D. Metodologija**) parafinskih rezin. Encimsko pridobivanje epitopov (EIER). Upoštevajte navodila za uporabo izdelka Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K. Priporočena razredčitve: 1 : 200, 30 minut pri 25 °C.

To so samo smernice; uporabniki naj poiščejo svoje lastne najbolj učinkovite delovne razredčitve.

Vizualizacija. Upoštevajte navodila za uporabo sistema za zaznavanje polimerov Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 testov), RE7150–K (500 testov), RE7140–K (250 testov) ali RE7290–K (50 testov).

Shranjevanje in stabilnost

Hraniti pri temperaturi 2–8 °C. Ne zamrzujte. Takoj po uporabi ohladite na temperaturo 2–8 °C. Ne uporabljajte po datumu izteka roka uporabnosti, ki je naveden na oznaki na viali. Uporabnik naj preveri pogoje shranjevanja, ki se razlikujejo od zgoraj navedenih.

Priprava vzorcev

Priporočena fiksirna raztopina je 10-% formalin v nevtralnem pufru za tkivne rezine, vstavljene v parafin.

Opozorila in previdnostni ukrepi

Vir priprave tega reagenta je supernatant celične kulture. Ker je to biološki izdelek, je treba z njim ravnati z ustrežno skrbnostjo.

Molarnost natrijevega azida v tem reagentu je 15 mM. Varnostni list za natrijev azid je na voljo na zahtevo.

Sledite zveznim, državnim ali lokalnim predpisom za odstranjevanje katerih koli morebitno strupenih sestavin.

Z vzorci, pred fiksiranjem in po njem, in vsemi materiali, s katerimi so prišli v stik, morate rokovati, kot da bi lahko prenašali okužbe, in pri njihovem odstranjevanju slediti ustreznim previdnostnim ukrepom.¹ Nikoli ne pipetirajte reagentov skozi usta; pazite, da reagenti in vzorci ne pridejo v stik s kožo in sluznicami. Če reagenti ali vzorci pridejo v stik z občutljivimi deli, jih izperite z obilo vode.

Poiščite zdravniško pomoč.

Pazite, da ne pride do mikrobnih okužb reagentov, saj lahko povzroči nespecifično barvanje.

Če uporabite čas ali temperature inkubacije, ki se razlikujejo od navedenih, lahko pridobite napačne rezultate. Uporabnik mora validirati morebitne spremembe.

Kontrola kakovosti

Razlike pri obdelavi tkiva in tehničnih postopkih v laboratoriju uporabnika lahko vodijo do precejšnje variabilnosti rezultatov, kar zahteva redne interne kontrole učinkovitosti poleg spodaj navedenih postopkov.

Kontrolni vzorci morajo biti sveži vzorci, pridobljeni z obdukcijo/biopsijo/kirurškim posegom, fiksirani s formalinom, obdelani in shranjeni v parafinskem vosku kakor hitro je mogoče ter na isti način, kot vzorci bolnikov.

Pozitivni kontrolni vzorci tkiva

Uporabite jih za opredelitev pravilno pripravljenih tkiv in ustreznih tehnik barvanja.

Pri vsakem postopku barvanja morate vsakemu sklopu preizkusnih pogojev dodati en pozitiven kontrolni vzorec tkiva.

Za kar najboljšo kontrolo kakovosti in boljše zaznavanje manjših stopenj razkroja reagenta je bolj primerno uporabiti tkivo s šibkim pozitivnim obarvanjem kot tkivo z močnim pozitivnim obarvanjem.²

Za pozitivni kontrolni vzorec tkiva priporočamo ščitnico (celice C).

Če pozitivni kontrolni vzorci tkiva ne pokažejo pozitivnega obarvanja, morate rezultate preizkusnih vzorcev zavreči kot neveljavne.

Negativni kontrolni vzorci tkiva

Pregledati jih morate po pregledu pozitivnih kontrolnih vzorcev tkiva, da preverite specifičnost oznake ciljnega antigena glede na primarno protiteleso.

Za negativni kontrolni vzorec tkiva priporočamo tkivo malih možganov.

Drugače pa se kot negativni kontrolni vzorci pogosto uporablja vrsta različnih celic, ki so prisotne v večini rezin tkiv, vendar pa mora tako uporabo preveriti uporabnik.

Nespecifično barvanje, če je prisotno, je običajno razpršeno. Opazite lahko tudi posamično obarvanje vezivnega tkiva v rezinah tkiv, kot posledica premočnega fiksiranja s formalinom. Za razlago rezultatov obarvanja uporabite nespremenjene celice. Obarvanje nekrotičnih ali degeneriranih celic je pogosto nespecifično.³ Lažno pozitivni rezultati se lahko pojavijo zaradi ne-imunološke vezave proteinov ali produktov reakcije substrata. Povzročijo jih lahko tudi endogeni encimi, kot so psevdoperoksidaza (eritrociti), endogena peroksidaza (citokromni C) ali endogeni biotin (npr. jetra, dojke, možgani, ledvice), odvisno od vrste uporabljenega imunskega barvila. Za razlikovanje med endogeno aktivnostjo encimov ali nespecifično vezavo encimov zaradi specifične imunske reaktivnosti, lahko barvate dodatna tkiva bolnika izključno ali s kromogenim substratom ali encimskimi kompleksi (avidin-biotin, streptavidin, označeni polimer) in kromogenim substratom. Če pride do specifičnega obarvanja negativnih kontrolnih vzorcev tkiva, morate rezultate vzorcev bolnika zavreči kot neveljavne.

