

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody N-Cadherin

Product Code: NCL-L-N-Cad

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 N-Cadherin

Product Code: NCL-L-N-Cad

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NCL-L-N-Cad is intended for the qualitative identification by light microscopy of N-Cadherin 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

IAR06.

Immunogen

Prokaryotic recombinant protein corresponding to 160 amino acids of the C-terminus of the human N-Cadherin molecule.

Specificity

Human N-Cadherin.

Reagent Composition

NCL-L-N-Cad is a liquid tissue culture supernatant containing sodium azide as a preservative.

Ig Class

IgG2b.

Total Protein Concentration

Total Protein

Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

Antibody Concentration

Greater than or equal to 95 mg/L as determined by ELISA. Refer to vial label for lot specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry on paraffin sections.

Heat Induced Epitope Retrieval (HIER): Please follow the instructions for use in Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Suggested dilution: 1:100 for 30 minutes at 25 °C. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

Visualization: Please follow the instructions for use in the Novolink™ Polymer Detection Systems. For further product information or support, contact your local distributor or regional office of Leica Biosystems, or alternatively, visit the Leica Biosystems' Web site, www.LeicaBiosystems.com

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.

This reagent contains sodium azide. A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from www.LeicaBiosystems.com

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.²

Recommended positive control tissue is testis.

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

Negative Tissue Control

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

Recommended negative control tissue is glands of prostate.

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

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

Negative Reagent Control

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

Patient Tissue

Examine patient specimens stained with NCL-L-N-Cad 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 IAR06 detected the N-Cadherin protein expressed on the membrane and in the cytoplasm of cells in a variety of tissues.

Expression was detected in cerebellum, kidney, adrenal gland, pancreas, liver, stomach, spleen, ovary, uterus, testis, thymus, parathyroid, breast, pituitary, tonsil and heart. Expression was also detected in the neural elements in a range of normal tissues. (Total number of cases =45).

Abnormal Tissues

Clone IAR06 detected the N-Cadherin protein in 42/77 tumors evaluated including 4/9 breast tumors, 5/7 ovarian tumors, 3/6 sarcomas, 3/6 lung cancers (including 2/3 adenocarcinomas, 1/2 squamous carcinomas, 0/1 bronchioalveolar carcinoma), 4/4 mesotheliomas, 4/4 neuroendocrine tumors, 2/4 kidney tumors, 3/3 adrenal tumors, 2/3 endometrial tumors, 2/3 melanomas, 2/3 liver tumors, 1/3 germ cell tumors, 2/2 astrocytomas, 2/2 thyroid carcinomas, 1/2 pancreatic tumors, 1/1 thymus carcinomas and 1/1 neural tumor. No staining was observed in bladder tumors (0/3), squamous cell carcinomas (0/3), prostate carcinomas /BPH (0/3), gastric carcinomas (0/2), skin tumors (0/1), lymphomas (0/1) and colon carcinomas (0/1).

NCL-L-N-Cad is recommended for use in the detection of N-Cadherin 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.⁴

Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

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

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

Bibliography - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. *Genes and Development*. 2006; 20:3199–3214.

Amendments to Previous Issue

Reagent Composition, Total Protein Concentration, Recommendations On Use, Warnings and Precautions.

Date of Issue

07 November 2018

Novocastra™ Anticorps Monoclonal Liquide de Souris N-Cadherin

Référence du Produit: NCL-L-N-Cad

Utilisation Prévue

Diagnostic in vitro.

Le NCL-L-N-Cad est destiné à l'identification qualitative par microscopie optique de la molécule N-cadhérine 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

IAR06

Immunogène

Protéine procaryote recombinante correspondant à 160 acides aminés de la partie C terminale de la molécule de N-cadhérine humaine.

Spécificité

N-cadhérine humaine.

Composition du Réactif

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

Classe d'Ig

IgG2b

Concentration Totale en Protéines Total Protein

La concentration totale en protéines, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

Concentration en Anticorps

Supérieure ou égale à 95 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 sur coupes en paraffine.

Restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER): Veuillez respecter le mode d'emploi de Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Dilution préconisée: 1:100 durant 30 minutes à 25 °C. Ceci n'est donné qu'à titre indicatif et les utilisateurs doivent déterminer leurs propres dilutions de travail optimales.

Visualisation: Veuillez respecter le mode d'emploi des Novolink™ Polymer Detection Systems. Pour plus d'informations sur le produit ou pour toute assistance, contactez votre représentant local ou le bureau régional de Leica Biosystems, ou sinon rendez vous sur le site www.LeicaBiosystems.com de Leica Biosystems.

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.

Ce réactif contient de l'azide de sodium. Une Fiche de données de sécurité est disponible sur demande ou sur le site www.LeicaBiosystems.com

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

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

Minimiser la contamination microbienne des réactifs sinon un accroissement du marquage non spécifique est susceptible de se produire.

Des durées et des températures d'incubation différentes de celles qui ont été spécifiées sont susceptibles de conduire à des résultats erronés. Toutes les modifications doivent être validées par l'utilisateur.

Contrôle de Qualité

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

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

Tissu de Contrôle Positif

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

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

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

Le tissu de contrôle positif recommandé est testicules.

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

Tissu de Contrôle Négatif

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

Le prostate constitue le tissu de contrôle négatif recommandé.

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

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

Réactif de Contrôle Négatif

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

Tissu du Patient

Examiner les échantillons du patient marqués au NCL-L-N-Cad 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 IAR06 a détecté l'expression de la protéine N-cadhérine sur la membrane et dans le cytoplasme des cellules de divers tissus. L'expression a été détectée dans le cerveaulet, le rein, les glandes surrénales, le pancréas, le foie, l'estomac, la rate, les ovaires, l'utérus, les testicules, le thymus, la parathyroïde, le sein, l'hypophyse, les amygdales et le cœur. L'expression a également été détectée dans les éléments neuraxiaux d'une série de tissus normaux. (Nombre total de cas = 45).

Tissus tumoraux

Le clone IAR06 a détecté la protéine N-cadhérine dans 42 des 77 tumeurs évaluées dont des tumeurs mammaires (4/9), des tumeurs ovariennes (5/7), des sarcomes (3/6), des cancers du poumon (3/6) (dont des adénocarcinomes (2/3), un carcinome squameux (1/2) et aucun carcinome bronchio-alvéolaire (0/1)), des mésothéliomes (4/4), des tumeurs neuroendocrines (4/4), des tumeurs du rein (2/4), des tumeurs des glandes surrénales (3/3), des tumeurs endométriales (2/3), des mélanomes (2/3), des tumeurs du foie (2/3), une tumeur des cellules germinales (1/3), des astrocytomes (2/2), des carcinomes de la thyroïde (2/2), des tumeurs pancréatiques (1/2), un carcinome du thymus (1/1) et une tumeur neurale (1/1). Aucun marquage n'a été observé dans les tumeurs de la vessie (0/3), les carcinomes des cellules squameuses (0/3), les carcinomes de la prostate /BPH (0/3), les carcinomes gastriques (0/2), les tumeurs de la peau (0/1), les lymphomes (0/1) et les carcinomes du côlon (0/1).

L'utilisation du NCL-L-N-Cad est recommandée pour la détection de la N-cadhérine 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.⁴

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

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

Les anticorps de Leica Biosystems Newcastle Ltd sont destinés, selon les besoins, à être utilisés sur des coupes incluses en paraffine ou des coupes congelées, et conformément à des exigences particulières en matière de fixation. Une expression 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. *Genes and Development*. 2006; 20:3199–3214.

Amendements Apportés à la Version Précédente

Composition du Réactif, Concentration Totale en Protéines, Recommandations d'utilisation, Mises en Garde et Précautions.

Date de Publication

07 novembre 2018

Novocastra™ Anticorpo Monoclonale Murino Liquido

N-Cadherin

Codice Del Prodotto: NCL-L-N-Cad

Uso Previsto

Per uso diagnostico in vitro.

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

Principio Della Procedura

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

Clone

IAR06

Immunogeno

Proteina ricombinante procariotica corrispondente a 160 aminoacidi della regione C-terminale della molecola N-caderina umana.

