

# Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody Akt (Phosphorylated)

**Product Code: NCL-L-Akt-Phos**

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 Akt (Phosphorylated)

## Product Code: NCL-L-Akt-Phos

### Intended Use

*For in vitro diagnostic use.*

NCL-L-Akt-Phos is intended for the qualitative identification by light microscopy of Akt (Phosphorylated) 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

LP18.

### Immunogen

A chemically synthesized phosphorylated peptide corresponding to residues around Ser473 of the human Akt molecule.

### Specificity

Human Akt phosphorylated at Ser473.

### Reagent Composition

NCL-L-Akt-Phos 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 300 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

### Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **Methodology**) on paraffin sections. Suggested dilution: 1:50 for 30 minutes at 25 °C. Heat induced epitope retrieval using Epitope Retrieval Solution pH 6.0 (RE7113 or RE7114). This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions. **Technical note:** NCL-L-Akt-Phos is not recommended for use with PBS, since the use of PBS-based wash buffers and possibly PBS-based antibody diluents gives increased background staining and decreased staining intensity.

### 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 autopsies/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.<sup>2</sup>

Recommended positive control tissue is skin.

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. 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.<sup>3</sup> 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-Akt-Phos 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 LP18 detected the Phosphorylated form of the Akt protein expressed in the nucleus and cytoplasm of cells of a variety of tissues (n=56). Expression was detected in colon, small bowel, cerebellum, kidney, adrenal gland, pancreas, lung, liver, stomach, esophagus, skin, skeletal muscle, spleen, heart, ovary, cervix, uterus, testis, prostate, thymus, salivary gland, thyroid, parathyroid, breast, pituitary gland, tonsil, bone marrow, mesothelium and aorta.

### Abnormal Tissues

Clone LP18 detected the Phosphorylated form of the Akt protein in 289/301 tumors evaluated including 80/85 prostate tumors, 67/67 breast tumors, 29/30 lung tumors, 13/14 ovarian tumors, 11/11 squamous cell carcinomas, 10/10 sarcomas, 10/10 thyroid tumors, 9/9 colon tumors, 7/7 liver tumors, 6/8 melanomas, 6/6 kidney tumors, 6/6 lymphomas, 5/5 stomach tumors, 4/4 neuroendocrine tumors, 4/4 pancreatic tumors, 3/4 adrenal tumors, 3/4 benign prostatic hyperplasia, 3/4 endometrial tumors, 3/3 neural tumors, 3/3 germ cell tumors, 3/3 bladder tumors, 2/2 skin tumors, 1/1 small bowel tumors and 1/1 thymus tumors.

**NCL-L-Akt-Phos is recommended for use in detecting expression of the phosphorylated form of the Akt protein in normal and neoplastic tissues.**

## 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.<sup>4</sup> 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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in Biochemical Sciences*. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Science*. 2001; 114:2903–2910.

## **Amendments to Previous Issue**

Not Applicable.

## **Date of Issue**

30 April 2019

# Immunohistochemical Methodology For Novocastra™ Antibodies On Paraffin-Embedded Tissue Utilizing The Heat Induced Epitope Retrieval Technique.

## Reagents Required but not Supplied

1. Standard solvents used in immunohistochemistry.
2. 50 mM Tris-Buffered Saline (TBS) pH 7.6.
3. Epitope Retrieval Solution (see C. Epitope Retrieval Solutions).
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.

## Equipment Required but not Supplied

1. Incubator set to 25 °C.
2. Heating device for epitope retrieval: water bath, steamer, pressure cooker or other temperature controlled laboratory equipment.
3. General immunohistochemistry laboratory equipment.

## Epitope Retrieval Solutions (see Recommendations on Use for one of the following)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Citrate-based buffer containing surfactant   |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | EDTA-based buffer containing surfactant      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tris/EDTA-based buffer containing surfactant |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## 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).

#### Epitope Retrieval

Please follow the instructions for use in Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 or RE7122.

#### 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).

## Amendments to Previous Issue

Not applicable

## Date of Issue

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Anticorps Monoclonal liquide de Souris Akt (Phosphorylated) Référence du Produit: NCL-L-Akt-Phos

## Utilisation Prévue

*Diagnostic in vitro.*

Le NCL-L-Akt-Phos est destiné à l'identification qualitative par microscopie optique de la molécule Akt (phosphorylée) 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

LP18.

## Immunogène

Peptide phosphorylé synthétisé chimiquement correspondant aux résidus voisins de la Ser473 de la molécule d'Akt humaine (phosphorylée).

## Spécificité

Akt humaine phosphorylée en position Ser473.

## Composition du Réactif

Le NCL-L-Akt-Phos 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 300 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 **Méthodologie**) sur des coupes en paraffine. Dilution préconisée : 1:50 pendant 30 minutes à 25 °C. Restauration de l'épitope induite par la chaleur à l'aide de Epitope Retrieval Solution pH 6,0 (RE7113 ou RE7114). Ceci n'est donné qu'à titre indicatif et les utilisateurs doivent déterminer leurs propres dilutions de travail optimales. Remarque technique: L'utilisation du NCL-L-Akt-Phos n'est pas recommandée avec le PBS, car l'emploi de tampons de lavage et de diluants d'anticorps à base de PBS conduit à une augmentation du bruit de fond de marquage et à une diminution de l'intensité du marquage.

## 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 appropriées<sup>1</sup>. 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.<sup>2</sup>

Le tissu de contrôle positif recommandé est peau.

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. 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 fixés 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.<sup>3</sup> 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-Akt-Phos 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 LP18 a détecté la forme phosphorylée de la protéine Akt exprimée dans le noyau et le cytoplasme des cellules de divers tissus (n=56). Une expression a été détectée dans le côlon, l'intestin grêle, le cerveau, le rein, les surrénales, le pancréas, le poumon, le foie, l'estomac, l'œsophage, la peau, les muscles squelettiques, la rate, le cœur, les ovaires, le col de l'utérus, l'utérus, les testicules, la prostate, le thymus, les glandes salivaires, la thyroïde, la parathyroïde, le sein, l'hypophyse, les amygdales, la moelle osseuse, le mésothéliome et l'aorte.

#### Tissus tumoraux

Le clone LP18 a détecté la forme phosphorylée de la protéine Akt dans 289 tumeurs évaluées sur 301 dont des tumeurs de la prostate (80/85), des tumeurs mammaires (67/67), des tumeurs du poumon (29/30), des tumeurs ovariennes (13/14), des carcinomes des cellules squameuses (11/11), des sarcomes (10/10), des tumeurs de la thyroïde (10/10), des tumeurs du côlon (9/9), des tumeurs du foie (7/7), des mélanomes (6/8), des tumeurs du rein (6/6), des lymphomes (6/6), des tumeurs de l'estomac (5/5), des tumeurs neuroendocrines (4/4), des tumeurs pancréatiques (4/4), des tumeurs des glandes surrénales (3/4), des hyperplasies bénignes de la prostate (3/4), des tumeurs endométriales (3/4), des tumeurs neurales (3/3), des tumeurs des cellules germinales (3/3), des tumeurs de la vessie (3/3), des tumeurs de la peau (2/2), une tumeur de l'intestin grêle (1/1) et une tumeur du thymus (1/1).

**L'utilisation du NCL-L-Akt-Phos est recommandée pour la détection de l'expression de la forme phosphorylée de la protéine Akt dans les tissus normaux et néoplasiques.**

### **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.<sup>4</sup>

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 antigénique 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.

## **Bibliographie Générale**

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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in Biochemical Sciences*. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Science*. 2001; 114:2903–2910.

## **Amendements Apportés à la Version Précédente**

Non applicable.

## **Date de Publication**

30 avril 2019

# Méthodologie immunohistochimique d'utilisation des anticorps Novocastra™ sur les tissus inclus en paraffine à l'aide de la technique de restauration de l'épitope par la chaleur.

## Réactifs nécessaires mais non fournis

1. Solvants standard utilisés en immunohistochimie.
2. Solution saline tamponnée de Tris (TBS) 50 mM, pH 7,6.
3. Solution de restauration de l'épitope (voir section C Solutions de restauration de l'épitope).
4. Diluant anticorps, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Système de révélation, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ou RE7290-K (50 tests).
6. Milieu de montage - utiliser selon les recommandations du fabricant.

## Equipements nécessaires mais non fournis

1. Incubateur réglé à 25 °C.
2. Dispositif de chauffage pour restauration de l'épitope : bain-marie ou four à vapeur, autocuiseur ou tout autre appareil de laboratoire à température contrôlée.
3. Équipements généraux de laboratoire d'immunohistochimie..

## Solutions de restauration de l'épitope (voir Recommandations d'utilisation pour l'une des solutions suivantes)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampon citrate contenant un surfactant   |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampon EDTA contenant un surfactant      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampon Tris/EDTA contenant un surfactant |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## 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).

#### Restauration de l'épitope

Veuillez respecter le mode d'emploi des Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

#### Révélation

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

## Amendements apportés à la version précédente

Non applicable.

## Date de publication

23 avril 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Anticorpo Monoclonale Murino Liquido

## Akt (Phosphorylated)

### Codice Del Prodotto: NCL-L-Akt-Phos

#### Uso Previsto

Per uso diagnostico in vitro.

NCL-L-Akt-Phos è destinato all'identificazione qualitativa in microscopia ottica della molecole Akt (fosforilata), 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 immunocitochimica (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

LP18.

#### Immunogeno

Peptide fosforilato di sintesi chimica, corrispondente a residui attorno al Ser473 della molecola Akt (fosforilata) umana.

#### Specificità

Akt umana fosforilata al Ser473.

#### Composizione Del Reagente

NCL-L-Akt-Phos 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 300 mg/L, come determinato mediante test ELISA. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione di Ig specifica del lotto.

#### Raccomandazioni Per L'uso

Immunocitochimica (vedere **Metodologia**) sulle sezioni in paraffina. Diluizione raccomandata: 1:50 per 30 minuti a 25 °C. Smascheramento ad alta temperatura dell'epitopo mediante Epitope Retrieval Solution pH 6,0 (RE7113 o RE7114). Queste raccomandazioni costituiscono delle semplici linee guida; spetta al singolo utente stabilire la diluizione di lavoro ottimale. **Nota tecnica:** Non si raccomanda NCL-L-Akt-Phos per l'uso con PBS, perché l'uso di tamponi di lavaggio ed eventualmente di diluenti per anticorpi a base di PBS provoca aumento della colorazione di fondo e riduzione dell'intensità della colorazione.

#### 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/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.<sup>2</sup>

Il tessuto raccomandato per il controllo positivo è cute.

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. 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 aspecifica<sup>3</sup>. 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 specifico 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 specifico 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-Akt-Phos. 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 immunocitochimici, 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 LP18 ha messo in evidenza la forma fosforilata della proteina Akt espressa nel nucleo e nel citoplasma delle cellule di una varietà di tessuti (n=56). L'espressione è stata messa in evidenza in: colon, intestino tenue, cervello, rene, ghiandola surrenale, pancreas, polmone, fegato, stomaco, esofago, cute, muscolo scheletrico, milza, cuore, ovaio, cervice uterina, utero, testicolo, prostata, timo, ghiandola salivare, tiroide, paratiroidi, mammella, ipofisi, tonsilla, midollo osseo, mesotelio e aorta.

### Tessuti tumorali

Il clone LP18 ha messo in evidenza la forma fosforilata della proteina Akt in 289/301 tumori esaminati: 80/85 tumori della prostata, 67/67 tumori mammari, 29/30 tumori polmonari, 13/14 tumori ovarici, 11/11 carcinomi a cellule squamose, 10/10 sarcomi, 10/10 tumori tiroidei, 9/9 tumori del colon, 7/7 tumori epatici, 6/8 melanomi, 6/6 tumori renali, 6/6 linfomi, 5/5 tumori gastrici, 4/4 tumori neuroendocrini, 4/4 tumori pancreatici, 3/4 tumori surrenalici, 3/4 iperplasie benigne della prostata, 3/4 tumori endometriali, 3/3 tumori neurali, 3/3 tumori a cellule germinali, 3/3 tumori della vescica, 2/2 tumori cutanei, 1/1 tumore dell'intestino tenue e 1/1 tumore timico.

**Si raccomanda l'uso di NCL-L-Akt-Phos nella determinazione dell'espressione della forma fosforilata della proteina Akt in tessuti normali e neoplastici.**

## Limitazioni Generali

L'immunocitochimica 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.<sup>4</sup>

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.

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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in Biochemical Sciences*. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Science*. 2001; 114:2903–2910.

### **Modifiche Alla Pubblicazione Precedente**

Non applicabile.

### **Data Di Pubblicazione**

30 aprile 2019

# Metodologia immunoistochimica per l'uso di anticorpi Novocastra™ su tessuto incluso in paraffina, utilizzando la tecnica di smascheramento ad alta temperatura dell'epitopo.

## Reagenti necessari ma non forniti

1. Solventi standard utilizzati in immunoistochimica.
2. Tampone Tris salino (TBS) 50 mM a pH 7.6.
3. Soluzione di smascheramento dell'epitopo (vedere sezione C Soluzioni per lo smascheramento dell'epitopo).
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. Mezzo di montaggio - usare secondo le raccomandazioni del produttore.

## Attrezzature necessarie ma non fornite

1. Set incubatore a 25 °C.
2. Dispositivo di riscaldamento per lo smascheramento dell'epitopo: bagno termostatico o vaporizzatore, autoclave o altre attrezzature termostatiche da laboratorio.
3. Attrezzatura di base del laboratorio di immunoistochimica: steamer vaporizer.

## Soluzioni per lo smascheramento dell'epitopo (vedere le Raccomandazioni per l'uso per uno dei seguenti prodotti)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampone citrato contenente surfattante   |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampone EDTA contenente surfattante      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampone Tris/EDTA contenente surfattante |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## Metodologia

### Prima di intraprendere questa metodologia, l'utente deve aver acquisito esperienza con le tecniche immunoistochimiche.

Gli utenti devono determinare le diluizioni ottimali degli anticorpi. Se non indicato diversamente, tutte le fasi vanno condotte a temperatura ambiente (25 °C).

#### Smascheramento dell'epitopo

Si prega di seguire le istruzioni per l'uso in Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

#### Visualizzazione

Si prega di seguire le istruzioni per l'uso in Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) o RE7290-K (50 tests).

## Modifiche alla pubblicazione precedente

Non applicabile.

## Data di pubblicazione

23 aprile 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Flüssiger Monoklonaler Maus-Antikörper Akt (Phosphorylated) Produkt-Nr.: NCL-L-Akt-Phos

## Verwendungszweck

Für *in-vitro*-Diagnostik.

NCL-L-Akt-Phos ist für den qualitativen Nachweis der Akt (phosphoryliert)-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

LP18.

## Immunogen

Ein chemisch synthetisiertes, phosphoryliertes Peptid, das Resten um Ser473 des humanen Akt-Moleküls (phosphoryliert) entspricht.

## Spezifität

Humanes Akt, phosphoryliert an Ser473.

## Reagenzzusammensetzung

NCL-L-Akt-Phos 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 300 mg/L laut ELISA-Bestimmung. Hinsichtlich der chargenspezifischen Ig-Konzentration siehe Angaben auf dem Produktetikett.

## Gebrauchsempfehlungen

Immunhistochemie (siehe **Vorgehensweise**) auf Paraffinschnitten. Empfohlene Verdünnung: 1:50 über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 25 °C. Hitzeinduzierte Epitopdemaskierung unter Verwendung von Epitope Retrieval Solution pH 6,0 (RE7113 oder RE7114). Dies ist nur eine Empfehlung, und die Benutzer sollten ihre eigenen optimalen Arbeitsverdünnungen bestimmen. **Technischer Hinweis:** NCL-L-Akt-Phos wird nicht zur Verwendung mit PBS empfohlen, da die Verwendung von PBS-basierten Waschpuffern und möglicherweise PBS-basierter Antikörperverdünnung zu einer verstärkten Hintergrundfärbung und verringerten Färbungsintensität führt.