Negativni kontrolni reagent

Za oceno nespecifičnega barvanja in boljšo razlago specifičnega obarvanja na antigenem mestu uporabite nespecifični negativni kontrolni reagent namesto primarnega protitelesa z eno rezino vsakega vzorca bolnika.

Bolnikovo tkivo

Nazadnje preglejte bolnikove vzorce, obarvane z izdelkom NCL-L-CALCITONIN. Intenzivnost pozitivnega obarvanja ocenite v okviru morebitnega nespecifičnega obarvanja ozadja z negativnim kontrolnim reagentom. Tako kot pri vseh imunohistokemijskih preizkusih negativen rezultat pomeni, da antigen ni bil zaznan, ne pa odsotnosti antigena v testiranih celicah/tkivih. Po potrebi uporabite nabor protiteles za opredelitev napačnih negativnih reakcij.

Pričakovani rezultati

Normalna tkiva

Klon CL1948 je zaznal protein kalcitonin v citoplazmi celic C ščitnice. Šibko izražajo so zaznali tudi v tubulih ledvic. (Skupno število primerov = 33).

Neormalna tkiva

Klon CL1948 je zaznal protein kalcitonin pri 8/40 ocenjenih tumorjev ščitnice, vključno z 8/8 medularnih tumorjev ščitnice. Obarvanja niso opazili pri papilarnem karcinomu ščitnice (0/13), folikularnem karcinomu ščitnice (0/7), adenomatozni hiperplaziji (0/5), folikularnem adenomu (0/5) ali anaplastičnem karcinomu ščitnice (0/2). Obarvanja niso opazili pri nobeni izmed 42 neščitničnih malignosti, ki so vključevale ploščatocelične karcinome (0/10), jetrne tumorje (0/4), tumorje jajčnikov (0/4), kolorektalne tumorje (0/3), limfome (0/3), možganske tumorje (0/2), tumorje dojke (0/2), želodčne tumorje (0/2), tumorje trebušne slinavke (0/2), pljučne tumorje (0/2), nespecificirane metastatske tumorje (0/2), ledvične tumorje (0/2) in tumorje prostate (0/4). (Skupno število primerov = 82).

NCL-L-CALCITONIN je priporočljiv za uporabo kot del nabora protiteles za pomoč pri opredelitvi malignosti ščitnice.

Splošne omejitve

Imunohistokemija je diagnostični postopek z več koraki, ki zahteva specializirano usposabljanje za izbiro ustreznih reagentov, izbiro, fiksiranje in obdelavo tkiv, pripravo IHC preparata in razlago rezultatov obarvanja.

Obarvanje tkiva je odvisno od rokovanja s tkivom in njegovo obdelavo pred barvanjem. Nepravilno fiksiranje, zamrzovanje, odtajanje, izpiranje, sušenje, segrevanje, rezanje ali okužba z drugimi tkivi ali tekočinami lahko povzročijo nastanek artefaktov, lovljenje protitelesa ali lažne negativne rezultate. Nedosledni rezultati so lahko posledica razlik pri metodah fiksiranja in priprave ali pa so del nepravilnosti tkiva samega.⁴ Prekomerno ali nepopolno nasprotno barvanje lahko neugodno vpliva na pravilno tolmačenje rezultatov.

Klinično razlago obarvanja ali odsotnosti le-tega morajo dopolnjevati morfološke študije ustreznih kontrolnih vzorcev, ki jih v okviru klinične anamneze bolnika in drugih diagnostičnih testov ocenijo usposobljeni patologi.

Protitelesa podjetja Leica Biosystems Newcastle Ltd so namenjena uporabi, kot je navedeno, na zamrznjenih ali parafinsko obdelanih rezinah z določeni zahtevami za fiksiranje. Lahko pride do nepričakovanega izražanja antigena, zlasti pri neoplazmah. Pri klinični razlagi obarvane rezine tkiva morate upoštevati morfološko analizo in oceno ustreznih kontrol.

Splošna literatura

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. Clinical Endocrinology. 2004; 61:299-310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2001; 1(4):299-305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. International Journal of Experimental Pathology. 2000; 81:405-422.

Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji

Ni primerno

Datum izdaje

15 julij 2019

Imunohistokemijska metodologija za uporabo protitelesa Novocastra™ pri tkivu, vstavljenem v parafin, z uporabo prebavnega encima proteinaza K.