Specificità

N-caderina umana.

Composizione Del Reagente

NCL-L-N-Cad è un supernatante liquido di coltura tissutale, contenente di sodio azide come conservante.

Classe Ig

IgG2b

Concentrazione Proteica Totale

Total Protein

Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione proteica totale specifica del lotto.

Concentrazione Anticorpale

Superiore o uguale a 95 mg/L, come determinato mediante test ELISA. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione di Ig specifica del lotto.

Raccomandazioni Per L'uso

Immunostochimica su sezioni incluse in paraffina.

Smascheramento antigenico termoiddotto (HIER): Si prega di seguire le istruzioni per l'uso fornite in Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Diluizione raccomandata: 1:100 per 30 minuti a 25 °C. Queste raccomandazioni costituiscono delle semplici linee guida; spetta al singolo utente stabilire le diluizioni di lavoro ottimali.

Visualizzazione: Si raccomanda di seguire le istruzioni per l'uso dei Novolink™ Polymer Detection Systems. Per ulteriori informazioni sui prodotti o assistenza, contattare il distributore di zona o la sede regionale di Leica Biosystems, oppure visitare il sito internet di Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

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. Questo reagente contiene sodio azide. Una scheda di sicurezza del prodotto (MSDS) è disponibile su richiesta o dal sito www.LeicaBiosystems.com

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

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

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

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

Controllo Qualità

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

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

Controllo Positivo Del Tessuto

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

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

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

Il tessuto raccomandato per il controllo positivo è testicolo.

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

Controllo Negativo Del Tessuto

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

Il tessuto raccomandato per il controllo negativo è prostata.

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

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

Controllo Negativo Del Reagente

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

Tessuto Del Paziente

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

Risultati Attesi

Tessuti normali

Il clone IAR06 ha messo in evidenza la proteina N-caderina umana espressa sulla membrana e nel citoplasma delle cellule di una varietà di tessuti. L'espressione è stata messa in evidenza in: cervelletto, rene, ghiandola surrenale, pancreas, fegato, stomaco, milza, ovaio, utero, testicolo, timo, paratiroide, mammella, ipofisi, tonsilla e cuore. L'espressione è stata messa in evidenza anche negli elementi neurali di una varietà di tessuti normali. (Numero complessivo dei casi =45).

Tessuti tumorali

Il clone IAR06 ha messo in evidenza la proteina N-caderina in 42/77 tumori esaminati: 4/9 tumori mammari, 5/7 tumori ovarici, 3/6 sarcomi, 3/6 carcinomi polmonari (compresi 2/3 adenocarcinomi, 1/2 carcinomi squamosi, 0/1 carcinoma broncoalveolare), 4/4 mesoteliomi, 4/4 tumori neuroendocrini, 2/4 tumori renali, 3/3 tumori surrenali, 2/3 tumori endometriali, 2/3 melanomi, 2/3 tumori epatici, 1/3 tumori a cellule germinali, 2/2 astrocitomi, 2/2 carcinomi tiroidei, 1/2 tumori pancreatici, 1/1 carcinoma timico e 1/1 tumore neurale. Non è stata messa in evidenza alcuna colorazione in: tumori della vescica urinaria (0/3), carcinomi a cellule squamose (0/3), carcinomi della prostata /BPH (0/3), carcinomi gastrici (0/2), tumori cutanei (0/1), linfomi (0/1) e carcinomi del colon (0/1).

Si raccomanda l'uso di NCL-L-N-Cad nella rilevazione dell'N-caderina nei tessuti normali e neoplastici.

Limitazioni Generali

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

La colorazione del tessuto dipende dalle modalità di manipolazione e di processazione del tessuto stesso, adottate prima della colorazione. La fissazione, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento o la sezione condotti in modo non corretto, o la contaminazione con altri tessuti o liquidi, possono produrre artefatti, intrappolamento (trapping) anticorpale o

risultati falsi negativi. Risultati incompatibili possono essere dovuti a modifiche dei metodi di fissazione e di inclusione o ad irregolarità intrinseche al tessuto.⁴

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

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

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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. Genes and Development. 2006; 20:3199–3214.

Modifiche Alla Pubblicazione Precedente

Composizione Del Reagente, Concentrazione Proteica Totale, Raccomandazioni Per L'uso, Avvertenze E Precauzioni.

Data Di Pubblicazione

07 novembre 2018

Novocastra™ Flüssiger Monoklonaler Maus-Antikörper

N-Cadherin

Produkt-Nr.: NCL-L-N-Cad

Verwendungszweck

Für in-vitro-Diagnostik.

NCL-L-N-Cad ist für den qualitativen Nachweis der N-Cadherin-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

IAR06

Immunogen

Prokaryotisches rekombinantes Protein, das 160 Aminosäuren des C-Terminus des humanen N-Cadherin-Moleküls entspricht.

Spezifität

Humanes N-Cadherin.

Reagenzzusammensetzung

NCL-L-N-Cad ist ein flüssiger Gewebekulturüberstand, der Natriumazid als Konservierungsmittel enthält.

Ig-Klasse

IgG2b

Gesamtproteinkonzentration Total Protein

Siehe Angaben auf dem Produktetikett bezüglich der chargenspezifischen Gesamtproteinkonzentration.

Antikörperkonzentration

Größer als oder gleich 95 mg/L laut ELISA-Bestimmung. Hinsichtlich der chargenspezifischen Ig-Konzentration siehe Angaben auf dem Produktetikett.

Gebrauchsempfehlungen

Immunhistochemie in Paraffinschnitten

Hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER): Bitte Gebrauchsanweisung für Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6 befolgen.

Empfohlene Verdünnung: 1:100 über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 25 °C. Dies ist nur eine Empfehlung, und die Benutzer sollten ihre eigenen optimalen Arbeitsverdünnungen bestimmen.

Visualisierung: Bitte Gebrauchsanweisung für Novolink™ Polymer Detection Systems befolgen. Wenn Sie weitere Produktinformationen oder Unterstützung wünschen, setzen Sie sich bitte mit ihrem Händler vor Ort oder mit der Zweigniederlassung von Leica Biosystems in Verbindung beziehungsweise besuchen Sie die Internetseite von Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

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.

Dieses Reagenz enthält Natriumazid. Ein Material Sicherheits-Datenblatt ist auf Anfrage von www.LeicaBiosystems.com erhältlich. Die entsprechenden nationalen und lokalen Bestimmungen und Vorschriften zur Entsorgung potentiell giftiger Komponenten sind einzuhalten.

Vor und nach der Fixierung sind die Proben sowie alle Materialien, die mit ihnen in Kontakt gekommen sind, als potentiell infektiös zu behandeln und daher mit entsprechender Vorsicht zu entsorgen.¹ Reagenzien dürfen niemals mit dem Mund pipettiert werden, und jeglicher Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden. Falls Reagenzien oder Proben mit empfindlichen Bereichen in Kontakt gekommen sind, müssen diese mit reichlich Wasser gespült werden. Ärztlichen Rat einholen. Die mikrobielle Verunreinigung von Reagenzien ist zu minimieren, da ansonsten eine erhöhte unspezifische Färbung auftreten kann. Falls die spezifizierten Inkubationszeiten oder –temperaturen nicht eingehalten werden, kann es zu fehlerhaften Ergebnissen kommen. Jegliche Abweichungen von den angegebenen Werten müssen vom Benutzer verifiziert werden.

Qualitätskontrolle

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

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

Positive Gewebekontrolle

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an.

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

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

Für die positive Gewebekontrolle wird Hoden.

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

Negative Gewebekontrolle

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

Für die negative Gewebekontrolle wird Prostata empfohlen.

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

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

Negative Reagenzkontrolle

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

Patientengewebe

Die mit NCL-L-N-Cad 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 IAR06 wies das auf der Membran und im Zytoplasma von Zellen einer Reihe unterschiedlicher Gewebe exprimierte N-Cadherin-Protein nach. Die Expression wurde in Cerebellum, Niere, Nebenniere, Pankreas, Leber, Magen, Milz, Ovar, Uterus, Hoden, Thymus, Parathyroidea, Mamma, Hypophyse, Tonsillen und Herz nachgewiesen. Sie wurde außerdem in den neuronalen Elementen einer Reihe normaler Gewebe nachgewiesen (Gesamtzahl der Fälle = 45).