## 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.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup>

Für die positive Gewebekontrolle wird Haut.

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.

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 Färbergegebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.<sup>3</sup> 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-Akt-Phos gefärbten Patientenproben müssen zuletzt untersucht werden. Eine positive Färbeintensität 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 LP18 wies die phosphorylierte Form des im Zellkern und Zytoplasma von Zellen unterschiedlicher Gewebe (n=56) exprimierten Akt-Proteins nach. Die Expression wurde in Kolon, Dünndarm, Cerebellum, Niere, Nebenniere, Pankreas, Lunge, Leber, Magen, Ösophagus, Haut, Skelettmuskel, Milz, Herz, Ovar, Zervix, Uterus, Hoden, Prostata, Thymus, Speicheldrüse, Thyroidea, Parathyroidea, Mamma, Hypophyse, Tonsillen, Knochenmark, Mesothel und Aorta nachgewiesen.

### Tumorgewebe

Klon LP18 wies die phosphorylierte Form des Akt-Proteins in 289/301 untersuchten Tumoren nach, einschließlich 80/85 Prostata Tumoren, 67/67 Mammatumoren, 29/30 Lungentumoren, 13/14 Ovar Tumoren, 11/11 Plattenzellkarzinomen, 10/10 Sarkomen, 10/10 Thyroidea Tumoren, 9/9 Kolontumoren, 7/7 Lebertumoren, 6/8 Melanomen, 6/6 Nierentumoren, 6/6 Lymphomen, 5/5 Magentumoren, 4/4 neuroendokrinen Tumoren, 4/4 Pankreastumoren, 3/4 Nebennierentumoren, 3/4 benignen prostaticischen Hyperplasien, 3/4 Endometriutumoren, 3/3 Nerventumoren, 3/3 Keimzelltumoren, 3/3 Harnblasentumoren, 2/2 Hauttumoren, 1/1 Dünndarmtumor und 1/1 Thymustumor.

**NCL-L-Akt-Phos wird zur Verwendung beim Nachweis der Expression der phosphorylierten Form des Akt-Proteins in normalen und neoplastischen Geweben 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 Färberegebnisse.

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.<sup>4</sup>



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. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? Journal of Cell Science. 2001; 114:2903–2910.

### **Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe**

Keine.

### **Ausgabedatum**

30 April 2019

# Immunhistochemische Vorgehensweise für die Anwendung von Novocastra™-Antikörpern auf in Paraffin eingebettetes Gewebe mit Hilfe des wärmeinduzierten Epitopdemaskierungsverfahrens.

## Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Reagenzien

1. In der Immunhistochemie gebräuchliche Standardlösungsmittel
2. 50 mM Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) mit pH-Wert 7,6.
3. Epitop-Retrieval-Lösung (siehe Abschnitt C Epitopdemaskierungslösungen)
4. Antikörperverdünnungsmittel, 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. Fixativ – gemäß Herstellerempfehlungen verwenden.

## Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Ausrüstung

1. Auf 25 °C eingestellter Inkubator.
2. Erwärmungsgerät für das Epitopdemaskierungsverfahren: Wasserbad oder Dampfbad, Dampfdrucktopf oder andere temperaturgesteuerte Laboranlage.
3. Allgemeine immunhistochemische Laborausrüstung.

## Epitopdemaskierungslösungen (siehe Gebrauchsempfehlungen für eines der folgenden Produkte)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Zitratbasierter Puffer mit Detergens     |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | EDTA-basierter Puffer mit Detergens      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tris-/EDTA-basierter Puffer mit Detergen |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## Vorgehensweise

**Vor der Durchführung dieser Methode müssen die Anwender in immunhistochemischen Verfahren ausgebildet werden.**

Die Kunden müssen die optimalen Verdünnungen für Antikörper bestimmen. Wenn nicht anders angegeben, werden alle Schritte bei Raumtemperatur (25 °C) durchgeführt.

### Epitopdemaskierungsverfahren

Bitte befolgen Sie die Gebrauchsanweisungen für die Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

### Visualisierung

Bitte befolgen Sie die Gebrauchsanweisungen der Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) oder RE7290-K (50 tests).

## Änderungen zur vorherigen Ausgabe

Keine.

## Ausgabedatum

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Anticuerpos Monoclonal Murino líquidos

## Akt (Phosphorylated)

### Código De Producto: NCL-L-Akt-Phos

#### Indicaciones De Uso

*Para uso diagnóstico in vitro.*

NCL-L-Akt-Phos está indicado para la identificación cualitativa en secciones de parafina, mediante microscopía óptica, de moléculas de Akt (fosforilada). 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 cubrebobjeto. 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

LP18.

#### Inmunógeno

Un péptido fosforilado sintetizado químicamente que corresponde a los residuos situados alrededor de Ser473 de la molécula humana de Akt (fosforilada).

#### Especificidad

Akt humana fosforilada en Ser473.

#### Composición Del Reactivo

NCL-L-Akt-Phos 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 300 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 **Metodología**) con secciones de parafina. Dilución sugerida: 1:50 durante 30 minutos a 25 °C. Recuperación de epitopos inducida por calor con Epitope Retrieval Solution (RE7113 o RE7114) a pH 6,0. Ésta es tan solo una pauta y cada usuario debe determinar sus propias diluciones de trabajo óptimas. **Nota técnica:** No se recomienda usar NCL-L-Akt-Phos con PBS, ya que el uso de tampones de lavado a base de PBS y posiblemente el de diluyentes de anticuerpos a base de PBS produce una mayor tinción de fondo y una menor intensidad de la tinción.

#### 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.<sup>1</sup> No pipetee 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.<sup>2</sup>

El tejido de control positivo recomendado es piel.

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.

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.<sup>3</sup> 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-Akt-Phos 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 LP18 detectó la forma fosforilada de la proteína Akt expresada en el núcleo y el citoplasma de las células de diversos tejidos (n=56). Dicha expresión se detectó en colon, intestino delgado, cerebelo, riñón, glándulas suprarrenales, páncreas, pulmón, hígado, estómago, esófago, piel, músculo esquelético, bazo, corazón, ovario, cuello de útero, útero, testículo, próstata, timo, glándula salival, tiroides, paratiroides, mama, glándula pituitaria, amígdala, médula ósea, mesotelio y aorta.

#### **Tejidos tumorales**

El Clon LP18 detectó la forma fosforilada de la proteína Akt en 289 de 301 de los tumores evaluados, con 80 de 85 tumores próstáticos, 67 de 67 tumores de mama, 29 de 30 tumores de pulmón, 13 de 14 tumores ováricos, 11 de 11 carcinomas de células escamosas, 10 de 10 sarcomas, 10 de 10 tumores de tiroides, 9 de 9 tumores de colon, 7 de 7 tumores hepáticos, 6 de 8 melanomas, 6 de 6 tumores de riñón, 6 de 6 linfomas, 5 de 5 tumores de estómago, 4 de 4 tumores neuroendocrinos, 4 de 4 tumores pancreáticos, 3 de 4 tumores suprarrenales, 3 de 4 hiperplasias prostáticas benignas, 3 de 4 tumores endometriales, 3 de 3 tumores neurológicos, 3 de 3 tumores de células germinales, 3 de 3 tumores de vejiga, 2 de 2 tumores de piel, 1 de 1 tumores del intestino delgado y 1 de 1 tumores de timo.

**Se recomienda el uso de NCL-L-Akt-Phos para detectar la expresión de la forma fosforilada de la proteína Akt en tejidos normales y neoplásicos.**

### **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.<sup>4</sup>

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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? Journal of Cell Science. 2001; 114:2903–2910.

### **Correcciones A La Publicación Anterior**

No aplicable.

### **Fecha De Publicación**

30 de abril de 2019

# Metodología inmunohistoquímica para la utilización de anticuerpos Novocastra™, en tejidos incluidos en parafina, con la aplicación de la técnica de recuperación de epítomos inducida por calor.

## Reactivos necesarios que no se suministran

1. Disolventes estándar utilizados en inmunohistoquímica.
2. Solución salina tamponada con Tris 50 mM (TBS), pH 7,6.
3. Solución para la recuperación de epítomos (véase la sección C Soluciones para la recuperación de epítomos).
4. Diluyente del anticuerpo, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Sistema de visualización, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) o RE7290-K (50 tests).
6. Medio de montaje; utilizado de la forma recomendada por el fabricante.

## Equipo necesario que no se suministra

1. Incubador ajustado a 25 °C.
2. Dispositivo de calentamiento para la recuperación de epítomos: baño de agua o de vapor, olla de presión u otro equipo de laboratorio con temperatura controlada.
3. Equipo de laboratorio utilizado generalmente para inmunohistoquímica.

## Soluciones para la recuperación de epítomos (véanse las Recomendaciones de uso de alguna de las siguientes)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampón basado en citrato, que contiene agente tensioactivo   |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampón basado en EDTA, que contiene agente tensioactivo      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampón basado en Tris/EDTA, que contiene agente tensioactivo |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## Metodología

### Antes de poner en práctica esta metodología, los usuarios deben formarse en el uso de las técnicas inmunohistoquímicas.

Los clientes deben determinar las diluciones óptimas de los anticuerpos. A menos que se indique otra cosa, todos los pasos se llevan a cabo a temperatura ambiente (25 °C).

#### Recuperación de epítomos

Siga las instrucciones de uso de las Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

#### Visualización

Siga las instrucciones de uso de los sistemas de detección de polímeros Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) o RE7290-K (50 tests).

## Correcciones con respecto a la publicación anterior

No aplicable.

## Fecha de publicación

23 de abril de 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Anticorpo Monoclonal líquido de Ratinho Akt (Phosphorylated)

## Código Do Produto: NCL-L-Akt-Phos

### Utilização prevista

*Para utilização em diagnósticos in vitro.*

NCL-L-Akt-Phos foi concebido para efectuar a identificação qualitativa da moléculas de Akt (fosforilada) 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 (IHQ) 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

LP18.

### Imunogénio

Um péptido fosforilado sintetizado quimicamente, correspondendo a resíduos em torno do Ser473 da molécula Akt humana (fosforilada).

### Especificidade

Akt humana fosforilada em Ser473.

### Composição Do Reagente

NCL-L-Akt-Phos 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 300 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 **Metodologia**) em secções de parafina. Diluição sugerida: 1:50 durante 30 minutos a 25 °C. Recuperação de epitopos induzida por calor, utilizando a Epitope Retrieval Solution com pH 6,0 (RE7113 ou RE7114). Esta recomendação é apenas uma directriz e o utilizador deve determinar qual a diluição ideal para o trabalho específico. **Nota técnica:** Não se recomenda a utilização de NCL-L-Akt-Phos com PBS, já que a utilização de tampões de lavagem à base de PBS e, possivelmente, de diluentes de anticorpos à base de PBS, resulta num aumento da coloração de fundo e numa diminuição da intensidade de coloração.

### 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 formal 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.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup>

O tecido de controlo positivo recomendado é a pele.

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.

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.<sup>3</sup> 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 colorir-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-Akt-Phos 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 LP18 detectou a forma fosforilada da proteína Akt expressa no núcleo e citoplasma de células de uma série de tecidos (n=56). Observou-se a expressão no cólon, intestino delgado, cerebelo, rim, glândula supra-renal, pâncreas, pulmão, fígado, estômago, esfôgado, pele, músculo esquelético, baço, coração, ovário, colo uterino, útero, testículo, próstata, timo, glândula salivar, tireóide, paratireóide, mama, pituitária, amígdala, medula óssea, mesotélio e aorta.

### Tecidos tumorais

O clone LP18 detectou a forma fosforilada da proteína Akt em 289/301 tumores avaliados, incluindo 80/85 tumores da próstata, 67/67 tumores da mama, 29/30 tumores pulmonares, 13/14 tumores do ovário, 11/11 carcinomas da célula escamosa, 10/10 sarcomas, 10/10 tumores da tireóide, 9/9 tumores do cólon, 7/7 tumores hepáticos, 6/8 melanomas, 6/6 tumores renais, 6/6 linfomas, 5/5 tumores estomacais, 4/4 tumores neuroendócrinais, 4/4 tumores pancreáticos, 3/4 tumores adrenais, 3/4 hiperplasias prostáticas benignas, 3/4 tumores endometriais, 3/3 tumores neurais, 3/3 tumores da célula germinal, 3/3 tumores da bexiga, 2/2 tumores de pele, 1/1 tumor do intestino delgado e 1/1 tumor do timo.

**Recomenda-se NCL-L-Akt-Phos para utilização na detecção da expressão da forma fosforilada da proteína Akt em tecidos normais e neoplásicos.**

## 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.<sup>4</sup>



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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in Biochemical Sciences*. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Science*. 2001; 114:2903–2910.

### **Emendas Da Edição Anterior**

Não é aplicável.

### **Data De Emissão**

30 de Abril de 2019

# Metodologia de imunohistoquímica para utilização de anticorpos Novocastra™ em tecidos envolvidos em parafina através da técnica de recuperação de epítomos por indução térmica.

## Reagentes necessários mas não fornecidos

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

## Equipamento necessário mas não fornecido

1. Incubador regulado para 25 °C.
2. Dispositivo de aquecimento para a recuperação de epítomos: banho-maria ou vaporizador, panela de pressão ou outro equipamento de laboratório com controlo da temperatura.
3. Equipamento geral de laboratório de imunohistoquímica.

## Soluções de recuperação de epítomos (ver as Recomendações sobre a utilização de um dos seguintes produtos)

|   |   |
|---|---|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampão à base de citrato contendo um surfactante    |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |   |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |   |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampão à base de EDTA contendo um surfactante       |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |   |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tampão à base de Tris/EDTA contendo um tenso-activo |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |   |

## Metodologia

### Antes de intentar esta metodologia, o utilizador deve ter recebido a devida formação em técnicas de imunohistoquímica.

O cliente deve determinar quais as fórmulas de diluição ideais para os anticorpos. A não ser indicação em contrário, todas as etapas devem ser efectuadas à temperatura ambiente (25 °C).

#### Recuperação de epítomos

Aderir às instruções de utilização aplicáveis às Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 e RE7122.

#### Visualização

Aderir às instruções de utilização dos Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) ou RE7290-K (50 tests).

## Emendas da edição anterior

Não é aplicável.

## Data de emissão

23 de abril de 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Flytande Monoklonal Musantikropp

## Akt (Phosphorylated)

### Produktkod: NCL-L-Akt-Phos

#### Avsedd Användning

För *in vitro* diagnostisk användning.

NCL-L-Akt-Phos är avsedd för kvalitativ identifiering med ljusmikroskopi av Akt (fosforylerad)-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 patalog 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

LP18.

#### Immunogen

En på kemisk väg framställd fosforylerad peptid som motsvarar rester av human Akt (fosforylerad) molekyll kring Ser473.

#### Specifitet

Human Akt fosforylerad vid Ser473.

#### Reagensinnehåll

NCL-L-Akt-Phos 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 300 mg/L fastställt genom ELISA. Se flaskans etikett för specifik Ig-koncentration för satsen.

#### Rekommendationer Vid Användning

Immunhistokemi (se **Metodologi**) på paraffinsnitt. Föreslagen spädning: 1:50 i 30 minuter vid 25 °C. Värmeinducerad epitopåtervinning med Epitope Retrieval Solution pH 6,0 (RE7113 eller RE7114). Detta är endast en riktlinje och användare bör själva fastställa den optimala bruksspädningen. **Teknisk anmärkning:** NCL-L-Akt-Phos rekommenderas inte för användning med PBS, eftersom användningen av PBS-baserade tvättbuffertar och möjligen PBS-baserade antikroppsutspädningsmedel ger ökad bakgrunds-färgning och sänkt färgningsintensitet.