A. Potrebni reagenti, ki niso priloženi

1. Standardna topila, ki se uporabljajo v imunohistokemiji.
2. Fiziološka raztopina s 50 mM pufru tris (TBS), pH 7,6.
3. Raztopina encima (glejte točko C. **Raztopina encima**).
4. Redčilo za protitelesa, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Sistem za vizualizacijo, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1250 testov), RE7150–K (500 testov), RE7140–K (250 testov) ali RE7290–K (50 testov).
6. Medij za pritrjevanje – uporabljajte skladno s priporočili izdelovalca.

B. Potrebna oprema, ki ni priložena

1. Inkubator nastavljen na 25 °C.
2. Splošna oprema za imunohistokemijski laboratorij.

C. Raztopina encima (glejte Priporočila za uporabo)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K.

D. Metodologija

Preden uporabniki začnejo uporabljati to metodologijo, morajo biti usposobljeni za delo z imunohistokemijskimi tehnikami.

Uporabniki morajo sami določiti optimalne razredčitve protiteles. Vse korake izvajajte pri sobni temperaturi (25 °C), razen če je navedeno drugače.

1. Odrežite in namestite rezine na objektna stekelca, prevlečena z ustreznim lepilom za tkivo.
 2. Odstranite parafin iz rezin s ksilenom ali nadomestkom za ksilen.
 3. Rehidrirajte skozi vrsto raztopin alkohola.
 4. Izperite preparate pod tekočo vodo.
- Predhodno obdelajte rezine na naslednji način:
5. Preparate operite v deionizirani vodi.
 6. Encim proteinaza K inkubirajte 5 minut pri 25 °C (ali uporabite drug čas, če je tako navedeno v **priporočilih za uporabo**).
 7. Izperite s TBS.
 8. Nadaljujte s protokolom IHC v skladu z navodili izdelovalca primarnega protitelesa in sistema za zaznavanje.

E. Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji

Navedba smiselno ni potrebna.

F. Datum izdaje

17. november 2009 (CEprotocol/Proteinase K).

Novocastra™ Tekutá myší monoklonální protilátka

Calcitonin

Kód výrobku: NCL-L-CALCITONIN

Zamýšlené použití

Pro diagnostické použití in vitro.

NCL-L-CALCITONIN je určena ke kvalitativnímu stanovení molekul calcitoninu světelnou mikroskopií na parafinových řezech.

Klinickou interpretaci jakéhokoli barvení nebo jeho nepřítomnosti je nutné doplnit morfologickým vyšetřením s použitím správných kontrol a zhodnotit je musí kvalifikovaný patolog v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a jinými diagnostickými testy.

Princip metody

Imunohistochemické (IHC) barvicí techniky umožňují vizualizaci antigenů pomocí sekvenční aplikace specifické protilátky proti antigenu (primární protilátka), sekundární protilátky proti primární protilátce a enzymového komplexu s chromogenním substrátem s interponovanými omývacími kroky. Enzymatická aktivace chromogenu má za následek viditelnou reakci produktu v místě antigenu. Vzorek pak může být kontrastně nabarven a překryt krycím sklíčkem. Výsledky se interpretují ve světlém mikroskopu; jsou pomůckou v diferenciální diagnostice patofyziologických procesů, které mohou, ale nemusí, souviset s příslušným antigenem.

Klon

CL1948

Imunogen

Prokaryotický rekombinantní fúzní protein obsahující 32 aminokyselin odpovídajících zralé molekule lidského calcitoninu.

Specifita

Lidský calcitonin.

Složení reagentie

NCL-L-CALCITONIN je tekutý supernatant z tkáňové kultury obsahující jako konzervační prostředek 15 mM roztok azidu sodného.

Třída Ig

IgG2b

Koncentrace celkového proteinu

Total Protein

1,0–8,0 g/l. Koncentrace celkového proteinu specifická pro šarži je uvedena na štítku na lahvičce.

Koncentrace protilátek

29 mg/l nebo vyšší, stanovená metodou ELISA. Koncentrace imunoglobulinu (Ig) specifická pro šarži je uvedena na štítku na lahvičce.

Doporučení k použití

Imunohistochemické vyšetření (viz **D. Metodika**) na parafinových řezech. Enzymy indukované odmaskování epitopu (Enzyme Induced Epitope Retrieval, EIER). Postupujte podle návodu k použití k roztoku Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160–K. Doporučené ředění: 1:200 po dobu 30 minut při 25 °C.

Toto doporučení je uvedeno jako vodítko; uživatelé musí stanovit vlastní optimální pracovní ředění.

Vizualizace. Postupujte podle návodu k použití k systému Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280–K (1 250 tests), RE7150–K (500 tests), RE7140–K (250 tests) nebo RE7290–K (50 tests).