Tumorgewebe

Klon IAR06 wies das N-Cadherin-Protein in 42/77 untersuchten Tumoren nach, einschließlich 4/9 Brustkrebsen, 5/7 Ovartumoren, 3/6 Sarkomen, 3/6 Lungenkrebsen (inkl. 2/3 Adenokarzinomen, 1/2 Plattenzellkarzinomen, 0/1 bronchioalveolären Karzinom), 4/4 Mesotheliomen, 4/4 neuroendokrinen Tumoren, 2/4 Nierentumoren, 3/3 Nebennierentumoren, 2/3 Endometriumtumoren, 2/3 Melanomen, 2/3 Lebertumoren, 1/3 Keimzelltumoren, 2/2 Astrozytomen, 2/2 Thyroideakarzinomen, 1/2 Pankreastumoren, 1/1 Thymuskarzinom und 1/1 Nerventumor. Bei Blasen Tumoren (0/3), Plattenzellkarzinomen (0/3), Prostatakarzinomen/BPH (0/3), Magenkarzinomen (0/2), Hauttumoren (0/1), Lymphomen (0/1) und Kolonkarzinomen (0/1) wurde keine Färbung beobachtet.

NCL-L-N-Cad wird zum Einsatz beim Nachweis von N-Cadherin 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 Färbeergebnisse.

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

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

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

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

Literatur - Allgemein

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, 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. Agiostratidou G, Hulit J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. Genes and Development. 2006; 20:3199–3214.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Reagenzzusammensetzung, Gesamtproteinkonzentration, Gebrauchsempfehlungen, Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen.

Ausgabedatum

07 November 2018

Novocastra™ Anticuerpos Monoclonal Murino Líquidos

N-Cadherin

Código De Producto: NCL-L-N-Cad

Indicaciones De Uso

Para uso diagnóstico in vitro.

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

Principio Del Procedimiento

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

Clon

IAR06

Inmunógeno

Proteína recombinante procaricótica correspondiente a 160 aminoácidos del extremo carboxiterminal de la molécula de la N-Cadherina humana.

Especificidad

N-Cadherina humana

Composición Del Reactivo

NCL-L-N-Cad es un sobrenadante de cultivo tisular líquido que contiene azida sódica como conservante.

Clase de Ig

IgG2b

Concentración Total De Proteína Total Protein

Consulte la etiqueta del vial para ver la concentración total de proteína específica del lote.

Concentración De Anticuerpo

Igual o superior a 95 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 con secciones de parafina.

Recuperación de epítomos inducida por calor (HIER): Por favor, siga las instrucciones de uso de Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Dilución sugerida: 1:100 durante 30 minutos a 25 °C. Esta es tan solo una pauta y cada usuario debe determinar sus propias diluciones de trabajo óptimas.

Visualización: Por favor, siga las instrucciones de uso de Novolink™ Polymer Detection Systems. Para obtener más información sobre el producto o para recibir soporte, póngase en contacto con su distribuidor local o con la oficina regional de Leica Biosystems, o bien visite el sitio web de Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

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.

Este reactivo contiene azida sódica. Está disponible una Hoja de información sobre la seguridad del material, previa petición, o en www.LeicaBiosystems.com

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.¹ 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.²

El tejido de control positivo recomendado es testículo.

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

Control Tisular Negativo

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

El tejido de control negativo recomendado es próstata.

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

Si aparece una tinción no específica, ésta tiene generalmente aspecto difuso. En cortes de tejido fijados excesivamente con formol puede observarse también una tinción esporádica del tejido conectivo. Utilice células intactas para la interpretación de los resultados de la tinción. A menudo, las células necróticas o degeneradas quedan teñidas de forma no específica.³ También pueden observarse falsos positivos causados por la unión no inmunológica a proteínas o a productos de reacción del sustrato. Estos falsos positivos pueden estar causados también por enzimas endógenas tales como la pseudoperoxidasa (eritrocitos), la peroxidasa endógena (citocromo C), o la biotina endógena (por ejemplo, de hígado, mama, cerebro, riñón), en función del tipo de inmunotinción utilizada. Para diferenciar la actividad de las enzimas endógenas o los enlaces no específicos de las enzimas de la inmunorreactividad 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-N-Cad 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 IAR06 detectó la proteína de la N-Cadherina expresada en la membrana y en el citoplasma de las células de diversos tejidos. Se detectó expresión en el cerebelo, el riñón, las glándulas suprarrenales, el páncreas, el hígado, el estómago, el bazo, el ovario, el útero, el testículo, el timo, las paratiroides, las mamas, la pituitaria, la amígdala y el corazón. También se detectó expresión en los elementos neurológicos de diversos tejidos normales. (Número total de casos =45.)

Tejidos tumorales

El clon IAR06 detectó la proteína de N-Cadherina en 42 de 77 tumores evaluados, como 4 de 9 tumores de mama, 5 de 7 tumores ováricos, 3 de 6 sarcomas, 3 de 6 cánceres de pulmón (incluidos 2 de 3 adenocarcinomas, 1 de 2 carcinomas de células escamosas, 0 de 1 carcinoma bronquioalveolar), 4 de 4 mesoteliomas, 4 de 4 tumores neuroendocrinos, 2 de 4 tumores de riñón, 3 de 3 tumores suprarrenales, 2 de 3 tumores endometriales, 2 de 3 melanomas, 2 de 3 tumores hepáticos, 1 de 3 tumores de células germinales, 2 de 2 astrocitomas, 2 de 2 carcinomas del tiroides, 1 de 2 tumores pancreáticos, 1 de 1 tumores del timo y 1 de 1 tumores neurológicos. No se observó ninguna unión en tumores de vejiga (0 de 3), carcinomas de células escamosas (0 de 3), carcinomas de próstata o hiperplasias benignas de la próstata (0 de 3), carcinomas gástricos (0 de 2), tumores de piel (0 de 1), linfomas (0 de 1) y carcinomas del colon (0 de 1).

NCL-L-N-Cad se recomienda para la detección de la expresión de la N-Cadherina 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.⁴

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

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

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

Bibliografía - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadjji 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. Genes and Development. 2006; 20:3199–3214.

Correcciones A La Publicación Anterior

Composición Del Reactivo, Concentración Total De Proteína, Recomendaciones De Uso, Advertencias Y Precauciones.

Fecha De Publicación

07 de noviembre de 2018

Novocastra™ Anticorpo Monoclonal Líquido de Ratinho N-Cadherin Código Do Produto: NCL-L-N-Cad

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos in vitro.

NCL-L-N-Cad foi concebido para efectuar a identificação qualitativa da moléculas de N-Caderina 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

IAR06

Imunogénio

Proteína recombinante procarciótica correspondendo a 160 aminoácidos do terminal C da molécula N-Caderina humana.

Especificidade

N-Caderina humana.

Composição Do Reagente

NCL-L-N-Cad é o sobrenadante líquido da cultura de um tecido contendo de azida de sódio como produto conservante.

Classe De Ig

IgG2b

Concentração Total De Proteína

Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração total de proteína do lote específico.

Concentração De Anticorpo

Maior que ou igual a 95 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 em cortes de inclusões em parafina.

Recuperação de epitopos induzida pelo calor (HIER): Queira seguir as instruções de utilização de Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Diluição sugerida: 1:100 durante 30 minutos a 25 °C. Esta recomendação serve apenas de orientação e os utilizadores devem determinar as suas diluições óptimas de trabalho.

Visualização: Queira seguir as instruções de utilização de Novolink™ Polymer Detection Systems. Para informação adicional do produto ou assistência, contactar o seu distribuidor local ou escritório regional de Leica Biosystems ou, alternativamente, visitar o sítio web de Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

Armazenamento E Estabilidade

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

Preparação Das Amostras

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

Avisos E Precauções

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

Este reagente contém azida sódica. Encontra-se disponível uma Ficha de Dados de Segurança do Material, mediante pedido ou através do site www.LeicaBiosystems.com

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.¹ Não pipetar nunca os reagentes com a boca e evitar o contacto entre a pele e membranas mucosas e os reagentes e amostras. Caso os reagentes ou amostras entrem em contacto com áreas sensíveis, lavar com grandes quantidades de água. Consultar um médico.