#### Förvaring Och Stabilitet

Förvara vid 2–8 °C. Frysa 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

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

Kontroller bör vara färskas 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.<sup>2</sup>

Hud 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.

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 färgas ofta ospecifikt.<sup>3</sup> 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-Akt-Phos 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 LP18 detekterade Akt-proteinets fosforylerade form som uttrycktes i kärnan och cytoplasmat hos celler från en mängd olika vävnader (n=56). Uttryck detekterades i kolon, tunntarm, lillhjärna, njure, binjure, bukspottkörtel, lunga, lever, magsäck, matstrupe, hud, skelettmuskulatur, mjälte, hjärta, äggstock, livmodershals, livmoder, testikel, prostata, brässen, spottkörtel, sköldkörtel, bisköldkörtel, bröst, hypofys, mandel, benmärg, mesotel och aorta.

### Tumörvävnader

Klon LP18 detekterade Akt-proteinets fosforylerade form i 289/301 tumörer utvärderade, inklusive 80/85 prostata-tumörer, 67/67 bröst-tumörer, 29/30 lungtumörer, 13/14 äggstockstumörer, 11/11 skvamösa cellkarcinom, 10/10 sarkom, 10/10 sköldkörteltumörer, 9/9 kolontumörer, 7/7 levertumörer, 6/8 melanom, 6/6 njurtumörer, 6/6 lymfom, 5/5 magsäckstumörer, 4/4 neuroendokrina tumörer, 4/4 bukspottkörteltumörer, 3/4 binjuretumörer, 3/4 benigna prostatahyperplasier, 3/4 endometrial tumörer, 3/3 nervtumörer, 3/3 könszellstumörer, 3/3 urinblåsetumörer, 2/2 hudtumörer, 1/1 tunntarmstumörer och 1/1 brässentumörer.

**NCL-L-Akt-Phos rekommenderas för användning för detektering av uttryck av Akt-proteinets fosforylerade form i normala och neoplastiska vävnader.**

## 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.<sup>4</sup>

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 neoplasmer. 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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? Journal of Cell Science. 2001; 114:2903–2910.

## **Rättelser Av Tidigare Utgivning**

Gäller inte

## **Utgivningsdatum**

30 april 2019

# Immunhistokemisk metodologi för användning av Novocastra™ antikroppar på paraffinbäddad vävnad med hög temperatur epitopåtervinningstekniken.

## Reagens som krävs men inte tillhandahålls

1. Standardlösningar som används inom immunhistokemi.
2. 50 mM tris-buffrad koksaltlösning (TBS) pH 7,6.
3. Epitopåtervinningslösning (se avsnitt C Epitopåtervinningslösningar).
4. Antikroppsutspädningsmedel, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Visualiseringssystem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) eller RE7290-K (50 tester).
6. Monteringsmedel – bered enligt tillverkarens rekommendationer.

## Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

1. Inkubator inställd på 25 °C.
2. Uppvärmningsapparat för epitopåtervinning: vattenbad eller förångare, tryckkokare eller annan temperaturkontrollerad laboratorieutrustning.
3. Allmän immunhistokemisk laboratorieutrustning.

## Epitopåtervinningslösningar (se Rekommendationer för användning för en av följande)

|   |   |
|---|---|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Citratbaserad buffert innehållande ytaktivt medel     |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |   |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |   |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | EDTA baserad buffert innehållande ytaktivt medel      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |   |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tris/EDTA baserad buffert innehållande ytaktivt medel |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |   |

## Metodologi

Innan metoden tillämpas måste användarna vara utbildade i immunhistokemiska tekniker.

Kunder bör fastställa optimal spädning för antikroppar. Om inte annat anges utförs alla steg vid rumstemperatur (25 °C).

### Epitopåtervinning

Vänligen följ instruktionerna för användning i Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

### 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).

## Rättelser av tidigare utgivning

Inte tillämpligt.

## Utgivningsdatum

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink)

# Novocastra™ Υγρό Μονοκλωνικό Αντίσωμα Ποντικού Akt (Phosphorylated) Κωδικός είδους: NCL-L-Akt-Phos

## Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Το NCL-L-Akt-Phos προορίζεται για την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός της ανθρώπινης Μόρια Akt (Φωσφορυλιωμένου) 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 ανιγόνων μέσω της διαδοχικής εφαρμογής ενός ειδικού αντισώματος στο αντιγόνο (πρωτογενές αντίσωμα), ενός δευτεροταγούς αντισώματος στο πρωτογενές 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 ανιγόνου. 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

LP18.

## Ανοσογόνο

Ένα χημικά συνθετικό φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο που αντιστοιχεί στα υπολείμματα Ser473 του ανθρώπινου Akt (Φωσφορυλιωμένου) μορίου.

## Ειδικότητα

Ανθρώπινη Akt φωσφορυλιωμένη σε Ser473.

## Σύνθεση Αντιδραστήριου

Το NCL-L-Akt-Phos 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 300 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

Ανοσοϊστοχημεία (δείτε την ενότητα **Μεθοδολογία**) σε τομές παραφίνης. Προτεινόμενη αραίωση: 1:50 επί 30 λεπτά στους 25 °C. Θερμικά επαγόμενη ανάκτηση επιτόπου με χρήση των Epitope Retrieval Solution pH6,0 (RE7113 ή RE7114). Αυτό παρέχεται ως οδηγός και οι χρήστες θα πρέπει να προσδιορίζουν τις δικές τους βέλτιστες αραιώσεις εργασίας. **Τεχνική σημείωση:** Το NCL-L-Akt-Phos δεν συνιστάται για χρήση με PBS, εφόσον η χρήση του PBS με βάση το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και πιθανότατα του PBS με βάση τα αραιωτικά αντισώματος, παράγει αυξημένη χρώση υποβάθρου και μειωμένη ένταση χρώσης.

## 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.

## Προεidoποιήσεις 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 δυναμικά μετάδοσης λοίμωξης και η απόρριψή τους να πραγματοποιείται λαμβάνοντας τις σωστές προφυλάξεις. Μην αναροφάτε ούτε με πιπέτα αντιδραστήρια με το στόμα και αποφυγετε 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 άφθονες 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 νεκροψίας/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.<sup>2</sup>

Συνιστώμενος ιστός θετικού μάρτυρα είναι δέρμα.

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 πρωτογενές αντισώμα.

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 συνδεδειμένου 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.<sup>3</sup> Ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ανοσολογικής δέσμευσης των πρωτεϊνών ή των προϊόντων αντίδρασης του υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδοϋπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός) ανάλογα με τον τύπο ανσοχώρησης που χρησιμοποιείται. Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμευσης των ενζύμων από ειδική ανσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπλέον ιστοί ασθενούς με χρωμογόνο υποστρώματος σύμπλοκα (βαθιδη-βιοτίνη, στρεπταβιδίνη, σημειωμένο πολυμερές) και υπόστρωμα-χρωμογόνο, 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 πρωτογενούς αντισώματος με μια τομή κάθε δείγματος ασθενούς για τη 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-Akt-Phos. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκτιμάται στα πλαίσια τυχόν μη ειδικής χρώσης υποβάθρου του αρνητικού μάρτυρα αντιδραστηρίου. Όπως συμβαίνει με οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική εξέταση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύθηκε, 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 LP18 ανίχνευσε τη Φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης Akt που εκφράστηκε στον πυρήνα και το κυτταροπλάσμα των κυττάρων σε μία ποικιλία ιστών (n=56). Η έκφραση ανιχνεύθηκε στο κόλον, στο λεπτό έντερο, στην παρεγκεφαλίδα, στο νεφρό, στο επιχρόνιο, στο πάγκρεας, στον πνεύμονα, στο ήπαρ, στο στομάχο, στον οισοφάγο, στο δέρμα, στο σκελετικό μύ, στο σπλήνα, στην καρδιά, στην ωοθήκη, στον τράχηλο, στους όρχεις, στον προστάτη, στο θύμο αδέν, στο σιελόγλονο αδέν, στο θυρεοειδή, στον παραθυρεοειδή, στο μαστό, στην υπόφυση, στην αμυγδαλή, στο μυελό των οστών, στο μεσοθήλιο και στην αορτή.

### Καρκινικοί ιστοί

Ο κλώνος LP18 ανίχνευσε τη Φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης Akt σε 289/301 αξιολογημένους όγκους, συμπεριλαμβανομένων 80/85 όγκων του προστάτη, 67/67 όγκων του μαστού, 29/30 όγκων του πνεύμονα, 13/14 όγκων της ωοθήκης, 11/11 ακανθοκυτταρικών καρκινωμάτων, 10/10 σαρκωμάτων, 10/10 όγκων του θυρεοειδούς, 9/9 όγκων του κόλου, 7/7 όγκων του ήπατος, 6/8 μελανωμάτων, 6/6 όγκων του νεφρού, 6/6 λεμφωμάτων, 5/5 όγκων του στομάχου, 4/4 νευροενδοκρινών όγκων, 4/4 παγκρεατικών όγκων, 3/4 επινεφριδικών όγκων, 3/4 καλοήθων προστατικών υπερπλασιών, 3/4 όγκων του ενδομυτηρίου, 3/3 όγκων των νεύρων, 3/3 όγκων των βλαστικών κυττάρων, 3/3 όγκων ουροδόχου κύστης, 2/2 όγκων δέρματος, 1/1 όγκων του λεπτού εντέρου και 1/1 όγκων του θύμου αδέν.

**Το NCL-L-Akt-Phos συνιστάται για χρήση στην ανίχνευση της έκφρασης της Φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης Akt σε φυσιολογικούς και νεοπλαστικούς ιστούς.**

## Γενικοί Περιορισμοί

Η ανοσοϊστοχημεία 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, αποψίξη, πύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να παράγει μορφώματα, παγίδευση αντισώματος ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τυχόν ασυνήθιστα αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται σε παραλλαγές των μεθόδων μονιμοποίησης και εγκλεισμού ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.<sup>4</sup>

Τυχόν υπερβολική ή ατελής αντίχρωση ενδέχεται να διακυβεύσει 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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? Journal of Cell Science. 2001; 114:2903–2910.

## **Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση**

Δεν έχει εφαρμογή.

## **Ημερομηνία Έκδοσης**

30 Απριλίου 2019

# Μεθοδολογία ανοσοϊστοχημείας για χρήση αντισωμάτων Novocastra™ σε ιστό εγκλεισμένο σε παραφίνη με χρήση της τεχνικής θερμικά επαγόμενης ανάκτησης επιτόπου.

## Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Πρότυποι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημεία
2. 50 mM αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος Tris (TBS) με pH 7,6.
3. Διάλυμα ανάκτησης επιτόπου (δείτε την ενότητα Γ)
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.

## Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

1. Θάλαμος επώασης ρυθμισμένος στους 25 °C.
2. Συσκευή θέρμανσης για ανάκτηση επιτόπου: υδατόλουτρο ή συσκευή ατμού, ατμοκλίβανος ή άλλος εργαστηριακός εξοπλισμός ελεγχόμενης θερμοκρασίας.
3. Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός ανοσοϊστοχημείας.

## Διαλύματα ανάκτησης επιτόπου (δείτε την ενότητα “Συστάσεις για τη χρήση” για ένα από τα ακόλουθα)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση κιτρικά που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα      |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση το EDTA που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Ρυθμιστικό διάλυμα με βάση το Tris/EDTA που περιέχει επιφανειοδραστικό παράγοντα |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## Μεθοδολογία

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

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

### Ανάκτηση επιτόπου

Παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης στα Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

### Απεικόνιση

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

## Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

## Ημερομηνία έκδοσης

23 Απρίλιος 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Væskeformigt Monoklonalt Museantistof

## Akt (Phosphorylated)

### Produktkode: NCL-L-Akt-Phos

#### Tilsigtet Anvendelse

*Til in vitro diagnostisk anvendelse.*

NCL-L-Akt-Phos er beregnet til kvalitativ identifikation af Akt (fosforyleret)-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

LP18.

#### Immunogen

Et kemisk syntetiseret fosforyleret peptid, svarende til restkoncentrationen omkring Ser473 af humant Akt (fosforyleret)-molekylet.

#### Specificitet

Human Akt fosforyleret ved Ser473.

#### Reagenssammensætning

NCL-L-Akt-Phos er en flydende vævskultursupernatant 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 300 mg/L som bestemt ved ELISA. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik Ig-koncentration.

#### Anbefalinger Vedrørende Anvendelse

Immunhistokemi (se **Metodologi**) på paraffinsnit. Foreslået fortynding: 1:50 ved 30 minutter ved 25 °C. Varmeinduceret epitopgenfinding ved brug af Epitope Retrieval Solutions pH 6,0 (RE7113 eller RE7114). Disse retningslinier er vejledende, og brugeren bør selv bestemme egne optimale brugsopløsninger. **Teknisk bemærkning:** NCL-L-Akt-Phos anbefales ikke brugt sammen med PBS, da anvendelsen af PBS-baserede vaskebuffer og muligvis PBS-baserede antistof-fortyndingsmidler giver en øget baggrundsfarvning og en formindsket farveintensitet.

#### 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 forholdsregler<sup>1</sup>. 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 farvningsteknikker.

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.<sup>2</sup>

Anbefalet positivt kontrolvæv er hud.

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.

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 diffust 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.<sup>3</sup> 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 endogen 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-Akt-Phos 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 LP18 detekterede den fosforylerede form af Akt-proteinet, udtrykt i kernen og cytoplasma i celler i en varians af vævsprøver (n=56). Udtryk blev detekteret i colon, tyndtarm, lillehjerne, nyre, binyre, bugspytkirtel, lunge, lever, mavesæk, spiserør, hud, skeletmuskulatur, milt, hjerte, ovarier, hals, livmoder, testikler, prostata, thymuskirtel, spytkirtel, skjoldbruskirtel, biskjoldbruskirtel, bryst, hypofyse, mandler, knoglemarv, mesothel og aorta.

### Tumorvæv

Klon LP18 detekterede den fosforylerede form af Akt-protein i 289/301 evaluerede tumorer, inklusive 80/85 prostata-tumorer, 67/67 bryst-tumorer, 29/30 lunge-tumorer, 13/14 ovarie-tumorer, 11/11 pladecelle-carcinomer, 10/10 sarcomer, 10/10 thyroidea-tumorer, 9/9 colon-tumorer, 7/7 lever-tumorer, 6/8 melanomer, 6/6 nyre-tumorer, 6/6 lymfomer, 5/5 mavesæk-tumorer, 4/4 neuroendokrine tumorer, 4/4 bugspytkirtel-tumorer, 3/4 binyre-tumorer, 3/4 godartet prostatisk hyperplasi, 3/4 livmoder-tumorer, 3/3 neurale tumorer, 3/3 kimcelle-tumorer, 3/3 blære-tumorer, 2/2 hud-tumorer, 1/1 tyndtarms-tumorer og 1/1 thymuskirtel-tumorer.

### NCL-L-Akt-Phos anbefales til detektering af udtryk for den fosforylerede form af Akt-protein i normale og neoplastiske vævsprøver.

## 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 irregularetter indeholdt i vævet.<sup>4</sup>

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 antigenekspresion, navnlig i neoplasmer. Den kliniske fortolkning af alle farvede vævssnit skal indbefatte morfologisk analyse og evaluering af passende kontroller.

## **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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? Journal of Cell Science. 2001; 114:2903–2910.

## **Rettelser Til Tidligere Udgave**

Ingen rettelser.

## **Udgivelsesdato**

30 april 2019

# Immunhistokemisk fremgangsmåde til anvendelse af Novocastra™ antistoffer på paraffinindstøbte væv ved anvendelse af varmeinduceret epitopgenfindingssteknik.

## Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

1. Standardopløsningsmidler anvendt i immunhistokemi
2. 50 mM tris-bufferjusteret saltvandsopløsning (TBS) pH 7,6
3. Epitopgenfindingsopløsning (se afsnit C Antigengfindingsopløsninger).
4. Antistofdiluent, Novocastra™ IHC Diluent, RE7133.
5. Visualiseringssystem, Novolink™ Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests) eller RE7290-K (50 tests).
6. Monteringsmedium – fremstilles ifølge producentens anbefalinger.

## Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

1. Inkubator sat til 25 °C.
2. Opvarmingsapparat til epitopgenfinding: vandbad eller dampbad, trykkoger eller andet temperaturkontrolleret laboratorieudstyr.
3. Almindeligt laboratorieudstyr til immunhistokemi.

## Antigengfindingsopløsninger (se Anbefalinger vedrørende anvendelse for en af følgende)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Citratbaseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel     |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | EDTA-baseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Tris/EDTA-baseret buffer indeholdende overfladeaktivt middel |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## Fremgangsmåde

### Inden ibrugtagning af denne metodologi, skal brugere være oplært i immunhistokemiske teknikker.

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

#### Epitopgenfinding

Følg venligst vejledningen i Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, RE7122.

#### Visualisering

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

## Rettelser til tidligere udgave

Ingen rettelser.

## Udgivelsesdato

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ vloeibaar monoklonaal muisantilichaam Akt (Phosphorylated)

## Productcode: NCL-L-Akt-Phos

### Beoogd gebruik

Voor gebruik bij *in-vitro*diagnostiek

NCL-L-Akt-Phos is bedoeld voor de kwalitatieve identificatie, door middel van lichtmicroscopie, van (gefosforyleerde) Akt-moleculen in paraffinecoupes. 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 (primaïr 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 lichtmicroscopie en helpen bij de differentiële diagnose van pathofysiologische processen, die al dan niet met een bepaald antigeen kunnen worden geassocieerd.

### Kloon

LP18.

### Immunogeen

Een chemisch gesynthetiseerd gefosforyleerd peptide dat overeenkomt met residuen rond Ser473 van het humane Akt-molecuul.

### Specificiteit

Humaan Akt gefosforyleerd bij Ser473.

### Reagenssamenstelling

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

### Ig-klasse

IgG2b.

### Totale eiwitconcentratie Total Protein

1,0-8,0 Zie het etiket van de flacon voor de totale eiwitconcentratie van de partij.

### Antilichaamconcentratie

Groter dan of gelijk aan 300 mg/L zoals bepaald door ELISA. Zie het flaconlabel voor specifieke Ig-concentratie van de partij.

### Aanbevelingen voor het gebruik

Immunohistochemie (zie **Methodologie**) op paraffinecoupes. Voorgestelde verdunning: 01:50 gedurende 30 minuten bij 25°C. Warmtegeïnduceerd epitoopherstel met Epitope Retrieval Solution 6.0 (RE7113 or RE7114). Dit is een richtlijn en gebruikers moeten zelf de voor hen optimale werkverdunning bepalen. Technische opmerking: NCL-L-Akt-Phos wordt niet aanbevolen voor gebruik met PBS, aangezien het gebruik van PBS-gebaseerde wasbuffers en mogelijk PBS-gebaseerde antilichaamverduunningsmiddelen meer achtergrondkleuring en minder kleuringintensiteit oplevert.

### Opslag en stabiliteit

Bewaar 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.

### Monsterpreparatie

Het aanbevolen fixatief 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.<sup>1</sup> 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 in aanvulling op de volgende procedures.

Controles zijn verse autopsie-/biopsie-/chirurgische monsters 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.<sup>2</sup>

Aanbevolen positief controleweefsel is huid.

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.

Aan de andere kant levert de verscheidenheid aan diverse cellypen 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 bovenmatig in formaline gefixeerde weefsels. Gebruik intacte cellen voor het interpreteren van kleuringresultaten. Necrotische of gedegeneerde cellen kleuren vaak niet-specifiek.<sup>3</sup> 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 (cytochrom c) of endogene 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-Akt-Phos 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 LP18 detecteerde de gefosforyleerde vorm van het Akt-eiwit, tot expressie gebracht in de kern en het cytoplasma van cellen van verschillende weefsels (n=56). Er werd expressie gedetecteerd in dikke darm, dunne darm, cerebellum, nier, bijnier, pancreas, long, lever, maag, slokdarm, huid, skeletspieren, milt, hart, eierstok, baarmoederhals, baarmoeder, testis, prostaat, thymus, speekselklier, schildklier, bijschildklier, borst, hypofyse, tonsil, beenmerg, mesothel en aorta.

### Afwijkende weefsels

Kloon LP18 detecteerde de gefosforyleerde vorm van het Akt-eiwit in 289/301 geëvalueerde tumoren inclusief 80/85 prostaattumoren, 67/67 borsttumoren, 29/30 longtumoren, 13/14 eierstoktumoren, 11/11 plaveiselcelcarcinomen, 10/10 sarcomen, 10/10 schildkliertumoren, 9/9 dikke darmtumoren, 7/7 levertumoren, 6/8 melanomen, 6/6 niertumoren, 6/6 lymfomen, 5/5 maagtumoren, 4/4 neuro-endocriene tumoren, 4/4 pancreastumoren, 3/4 bijniertumoren, 3/4 goedaardige prostaathyperplasie, 3/4 endometrische tumoren, 3/3 neurale tumoren, 3/3 geslachtsceltumoren, 3/3 blaastumoren, 2/2 huidtumoren, 1/1 dunne darmtumoren en 1/1 thymustumoren.

### **NCL-L-Akt-Phos wordt aanbevolen voor gebruik voor detectie van de gefosforyleerde vorm van het Akt-eiwit in normale en neoplastische weefsels.**

## 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, ontdooien, 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 inbeddingsmethoden, of aan intrinsieke onregelmatigheden in het weefsel.<sup>4</sup>

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

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.

Antilichamen van Leica Biosystems Newcastle Ltd zijn bedoeld voor gebruik, zoals aangegeven, op bevoren of in paraffine ingebedde coupes die een specifieke fixatie vereisen. Er kan onverwachte antigeenexpressie 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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? Journal of Cell Science. 2001; 114:2903–2910.

## Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave

Niet van toepassing.

## Datum uitgave

30 april 2019

# Immunohistochemische methodologie voor Novocastra™-antilichamen op in paraffine ingebed weefsel met de warmte-geïnduceerd epitoophersteltechniek.

## Benodigde, maar niet inbegrepen reagentia

1. Standaard oplossingen gebruikt in de immunohistochemie.
2. 50 mM Tris-gebufferde zoutoplossing (TBS), pH 7,6.
3. Epitope Retrieval Solution (zie C. Epitope Retrieval Solutions).
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. Inbedmiddel - gebruiken volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

## Benodigde, maar niet inbegrepen apparatuur

1. Incubator ingesteld op 25°C.
2. Verwarmingsapparaat voor epitoopherstel: waterbad, stomer, snelkoker of andere temperatuurgecontroleerde laboratoriumapparatuur.
3. Algemene uitrusting van immunohistochemisch laboratorium.

## Epitope Retrieval Solutions (zie gebruiksaanwijzingen voor één van de volgende)

|   |   |
|---|---|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l    | Oppervlakte-actieve stof met buffer op basis van citraat    |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml |   |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 l       |   |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l    | Oppervlakte-actieve stof met buffer op basis van EDTA       |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 l       |   |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l    | Oppervlakte-actieve stof met buffer op basis van Tris/ EDTA |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 l       |   |

## 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).

### Epitoopherstel

Volg de instructies voor gebruik in Epitope Retrieval Solutions RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 of RE7122.

### 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).

## Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave

Niet van toepassing

## Datum uitgave

23 April 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ flytende murint monoklonalt antistoff Akt (Phosphorylated)

## Produktkode: NCL-L-Akt-Phos

### Tiltenkt bruk

*Til in vitro-diagnostisk bruk.*

NCL-L-Akt-Phos skal brukes til kvalitativ identifikasjon av Akt (fosforylerte) molekyler i parafinsnitt ved lysmikroskopering. 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 kliniske historie 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 kromogen substrat 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 lysmikroskop og bidrar til differensialdiagnosen for patofysiologiske prosesser, som kan være tilknyttet et spesielt antigen eller ikke.

### Klon

LP18.

### Immunogen

Et kjemisk syntetisert fosforylert peptid som tilsvarer rester rundt Ser473 av det humane Akt-molekylet.

### Spesifisitet

Humant Akt fosforylert ved Ser473.

### Reagenssammensetning

NCL-L-Akt-Phos er en flytende vevkultursupernatant som inneholder 15 mM natriumazid som konserveringsmiddel.

### Ig-klasse

IgG2b.

### Totalproteinkonsentrasjon Total Protein

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

### Antistoffkonsentrasjon

Større enn eller lik 300 mg/l som fastslått av ELISA. Se etiketten på hetteglasset for batchspesifikk Ig-konsentrasjon.

### Anbefalinger for bruk

Immunhistokjemi (se **Metode**) på parafinsnitt. Foreslått fortyning: 01:50 i 30 minutter ved 25 °C. Varmeindusert epitop demaskering med Epitope Retrieval Solution pH 6,0 (RE7113 eller RE7114). Dette er kun veiledende, og brukerne bør fastslå egne optimale fortyninger for sitt arbeid. **Teknisk merknad:** NCL-L-Akt-Phos anbefales ikke til bruk med PBS, siden bruken av PBS-baserte vaskebuffer og muligens PBS-baserte antistofffortynningsmidler gir økt bakgrunnsfarging og redusert fargingsintensitet.

### 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 % nøytralt bufret formalin for parafinnstøpte vevsnitt.

### Advarsler og forholdsregler

Dette reagentet 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 avhending 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.<sup>1</sup> 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. Oppsøk lege.

Minimer mikrobiell kontaminering av reagenser, ellers kan det forekomme en økning i ikke-spesifikk farging.

Andre inkubasjonstider 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 formalinfiksert, behandlet og parafinvoxsinnstøpt så snart som mulig på samme måte som pasientprøven(e).

## Positiv vevkontroll

Brukes for å indikere riktig klargjorte vev og riktige fargingsteknikker.

En positiv vevkontroll 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 reagensedbrytning.<sup>2</sup>

Anbefalt positivt kontrollvev er hud.

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

## Negativ vevkontroll

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

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

Ikke-spesifikk farging, hvis dette forekommer, har vanligvis et diffust 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 uspesifikt.<sup>3</sup> Falske positive resultater kan sees på grunn av ikke-immunologisk binding av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan også forårsakes av endogene enzymer slik som pseudoperoksidase (erythrocytter), endogen peroksidase (cytokrom C) eller endogent 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 substratkromogen eller enzymkomplekser (avidin-biotin, streptavidin, merket polymer) og substratkromogen. 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-Akt-Phos 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

Klon LP18 påviste den fosforylerte formen av Akt-proteinet uttrykt i kjernen og cytoplasma av celler i en rekke forskjellige vev (n=56).

Antigenuttrykk ble påvist i tykktarm, tynntarm, cerebellum, nyre, binyre, bukspyttkjertel, lunge, lever, mage, spiserør, hud, skjelettmuskler, milt, hjerte, eggstokk, livmorhals, livmor, testikkel, prostata, tymus, spyttkjertel, skjoldbruskkjertel, biskjoldkjertel, bryst, hypofyse, mandel, beinmarg, mesotelium og aorta.

### Unormale vev

Klon LP18 påviste den fosforylerte formen av Akt-proteinet i 289/301 evaluerte tumorer, inkludert 80/85 prostatatumorer, 67/67 brysttumorer, 29/30 lungetumorer, 13/14 eggstokktumorer, 11/11 skvamøse cellekarsinomer, 10/10 sarkomer, 10/10 skjoldbrusktumorer, 9/9 kolontumorer, 7/7 levertumorer, 6/8 melanomer, 6/6 nyretumorer, 6/6 lymfomer, 5/5 magetumorer, 4/4 nevendokrine tumorer, 4/4 bukspyttkjerteltumorer, 3/4 binyretumorer, 3/4 godartet prostatahyperplasi, 3/4 endometriale tumorer, 3/3 nevraltumorer, 3/3 kimcelletumorer, 3/3 blæretumorer, 2/2 hudtumorer, 1/1 tynntarmtumorer og 1/1 tymustumorer.

## NCL-L-Akt-Phos anbefales for bruk i å påvise uttrykk av den fosforylerte formen av Akt-proteinet i normalt og neoplastisk vev.

## 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, farging av antistoff eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstappingsmetoder eller uregelmessigheter i vevet.<sup>4</sup> 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 kliniske historie og andre diagnostiske tester.

Antistoffer fra Leica Biosystems Newcastle Ltd er til bruk, som indisert, på enten frosne eller paraffininnstøpte 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 – 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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.

6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Science*. 2001; 114:2903–2910.

**Endringer på tidligere utgave**

Ikke relevant.

**Utstedelsesdato**

30 april 2019

# Immunhistokjemisk metode for Novocastra™-antistoffer på parafininnstøpt vev gjennom varmeindusert epitop demaskeringsteknikk.

## Nødvendige reagenser som ikke følger med

1. Standard løsemidler som brukes innen immunhistokjemi.
2. 50 mM tris-bufret saltvann (TBS) pH 7,6.
3. Epitope Retrieval Solution (se C. Løsninger for epitop demaskering).
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.

## Nødvendig utstyr som ikke følger med

1. Inkubator stilt til 25 °C.
2. Oppvarmingsutstyr for epitop demaskering: vannbad, dampkoker, trykkoker eller annet laboratorieutstyr med temperaturkontroll.
3. Generelt immunhistokjemisk laboratorieutstyr.

## Løsninger for epitop demaskering (se anbefalinger for bruk for en av følgende)

|   |   |
|---|---|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l    | Sitratbasert buffer som inneholder et overflateaktivt stoff     |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml |   |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (klar til bruk) 1 L      |   |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l    | EDTA-basert buffer som inneholder et overflateaktivt stoff      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (klar til bruk) 1 L      |   |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l    | Tris/EDTA-basert buffer som inneholder et overflateaktivt stoff |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (klar til bruk) 1 L      |   |

## Metodikk

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

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

#### Epitop demaskering

Følg bruksanvisningen for Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 eller RE7122.

#### Visualisering

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

## Endringer på tidligere utgave

Ikke relevant

## Utstedelsesdato

23. april 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Likit Monoklonal Fare Antikoru Akt (Phosphorylated)

## Ürün Kodu: NCL-L-Akt-Phos

### Kullanım Amacı

*In vitro* diagnostik kullanım içindir.

NCL-L-Akt-Phos, parafin bölümlerindeki Akt (Fosforlanmış) moleküllerinin ışık mikroskopisi ile kalitatif tanımlanması için tasarlanmıştır. Herhangi bir boyanmanın veya yokluğunun klinik yorumlaması hastanın klinik öyküsü ve diğer tanısal testler bağlamında nitelikli bir patoloji uzmanı tarafından değerlendirilmeli ve uygun kontroller kullanılarak morfolojik çalışmalarla desteklenmelidir.

### İşlem Prensipleri

İmmünohistokimyasal (İHK) boyama teknikleri, antijene ardışık olarak belirli bir antikoru uygulanması (birincil antikor), birincil antikora ikincil bir antikorun uygulanması ve aralardeki yıkama adımları ile, antijenlerin kromojenik substratlı bir enzim kompleksi yoluyla görselleştirilmesine olanak tanır. Kromojenin enzimle etkinleştirilmesi, antijen alanında gözle görülür bir tepkiye yol açar. Numune daha sonra karşıt boyanabilir ve lamelle örtülebilir. Sonuçlar bir ışık mikroskopu kullanılarak yorumlanır ve belirli bir antijen ile ilişkili olabileceği veya olmayabileceği patofizyolojik süreçlerin ayrıntı tanısına yardımcı olur.