Skladování a stabilita

Uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Nezmrazujte. Okamžitě po použití vraťte do teploty 2–8 °C. Nepoužívejte po uplynutí data expirace uvedeného na štítku na lahvičce. Podmínky skladování jiné než výše uvedené musí uživatel validovat.

Příprava vzorku

Fixační roztok doporučený pro parafinové tkáňové řezy je 10% formalin pufovaný na neutrální pH.

Varování a bezpečnostní opatření

Tato reagentie byla připravena ze supernatantu z buněčné kultury. Protože jde o biologický produkt, je nutno manipulaci s ní věnovat náležitou pozornost.

Molarita azidu sodného v této reagentii je 15 mM. Bezpečnostní list materiálu (MSDS) pro azid sodný je k dispozici na vyžádání.

Údaje o likvidaci jakýchkoli potenciálně toxických komponent prostudujte ve federálních, státních nebo místních nařízeních.

Se vzorky, před fixací i po fixaci, a se všemi materiály jim vystavenými, je nutno zacházet, jako by mohly způsobit přenos infekce, a likvidovat je s náležitými bezpečnostními opatřeními.¹ Reagentie nikdy nepipetujte ústy a zabraňte styku reagentií a vzorků s kůží a sliznicemi. Pokud se reagentie nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody. Vyhleďte lékařskou pomoc.

Minimalizujte mikrobiální kontaminaci reagentií, mohlo by dojít ke zvýšení výskytu nespecifického barvení.

Inkubační doby nebo teploty jiné než předepsané mohou vést k chybným výsledkům. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

Kontrola jakosti

Rozdíly ve zpracování tkání a v technických postupech v laboratoři uživatele mohou způsobit významnou variabilitu výsledků, což vyžaduje kromě níže uvedených postupů i pravidelné provádění kontrol v laboratoři.

Kontroly musí být čerstvé pitevni/bioptické/operační vzorky co nejdříve fixované formálním, zpracované a zalité do parafinového vosku, stejným způsobem jako vzorek/vzorky pacienta.

Positivní tkáňová kontrola

Používá se k průkazu správně připravených tkání a správných barvicích technik.

V každém barvicím cyklu musí být použita jedna pozitivní tkáňová kontrola pro každý soubor testovacích podmínek.

Pro optimální kontrolu jakosti a k detekci menšího stupně degradace reagenzie je vhodnější tkáň se slabým pozitivním barvením než tkáň se silným pozitivním barvením.²

Doporučená pozitivní tkáňová kontrola je štítná žláza (C buňky).

Pokud pozitivní tkáňová kontrola nevykazuje pozitivní barvení, musí být výsledky testovaných vzorků považovány za neplatné.

Negativní tkáňová kontrola

Musi být vyšetřena po pozitivní tkáňové kontrole k ověření specificity označení cílového antigenu primární protilátkou.

Doporučená negativní tkáňová kontrola je mozeček.

Alternativně často představuje místa negativní kontroly řada různých typů buněk přítomných ve většině tkáňových řezů, to ale musí uživatel validovat.

Nespecifické barvení, je-li přítomno, má obvykle difúzní vzhled. V řezech ze tkání nadměrně fixovaných formálním může být také zjištěno sporadické barvení pojivové tkáně. K interpretaci výsledků barvení použijte neporušené buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky se často barví nespecificky.³ Falešně pozitivní výsledky mohou být důsledkem imunologické vazby proteinů nebo produktů reakčního substrátu. Mohou být také způsobeny endogenními enzymy, jako je např. pseudoperoxidáza (erythrocyty), endogenní peroxidáza (cytochrom C) nebo endogenní biotin (např. játra, prs, mozek, ledviny), podle typu použitého imunobarviva. K odlišení aktivity endogenních enzymů či nespecifické vazby enzymů od specifické imunoreaktivity mohou být barveny další tkáň pacienta vylučně chromogenním substrátem, případně enzymovými komplexy (avidin-biotin, streptavidin, značený polymer) a chromogenním substrátem. Pokud dojde v negativní tkáňové kontrole ke specifickému barvení, musí být výsledky vzorků pacienta považovány za neplatné.

Negativní reagenční kontrola

K vyhodnocení nespecifického barvení a umožnění lepší interpretace specifického barvení v místě antigenu použijte na řezu z každého vzorku pacienta specifickou negativní reagenční kontrolu místo primární protilátky.

Tkáň pacienta

Nakonec vyšetřete vzorky pacienta barvené pomocí NCL-L-CALCITONIN. Intenzita pozitivního barvení musí být zhodnocena v kontextu se vším nespecifickým barvením pozadí u negativní reagenční kontroly. Jako u každého imunohistochemického vyšetření, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl zjištěn, nikoli, že antigen není ve vyšetřovaných buňkách/tkáňích přítomen. V případě potřeby použijte k identifikaci falešně negativních reakcí panel protilátek.

Očekávané výsledky

Normální tkáň

Klon CL1948 detekoval protein kalcitonin v cytoplasmě C buněk štítné žlázy. Expresce byla též slabě detekována v tubulech ledvin. (Celkový počet tkání = 33).