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

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

Controlo Da Qualidade

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

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

Controlo De Tecido Positivo

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

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

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

O tecido de controlo positivo recomendado é a testículo.

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

Controlo De Tecido Negativo

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

O controlo de tecido negativo recomendado é o próstata.

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

A coloração não específica, caso ocorra, tem geralmente um aspecto difuso. A coloração esporádica do tecido conjuntivo pode também ter lugar em secções de tecido excessivamente fixado em formol. Devem utilizar-se células intactas para a interpretação dos resultados da coloração. As células necróticas ou degeneradas causam muitas vezes uma coloração não específica.³ Podem verificar-se resultados positivos falsos devido à ligação não imunológica de proteínas ou de produtos da reacção do substrato. Esses resultados podem também ser causados por enzimas endógenas tais como a pseudoperoxidase (eritrócitos), a peroxidase endógena (citocromo C), ou a biotina endógena (ex. no fígado, mama, cérebro ou rim) dependendo do tipo de imunocoloração utilizado. Para diferenciar entre a actividade das enzimas endógenas e as ligações não específicas de enzimas de imunoreactividade específica, podem 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-N-Cad 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 IAR06 detectou a proteína N-Caderina expressada na membrana e no citoplasma das células de uma série de tecidos. Detectou-se a expressão no cerebelo, rim, glândula supra-renal, pâncreas, fígado, estômago, baço, ovário, útero, testículo, timo, paratiróide, mama, pituitária, amígdala e coração. Detectou-se ainda a expressão nos elementos neurais de uma série de tecidos normais. (Número total de casos = 45).

Tecidos tumorais

O clone IAR06 detectou a proteína N-Caderina em 42/77 tumores avaliados, incluindo 4/9 tumores da mama, 5/7 tumores do ovário, 3/6 sarcomas, 3/6 cancro do pulmão (incluindo 2/3 adenocarcinomas, 1/2 carcinomas escamosos, 0/1 carcinoma bronquioalveolar), 4/4 mesoteliomas, 4/4 tumores neuroendócrinos, 2/4 tumores do rim, 3/3 tumores supra-renais, 2/3 tumores endometriais, 2/3 melanomas, 2/3 tumores hepáticos, 1/3 tumores das células germinais, 2/2 astrocitomas, 2/2 carcinomas da tiróide, 1/2 tumores pancreáticos, 1/1 carcinomas do timo e 1/1 tumor neural. Não se observou qualquer coloração em tumores da bexiga (0/3), carcinomas da célula escamosa (0/3), carcinomas da próstata/BPH (0/3), carcinomas gástricos (0/2), tumores da pele (0/1), linfomas (0/1) e carcinomas do cólon (0/1).

NCL-L-N-Cad é recomendado para utilizar na detecção de N-Caderina 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.⁴

Uma contrastação 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. Nadjji 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. Genes and Development. 2006; 20:3199–3214.

Emendas Da Edição Anterior

Composição Do Reagente, Concentração Total De Proteína, Recomendações Sobre A Utilização, Avisos E Precauções.

Data De Emissão

07 de Novembro de 2018

Novocastra™ Flytande Monoklonal Musantikropp

N-Cadherin

Produktkod: NCL-L-N-Cad

Avsedd Användning

För in vitro diagnostisk användning.

NCL-L-N-Cad är avsedd för kvalitativ identifiering med ljusmikroskopi av N-Cadherin-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 patolog 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

IAR06

Immunogen

Prokaryotiskt rekombinant protein motsvarande 160 aminosyror från den humana N-Cadherin molekylen C-terminus.

Specificitet

Humant N-Cadherin.

Reagensinnehåll

NCL-L-N-Cad är en flytande supernatant från vävnadsodling som innehåller natriumazid som konserveringsmedel.

Ig-klass

IgG2b

Total Proteinkoncentration Total Protein

Se flaskans etikett för total specifik proteinkoncentration för satsen.

Antikropps-koncentration

Större än eller lika med 95 mg/L fastställt genom ELISA. Se flaskans etikett för specifik Ig-koncentration för satsen.

Rekommendationer Vid Användning

Immunhistokemi på paraffinsnitt.

Värmeinducerad epitopåtervinning (HIER): Vänligen följ instruktionerna för användning i Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Föreslagen spädning: 1:100 i 30 minuter vid 25 °C. Detta är endast en riktlinje och användare bör själva fastställa den optimala bruksspädningen.

Visualisering: Vänligen följ instruktionerna för användning i Novolink™ Polymer Detection Systems. Om ytterligare produktinformation eller stöd behövs, kontakta då din lokala distributör eller Leica Biosystems regionalkontor, alternativt i på Leica Biosystems webbplats, www.LeicaBiosystems.com

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 iakttas vid hantering.

Detta reagens innehåller natriumazid. Materialsäkerhetsdatablad finns att få på begäran eller från www.LeicaBiosystems.com

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 slemhinnorna inte kommer i kontakt med reagens och prover. Om reagens eller prover kommer i kontakt med känsliga områden, tvätta med rikliga mängder vatten. Rådgör med läkare.

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

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

Kvalitetskontroll

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

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

Positiv Vävnadskontroll

Används för att ange korrekt förberedda vävnader och rätt färgningstekniker.

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

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

Testikel 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.

Prostata rekommenderades som negativ kontrollvävnad.

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

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

Negativ Reagenskontroll

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

Patientvävnad

Undersök patientprover färgade med NCL-L-N-Cad sist. Positiv färgningsintensitet bör utvärderas inom ramen för all ospecifik bakgrundsfärgning 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 IAR06 detekterade N-Cadherin-proteinet uttryckt på membranet och i cytoplasmat hos celler från en mängd olika vävnader. Uttryck detekterades i lillhjärna, njure, binjura, bukspottkörtel, lever, magsäck, mjälte, äggstock, livmoder, testikel, bränsen, bisköddkörtel, bröst, hypofys, tonsill och hjärta. Uttryck detekterades också i neurala element i en mängd normala vävnader. (Totalt antal fall = 45.)

Tumörvävnader

Klon IAR06 detekterade N-Cadherin-proteinet i 42/77 tumörer utvärderade inklusive 4/9 brösttumörer, 5/7 äggstockstumörer, 3/6 sarkom, 3/6 lungcancer (inklusive 2/3 adenokarcinom, 1/2 skvamösa karcinom, 0/1 bronkioalveolära karcinom), 4/4 mesoteliom, 4/4 neuroendokrina tumörer, 2/4 njurtumörer, 3/3 binjuretumörer, 2/3 endometriala tumörer, 2/3 melanom, 2/3 levertumörer, 1/3 könsellstumörer, 2/2 astrocytom, 2/2 sköldkörtelkarcinom, 1/2 bukspottkörteltumörer, 1/1 bränsenkarcinom och 1/1 neurala tumörer. Ingen färgning observerades i urinblåsetumörer (0/3), skvamösa cellkarcinom (0/3), prostatakarcinom /BPH (0/3), gastriska karcinom (0/2), hudtumörer (0/1), lymfom (0/1) och kolonkarcinom (0/1).

NCL-L-N-Cad rekommenderas för användning för detektering av N-Cadherin 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.⁴

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

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

Antikroppar från Leica Biosystems Newcastle Ltd är till för användning så som anges på antingen frysta eller paraffinbäddade snitt med specifika fixeringskrav. Övrigt 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. Genes and Development. 2006; 20:3199–3214.

Rättelser Av Tidigare Utgivning

Reagensinnehåll, Total Proteinkoncentration, Rekommendationer Vid Användning, Varningar Och Försiktighetsåtgärder.

Utgivningsdatum

07 november 2018

Novocastra™ Υγρό Μονοκλωνικό Αντίσωμα Ποντικού N-Cadherin Κωδικός είδους: NCL-L-N-Cad

Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

Για in vitro διαγνωστική χρήση.