### Clone

LP18.

### İmmünojen

İnsan Akt molekülünün Ser473'ü etrafındaki kalıntılara karşılık gelen, kimyasal olarak sentezlenmiş fosforlanmış peptid.

### Özellikler

Ser473'te fosforlanmış insan Akt'si.

### Reaktif Bileşimi

NCL-L-Akt-Phos, koruyucu olarak 15 mM sodyum azit içeren bir sıvı doku kültürü süpernatantıdır.

### Ig Sınıfı

IgG2b.

### Toplam Protein Konsantrasyonu Total Protein

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

### Antikor Konsantrasyonu

ELISA tarafından belirlendiği gibi 300 mg/L'ye eşit veya bu değerden yüksek. Seriyeye özgül Ig konsantrasyonu için flakon etiketine bakın.

### Kullanım Önerileri

Parafin kesitlerinde immünohistokimya (bkz **Metodoloji**), parafin bölümü Önerilen dilüsyon: 25°C'de 30 dakika boyunca 01:50. Epitope Retrieval Solution pH 6,0 (RE7113 veya RE7114) kullanılarak yapılan ısı induklü epitop geri kazanımı. Bu, kılavuz olarak verilmiştir ve kullanıcılar kendi optimal çalışma seyreltilerini belirlemelidir. **Teknik not:** PBS esaslı yıkama tamponlarının kullanımının ve muhtemel olarak PBS esaslı antikor seyreltilerinin arka plan boyanmasının artışına ve boyama yoğunluğunun azalmasına yol açmasından ötürü, NCL-L-Akt-Phos'un PBS ile kullanımını tavsiye edilmemektedir.

### Saklama ve Stabiliteler

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.

### Numune Hazırlama

Parafine gömülü doku kesitleri için önerilen fiksatif %10 nötr tamponlanmış formalindir.

### Uyarılar ve Önlemler

Bu reaktif hücre kültürü süpernatantından hazırlanmıştır. Biyolojik bir üründen olduğu için, 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 yayabileceği gibi işlem görmelidir ve gerekli önlemler alınarak atılmalıdır. 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 mikrobiyel kontaminasyonunu minimuma indirin yoksa nonspesifik boyanmada bir artış olabilir.

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

## Kalite Kontrol

Kullanıcının laboratuvarında doku işleme ve teknik işlemlerdeki farklar sonuçlarda önemli değişkenliğe neden olabilir ve aşağıdaki işlemlere ek olarak düzenli şekilde tesis içi kontrollerin kullanılmasını gerektirir.

Kontroller, hasta numunesi/numuneleriyle aynı şekilde mümkün olduğunca kısa süre içinde formalin fiksasyonlu, işlenmiş ve parafine gömülmüş taze otopsi/biyopsi/cerrahi materyal 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.<sup>2</sup>

Önerilen pozitif kontrol dokusu deridir.

Eğer pozitif doku kontrolü pozitif boyanma göstermezse, test numunelerinin sonuçları geçersiz kabul edilmelidir.

## Negatif Doku Kontrolü

Primer antikor tarafından hedef antijenin etiketlenmesinin spesifikliğini doğrulamak için, pozitif doku kontrolünden sonra incelenmelidir.

Alternatif olarak çoğu doku kesitinde bulunan farklı hücre tiplerinin çeşitliliği sıklıkla negatif kontrol bölgeleri sunar ama bu durum kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Eğer varsa nonspesifik boyanmanın görünümü genellikle difüzdür. Aşırı formalin fiksasyonlu dokulardan kesitlerde bağ dokusunun sporadik boyanması da görülebilir. Boyanma sonuçlarının yorumlanması için sağlam hücreler kullanın. Nekrotik ve dejenerer hücreler genellikle spesifik olmayan şekilde boyanır.<sup>3</sup> Proteinlerin veya substrat reaksiyon ürünlerinin immünoolojik olmayan bağlanması nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar görülebilir. Bu sonuçlar ayrıca, kullanılan immün-boyaya bağlı olarak psödoperoksidad (eritrositler), endojen peroksidad (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 numunelerinin 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-Akt-Phos ile boyanmış hasta numunelerinin en son inceleyin. Pozitif boyama yoğunluğu, negatif reaktif kontrolünün spesifik olmayan herhangi bir arka plan boyaması bağlamında değerlendirilmelidir. Her immünohistokimyasal testle olduğu gibi negatif bir sonuç antijenin saptanmadığı anlamına gelir ve antijenin çalışılan hücrelerde/dokuda bulunmadığı anlamına gelmez. Gerekirse yalnızca negatif reaksiyonları tanımlamak için bir antikor paneli kullanın.

## Öngörülen Sonuçlar

### Normal Dokular

Klon LP18, çeşitli dokulardaki hücrelerin çekirdeklerinde ve sitoplazmalarında (n=56) Akt proteininin Fosforlanmış halinin ifade edildiğini tespit etti. Kolon, ince bağırsak, serebellum, böbrek, adrenal bez, pankreas, akciğer, karaciğer, mide, özofagus, cilt, iskelet kası, dalak, kalp, yumurtalık, serviks, uterus, testis, prostat, timus, tükürük bezi, tiroid, paratiroid, meme, hipofiz bezi, tonsil, kemik iliği, mezotel ve aortta ekspresyon saptanmıştır.

### Anormal Dokular

Klon LP18; 80/85 prostat tümörü, 67/67 meme tümörü, 29/30 akciğer tümörü, 13/14 yumurtalık tümörü, 11/11 skuamöz hücreli karsinom, 10/10 sarkom, 10/10 tiroid tümörü, 9/9 kolon tümörü, 7/7 karaciğer tümörü, 6/8 melanom, 6/6 böbrek tümörü, 6/6 lenfoma, 5/5 mide tümörü, 4/4 nöroendokrin tümör, 4/4 pankreatik tümör, 3/4 adrenal tümör, 3/4 benign prostatik hiperplazi, 3/4 endometriyal tümör, 3/3 nöral tümör, 3/3 germ hücreli tümör, 3/3 mesane tümörü, 2/2 cilt tümörü, 1/1 ince bağırsak tümörü ve 1/1 timus tümörü dahil olmak üzere değerlendirilen 289/301 tümörde Akt proteininin Fosforlanmış halini saptamıştır.

**NCL-L-Akt-Phos'un, Akt proteininin fosforlanmış halinin normal ve neoplastik dokulardaki ekspresyonunu saptamak için kullanılması tavsiye edilmektedir.**

## Genel Sınırlamalar

İmmünohistokimya; uygun reaktiflerin seçimi, doku seçimi, fiksasyonu ve işlenmesi, IHC slaytının hazırlanması ve boyama sonuçlarının yorumlanması alanlarında özel eğitimden 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 sıvıların kontaminasyon artefaktlarına, antikor tutulmasına veya yalnızca negatif sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki değişikliklerden ya da dokunun yapısından kaynaklanan düzensizliklerden kaynaklanabilir.<sup>4</sup>

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

Herhangi bir boyanmanın veya yokluğunun klinik yorumlaması hastanın klinik öyküsü ve diğer tanısal testler bağlamında nitelikli bir patoloji uzmanı tarafından değerlendirilmeli ve uygun kontroller kullanılarak morfolojik çalışmalarla desteklenmelidir.

Leica Biosystems Newcastle Ltd'nin antikorları, belirtilen şekilde, özel fiksasyon gereklilikleriyle parafine gömülmüş veya dondurulmuş kesitler üzerinde kullanılır. Özellikle neoplazmlarda beklenmeyen antijen ekspresyonu oluşabilir. Herhangi bir boyanmış 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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? Journal of Cell Science. 2001; 114:2903–2910.

## **Önceki Sayıya Göre Değişiklikler**

Geçerli Değildir.

## **Yayın Tarihi**

30 Nisan 2019

# Isı İndüklü Epitop Alımı Tekniğinden faydalanılarak Parafine Gömülmüş Dokuda Novocastra™ Antikorları İçin İmmünohistokimya Yöntemi.

## Gereken ancak sağlanmayan reaktifler

1. İmmünohistokimya kullanılan standart çözücüler.
2. 50 mM Tris Tamponlu Salin (TBS) pH 7,6.
3. Epitop Geri Kazanım Çözeltisi (bkz. Epitop Geri Kazanım Çözeltileri).
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. Monte etme çözümü - üreticinin önerdiği şekilde kullanın.

## Gereken ancak sağlanmayan ekipman

1. 25°C'ye ayarlı inkübatör.
2. Epitop geri kazanımı için ısıtıcı cihaz: Su banyosu, buhar makinesi, basınçlı pişirici veya diğer sıcaklık kontrollü laboratuvar ekipmanı.
3. Genel immünohistokimya laboratuvar ekipmanı.

## Epitop Geri Kazanım Çözeltileri (bkz. aşağıdakilerden birinin Kullanım Önerileri)

|   |   |
|---|---|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Süpfaktan içeren sitrat bazlı tampon    |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml |   |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       | Süpfaktan içerek EDTA bazlı tampon      |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    |   |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |   |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Süpfaktan içerek Tirs/EDTA bazlı tampon |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |   |

## 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) gerçekleştirilir.

### Epitop Geri Kazanımı

Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 veya RE7122'de kullanım için lütfen talimatları izleyin.

### 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.

## Önceki Sayıya Göre Değişiklikler

Geçerli değildir

## Yayın Tarihi

23 Nisan 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Течно мише моноклонално антитяло Novocastra™ Akt (Phosphorylated)

## Код на продукта: NCL-L-Akt-Phos

### Предназначение

За употреба при *in vitro* диагностика.

Продуктът NCL-L-Akt-Phos е предназначен за качествено идентифициране посредством оптична микроскопия на молекули Akt (фосфорилиран) 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

LP18.

### Имуноген

Синтезиран по химичен път фосфорилиран пептид, съответстващ на остатъците около Ser473 от молекулата човешки Akt.

### Специфичност

Човешки Akt, фосфорилиран при Ser473.

### Състав на реагента

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

### Имуноглобулинов клас

IgG2b.

### Концентрация на общ 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 300 mg/L, както е определено от ELISA. Вижте етикета на флакона относно специфичната за партидата концентрация на имуноглобулин.

### Препоръки за употреба

Имунохистохимия (вж **Методология**) върху парафинови срези. Предложение за разреждане: 1:50 за 30 минути при температура 25°C. Термично индуцирано извличане на епитоп с помощта на разтвор за извличане на епитоп с pH 6,0 (RE7113 или RE7114).

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

**Технически бележки:** Продуктът NCL-L-Akt-Phos не се препоръчва за употреба с PBS (фосфатно буферизиран физиологичен разтвор), тъй като употребата на буфери за промиване и вероятно на разредители за антитела на PBS основа дава завишено фоново оцветяване и намалена интензивност на оцветяването.

### 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 буферизиран 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.

Молярността 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 третира като възможни преносители на инфекция и да се изхвърлят, като се вземат правилни предпазни мерки.<sup>1</sup> 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 пригответни 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.<sup>2</sup>

Препоръчителната тъкан за позитивна контрола е кожа.

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 белязането на таргетния антиген от първичното антияло.

Алтернативно, разнообразието от различни видове клетки, присъстващи в повечето тъкани 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.<sup>3</sup>

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 имунна 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-Akt-Phos, 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 LP18 открива фосфорилираната форма на протеина Akt, експресирана в ядрото и цитоплазмата на клетките в редица тъкани (n=56). Експресия се открива в ободното черво, тънките черва, малкия мозък, бъбрека, надбъбречната жлеза, панкреаса, белия дроб, черния дроб, стомаха, хранопровода, кожата, скелетния мускул, далака, сърцето, яйчника, цервикса, матката, тестиса, простатата, тимуса, слюнчестата жлеза, щитовидната жлеза, паразитовидната жлеза, гърдата, хипофизната жлеза, сливищата, костния мозък, мезотела и аортата.

#### Абнормни тъкани

Клонинг LP18 открива фосфорилираната форма на протеина Akt при 289/301 оценени тумора, включително 80/85 тумора на простатата, 67/67 тумора на гърдата, 29/30 тумора на белия дроб, 13/14 тумора на яйчника, 11/11 плоскоклетъчни карцинома, 10/10 саркома, 10/10 тумора на щитовидната жлеза, 9/9 тумора на ободното черво, 7/7 тумора на черния дроб, 6/8 меланома, 6/6 тумора на бъбрека, 6/6 лимфома, 5/5 тумора на стомаха, 4/4 невроендокринни тумора, 4/4 тумора на панкреаса, 3/4 тумора на надбъбречната жлеза, 3/4 доброкачествена хиперплазия на простатата, 3/4 тумора на ендометриума, 3/3 неврални тумора, 3/3 тумора на зародишните клетки, 3/3 тумора на пикочния мехур, 2/2 кожни тумора, 1/1 тумора на тънките черва и 1/1 тумора на тимуса.

**Продуктът NCL-L-Akt-Phos се препоръчва за употреба при откриване на експресия на фосфорилирала форма на протеина Akt в нормални и неопластични тъкани.**

### 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 ИНС предметно стъкло 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.<sup>4</sup> 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 предназначени за употреба, както е указано, върху замразени или вградени в парафин срези 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 – основна**

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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in Biochemical Sciences*. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Science*. 2001; 114:2903–2910.

## **Изменения на предишно издание**

Не е приложимо.

## **Дата на издаване**

30 Април 2019

# Имунохистохимична методология за антитела Novocastra™ върху вградени в парафин тъкани, използвайки техниката за термично индуцирано извличане на епитоп.

## Необходими, но непредоставени реагенти

1. Стандартни разтворители, използвани с имунохистохимията.
2. 50 mM трометамин-буфериран физиологичен разтвор (TBS) pH 7,6.
3. Разтвор за извличане на епитоп (вж. С. Разтвори за извличане на епитоп).
4. Разредител 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.

## Необходимо, но непредоставено оборудване

1. Инкубатор, настроен на температура 25°C.
2. Загриващ уред за извличане на епитоп: водна вана, изпарител, съд за загряване под налягане или друго лабораторно оборудване с контролирана температура.
3. Общо имунохистохимично лабораторно оборудване.

## Разтвори за извличане на епитоп (вж. Препоръки за употреба за един от следните)

|   |   |
|---|---|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Базиран на цитрат буфер, съдържащ повърхностно активно вещество   |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |   |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (готов за употреба) 1 L  |   |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | Базиран на етилендиаминтетраоцетна киселина буфер, съдържащ повърхностно активно вещество   |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (готов за употреба) 1 L  |   |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Базиран на трометамин-буфериран физиологичен разтвор/етилендиаминтетраоцетна киселина буфер, съдържащ повърхностно активно вещество |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (готов за употреба) 1 L  |   |

## 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).

### Извличане на епитоп

Моля, следвайте инструкциите за употреба в Разтвори за извличане на епитоп RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 или RE7122.

### 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).

## Изменения на предишно издание

Не е приложено

## Дата на издаване

23 април 2008 г. (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ folyékony egér monoklonális antitest

## Akt (Phosphorylated)

### Termékkód: NCL-L-Akt-Phos

#### Alkalmazási terület

*In vitro* diagnosztikai használatra.

Az NCL-L-Akt-Phos az Akt (foszforilált) 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 következõ 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

LP18.

#### Immunogén

A humán Akt molekula Ser473 aminosavja körüli maradványoknak megfelelő, kémiailag úton szintetizált foszforilált peptid.

#### Specifitás

Ser473-foszforilált humán Akt.

#### A reagens összetétele

Az NCL-L-Akt-Phos egy tartósítószerként 15 mM nátrium-azidot tartalmazó folyékony szövetkultúra felülúszó.

#### Ig-osztály

IgG2b.

#### Összfehérje-koncentráció

Total Protein

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

#### Antitest-koncentráció

Legalább 300 mg/l ELISA módszerrel meghatározva. A sarzsspecifikus Ig-koncentrációt lásd az üveg címkéjén.