Abnormální tkáň

Klon CL1948 detekoval protein kalcitonin v 8/40 hodnocených nádorů štítné žlázy, včetně 8/8 nádorů dřeně štítné žlázy. Žádné barvení nebylo detekováno u papilárního karcinomu štítné žlázy (0/13), folikulárního karcinomu štítné žlázy (0/7), adenomatózní hyperplazie (0/5), folikulárního adenomu (0/5) nebo anaplastického karcinomu štítné žlázy (0/2). Barvení nebylo pozorováno u žádné ze 42 nethyroidních malignit, které zahrnovaly dlaždicobuněčné karcinomy (0/10), nádory jater (0/4), nádory vaječniku (0/4), kolorektální nádory (0/3), lymfomy (0/3), nádory mozku (0/2), nádory prsu (0/2), nádory žaludku (0/2), nádory pankreatu (0/2), nádory plic (0/2), nespecifické metastatické nádory (0/2), nádory ledvin (0/2) a nádory prostaty (0/4). (Celkový počet tkání = 82).

NCL-L-CALCITONIN se doporučuje použít jako součást panelu protilátek při charakterizaci malignit štítné žlázy.

Obecná omezení

Imunohistochemické vyšetření je vícekrokový diagnostický proces, který spočívá ve specializovaném školení ve výběru vhodných reagenzií; výběru, fixaci a zpracování tkání; přípravě imunohistochemického sklíčka; a v interpretaci výsledků barvení. Barvení tkáně závisí na manipulaci s tkání a jejím zpracování před barvením. Nesprávným postupem při fixaci, zmrazení, rozmrazení, omývání, sušení, zahřívání, krájení řezů nebo kontaminací jinými tkáněmi či tekutinami mohou vzniknout artefakty, může dojít k vychytávání protilátek nebo k falešně negativním výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem odchylek ve fixačních metodách a metodách zalití v konzervačním médiu, nebo přirozených odchylek ve tkáni.⁴

Nadměrné nebo nedostatečné kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.

Klinickou interpretaci jakéhokoliv barvení nebo jeho nepřítomnosti je nutné doplnit morfologickým vyšetřením s použitím správných kontrol a zhodnotit je musí kvalifikovaný patolog v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a jinými diagnostickými testy.

Protilátky společnosti Leica Biosystems Newcastle Ltd se používají, jak bylo uvedeno, u zmrazených nebo u parafinových řezů se specifickými požadavky na fixaci. Může dojít k expresi neočekávaných antigenů, zejména u nádorů. Klinická interpretace jakéhokoliv barveného tkáňového řezu musí zahrnovat morfologickou analýzu a zhodnocení příslušných kontrol.

Literatura – všeobecná

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology*. 2000; 81:405–422.

Opravy předchozího vydání

Nevztahuje se

Datum vydání

15 červenec 2019

Imunohistochemická metodika při použití protilátek Novocastra™ u tkáně zalité v parafínu s použitím digesce enzymu Proteinázy K

A. Potřebné reagensie, které nejsou součástí dodávky

1. Standardní rozpouštědla používaná v imunohistochemii.
2. Fyziologický roztok pufovaný 50mM roztokem tris-pufu (TBS), pH 7,6.
3. Roztok enzymu (viz C. **Roztok enzymu**).
4. Ředící roztok na protilátky, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Vizualizační systém, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1 250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) nebo RE7290-K (50 tests).
6. Fixační médium – použijte podle doporučení výrobce.

B. Potřebné vybavení, které není dodáno

1. Inkubátor nastavený na 25 °C.
2. Obecné vybavení imunohistochemické laboratoře.

C. Roztok enzymu (viz Doporučení k použití)

Enzym proteináza K (IHC), RE7160-K.

D. Metodika

Než uživatelé přistoupí k této metodice, musí být proškoleni v imunohistochemických technikách.

Uživatelé musí stanovit optimální ředění pro protilátky. Pokud není uvedeno jinak, provádějí se všechny kroky při pokojové teplotě (25 °C).

1. Řezy nakrájejte a namontujte na podložní sklíčka potažená vhodným tkáňovým lepidlem.
2. Řezy deparafinujte xylenem nebo látkou nahrazující xylen.
3. Rehydratujte alkoholem v odstupňované koncentraci.
4. Sklíčka omyjte tekoucí vodou z vodovodu.

Řezy předběžně zpracujte takto:

5. Sklíčka omyjte deionizovanou vodou.
6. Inkubujte v roztoku při teplotě 25 °C po dobu 5 minut (nebo jinou dobu, pokud je tak stanoveno v **Doporučení k použití**).
7. Omyjte v TBS.
8. Postupujte podle imunohistochemického protokolu v souladu s návodem k použití pro primární protilátku a detekční systém od výrobce.

E. Opravy předchozího vydání

Nevztahuje se.