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

Αρχή Της Διαδικασίας

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

Κλώνος

IAR06

Ανοσογόνο

Προκαρυωτική ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που αντιστοιχεί σε 160 αμινοξέα του C-τελικού άκρου του μορίου ανθρώπινης N-Cadherin.

Ειδικότητα

Ανθρώπινη N-Cadherin.

Σύνθεση Αντιδραστήριου

Το NCL-L-N-Cad είναι ένα υγρό υπερκείμενο ιστοκαλλιέργειας που περιέχει αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.

Τάξη Ig

IgG2b

Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης

Total Protein

Για την ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

Συγκέντρωση Αντισώματος

Μεγαλύτερη ή ίση με 95 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 σε παρασκευάσματα παραφίνης.

Ανάκτηση Επιτόπου με Θερμική Επαγωγή (HIER): Παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες για τη χρήση στο Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Προτεινόμενη διάλυση: 1:100 επί 30 λεπτά σε 25 °C. Παρέχεται ως οδηγός και οι χρήστες θα πρέπει να καθορίζουν τις δικές τους διαλύσεις εργασίας.

Απεικόνιση: Παρακαλούμε ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης στο Novolink™ Polymer Detection Systems. Για περισσότερες πληροφορίες για το προϊόν ή για υποστήριξη, επικοινωνήστε με τον τοπικό διανομέα ή το περιφερειακό γραφείο της Leica Biosystems ή εναλλακτικά επισκεφθείτε τον ιστότοπο της Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

Φύλαξη Και Σταθερότητα

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

Παρασκευή Δείγματος

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

Προειδοποιήσεις Και Προφυλάξεις

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

Αυτό το αντιδραστήριο περιέχει αζίδιο του νατρίου. Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού διατίθεται κατόπιν αιτήματος ή από τη διεύθυνση www.LeicaBiosystems.com

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

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

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

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

Ποιοτικός Έλεγχος

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

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

Θετικός Μάρτυρας Ιστού

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

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

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

Συνιστώμενος ιστός θετικού μάρτυρα είναι όρχις.

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 επισημάνσης του αντιγόνου-στόχου από το πρωτοταγές αντίσωμα.

Συνιστώμενος ιστός αρνητικού μάρτυρα είναι προστάτης.

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

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

Αρνητικός Μάρτυρας Αντιδραστηρίου

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

Ιστός Ασθενούς

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

Αναμενόμενα Αποτελέσματα

Φυσιολογικοί ιστοί

Ο κλώνος IAR06 ανιχνεύει την πρωτεΐνη N-Cadherin που εκφράζεται στη μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα των κυττάρων ποικιλίας ιστών. Έκφραση παρατηρήθηκε στην παρεγκεφαλίδα, στο νεφρό, στο επινεφρίδιο, στο πάγκρεας, στο ήπαρ, στο στομάχο, στο σπλήν, στην ωοθήκη, στη μήτρα, στους όρχεις, στο θύμο αδέν, στον παραθυρεοειδή, στο μαστό, στην υπόφυση, στην αμυγδαλή και στην καρδιά. Έκφραση ανιχνεύτηκε επίσης σε νευρικά στοιχεία σε ποικιλία φυσιολογικών ιστών. (Συνολικός αριθμός περιπτώσεων = 45.)

Καρκινικοί ιστοί

Ο κλώνος IAR06 ανιχνεύει την πρωτεΐνη N-Cadherin σε 42/77 όγκους που αξιολογήθηκαν, συμπεριλαμβανομένων 4/9 όγκων του μαστού, 5/7 όγκων της ωοθήκης, 3/6 σαρκομάτων, 3/6 καρκίνων του πνεύμονα (συμπεριλαμβανόμενοι 2/3 αδενοκαρκινώματα, 1/2 ακανθοκυτταρικά καρκινώματα, 0/1 βρογχοκυψελιδικό καρκινώματος), 4/4 μεσοθηλιωμάτων, 4/4 νευροενδοκρινικών όγκων, 2/4 όγκων του νεφρού, 3/3 επινεφριδικών όγκων, 2/3 όγκων του ενδοηπίου, 2/3 μελανώματων, 2/3 όγκων του ήπατος, 1/3 όγκων των βλαστικών κυττάρων, 2/2 αστροκυτωμάτων, 2/2 καρκινωμάτων του θυρεοειδούς, 1/2 παγκρεατικών όγκων, 1/1 καρκινώματα του θύμου αδένος και 1/1 όγκων των νεύρων. Δεν παρατηρήθηκε χρώση σε όγκους της ομορδόχου κύστης (0/3), σε ακανθοκυτταρικά καρκινώματα (0/3), σε καρκινώματα του προστάτη/BPH (0/3), σε γαστρικά καρκινώματα (0/2), σε όγκους του δέρματος (0/1), σε λεμφώματα (0/1) και καρκινώματα του κόλου (0/1).

Το NCL-L-N-Cad συνιστάται για χρήση στην ανίχνευση της N-Cadherin σε φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς 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, πλύση, 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 παραλλανγές των μεθόδων μονιμοποίησης και εγκλεισμού ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.⁴

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

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

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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. *Genes and Development*. 2006; 20:3199–3214.

Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση

Σύνθεση Αντιδραστηρίου, Ολική Συγκέντρωση Πρωτεΐνης, Συστάσεις Για Τη Χρήση, Προειδοποιήσεις Και Προφυλάξεις.

Ημερομηνία Έκδοσης

07 Νοεμβρίου 2018

Novocastra™ Væskeformigt Monoklonalt Museantistof

N-Cadherin

Produktkode: NCL-L-N-Cad

Tilsigtet Anvendelse

Til in vitro diagnostisk anvendelse.

NCL-L-N-Cad er beregnet til kvalitativ identifikation af N-Cadherin-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

Immunhistokemi (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

IAR06

Immunogen

Prokaryot rekombinant protein svarende til 160 aminosyrer af C-terminalen af det humane N-Cadherin-molekyle.

Specifitet

Humant N-Cadherin.

Reagenssammensætning

NCL-L-N-Cad er en flydende vævskultursupernatant indeholdende natriumazid som konserveringsmiddel.

Ig-klasse

IgG2b

Totalproteinkoncentration

Total Protein

Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik totalproteinkoncentration.

Antistofkoncentration

Større end eller lig med 95 mg/L som bestemt ved ELISA. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik Ig-koncentration.

Anbefalinger Vedrørende Anvendelse

Immunhistokemi på paraffinsnit.

Varmeinduceret epitopgenfinding (HIER): Følg venligst vejledningen i Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Foreslået fortynding: 1:100 ved 30 minutter ved 25 °C. Disse retningslinjer er vejledende, og brugeren bør selv bestemme egne optimale brugsopløsninger.

Visualisering: Følg venligst vejledningen i Novolink™ Polymer Detection Systems. Yderligere produktinformation og support fås ved henvendelse til lokal forhandler eller Leica-Biosystems regionskontor - samt på vores hjemmeside: www.LeicaBiosystems.com

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 paraffinindstøbte vævsnit.

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.

Denne reagens indeholder natriumazid. Et datablad for materialesikkerhed kan fås efter anmodning eller er tilgængeligt på www.LeicaBiosystems.com

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

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

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

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

Kvalitetskontrol

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

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

Positiv Vævskontrol

Anvendes til påvisning af, at vævet er fremstillet korrekt, og at der er anvendt korrekte 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.²

Anbefalet positivt kontrolvæv er testikel.

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.

Det anbefalede negative kontrolvæv er prostata.

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

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

Patientvæv

Eksaminer patientprøver farvet med NCL-L-N-Cad 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 IAR06 detekterede N-Cadherin-protein udtrykt på membranen og i cytoplasma i en række forskellige vævsprøver. Udtryk blev detekteret i cerebellum, nyre, binyre, bugspytkirtel, lever, mavesæk, milt, ovarier, uterus, testikel, thymuskirtel, biskjoldbruskkirtel, bryst, hypofyse, mandel og hjerte. Udtryk blev også detekteret i de neurale elementer i en række normale vævsprøver. (Totalt antal forekomster = 45.)