#### Felhasználási javaslatok

Immunhisztokémia (lásd **Módszer**) paraffinos metszeteken. Javasolt hígítás: 1:50, 30 percen át, 25 °C-on. Hőindukált epitópfeltárás Epitope Retrieval Solution pH 6,0 (RE7113 vagy RE7114) alkalmazásával. Az adatok csak útmutatásul szolgálnak, a felhasználóknak kell meghatározniuk saját optimális munkaadataikat. **Technikai megjegyzés:** Az NCL-L-Akt-Phos alkalmazása PBS-sel nem javasolt, mivel a PBS-alapú mosópufferrek és feltehetően a PBS-alapú antitesthígítók is nagyobb mértékű háttérfestődést és csökkent festésintenzitást okoznak.

#### 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 lejárati 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 sejt-kultúra felülúszójából készült. Mivel biológiai termék, kezelésekor ésszerű 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.<sup>1</sup> Soha ne pipettázza szájjal a reagenst, továbbá kerülje a bőr és a nyálkahártyák érintkezését a reagenssel és a mintákkal. Ha a reagens vagy minták érzékeny területtel érintkeznek, bő vízzel mossa le az érintett területet. Forduljon orvoshoz.

Minimálisra kell csökkenteni a reagens 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, amelyek a lehető leghamarabb a betegmintákkal megegyező módon kell formalinban fixálni, feldolgozni és paraffiniaszba ágyazni.

## Posztív szövETFkontroll

A megfelelő szövETF-előkészítés és festési technikák ellenőrzésére használatos.

Minden tesztelési körülménygyűtes 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.<sup>2</sup>

A javasolt pozitív kontrollszövet a bőr.

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.

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

Ha van nem specifikus festődés, az rendszerint diffúz megjelenésű. A formalinban túlfixált szövETFekből származó metszeteknél a kötőszövet szórányos festődése is megfigyelhető. A festési eredmények értelmezésére ép sejteket használjon. A nekrotizált vagy degenerálódott sejtek gyakran nem specifikusan festődnek meg.<sup>3</sup> A fehérjék vagy a szubsztrát reakciótermékeinek nem immunológiai kötődése miatt álpozitív eredmények jelentkezhetnek. Okozhatják ezt olyan endogén enzimek is, mint a pszeudoperoxidáz (eritrociták), endogén peroxidáz (citokrom C), illetve endogén biotin (pl. máj, mell, agy, vese), az alkalmazott immunmegfestés típusától függően. Az endogén enzim aktivitásának vagy az enzimek 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 metszetet alkalmazzon az elsődleges antitest helyett nem specifikus negatív reagenskontrollt.

## Betegszövet

Az NCL-L-Akt-Phos 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

Az LP18 klón kimutatta a különféle szövetek (n = 56) sejteinek sejtmagjában és citoplazmájában expresszált Akt fehérje foszforilált formáját. Expresszió volt megfigyelhető az alábbiakban: vastagbél-, vékonybél-, cerebellum, vese, mellékvese, hasnyálmirigy, tüdő, máj, gyomor, nyelőcső, bőr, vázizom, lép, szív, petefészek, méhnyak, méh, here, prosztata, csecsemőmirigy, nyálmirigy, pajzsmirigy, mellékpajzsmirigy, emlő, hipofízis, tonsilla, csontvelő, mezotélium és aorta.

### Kóros szövetek

Az LP18 klón a vizsgált 301 daganat közül 289-ben mutatta ki az Akt fehérje foszforilált formáját, az alábbiak szerint: 80/85 prosztata-daganat, 67/67 emlődaganat, 29/30 tüdődaganat, 13/14 petefészek-daganat, 11/11 laphámsejtes karcinóma, 10/10 szarkóma, 10/10 pajzsmirigy-daganat, 9/9 vastagbél-daganat, 7/7 májdaganat, 6/8 melanóma, 6/6 vesedaganat, 6/6 limfóma, 5/5 gyomordaganat, 4/4 neuroendokrin daganat, 4/4 hasnyálmirigy-daganat, 3/4 mellékvese-daganat, 3/4 jóindulatú prosztata-hiperplázia, 3/4 endometrium-daganat, 3/3 neurális daganat, 3/3 csírasejtes daganat, 3/3 húgyhólyag-daganat, 2/2 bőrdaganat, 1/1 vékonybél-daganat és 1/1 csecsemőmirigy-daganat.

### Az NCL-L-Akt-Phos a foszforilált Akt fehérje expressziójának detektálására ajánlott normál és daganatos szövetekben.

## 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 tárgyilemez előkészítése; és a festési eredmények értelmezése.

A szövETF festődése függ a szövETF 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. Ellentmondó eredményekhez vezethetnek a fixálási vagy beágyazási módszerek eltérései, illetve a szövETF erendendó rendelkezései.<sup>4</sup>

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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? Journal of Cell Science. 2001; 114:2903–2910.

## **Módosítások az előző változathoz képest**

Nem alkalmazható.

## **Kiadás dátuma**

30 április 2019

# A Novocastra™ antitestek paraffinba ágyazott szöveten történő felhasználásának immunhisztokémiai módszere hőindukált epitópfeltárással.

## Szükséges, de nem szállított reagensek

1. Az immunhisztokémiában alkalmazott standard oldószerek.
2. 50 mM tris-pufferelt sóoldat (Tris-buffered saline, TBS), pH 7,6.
3. Epitópfeltárási oldat (lásd C. Epitópfeltárási oldatok).
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.

## Szükséges, de nem szállított felszerelés

1. 25 °C-ra beállított inkubátor.
2. Melegítő készülék az epitópfeltáráshoz: vízfürdő, gőzölő, kukta vagy egyéb szabályozott hőmérsékletű laboratóriumi eszköz.
3. Általános immunhisztokémiai laboratóriumi felszerelés.

## Epitópfeltárási oldatok (lásd Felhasználási javaslatok az adott oldat esetében)

|   |   |
|---|---|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l    | Felületaktív anyagot tartalmazó, citrátalapú puffer     |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |   |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 l       |   |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l    | Felületaktív anyagot tartalmazó, EDTA-alapú puffer      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 l       |   |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l    | Felületaktív anyagot tartalmazó, tris/EDTA-alapú puffer |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 l       |   |

## 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.

### Epitópfeltárási

Kövesse az RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119, illetve RE7122 számú epitópfeltárási oldatok használati útmutatóját.

### Megjelenítés

Kövesse a Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 tests), RE7150-K (500 tests), RE7140-K (250 tests), illetve RE7290-K (50 tests) használati útmutatóját.

## Előző kiadás módosításai

Nem alkalmazható

## Kiadás időpontja

2008. április 23. (CE-protokoll/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Anticorp monoclonal lichid de șoarece Akt (Phosphorylated)

## Cod produs: NCL-L-Akt-Phos

### Utilizare prevăzută

*Pentru diagnosticare in vitro.*

NCL-L-Akt-Phos este destinat identificării calitative, prin intermediul microscopiei optice, a moleculelor Akt (fosforilate) 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 anticorpul primar 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

LP18.

### Imunogen

O peptidă fosforilată sintetizată chimic corespunzând reziduurilor din jurul Ser473 din molecula umană Akt .

### Specificitate

Akt umană fosforilată la Ser473.

### Compoziția reactivului

NCL-L-Akt-Phos este un supernatant lichid de cultură tisulară, 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 300 mg/L, așa cum este determinată prin ELISA. Consultați eticheta flaconului pentru concentrația Ig specifică lotului.

### Recomandări privind utilizarea

Imunohistochimie (a se vedea **Metodologie**) pe secțiuni în parafină. Diluție sugerată: 1:50 timp de 30 minute la 25 °C. Recuperarea indusă de căldură a epitopilor utilizând Epitope Retrieval Solution pH 6,0 (RE7113 sau RE7114). Aceste informații sunt furnizate cu rol de îndrumare, iar utilizatorii trebuie să-și stabilească singuri propriile diluții de lucru optime. **Notă tehnică:** NCL-L-Akt-Phos nu este recomandat pentru utilizare cu SSTF, întrucât utilizarea de soluții tampon de spălare bazate pe SSTF și eventual a diluanților pentru anticorp bazați pe SSTF produce o colorație de fundal sporită și o intensitate scăzută a colorației.

### 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

Mediul de fixare 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.

Specimenele, înainte și după fixare, precum și toate materialele expuse la acestea, trebuie manevrate ca și când ar avea potențialul de a transmite infecții și trebuie eliminate luând măsurile de precauție adecvate.<sup>1</sup> Nu pipetați niciodată reactivii pe gură și evitați contactul reactivilor și specimenelor cu pielea și mucoasele. 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.<sup>2</sup>

Țesutul de control pozitiv recomandat este pielea.

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 anticorpii primari.

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.<sup>3</sup> 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, creier, 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 situsul antigenului.

### Țesutul pacientului

Examinați speciimenele pacientului colorate cu NCL-L-Akt-Phos 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 LP18 a detectat forma fosforilată a proteinei Akt exprimată în nucleul și citoplasma celulelor într-o varietate de țesuturi (n=56). Expresia a fost detectată în colon, intestinul subțire, creierul, rinichi, glanda suprarenală, pancreas, plămân, ficat, stomac, esofag, piele, mușchi scheletic, splină, inimă, ovar, col uterin, uter, testicul, prostată, timus, glanda salivară, tiroidă, paratiroidă, sân, glanda pituitară, amigdală, măduva osoasă, mezoteliu și aortă.

#### Țesuturi anormale

Clona LP18 a detectat forma fosforilată a proteinei Akt în 289/301 tumori evaluate incluzând 80/85 tumori prostatice, 67/67 tumori mamare, 29/30 tumori pulmonare, 13/14 tumori ovariene, 11/11 carcinoame cu celule scuamoase, 10/10 sarcoame, 10/10 tumori tiroidiene, 9/9 tumori de colon, 7/7 tumori hepatice, 6/8 melanoame, 6/6 limfoame, 5/5 tumori ale stomacului, 4/4 tumori neuroendocrine, 4/4 tumori pancreatice, 3/4 tumori suprarenale, 3/4 hiperplazii prostatice benigne, 3/4 tumori endometriale, 3/3 tumori neurale, 3/3 tumori cu celule germinale, 3/3 tumori ale vezicii urinare, 2/2 tumori ale pielii, 1/1 tumori ale intestinului subțire și 1/1 o tumoră a timusului.

**NCL-L-Akt-Phos este recomandat pentru utilizare în detectarea expresiei formei fosforilate a proteinei Akt în țesuturi normale și neoplazice.**

### 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 neregularităților inerente ale țesutului.<sup>4</sup>

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 neoplasm. 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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? Journal of Cell Science. 2001; 114:2903–2910.

## **Amendamente la ediția anterioară**

Nu este cazul.

## **Data publicării**

30 aprilie 2019

# Metodologie imunohistochimică pentru Anticorpi Novocastra™ pe țesut încorporat în parafină utilizând tehnica de recuperare indusă de căldură a epitopilor.

## 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 de recuperare a epitopilor (a se vedea C. Soluții de recuperare a epitopilor).
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.

## Echipeamente necesare care nu sunt însă furnizate

1. Incubator setat la 25 °C.
2. Dispozitiv de încălzire pentru recuperarea epitopilor: baie de apă, vas de aburi, vas sub presiune sau alte echipamente de laborator cu temperatură controlată.
3. Echipament de laborator general pentru imunohistochimie.

## Soluții de recuperare a epitopilor (a se vedea Recomandări de utilizare pentru una din următoarele)

|   |   |
|---|---|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Soluție tampon bazată pe citrat conținând surfactant    |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |   |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |   |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | Soluție tampon bazată pe EDTA conținând surfactant      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |   |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Soluție tampon bazată pe Tris/EDTA conținând surfactant |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |   |

## 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).

#### Recuperarea epitopilor

Urmați instrucțiunile de utilizare pentru Soluții de recuperare a epitopilor, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 sau RE7122.

#### 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).

## Amendamente la ediția anterioară

Nu este cazul

## Data publicării

23 aprilie 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Жидкая форма моноклональных антител мыши Novocastra™ Akt (Phosphorylated)

## Код продукта: NCL-L-Akt-Phos

### Назначение

*Для диагностики in vitro*

Препарат NCL-L-Akt-Phos предназначен для качественной идентификации молекул Akt (Фосфорилированный) 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 патофизиологических процессов, которые могут быть связаны или не связаны с конкретным антигеном.

### Клон

LP18.

### Иммуноген

Химически синтезированный фосфорилированный пептид, соответствующий остаткам вокруг Ser473 молекул Akt человека.

### Специфичность

Фосфорилированный Akt человека при Ser473.

### Состав реактива

NCL-L-Akt-Phos является супернатантом жидкой культуры тканей, который в качестве консерванта содержит азид натрия в концентрации 15 мМ.

### 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 300 мг/л при измерении методом ИФА. Концентрация иммуноглобулина, соответствующая данной серии, указана на этикетке флакона.

### Рекомендации по применению

Иммуногистохимия парафиновых срезов (смотрите раздел **Методология**). Рекомендуемое разведение: 1:50 в течение 30 минут при температуре 25 °С. Тепловая демаскировка эпитопа с использованием раствора для демаскировки эпитопов (Epitope Retrieval Solution), pH 6,0 (RE7113 или RE7114). Данная информация носит рекомендательный характер, и пользователям следует самостоятельно определять оптимальные рабочие разведения. **Техническая записка:** NCL-L-Akt-Phos не рекомендован к использованию с фосфатно-солевым буфером (ФСБ), поскольку промывочный раствор, основанный на ФСБ, и возможно разбавители антител, основанные на ФСБ, увеличивают фоновое окрашивание и снижают интенсивность окрашивания.

### Хранение и стабильность

Хранить при температуре 2–8 °С. Не замораживать. После использования немедленно 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 приготовления 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 азид 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.<sup>1</sup> 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.

Сводите 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 внутрिलाбораторных 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.<sup>2</sup>

Кожа является тканью, которую рекомендуется использовать в качестве положительного контроля.

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 мечения целевого антигена первичным антителом.

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.<sup>3</sup> 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-Akt-Phos, в последнюю очередь. Интенсивность положительного результата окрашивания следует оценивать с учетом любого неспецифического фоновое 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 LP18 обнаружил фосфорилированную форму белка Akt, выраженной в ядре и цитоплазме клеток различных тканей (n=56). Экспрессия была обнаружена в толстом кишечнике, тонком кишечнике, мозжечке, почках, надпочечнике, поджелудочной железе, легком, печени, желудке, пищеводе, коже, скелетных мышцах, селезенке, сердце, яичнике, шейке матки, матке, яичке, простате, вилочковой железе, слюнной железе, щитовидной железе, парацистовидной железе, молочной железе, гипофизе, миндалине, косном мозге, мезотелии и аорте.

Патологические измененные ткани

Клон LP18 обнаружил фосфорилированную форму белка Akt в 289/301 случая исследованных опухолей, включая 80/85 случаев опухоли простаты, 67/67 опухолей молочной железы, 29/30 случаев опухоли легких, 13/14 случаев опухоли яичников, 11/11 случаев плоскоклеточной карциномы, 10/10 случаев саркомы, 10/10 случаев опухоли щитовидной железы, 9/9 случаев опухоли толстого кишечника, 7/7 случаев опухоли печени, 6/8 случаев меланомы, 6/6 случаев опухоли печени, 6/6 случаев лимфомы, 5/5 случаев опухоли желудка, 4/4 случаев нейроэндокринной опухоли, 4/4 случаев опухоли поджелудочной железы, 3/4 случаев опухоли надпочечников, 3/4 случаев злокачественной гиперплазии простаты, 3/4 случаев опухоли эндометрия, 3/3 случаев невральной опухоли, 3/3 случаев опухоли зародышевых клеток, 3/3 случаев опухоли мочевого пузыря, 2/2 случаев опухоли кожи, 1/1 случая опухоли тонкого кишечника и 1/1 случая опухоли вилочковой железы.