F. Datum vydání

17. listopadu 2009 (CEprotocol/Proteinase K).

Tekutá myšia monoklonálna protilátka Novocastra™

Calcitonin

Kód produktu: NCL-L-CALCITONIN

Zamýšľané použitie

Na diagnostické použitie *in vitro*.

NCL-L-CALCITONIN slúži na kvalitatívnu identifikáciu molekúl kalcitonínu v parafínových rezoch pomocou svetelnej mikroskopie. Klinická interpretácia akéhokoľvek farbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými vyšetreniami za použitia zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a iných diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.

Princíp postupu

Techniky imunohistochemického (IHC) zafarbenia umožňujú vizualizáciu antigénov sekvenčnou aplikáciou špecifickej protilátky proti antigénu (primárna protilátka), sekundárnej protilátky proti primárnej protilátke a enzymatického komplexu s chromogénnym substrátom. Medzi jednotlivými krokmi prebieha premývanie. Enzymatická aktivácia chromogénu vytvára v mieste antigénu viditeľné produkty reakcie.

Môžete doplniť kontrastné zafarbenie vzorky a zakryť ju krycím sklíčkom. Výsledky sa interpretujú pomocou svetelného mikroskopu a napomáhajú pri diferenciálnej diagnostike patofyziologických procesov, ktoré môžu, ale nemusia byť spojené s určitým antigénom.

Klon

CL1948

Imunogén

Prokaryotický rekombinantný fúzny proteín obsahujúci 32 aminokyselín zodpovedajúci zrelej molekule ľudského kalcitonínu.

Špecificita

Ľudský kalcitonín.

Zloženie činidla

NCL-L-CALCITONIN je tekutý supernatant na tkanivovú kultiváciu obsahujúci 15 mM azidu sodného ako konzervačnej látky.

Trieda Ig

IgG2b

Celková koncentrácia proteínov

Total Protein

1,0 – 8,0 g/l. Celkovú koncentráciu proteínov špecifickú pre šaržu nájdete na štítku fľaštičky.

Koncentrácia protilátok

Vyššia alebo rovná 29 mg/l podľa ELISA. Koncentráciu Ig špecifickú pre šaržu nájdete na štítku fľaštičky.

Odporúčania na použitie

Imunohistochemia (pozri časť **D. Metóda**) parafínových rezov. Záchyt epitopov s enzymatickou indukciou (EIER). Postupujte podľa návodu na použitie systému Novocastra Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K. Odporúčané riedenie: 1 : 200 po dobu 30 minút pri teplote 25 °C.

Táto hodnota je orientačná, používatelia si musia stanoviť svoje vlastné optimálne pracovné riedenia.

Vizualizácia. Postupujte podľa návodu na použitie pre systémy Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 testov), RE7150-K (500 testov), RE7140-K (250 testov) alebo RE7290-K (50 testov).

Uskladnenie a stabilita

Skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Nezmrazujte. Okamžite po použití vráťte do teploty 2 – 8 °C. Nepoužívajte po uplynutí dátumu expirácie uvedeného na štítku fľaštičky. Iné než vyššie uvedené podmienky skladovania si vyžadujú validáciu používateľom.

Príprava vzorky

Odporúčaný ustaľovač je 10 % neutrálny pufrovaný formalín pre bločky tkaniva zaliate do parafínu.

Varovania a bezpečnostné opatrenia

Toto činidlo bolo pripravené zo supernatantu bunkovej kultúry. Keďže ide o biologický produkt, pri manipulácii je nutné vynaložiť zodpovedajúcu starostlivosť.

Molarita azidu sodného v tomto činidle je 15 mM. Materiálový bezpečnostný list (MSDS) k azidu sodnému je k dispozícii na požiadanie.

Likvidáciu prípadných potenciálne toxických súčastí definujú federálne, štátne alebo miestne predpisy.

So vzorkami pred fixáciou a po nej a všetkými materiálmi, ktoré s nimi prišli do kontaktu, je nutné manipulovať ako s potenciálne infekčnými a zlikvidovať ich pri dodržaní zodpovedajúcich bezpečnostných opatrení.¹ Činidlá nikdy nepipetujte ústami a zabráňte kontaktu činidiel a vzoriek s kožou a sliznicami. Ak sa činidlá alebo vzorky dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, umyte ich veľkým množstvom vody.

Vyhľadajte lekársku pomoc.

Minimalizujte mikrobiálnu kontamináciu činidiel. V opačnom prípade môže dôjsť k zvýšeniu nešpecifického zafarbenia.

Nedodržanie predpísaných inkubačných dôb alebo teplôt môže viesť k nesprávnym výsledkom. Všetky takéto zmeny si vyžadujú validáciu používateľom.

Kontrola kvality

Rozdiely v spracovaní tkaniva a technických postupoch v laboratóriu používateľa môžu viesť k významnému kolísaniu výsledkov, čo si vyžaduje, okrem nasledujúcich postupov, aj pravidelné interné kontroly.