Tumorvæv

Klon IAR06 detekterede N-Cadherin-protein i 42/77 evaluerede tumorer, inklusive 4/9 brysttumorer, 5/7 ovarietumorer, 3/6 sarkomer, 3/6 lungecancer (inklusive 2/3 adenokarcinomer, 1/2 pladecellekarcinomer, 0/1 bronchioalveolar karcinom), 4/4 mesotheliomer, 4/4 neuroendokrine tumorer, 2/4 nyretumorer, 3/3 binyretumorer, 2/3 endometriale tumorer, 2/3 melanomer, 2/3 levertumorer, 1/3 kimcelletumorer, 2/2 astrocytomer, 2/2 skjoldbruskkirtelkarcinomer, 1/2 bugspytkirteltumorer, 1/1 thymuskirtelkarcinomer og 1/1 neural tumor. Ingen farvning blev observeret ved blæretumorer (0/3), pladecellekarcinomer (0/3), prostatakarcinomer /BPH (0/3), gastriske karcinomer (0/2), hudtumorer (0/1), lymfomer (0/1) og colonkarcinomer (0/1).

NCL-L-N-Cad anbefales anvendt til detektering af N-Cadherin i normalt og neoplastisk væv.

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

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

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

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

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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. Genes and Development. 2006; 20:3199–3214.

Rettelser Til Tidligere Udgave

Reagenssammensætning, Totalprotein koncentration, Anbefalinger Vedrørende Anvendelse, Advarsler Og Forholdsregler.

Udgivelsesdato

07 november 2018

Novocastra™ vloeibaar monoklonaal muisantilichaam

N-Cadherin

Productcode: NCL-L-N-Cad

Beoogd gebruik

Voor gebruik bij *in-vitro*diagnostiek

NCL-L-N-Cad is bedoeld voor de kwalitatieve identificatie van N-Cadherin-moleculen in paraffinecoupes door middel van lichtmicroscopie. De klinische interpretatie van elke kleuring of het ontbreken hiervan moet worden aangevuld door morfologische studies met de juiste controles en moet binnen de context van de klinische voorgeschiedenis van de patiënt en andere diagnostische tests worden geëvalueerd door een bevoegd patholoog.

Principe van de procedure

Immunohistochemische (IHC) kleuringstechnieken maken het mogelijk om antigenen te visualiseren via de sequentiële toepassing van een specifiek antilichaam op het antigeen (primaire antilichaam), een secundair antilichaam op het primaire antilichaam en een enzymcomplex met een chromogeen substraat met ingevoegde wasstappen. De enzymatische activering van het chromogeen resulteert in een zichtbaar reactieproduct op de antigeenplaats. Het monster kan dan worden tegengekleurd en met een dekglasje worden bedekt. De resultaten worden geïnterpreteerd met behulp van een lichtmicroscop en helpen bij de differentiële diagnose van pathofysiologische processen, die al dan niet met een bepaald antigeen kunnen worden geassocieerd.

Kloon

IAR06.

Immunogeen

Prokaryotisch recombinant eiwit dat overeenkomt met 160 aminozuren van de C-terminus van het humane N-Cadherin-molecuul.

Specificiteit

Humane N-Cadherin.

Reagenssamenstelling

NCL-L-N-Cad is een vloeibaar supernatant van weefselkweek dat natriumazide bevat als conserveringsmiddel.

Ig-klasse

IgG2b.

Totale eiwitconcentratie

Total Protein

Zie het etiket van de flacon voor de totale eiwitconcentratie van de partij.

Antilichaamconcentratie

Groter dan of gelijk aan 95 mg/L zoals bepaald door ELISA. Zie het etiket van de flacon voor de totale Ig-concentratie van de partij.

Aanbevelingen voor het gebruik

Immunohistochemie op paraffinecoupes.

Warmte-geïnduceerd epitoopherstel (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER): Volg de instructies voor het gebruik in Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Vorgestelde verdunning: 1:100 gedurende 30 minuten bij 25 °C. Dit is een richtsnoer en gebruikers moeten zelf de voor hen optimale werkverdunding bepalen.

Visualisatie: Volg de instructies voor het gebruik in de Novolink™ Polymer Detection Systems. Voor meer productinformatie of -ondersteuning kunt u contact opnemen met uw lokale distributeur of de regionale vestiging van Leica Biosystems of u kunt naar de Leica Biosystems Website gaan, www.LeicaBiosystems.com.

Opslag en stabiliteit

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

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 celkweek. Aangezien dit een biologisch product is, moet redelijke voorzichtigheid worden betracht bij het hanteren ervan.

Dit reagens bevat natriumazide. Er is een veiligheidsinformatieblad verkrijgbaar op verzoek of via www.LeicaBiosystems.com.

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

Specimens, zowel voor als na de fixatie, en alle materialen die eraan worden blootgesteld, moeten worden behandeld als potentiële overdragers van infecties en met inachtneming van de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgevoerd.¹ Pipetteer reagentia nooit met de mond en vermijd dat de huid en slijmvliezen in aanraking komen met reagentia en specimen. 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 kleuringsrun moet één positieve weefselcontrole worden opgenomen.

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

Aanbevolen positief controleweefsel is testis.

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

Negatieve weefselcontrole

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

Aanbevolen negatief controleweefsel is prostaatklieren.

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

Niet-specifieke kleuring, indien aanwezig, ziet er doorgaans diffuus uit. Een sporadische kleuring van bindweefsel kan ook worden waargenomen in coupes van bovenmatig in formaline gefixeerde weefsels. Gebruik intacte cellen voor het interpreteren van kleuringresultaten. Necrotische of gedegenererde cellen kleuren vaak niet-specifiek.³ Fout-positieve resultaten kunnen optreden als gevolg van niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten. Ze kunnen ook worden veroorzaakt door endogene enzymen zoals pseudoperoxidase (erythrocyten), endogene peroxidase (cytochroom c) of 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-N-Cad 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 IAR06 detecteerde het N-Cadherin-eiwit, tot expressie gebracht op het membraan in het cytoplasma van cellen van verschillende weefsels. Expressie werd gedetecteerd in cerebellum, nier, bijnier, pancreas, lever, maag, milt, eierstok, baarmoeder, testis, thymus, bijschildklier, borst, hypofyse, tonsil en hart. Er werd ook expressie gedetecteerd in de neurale elementen in verscheidene weefsels. (Totaal aantal gevallen = 45).

Afwijkende weefsels

Kloon IAR06 detecteerde het N-Cadherin-eiwit in 42/77 onderzochte tumoren inclusief 4/9 borsttumoren, 5/7 eierstoktumoren, 3/6 sarcomen, 3/6 longkankers (inclusief 2/3 adenocarcinomen, 1/2 plaveiselcarcinomen, 0/1 broncho-alveolaire carcinomen), 4/4 mesotheliomen, 4/4 neuro-endocriene tumoren, 2/4 niertumoren, 3/3 bijnier tumoren, 2/3 endometrische tumoren, 2/3 melanomen, 2/3 levertumoren, 1/3 geslachtsceltumoren, 2/2 astrocytomen, 2/2 schildklieradenocarcinomen, 1/2 pancreastumoren, 1/1 thymuscarcinomen en 1/1 neurale tumoren. Er werd geen kleuring waargenomen in blaastumoren (0/3), plaveiselcelcarcinomen (0/3), prostaatcarcinomen /BPH (0/3), maagcarcinomen (0/2), huidtumoren (0/1), lymfomen (0/1) en dikke darmcarcinomen (0/1).

NCL-L-N-Cad wordt aanbevolen voor gebruik bij de detectie van N-Cadherin 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, ontdooven, wassen, drogen, verwarmen, snijden, of contaminatie met andere weefsels of vloeistoffen kan tot artefacten, insluiting van antilichamen of fout-negatieve resultaten leiden. Inconsistente resultaten kunnen te wijten zijn aan variaties in de fixatie- en inbeddingsmethodes, of aan intrinsieke onregelmatigheden in het weefsel.⁴

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

De klinische interpretatie van 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 bevroren 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. Genes and Development. 2006; 20:3199–3214.

Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave

Reagentiasamenstelling, Totale Proteïneconcentratie, Aanbevelingen over het Gebruik, Waarschuwingen en Voorzorgsmaatregelen, Verwachte Resultaten.

Datum uitgave

07 november 2018

Novocastra™ flytende murint monoklonalt antistoff

N-Cadherin

Produktkode: NCL-L-N-Cad

Tiltenkt bruk

Til in vitro-diagnostisk bruk.

NCL-L-N-Cad skal brukes til kvalitativ identifikasjon av N-Cadherin-molekyler i parafinsnitt ved lysmikroskopering. Den kliniske tolkingen 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

IAR06.

Immunogen

Prokaryotisk rekombinant protein tilsvarende 160 aminosyrer på den N-terminale delen av humant N-Cadherin-molekyl.

Spesifisitet

Human N-Cadherin.

Reagenssammensetning

NCL-L-N-Cad er flytende vekultur supernatant med natriumazid som et konserveringsmiddel.

Ig-klasse

IgG2b.

Totalproteinkonsentrasjon Total Protein

Se etiketten på hetteglasset for partispesifikk totalproteinkonsentrasjon.

Antistoffkonsentrasjon

Større enn eller lik 19 mg/l som fastslått av ELISA. Se etiketten på hetteglasset for partispesifikk Ig-konsentrasjon.

Anbefalinger for bruk

Immunhistokjemi på parafinsnitt.

Varmeindusert epitopgjenfinning (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER): Følg bruksanvisningen for Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Foreslått fortynning: 1:100 i 30 minutter ved 25 °C. Dette er kun veiledende, og brukerne bør fastslå egne optimale fortynninger for sitt arbeid.

Visualisering: Følg bruksanvisningen for Novolink™ Polymer Detection Systems. Hvis du ønsker ytterligere produktinformasjon eller -støtte, kan du kontakte din lokale forhandler eller regionkontoret til Leica Biosystems, eller du kan besøke Leica Biosystems-nettstedet på www.LeicaBiosystems.com

Oppbevaring og stabilitet

Oppbevares ved 2–8 °C. Skal 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 parafininnstøpte vevsnitt.

Advarsler og forholdsregler

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

Dette reagenset inneholder natriumazid. Et sikkerhetsdatablad er tilgjengelig på forespørsel eller tilgjengelig fra www.LeicaBiosystems.com

Følg nasjonale og lokale forskrifter for avfallshåndtering av bestanddeler som kan være giftige.

Prøver, før og etter fiksering, og alle materialer som utsettes for dem, skal håndteres som smittefarlige og avhendes etter egnede forholdsregler.¹ Pipetter aldri reagenser via munnen og unngå kontakt med hud og slimhinner med reagenser og prøver. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skyl med rikelige mengder vann. 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 parafinvoksinntøpt 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 reagensnedbrytning.²

Anbefalt positivt kontrollvev er testikkel.

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. Anbefalt negativt kontrollvev er prostakjertel.

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

Ikke-spesifikk farging, hvis dette forekommer, har vanligvis et diffus utseende. Sporadisk farging av bindevev vil også kunne observeres i vevsniitt som er fiksert i for mye formalin. Bruk intakte celler til tolkning av fargingsresultater. Nekrotiske eller degenererte celler farger ofte uspesifikt.³ Falske positive resultater kan sees på grunn av ikke-immunologisk binding av proteiner eller substratreaksjonsprodukter. De kan også forårsakes av endogene enzymer slik som pseudoperoksidase (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-N-Cad 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 IAR06 påviste N-kadherinprotein uttrykt på membranen og i cytoplasma av celler i en rekke vev. Uttrykk ble påvist i cerebellum, nyre, binyre, bukspyttkjertel, lever, mage, milt, eggstokk, livmor, testikler, tymus, biskjoldkjertel, bryst, hypofyse, mandel og hjerte. Uttrykk ble også påvist i nevrale elementer i en rekke normale vev. (Totalt antall tilfeller = 45).

Unormale vev

Klon IAR06 påviste N-kadherinprotein i 42/77 evaluerte tumorer, inkludert 4/9 brysttumorer, 5/7 eggstokktumorer, 3/6 sarkomer, 3/6 lungekreft (inkludert 2/3 adenokarsinomer, 1/2 skvamøse karsinomer, 0/1 bronkioalveolært karsinom), 4/4 mesoteliom, 4/4 nevendokriner tumorer, 2/4 nyretumorer, 3/3 binyretumorer, 2/3 endometriale tumorer, 2/3 melanomer, 2/3 levertumorer, 1/3 kimcelletumorer, 2/2 astrocytomer, 2/2 skjoldbruskkarsinomer, 1/2 bukspyttkjerteltumorer, 1/1 tymuskarsinomer og 1/1 nevral tumor. Ingen farging ble observert i blæretumorer (0/3), skvamøse cellekarsinomer (0/3), prostatakarsinomer/BPH (0/3), gastriske karsinomer (0/2), hudtumorer (0/1), lymfomer (0/1) og kolonkarsinomer (0/1).

NCL-L-N-Cad anbefales for bruk i påvisning av N-Cadherin 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, dyppfrysing, opptining, vasking, tørking, oppvarming, snitting eller kontaminering med annet vev eller væsker kan frembringe artefakter, fangning av antistoff eller falske negative resultater. Inkonsistente resultater kan skyldes variasjoner i fikserings- og innstøpsmetoder eller uregelmessigheter i vevet.⁴ Overdreven eller ufullstendig kontrastfarging kan hindre riktig tolkning av resultater.

Den kliniske tolkningen av en farging eller utblett 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 parafininnstøpte snitt med spesifikk fikseringskrav. Det kan forekomme uventet antigenuttrykk, spesielt i neoplasmer. Den kliniske tolkningen av ethvert farget vevsniitt 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. *Genes and Development*. 2006; 20:3199–3214.

Endringer på tidligere utgave

Reagenssammensetning, Totalproteinkonsentrasjon, Anbefalinger for bruk, Advarsler og forholdsregler, Forventede resultater.

Utstedelsesdato

07 november 2018

Novocastra™ Likit Monoklonal Fare Antikoru N-Cadherin

Ürün Kodu: NCL-L-N-Cad

Kullanım Amacı

In vitro diagnostik kullanım içindir.

NCL-L-LCA, parafin bölümlerindeki N-Kadherin moleküllerinin ışık mikroskopisi ile kalitatif tanımlanması içindir. 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 antikorun uygulanması (birincil antikor), birincil antikora ikincil bir antikorun uygulanması ve aralaradaki yıkama adımları ile, antijenlerin kromojenik substratlı bir enzim kompleksi yoluyla görselleştirilmesine olanak tanır. Kromojenin enzimle etkinleştirilmesi, antijen alanında gözle görüldür bir tepkiye yol açar. Numune daha sonra karşıt boyanabilir ve lamelle örtülebilir. Sonuçlar bir ışık mikroskobu kullanılarak yorumlanır ve belirli bir antijen ile ilişkili olabileceği veya olmayabileceği patofizyolojik süreçlerin ayrıncı tanısına yardımcı olur.

Clone

IAR06.

İmmünojen

İnsan N-Kadherin molekülünün C-terminusundaki 160 aminoasitlik gelen prokaryotik rekombinant protein.

Özgüllük

İnsan N-Kadherin.

Reaktif Bileşimi

NCL-L-N-Cad, koruyucu olarak sodyum azit içeren sıvı doku kültürü süpernatantıdır.

Ig Sınıfı

IgG2b.

Toplam Protein Konsantrasyonu Total Protein

Lota özgül toplam protein konsantrasyonu için flakon etiketine başvurun.

Antikor Konsantrasyonu

ELISA tarafından belirlendiği gibi 95 mg/L'ye eşit veya bu değerden yüksek. Lota özgül Ig konsantrasyonu için flakon etiketine başvurun.

Kullanım Önerileri

Parafin kesitlerinde immünohistokimya.

Isı Etkisiyle Epitop Geri Kazanımı (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER): Lütfen, Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6 için kullanma talimatını izleyin.