**NCL-L-Akt-Phos рекомендуется использовать для обнаружения экспрессии фосфорилированной формы белка Akt в здоровых и пораженных опухолью тканях.**

**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.<sup>4</sup>

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.

**Литература — 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. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? Journal of Cell Science. 2001; 114:2903–2910.

**Дополнения к предыдущему выпуску**

Не применимо.

**Дата выпуска**

30 Апрель 2019

# Методика иммуногистохимического исследования антител Novocastra™ в залитых в парафин тканях с использованием технологии тепловой демаскировки эпитопа.

## Необходимые реактивы, не входящие в комплект поставки

1. Стандартные растворители, используемые в иммуногистохимических исследованиях.
2. 50 мМ трис-буферный солевой раствор (TBS), pH 7,6.
3. Раствор для демаскирования эпитопов (смотрите раздел «Растворы для демаскирования эпитопов»).
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.

## Необходимое оборудование, не входящее в комплект поставки

1. Термостат, установленный на 25 °С.
2. Устройства для нагревания, используемые при демаскировании антигенов: водяная баня, паогенератор, скороварка или иное лабораторное оборудование, снабженное регулятором температуры.
3. Стандартное лабораторное оборудование для иммуногистохимических исследований.

## Растворы для демаскирования эпитопов (смотрите Рекомендации по использованию одного из следующих)

|   |   |
|---|---|
| Раствор для демаскирования эпитопов RE7113 Epitope Retrieval Solution, pH 6, (10-кратный концентрат), 1 л           | Буфер на основе лимонной кислоты, содержащий сурфактант |
| Раствор для демаскирования эпитопов RE7114 Epitope Retrieval Solution, pH 6, (10-кратный концентрат), 500 мл        |   |
| Раствор для демаскирования эпитопов RE7115 Epitope Retrieval Solution, pH 6, (готовый к использованию реактив), 1 л | Буфер на основе EDTA, содержащий сурфактант             |
| Раствор для демаскирования эпитопов RE7116 Epitope Retrieval Solution, pH 8, (10-кратный концентрат), 1 л           |   |
| Раствор для демаскирования эпитопов RE7118 Epitope Retrieval Solution, pH 8, (готовый к использованию реактив), 1 л | Буфер на основе EDTA/Tris, содержащий сурфактант        |
| Раствор для демаскирования эпитопов RE7119 Epitope Retrieval Solution, pH 9, (10-кратный концентрат), 1 л           |   |
| Раствор для демаскирования эпитопов RE7122 Epitope Retrieval Solution, pH 9, (готовый к использованию реактив), 1 л |   |

## 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).

### Демаскирование эпитопа

Пожалуйста, следуйте инструкциям по использованию растворов для демаскирования эпитопов RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 или RE7122.

### Визуализация

Пожалуйста, следуйте инструкциям по использованию систем визуализации Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 исследований), RE7150-K (500 исследований), RE7140-K (250 исследований) или RE7290-K (50 исследований).

## Дополнения к предыдущему выпуску

не применимо

## Дата выпуска

23 апреля 2008 г. (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Płynne mysie przeciwciała monoklonalne Novocastra™

## Akt (Phosphorylated)

### Kod produktu: NCL-L-Akt-Phos

#### Przeznaczenie

Do diagnostyki *in vitro*.

Produkt NCL-L-Akt-Phos jest przeznaczony do identyfikacji jakościowej z zastosowaniem mikroskopii świetlnej cząsteczek Akt (fosforyzowanych) 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 antygeny. 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

LP18.

#### Immunogen

Syntetyzowany chemicznie fosforylowany peptyd odpowiadający resztom wokół Ser473 ludzkiej cząsteczki Akt.

#### Swoistość

Ludzka Akt fosforyzowana w Ser473.

#### Skład odczynnika

NCL-L-Akt-Phos jest płynnym supernatantem hodowli tkankowej zakonserwowanym 15 mM azydkiem sodu.

#### Klasa Ig

IgG2b.

#### Całkowite stężenia białka

Total Protein

1,0–8,0 g/l. Całkowite stężenie białka w danej serii podano na etykiecie fiolki.

#### Stężenie przeciwciał

Większe lub równe 300 mg/L oznaczone za pomocą testu ELISA. Stężenie Ig w danej serii podano na etykiecie fiolki.

#### Zalecenia dotyczące stosowania

Badanie immunochemiczne (zob **Metodologia**) skrawków parafinowych. Sugerowane rozcieńczenie: 1:50 przez 30 minut w temperaturze 25 °C. Ciepłe odmaskowywanie epitopu przy użyciu roztworu Epitope Retrieval Solution pH 6.0 (RE7113 lub RE7114).

Te informacje stanowią jedynie wskazówkę – użytkownicy powinni sami określić swoje optymalne rozcieńczenie robocze. **Uwagi techniczne:** Nie zaleca się stosowania NCL-L-Akt-Phos z PBS, ponieważ stosowanie buforów płuczających na bazie PBS (soli fizjologicznej buforowanej fosforanem) i ewentualnie rozcieńczalników przeciwciał na bazie PBS zapewnią zwiększone wybarwienie tła i zmniejsza intensywność barwienia.

#### 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 fiolki. Przechowywanie w warunkach innych od wskazanych powyżej wymaga weryfikacji użytkownika.

#### Przygotowanie próbek

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

#### 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 azydkiem sodu w tym odczynniku wynosi 15 mM. Karta charakterystyki azydkiem sodu jest udostępniana na żądanie.

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

Próbki, przed i po utrwaleniu oraz wszystkie materiały mające z nimi kontakt należy traktować jako potencjalnie zakaźne i usuwać przy zachowaniu odpowiednich środków ostrożności.<sup>1</sup> Nigdy nie zasysać odczynników ustami podczas pobierania pipetą oraz unikać kontaktu odczynników i próbek badanych ze skórą i błonami śluzowymi. W razie kontaktu odczynników lub próbek ze szczególnie narażonymi miejscami przemyć miejsce kontaktu dużą ilością wody. Należy zasięgnąć porady lekarza.

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

Zastosowanie okresów inkubacji i temperatur innych niż podano w instrukcji może spowodować błędne wyniki. Wszelkie zmiany tego typu muszą zostać zweryfikowane 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 wewnątrznych.

Kontrolie należy przeprowadzać jak najszyciej na świeżych próbkach z autopsji/biopsji/operacji chirurgicznej utwalonych, 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.<sup>2</sup>

Tkankowa kontrola pozytywna powinna obejmować skórę.

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.

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 utwalonego 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.<sup>3</sup> 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 biotyna (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 niespecyficzną kontrolę negatywną odczynnika w miejscu wiązania przeciwciała pierwszorzędowego.

## Tkanka pacjenta

Próbki pacjenta wybarwione testem NCL-L-Akt-Phos należy badać jako ostatnie. Intensywność barwienia pozytywnego należy oceniać w kontekście ewentualnego niespecyficznego barwienia tła 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 LP18 wykrył fosforylowaną postać białka Akt ulegającą ekspresji w jądrze komórkowym i cytoplazmie komórek różnych tkanek (n=56). Ekspresję wykryto w okrężnicy, jelicie cienkim, mózdzku, nerce, nadnerczach, trzustce, płucach, wątrobie, żołądku, przelyku, skórze, mięśniach szkieletowych, śledzionie, sercu, jajniku, szyjce macicy, macicy, jądrach, gruczole krokowej, grasicy, śliniance, tarczycy, przytarczycach, sutku, przysadce, migdałku, szpiku kostnym, mezotelium i aortic.

### Tkanki nieprawidłowe

Klon LP18 wykrył fosforylowaną postać białka Akt w ocenianych 289/301 guzach, w tym w 80/85 nowotworach prostaty, 67/67 guzach sutka, 29/30 guzach płuc, 13/14 guzach jajnika, 11/11 rakach płaskonabłonkowych, 10/10 mięśniakach, 10/10 guzach tarczycy, 9/9 guzach okrężnicy, 7/7 guzach wątroby, 6/8 czerniakach, 6/6 guzach nerki, 6/6 chłoniakach, 5/5 guzach żołądka, 4/4 guzach neuroendokrynych, 4/4 guzach trzustki, 3/4 guzach nadnerczy, 3/4 przypadkach łagodnego wzrostu gruczołu krokowego, 3/4 guzach endometrialnych, 3/3 guzach nerwowych, 3/3 guzach zarodkowych, 3/3 guzach pęcherza moczowego, 2/2 nowotworach skóry, 1/1 guzie jelita cienkiego i 1/1 guzie grasicy.

### Zaleca się stosowanie NCL-L-Akt-Phos do wykrywania ekspresji fosforylowanej formy białka Akt w tkankach prawidłowych i nowotworowych.

## Ograniczenia ogólne

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

Barwienie tkanek zależy od postępowania z tkanką i jej przetwarzania przed barwieniem. Nieprawidłowe utwalanie, 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 utwalania i zatapiania lub nieprawidłowości związanej z tkanką.<sup>4</sup>

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. Ocenie powinien przeprowadzić wykwalifikowany patolog w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych. Przeciwciała firmy Leica Biosystems Newcastle Ltd są przeznaczone do badania skrawków zamrożonych lub zatopionych w parafinie, które utwalono zgodnie z określonymi wymogami. Może wystąpić nieoczekiwana ekspresja antygeny, 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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? Journal of Cell Science. 2001; 114:2903–2910.

### **Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania**

Nie dotyczy.

### **Data publikacji**

30 kwietnia 2019

# Metodologia badań immunohistochemicznych wykorzystujących przeciwciała Novocastra™ do badania tkanek zatopionych w parafinie techniką cieplnego odmaskowywania epitopu.

## Odczynniki wymagane, lecz niedostarczane

1. Standardowe rozpuszczalniki stosowane w immunohistochemii.
2. 50 mM roztworu soli fizjologicznej buforowanego odczynnikiem Tris (TBS) pH 7.6.
3. Epitope Retrieval Solution (zob.: C. Roztwory do odmaskowywania epitopu).
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 - użyć zgodnie z zaleceniami producenta.

## Sprzęt wymagany, lecz niedostarczany

1. Inkubator ustawiony na 25 °C.
2. Urządzenie grzewcze do odmaskowywania epitopu: łaźnia wodna, parowar, szybkowar lub inne urządzenie laboratoryjne z kontrolowaną temperaturą.
3. Ogólne wyposażenie laboratorium immunohistochemicznego.

## Roztwory do odmaskowywania epitopu (zob. Zalecenia dotyczące stosowania dla jednego z poniższych)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 l    | Bufor na bazie cytrynianu zawierający środek powierzchniowo czynny |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 l       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 l    | Bufor na bazie EDTA zawierający środek powierzchniowo czynny       |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 l       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 l    | Bufor na bazie Tris/EDTA zawierający środek powierzchniowo czynny  |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 l       |  |

## 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).

### Odmaskowywanie epitopu

Należy postępować zgodnie z instrukcją stosowania dołączonej do roztworów Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 lub RE7122.

### 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).

## Poprawki do poprzedniego wydania

Nie dotyczy

## Data publikacji

23 kwietnia 2008 r. (CEprotocol/HTAUT + Novolink).

# Tekočinsko monoklonsko protiteleso Novocastra™ iz miši Akt (Phosphorylated)

## Koda izdelka: NCL-L-Akt-Phos

### Predvidena uporaba

Za diagnostično uporabo *in vitro*.

Izdelek NCL-L-Akt-Phos je namenjen za kvalitativno identifikacijo molekul Akt (fosforiliran) 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 protiteleso), sekundarnega protitelesa na primarno protiteleso 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

LP18

### Imunogen

Kemično sintetiziran fosforiliran peptid, ki ustreza ostankom okrog Ser473 človeške molekule Akt.

### Specifičnost

Človeški Akt, fosforiliran na Ser473.

### Sestava reagenta

Izdelek NCL-L-Akt-Phos je tekočinski supernatant kulture tkiva, ki kot konzervans vsebuje 15 mM natrijevega azida.

### 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 300 mg/l, določena s testom ELISA. Za specifično koncentracijo Ig v seriji glejte oznako na viali.

### Priporočila za uporabo

Imunohistokemija (glejte poglavje **Metodologija**) parafinskih rezin. Predlagano redčenje: 1:50 za 30 minut pri 25 °C. Toplotno pridobivanje epitopa z raztopino Epitope Retrieval Solution pH 6,0 (RE7113 ali RE7114). To so samo smernice; uporabniki naj poiščejo svoje lastne najbolj učinkovite delovne razredčine. **Tehnična opomba:** Izdelek NCL-L-Akt-Phos se ne priporoča za uporabo s fiziološko raztopino s fosfatnim pufrom PBS, saj pufri za izpiranje na osnovi PBS in morebitna redčila za protitelesa na osnovi PBS povzročijo večje obarvanje ozadja in manjšo intenzivnost obarvanja.

### 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

Priporočeni fiksativ 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.<sup>1</sup> 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 povzročijo 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 razvoja reagenta je bolj primerno uporabiti tkivo s šibkim pozitivnim obarvanjem kot tkivo z močnim pozitivnim obarvanjem.<sup>2</sup>

Za pozitivni kontrolni vzorec tkiva priporočamo kožno tkivo.

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.

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.<sup>3</sup> Lažno pozitivni rezultati se lahko pojavijo zaradi neimunološke 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 imunске reaktivnosti, lahko barvate dodatna tkiva bolnika izključno ali s kromogenskim substratom ali encimskimi kompleksi (avidin-biotin, streptavidin, označeni polimer) in kromogenskim 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-Akt-Phos. 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 LP18 je zaznal fosforilirano obliko proteina Akt, izraženo v jedrih in citoplazmi celic različnih tkiv (n = 56). Izražanje so opazili v kolonu, tankem črevesu, malih možganih, ledvicah, nadledvični žlezi, trebušni slinavki, pljučih, jetrih, želodcu, požiralniku, koži, skeletnih mišicah, vranici, srcu, jajčniku, materničnem vratu, maternici, testisih, prostati, priželjcu, žlezah slinavkah, ščitnici, obščitnici, dojkah, hipofizi, tonzilah, kostnem mozgu, mezoteliju in aorti.

### Nenormalna tkiva

Klon LP18 je zaznal fosforilirano obliko proteina Akt pri 289/301 ocenjenih tumorjev, vključno z 80/85 tumorjev prostate, 67/67 tumorjev dojke, 29/30 pljučnih tumorjev, 13/14 tumorjev jajčnikov, 11/11 ploščatoceličnih karcinomov, 10/10 sarkomov, 10/10 tumorjev ščitnice, 9/9 tumorjev kolona, 7/7 jetrnih tumorjev, 6/8 melanomov, 6/6 ledvičnih tumorjev, 6/6 limfomov, 5/5 žlezočnih tumorjev, 4/4 neuroendokrinih tumorjev, 4/4 tumorjev trebušne slinavke, 3/4 tumorjev nadledvične žleze, 3/4 benignih hiperplazij prostate, 3/4 endometrijskih tumorjev, 3/3 nevrlnih tumorjev, 3/3 tumorjev germinalnih celic, 3/3 tumorjev sečnega mehurja, 2/2 kožnih tumorjev, 1/1 tumorja tankega črevesa in 1/1 tumorja priželjca.

### Izdelek NCL-L-Akt-Phos se priporoča za zaznavanje izražanja fosforilirane oblike proteina Akt v normalnih in neoplastičnih tkivih.

## 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 povzroči 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.<sup>4</sup> 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 oceni usposobljen patolog.

Protitelesa družbe Leica Biosystems Newcastle Ltd so namenjena uporabi, kot je navedeno, na zamrznjenih ali v parafin vstavljenih 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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in Biochemical Sciences*. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Science*. 2001; 114:2903–2910.