Kontroly by mali byť čerstvé pitevné/bioptické/chirurgické vzorky fixované čo najskôr formálnom a spracované zaliatím do parafínu rovnakým spôsobom ako vzorky pacienta.

Positívna kontrola tkanivom

Identifikuje správne pripravené tkanivá a správne techniky zafarbenia.

Každá súprava testových podmienok v každom cykle zafarbenia musí obsahovať jednu pozitívnu kontrolu tkanivom.

Tkanivo so slabým pozitívnym farbením je pre optimálnu kontrolu kvality a na detekciu slabšej degradácie činidla vhodnejšie než tkanivo so silným pozitívnym farbením.²

Odporúčané tkanivo na pozitívnu kontrolu je štítna žľaza (C-bunky).

Ak pozitívna kontrola tkanivom nebude vykazovať pozitívne zafarbenie, výsledky testovaných vzoriek je nutné považovať za neplatné.

Negatívna kontrola tkanivom

Nutné vyšetrieť po pozitívnej kontrole tkanivom s cieľom overiť špecificitu značenia cieľového antigénu primárnou protilátkou.

Odporúčané tkanivo na negatívnu kontrolu je mozoček.

Ako negatívnu kontrolu je možné použiť aj rôzne typy buniek prítomné vo väčšine tkanivových rezov, takýto postup si však vyžaduje validáciu používateľom.

Prípadné nešpecifické farbenie má obvykle difúzný vzhľad. V rezoch tkanív silne fixovaných formálnom môže byť pozorované sporadické farbenie spojiva. Na interpretáciu výsledkov farbenia používajte intaktné bunky. Nekrotické alebo degenerované bunky sa často farbja nešpecificky.³ Falošne pozitívne výsledky môžu byť pozorované v dôsledku neimunologickej väzby proteínov alebo produktov reakcie substrátu. Môžu byť spôsobené aj endogénnymi enzýmami, ako napr. pseudoperoxidázou (erytrocyty), endogénnou peroxidázou (cytochrom C) alebo endogénnym biotínom (napr. pečeň, prsník, mozog, oblička) v závislosti od typu imunologického farbenia. S cieľom diferencovať endogénnu enzymatickú aktivitu alebo nešpecifickú väzbu enzýmov od špecifickej imunoreaktivity môžete zafarbiť ďalšie vzorky tkanív pacienta výhradne substrátovým chromogénom alebo enzymatickými komplexmi (avidín-biotín, streptavidín, značený polymér),

resp. substrátovým chromogénom. V prípade špecifického farbenia v negatívnej kontrole tkanivom je nutné výsledky vzoriek pacienta považovať za neplatné.

Negatívna kontrola činidlom

Na vyhodnotenie nešpecifického zafarbenia použite nešpecifickú negatívnu kontrolu činidlom miesto primárnej protilátky s rezom jednotlivých vzoriek pacienta, čo umožní lepšiu interpretáciu špecifického farbenia na mieste antigénu.

Tkanivo pacienta

Pacientske vzorky zafarbené prípravkom NCL-L-CALCITONIN preskúmajte ako posledné. Intenzitu pozitívneho farbenia je nutné vyhodnotiť v kontexte prípadného nešpecifického zafarbenia negatívnej kontroly činidlom na pozadí. Podobne ako pri všetkých imunohistochemických testoch znamená negatívny výsledok, že antigén nebol detegovaný. Nepotvrzuje jeho absenciu v testovaných bunkách/tkanivách. V prípade potreby identifikujte falošne negatívne reakcie pomocou panelu protilátok.

Očakávaný výsledky

Normálne tkanivá

Klon CL1948 detegoval proteín kalcitonín v cytoplazme C-buniek štítnej žľazy. Slabá expresia bola detegovaná aj v obličkových kanálikoch. (Celkový počet prípadov = 33).

Abnormálne tkanivá

Klon CL1948 detegoval proteín kalcitonín pri 8/40 hodnotených nádorov štítnej žľazy vrátane 8/8 medulárnych nádorov štítnej žľazy. Nezistilo sa žiadne zafarbenie pri papilárnych karcinómoch štítnej žľazy (0/13), folikulárnych karcinómoch štítnej žľazy (0/7), adenomatóznej hyperplázii (0/5), folikulárnych adenómoch (0/5) ani pri anaplastických karcinómoch štítnej žľazy (0/2). Nezistilo sa žiadne zafarbenie pri žiadnej zo 42 netyroidálnych malignít, ktoré zahŕňali skvamocelulárne karcinómy (0/10), nádory pečene (0/4), nádory vaječníkov (0/4), kolorektálne nádory (0/3), lymfómy (0/3), nádory mozgu (0/2), nádory prsníkov (0/2), nádory žalúdka (0/2), nádory pankreasu (0/2), nádory pľúc (0/2), nešpecifikované metastatické nádory (0/2), nádory obličiek (0/2) a nádory prostaty (0/4). (Celkový počet prípadov = 82).

NCL-L-CALCITONIN sa odporúča ako súčasť panela protilátok na charakterizáciu tyroidálnych malignít.

Všeobecné limitácie

Imunohistochemia je diagnostický postup pozostávajúci z viacerých krokov, ktorý si vyžaduje špecializované zaškolenie vo výbere zodpovedajúcich činidiel, výbere tkanív, fixácie a spracovania, príprave IHC skĺbka a interpretácii výsledkov farbenia.

Farbenie tkaniva závisí od manipulácie s tkanivom a od jeho spracovania pred farbením. Nesprávna fixácia, zmrazovanie, rozmrazovanie, premývanie, sušenie, ohrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými tkanivami či tekutinami môžu viesť k vzniku artefaktov, zachytu protilátok alebo falošne negatívnym výsledkom. Inkonzistentné výsledky môžu byť spôsobené zmenami metód fixácie a montáže preparátov alebo inherentnými nepravidelnosťami v tkanive.⁴ Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže narušiť správnosť interpretácie výsledkov.

Klinická interpretácia akýchkoľvek farbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými vyšetreniami za použitia zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a iných diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.

Protilátky spoločnosti Leica Biosystems Newcastle Ltd sú určené na použitie na zmrazených rezoch alebo rezoch zaliatých parafínom so špecifickými požiadavkami na fixáciu, ako uvádza tento dokument. Najmä pri neopláziách môže dôjsť k nečakanej expresii antigénov. Klinická interpretácia akýchkoľvek farbených tkanivových rezov musí zahŕňať morfológickú analýzu a vyhodnotenie zodpovedajúcich kontrol.

Bibliografia – všeobecne

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29–P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio–Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, et al. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.
5. Leboulleux S, Baudin E, Travagli J et al. Medullary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology*. 2004; 61:299–310.
6. Hirsch P, Lester G, Talmage R. Calcitonin, an enigmatic hormone: does it have a function? *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. 2001; 1(4):299–305.
7. Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology*. 2000; 81:405–422.

Úpravy predchádzajúceho vydania

Neuplatňuje sa

Dátum vydania

15 júl 2019

Imunohistochemická metóda použitia protilátok Novocastra™ na tkanive zaliatom do parafínu s využitím digescie prípravkom Enzyme Proteinase K.

A. Požadované, ale nedodávané činidlá

1. Štandardné rozpúšťadlá používané v imunohistochemii
2. 50mM tris-pufrovaný fyziologický roztok (TBS), pH 7,6
3. Enzymový roztok (pozri časť C. **Enzymový roztok**).
4. Zriedčovací roztok protilátok, Novocastra IHC Diluent, RE7133.
5. Vizualizačný systém, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 testov), RE7150-K (500 testov), RE7140-K (250 testov) alebo RE7290-K (50 testov).
6. Upevňovacie médium – používajte podľa odporúčania výrobcu.

B. Požadované, ale nedodávané vybavenie

1. Inkubátor nastavený na teplotu na 25 °C.
2. Všeobecné vybavenie imunohistochemického laboratória

C. Enzymový roztok (pozri časť Odporúčania na použitie)

Enzyme Proteinase K (IHC), RE7160-K.

D. Metóda

Používatelia musia byť vyškolení v oblasti imunohistochemických techník skôr, než pristúpia k tejto metóde.

Používateľ musí stanoviť optimálne riedenie protilátok. Ak nie je uvedené inak, všetky kroky sa vykonávajú pri izbovej teplote (25 °C).

1. Rezy narežte a upevnite na sklíčka pokryté vhodnou vrstvou tkanivového lepidla.
2. Rezy deparafinizujte v xyléne alebo substitútoch xylénu.
3. Reehydratujte pomocou odstupňovaných alkoholov.
4. Sklíčka umyte pod tečúcou vodou z vodovodu.

Rezy predprípravte týmto spôsobom:

5. Sklíčka umyte v deionizovanej vode.
6. Inkubujte v prípravku Enzyme Proteinase K pri teplote 25 °C počas 5 minút (alebo iný čas, ako sa uvádza v časti **Odporúčania na použitie**).
7. Premyte v TBS.
8. Postupujte podľa protokolu IHC v súlade s návodom na použitie od výrobcu primárnej protilátky a detekčného systému.

E. Úpravy predchádzajúceho vydania

Neuplatňuje sa.

F. Dátum vydania

17. novembra 2009 (CE protokol/Proteinase K).

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



Leica Biosystems Canada
71 Four Valley Drive
Concord, Ontario L4K 4V8
Canada
☎ +1 800 248 0123

Leica Biosystems Inc
1700 Leider Lane
Buffalo Grove IL 60089
USA
☎ +1 800 248 0123

Leica Biosystems Melbourne
Pty Ltd
495 Blackburn Road
Mt Waverley VIC 3149
Australia
☎ +61 2 8870 3500