## **Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji**

Navedba smiselno ni potrebna.

## **Datum izdaje**

30 april 2019

# Imunohistokemijska metodologija za uporabo protiteles Novocastra™ pri tkivu, vstavljenem v parafin, s tehniko toplotnega pridobivanja epitopa.

## 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. Epitope Retrieval Solution (glejte C. Raztopine za pridobivanje epitopa).
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.

## Potrebna oprema, ki ni priložena

7. Inkubator nastavljen na 25 °C.
8. Grelnik za pridobivanje epitopa: vodna kopel, parni kuhalnik, tlačni lonec ali druga laboratorijska oprema z nadzorom temperature.
9. Splošna oprema za imunohistokemijski laboratorij.

## Epitope Retrieval Solution (glejte priporočila za uporabo enega izmed naslednjih izdelkov)

|   |  |
|---|--|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Citratni pufer, ki vsebuje surfaktant    |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |  |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | Pufer z EDTA, ki vsebuje surfaktant      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |  |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Pufer s tris/EDTA, ki vsebuje surfaktant |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |  |

## 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.

### Pridobivanje epitopov

Upošteвайте navodila za uporabo raztopin za pridobivanje epitopov Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 ali RE7122.

### Vizualizacija

Upošteвайте navodila za uporabo sistemov za zaznavanje polimerov Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 testov), RE7150-K (500 testov), RE7140-K (250 testov) ali RE7290-K (50 testov).

## Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji

Ni primerno

## Datum izdaje

23. april 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Novocastra™ Tekutá myši monoklonální protilátka

## Akt (Phosphorylated)

### Kód výrobku: NCL-L-Akt-Phos

#### Zamýšlené použití

*Pro diagnostické použití in vitro.*

NCL-L-Akt-Phos je určen ke kvalitativnímu stanovení lidských Akt (fosforylovaný) molekul 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

LP18.

#### Imunogen

Chemicky syntetizovaný fosforylovaný peptid odpovídající reziduum kolem Ser473 lidské molekuly Akt.

#### Specifita

Lidský Akt fosforylovaný v Ser473.

#### Složení reagentie

NCL-L-Akt-Phos je tekutý supernatant z tkáňové kultury obsahující jako konzervační prostředek 15mM 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

300 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 **Metodika**) na parafinových řezech. Doporučené ředění: 1:50 po dobu 30 minut při 25 °C. Teplem indukované odmaskování epitopu pomocí odmaskovacího roztoku Epitope Retrieval Solution pH 6,0 (RE7113 nebo RE7114). Toto doporučení je uvedeno jako vodítko; uživatelé musí stanovit vlastní optimální pracovní ředění. **Technická poznámka:** NCL-L-Akt-Phos se nedoporučuje k použití s PBS, jelikož použití promývacích pufrů na bázi PBS a ředících roztoků na protilátka na bázi PBS vede ke zvýšenému barvení pozadí a snížení intenzity barvení.

#### 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 řezy tkáně zalité v parafinu 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 jím vystavenými je nutno zacházet, jako by mohly způsobit přenos infekce, a likvidovat je s náležitými bezpečnostními opatřeními.\* 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.<sup>2</sup>

Doporučená pozitivní tkáňová kontrola je kůže.

Pokud pozitivní tkáňová kontrola nevykazuje pozitivní barvení, musí být výsledky testovaných vzorků považovány za neplatné.

## Negativní tkáňová kontrola

Musí být vyšetřena po pozitivní tkáňové kontrole k ověření specificity označení cílového antigenu primární protilátkou.

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 formálem může být také zjištěno sporadické barvení pojivové tkáně. K interpretaci výsledků barvení použijte neporušené buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky se často barví nespecificky.<sup>3</sup> Falešně pozitivní výsledky mohou být důsledkem neimunologické 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 tkáně 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 nespecifickou negativní reagenční kontrolu místo primární protilátky.

## Tkáň pacienta

Nakonec vyšetřete vzorky pacienta barvené pomocí NCL-L-Akt-Phos. 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 tkáně

Klon LP18 detekoval fosforylovanou formu proteinu Akt exprimovanou v jádře a cytoplasmě buněk různých tkání (n=56). Expres byla detekována v tlustém a tenkém střevě, cerebellu, ledvinách, adrenální žláze, pankreatu, plicích, játrech, žaludku, jícnu, kůži, skeletálnímu svalu, ledvinách, srdci, vaječnicku, děloze, varlatech, prostatě, thymu, slinné žláze, štítné žláze, příštítných tělískách, prsu, hypofýze, tonsilách, kostní dřeně, mesothelu a aortě.

### Abnormální tkáně

Klon LP18 detekoval fosforylovanou formu proteinu Akt u 289/301 hodnocených nádorů, vč. 80/85 nádorů prostaty, 67/67 nádorů prsu, 29/30 nádorů plic, 13/14 nádorů vaječnicků, 11/11 spinocelulárních karcinomů, 10/10 sarkomů, 10/10 nádorů štítné žlázy, 9/9 nádorů tlustého střeva, 7/7 nádorů jater, 6/8 melanomů, 6/6 nádorů ledvin, 6/6 lymfomů, 5/5 nádorů žaludku, 4/4 neuroendokrinních tumorů, 4/4 nádorů pankreatu, 3/4 adrenálních tumorů, 3/4 případů benigní hyperplázie prostaty, 3/4 endometriálních tumorů, 3/3 neurálních tumorů, 3/3 tumorů zárodečných buněk, 3/3 nádorů močového měchýře, 2/2 nádorů kůže, 1/1 nádoru tenkého střeva a 1/1 nádoru thymu.

**NCL-L-Akt-Phos se doporučuje používat k detekci exprese fosforylované formy proteinu Akt v normálních a neoplastických tkáních.**

## Obecná omezení

Imunohistochemické vyšetření je víceřadový 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.<sup>4</sup>

Nadměrně nebo nedostatečně kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.

Klinickou interpretaci jakéhokoli barvení nebo jeho nepřítomnosti je nutné doplnit morfoloogickým 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 jakéhokoli barveného tkáňového řezu musí zahrnovat morfoloogickou 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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? Journal of Cell Science. 2001; 114:2903–2910.

## **Opravy předchozího vydání**

Nevztahuje se.

## **Datum vydání**

30 duben 2019

# Imunohistochemická metodika při použití protilátek Novocastra™ u tkáně zalité v parafínu s použitím techniky teplem indukovaného odmaskování epitopu.

## Potřebné reagenty, které nejsou součástí dodávky

1. Standardní rozpouštědla používaná v imunohistochemii.
2. Fyziologický roztok pufovaný 50mM roztokem tris-pufiru (TBS), pH 7,6.
3. Odmaskovací roztok epitopu (viz C. Roztoky Epitope Retrieval Solutions).
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.

## Potřebné vybavení, které není součástí dodávky

1. Inkubátor nastavený na 25 °C.
2. Zahřívací zařízení k odmaskování epitopu: vodní lázeň, sterilizační přístroj, tlakový hrnec nebo jiné laboratorní vybavení s kontrolovanou teplotou.
3. Obecné vybavení imunohistochemické laboratoře.

## Roztoky k odmaskování epitopu (viz Doporučení k použití pro jeden z následujících roztoků)

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 koncentrát) 1 l              | Citrátový pufr s obsahem surfaktantu |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 ml          |                                      |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (roztok připravený k použití) 1 l |                                      |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 koncentrát) 1 l              | EDTA pufr s obsahem surfaktantu      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (roztok připravený k použití) 1 l |                                      |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 koncentrát) 1 l              | Tris/EDTA pufr s obsahem surfaktantu |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (roztok připravený k použití) 1 l |                                      |

## 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).

#### Odmaskování epitopu

Postupujte podle pokynů k roztokům Epitope Retrieval Solutions, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 nebo RE7122.

#### Vizualizace

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

## Opravy předchozího vydání

Nevztahuje se

## Datum vydání

23. dubna 2008 (CEprotocol/HTAUT+Novolink).

# Tekutá myšia monoklonálna protilátka Novocastra™

## Akt (Phosphorylated)

### Kód produktu: NCL-L-Akt-Phos

#### Zamýšľané použitie

Na diagnostické použitie *in vitro*.

NCL-L-Akt-Phos slúži na kvalitatívnu identifikáciu molekúl proteínu Akt (fosforylovaného) v parafinových rezoch pomocou svetelnej mikroskopie. Klinická interpretácia akéhokoľvek zafarbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými výšetreniami 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

LP18.

#### Imunogén

Chemicky syntetizovaný fosforylovaný peptid zodpovedajúci reziduám okolo Ser473 molekuly ľudského proteínu Akt.

#### Špecificita

Ľudský Akt fosforylovaný pri Ser473.

#### Zloženie činidla

NCL-L-Akt-Phos 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 300 mg/l podľa ELISA. Koncentráciu Ig špecifickú pre šaržu nájdete na štítku fľaštičky.

#### Odporúčania na použitie

Imunohistochemia (pozri časť **Metóda**) parafinových rezov. Odporúčané riedenie: 1 : 50 počas 30 minút pri teplote 25 °C. Záchyt epitopov s tepelnou indukciou s použitím záchytného roztoku pre epitopy s pH 6,0 (RE7113 alebo RE7114). Táto hodnota je orientačná, používatelia si musia stanoviť svoje vlastné optimálne pracovné riedenia. **Technická poznámka:** NCL-L-Akt-Phos sa neodporúča na použitie s PBS, pretože použitie premývacích pufov na báze PBS a prípadne zriedovadiel protilátok na báze PBS zvyšuje zafarbenie pozadia a znižuje intenzitu zafarbenia.

#### Ukladnenie 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 fixačný prípravok je 10 % neutrálny pufovaný 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.<sup>1</sup> 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 dób 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 piteľné/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.<sup>2</sup>

Odporúčané tkanivo na pozitívnu kontrolu je koža.

Ak pozitívna kontrola tkanivom nebude vykazovať pozitívne zafarbenie, výsledky testovaných vzoriek je nutné považovať za neplatné.

## Negatívna kontrola tkanivom

Nutné vyšetříť po pozitívnej kontrole tkanivom s cieľom overiť špecifickosť značenia cieľového antigénu primárnou protilátkou.

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 difúznu 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.<sup>3</sup> Falošne pozitívne výsledky môžu byť pozorované v dôsledku neimunologickej väzby proteínov alebo produktov reakcie substrátu. Môžu byť spôsobené aj endogénnymi enzýmami, ako napr. pseudoperoxidázou (erythrocyty), endogénnou peroxidázou (cytochróm 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 nafarbiť 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-Akt-Phos 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. Nepotvrďuje jeho absenciu v testovaných bunkách/tkanivách. V prípade potreby identifikujte falošne negatívne reakcie pomocou panelu protilátok.

## Očakávané výsledky

### Normálne tkanivá

Klon LP18 detegoval fosforylovanú formu proteínu Akt exprimovaného v jadrách a cytoplazme buniek z rôznych tkanív (n = 56). Expresia bola detegovaná v hrubom čreve, tenkom čreve, mozoch, obličkách, nadobličkách, pankrease, pľúcach, pečeni, žalúdku, pažeráku, koži, kostrovom svalstve, slezine, srdci, vaječníkoch, krčku maternice, maternici, semenníkoch, prostate, týmuse, slinnej žľazy, štítnej žľazy, prstínej žľazy, prsníkov, hypofýze, tonzilách, kostnej dreni, mezotelii a aorte.

### Abnormálne tkanivá

Klon LP18 detegoval fosforylovanú formu proteínu Akt v 289/301 hodnotených nádorov vrátane 80/85 nádorov prostaty, 67/67 nádorov prsníka, 29/30 nádorov pľúc, 13/14 nádorov vaječníkov, 11/11 skvamocelulárnych karcinómov, 10/10 sarkómov, 10/10 nádorov štítnej žľazy, 9/9 nádorov hrubého čreva, 7/7 nádorov pečene, 6/8 melanómov, 6/6 nádorov obličiek, 6/6 lymfómov, 5/5 nádorov žalúdka, 4/4 neuroendokrinných nádorov, 4/4 nádorov pankreasu, 3/4 nádorov nadobličiek, 3/4 benigných hyperplázií prostaty, 3/4 nádorov endometria, 3/3 neurálnych nádorov, 3/3 nádorov zárodočných buniek, 3/3 nádorov močového mechúra, 2/2 nádorov kože, 1/1 nádoru tenkého čreva a 1/1 nádoru týmusu.

## NCL-L-Akt-Phos sa odporúča na použitie pri detegovaní expresie fosforylovaného proteínu Akt v normálnych a neoplastických tkanivách.

## 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 sklíčka 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, záchytu protilátok alebo falošne negatívnych výsledkov. Inkonzistentné výsledky môžu byť spôsobené zmenami metód fixácie a montáže preparátov alebo inherentnými nepravidłnosťami v tkanive.<sup>4</sup>

Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže narušiť správnosť interpretácie výsledkov.

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.

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, Peters RL. 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. Brazil D, Yang Z and Hemmings B. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. Trends in Biochemical Sciences. 2004; 29(5):233–242.
6. Nicholson K and Anderson N. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling. 2002; 14:381–395.
7. Lawlor M and Alessi D. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? Journal of Cell Science. 2001; 114:2903–2910.

## **Úpravy predchádzajúceho vydania**

Neuplatňuje sa.

## **Dátum vydania**

30 apríl 2019

# Imunohistochemická metóda spracovania protilátok Novocastra™ na tkanive zaliatom v parafíne pomocou techniky záchytu epitopov s tepelnou indukciou.

## Požadované, ale nedodávané činidlá

1. Štandardné rozpúšťadlá používané v imunohistochemii
2. 50mM tris-pufrovaný fyziologický roztok (TBS), pH 7,6
3. Roztok na záchyt epitopov (pozri časť C. Roztoky na záchyt epitopov)
4. Zriedovadlo 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.

## Požadované, ale nedodávané vybavenie

1. Inkubátor nastavený na teplotu 25 °C.
2. Ohrievač na záchyt epitopov: vodný kúpeľ, napařovač, tlakový hrniec alebo iné laboratórne vybavenie s reguláciou teploty
3. Všeobecné vybavenie imunohistochemického laboratória

## Roztoky na záchyt epitopov (pozri časť Odporúčania na použitie pre niektorý z nasledujúcich produktov)

|   |   |
|---|---|
| RE7113 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 1 L    | Pufor na báze citranu obsahujúci surfaktant   |
| RE7114 Epitope Retrieval Solution pH 6 (x10 Concentrate) 500 mL |   |
| RE7115 Epitope Retrieval Solution pH 6 (Ready to Use) 1 L       |   |
| RE7116 Epitope Retrieval Solution pH 8 (x10 Concentrate) 1 L    | Pufor na báze EDTA obsahujúci surfaktant      |
| RE7118 Epitope Retrieval Solution pH 8 (Ready to Use) 1 L       |   |
| RE7119 Epitope Retrieval Solution pH 9 (x10 Concentrate) 1 L    | Pufor na báze tris/EDTA obsahujúci surfaktant |
| RE7122 Epitope Retrieval Solution pH 9 (Ready to Use) 1 L       |   |

## 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).

### Záchyt epitopov

Postupujte podľa návodu na použitie v časti Roztoky na záchyt epitopov, RE7113, RE7114, RE7115, RE7116, RE7118, RE7119 alebo RE7122.

### Vizualizácia

Postupujte podľa návodu na použitie v systémoch Novolink Polymer Detection Systems, RE7280-K (1250 testov), RE7150-K (500 testov), RE7140-K (250 testov) alebo RE7290-K (50 testov).

## Úpravy predchádzajúceho vydania

Neuplatňuje sa

## Dátum vydania

23. apríla 2008 (CE protokol/HTAUT+Novolink).



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