Önerilen dilüsyon: 25°C'de 30 dakika süreyle 1:100. Bu, kılavuz olarak verilmiştir ve kullanıcılar kendi optimal çalışma seyreltilerini belirlemelidir.

Görselleştirme: Lütfen Novolink™ Polymer Detection Systems'ın kullanım talimatlarını izleyin. Ürünle ilgili daha fazla bilgi veya destek için yerel distribütörünüzle veya Leica Biosystems bölge ofisiyle iletişime geçebilirsiniz ya da bunun yerine Leica Biosystems Web sitesini ziyaret edebilirsiniz: www.LeicaBiosystems.com

Saklama ve Stabilite

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

Numune Hazırlama

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

Uyarılar ve Önlemler

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

Bu reaktif sodyum azid içerir. Malzeme Güvenlik Bilgileri Formu, talep üzerine sağlanabilir ve www.LeicaBiosystems.com sitesinde mevcuttur.

Potansiyel olarak toksik bileşenlerin atılmasıyla ilgili yerel, ulusal veya bölgesel düzenlemeleri dikkate alın.

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.²

Önerilen pozitif kontrol dokusu testistir.

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. Önerilen negatif kontrol dokusu prostat bezleridir.

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 dejeneren hücreler genellikle spesifik olmayan şekilde boyanır.³ Proteinlerin veya substrat reaksiyon ürünlerinin immünohistokimyasal olmayan bağlanması nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar görülebilir. Bu sonuçlar ayrıca, kullanılan immün-boyaya bağlı olarak psödo-peroksidaz (eritrositler), endojen peroksidaz (sitokrom C) veya endojen biotin (örn. karaciğer, meme, beyin, böbrek) gibi endojen enzimlerden de kaynaklanabilir. Endojen enzim aktivitesini veya nonspesifik enzim bağlanmasını spesifik immünoreaktiveden ayırmak için ek hasta dokuları sırasıyla sadece substrat kromojen veya enzim kompleksleri (avidin-biotin, streptavidin, etiketli polimer) ve substrat kromojen ile boyanabilir. Negatif doku kontrolünde spesifik boyanma olursa hasta 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-N-Cad ile boyanmış hasta numunelerini en son inceleyin. Pozitif boyama yoğunluğu, negatif reaktif kontrolünün spesifik olmayan herhangi bir arka plan boyanması 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 IAR06 çeşitli dokulardaki hücrelerin membranlarında ve sitoplazmalarında N-Kadherin proteininin ifade edildiğini saptamıştır. Serebellum, böbrek, adrenal bez, pankreas, karaciğer, mide, dalak, yumurtalık, uterus, testis, timus, paratiroid, meme, hipofiz, tonsil ve kalpte ekspresyon saptanmıştır. Biz dizi normal dokudaki nöral unsurlarda da ekspresyon saptanmıştır. (Toplam vaka sayısı = 45).

Anormal Dokular

Klon IAR06 4/9 meme tümörü, 5/7 yumurtalık tümörü, 3/6 sarkom, 3/6 akciğer kanseri (2/3 adenokarsinom, 1/2 skuamöz karsinom, 0/1 bronşioalveolar karsinom dahil), 4/4 mezoteliyom, 4/4 nöroendokrin tümör, 2/4 böbrek tümörü, 3/3 adrenal tümör, 2/3 endometriyal tümör, 2/3 melanom, 2/3 karaciğer tümörü, 1/3 germ hücre tümörü, 2/2 astrositom, 2/2 tiroid karsinomu, 1/2 pankreatik tümör, 1/1 timus karsinomu ve 1/1 nöral tümör dahil olmak üzere değerlendirilen 42/77 tümörde N-Kadherin proteini saptamıştır. Mesane tümörleri (0/3), skuamöz hücreli karsinomlar (0/3), prostat karsinomları /BPH (0/3), gastrik karsinomlar (0/2), ciit tümörleri (0/1), lenfomalar (0/1) ve kolon karsinomlarında (0/1) boyama gözlenmemiştir.

NCL-L-N-Cad'nin normal ve neoplastik dokular N-kadherin saptaması için kullanılması önerilir.

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 kontaminasyonu artefaktlara, antikor tutulmasına veya yalnızca negatif sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki değişikliklerden ya da dokunun yapısından kaynaklanan düzensizliklerden kaynaklanabilir.⁴

Aşırı ya da tam olmayan karşı 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'in antikorları, belirtilen şekilde, özel fiksasyon gereklilikleriyle parafine gömülü 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. *Genes and Development*. 2006; 20:3199–3214.

Önceki Sayıya Göre Değişiklikler

Reaktif Bileşimi, Toplam Protein Konsantrasyonu, Kullanım Hakkında Öneriler, Uyarılar ve Önlemler, Beklenen Sonuçlar.

Yayın Tarihi

07 Kasım 2018

Течно мише моноклонално антитяло Novocastra™

N-Cadherin

Код на продукта: NCL-L-N-Cad

Предназначение

За употреба при *in vitro* диагностика.

Продуктът NCL-L-N-Cad е предназначен за качествено идентифициране посредством оптична микроскопия на молекули N-кадхерин 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 патолофизиологични процеси, които може да са или да не са свързани с определен антиген.

Клонинг

IAR06.

Имуноген

Прокариотен рекомбинантен протеин, съответстващ на 160 аминокиселини в C-термина на човешката молекула N-кадхерин.

Специфичност

Човешки N-кадхерин.

Състав на реагента

NCL-L-N-Cad е супернатантна течност от тъканна култура, съдържаща натриев азид като консервант.

Имуноглобулинов клас

IgG2b.

Обща концентрация на протеин Total Protein

Вижте етикета на флакона относно специфичната за партидата концентрация на общ протеин.

Концентрация на антитела

По-висока или равна на 95 mg/L, както е определено от ELISA. Вижте етикета на флакона за специфичната за партидата концентрация на имуноглобулин.

Препоръки за употреба

Имунохистохимия върху парафинови срези.

Термично индуцирано извличане на епитоп (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER): Моля, спазвайте инструкциите за употреба, включени в опаковката на Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Предложение за разреждане: 1:100 за 30 минути при 25°C. Това е дадено като указание, като потребителите трябва сами да определят техни собствени оптимални работни разреждания.

Визуализация: Спазвайте инструкциите за употреба, приложени към Novolink™ Polymer Detection Systems. За допълнителна информация за продукта или помощ се свържете с вашия местен дистрибутор или с регионалния офис на Leica Biosystems, а също така може да посетите уебсайта на Leica Biosystems www.LeicaBiosystems.com

Съхранение и стабилност

Да се съхранява при температура 2 – 8°C. Да не се замразява. 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 реактив е приготвен от супернатант от клетъчна култура. Тъй като е биологичен продукт, необходимо е повишено внимание при работа с него.

Този реактив съдържа натриев азид. Информационният лист за безопасност на материалите е наличен при запитване или от www.LeicaBiosystems.com.

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

Всички спесимени преди и след фиксация, както и всички материали, изложени на тях, трябва да се третират като възможни преносители на инфекция и да се изхвърлят, като се вземат правилни предпазни мерки.¹ Никога не пипетирайте реагенти с уста

и избягвайте контакт на кожата и лигавиците с реагенти и спесимени. В случай че реактиви или спесимени влязат в контакт с чувствителни зони, да се измият с обилно количество вода. Потърсете медицинска помощ.

Свеждайте до минимум микробната контаминация на реактивите, иначе може да се появи увеличаване на неспецифичното оцветяване.

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

Качествен контрол

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

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

Позитивна тъканна контрола

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

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

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

Препоръчителната позитивна тъканна контрола е тестис.

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

Негативна тъканна контрола

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

Препоръчителната тъкан за негативна контрола са жлезните клетки на простатата.

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

Неспецифичното оцветяване, ако присъства, обикновено е дифузно на вид. Спорадично оцветяване на съединителна тъкан може да се наблюдава и в части от прекомерно фиксирани във формалин тъкани. Използвайте интактни клетки за интерпретация на резултатите от оцветяването. Некротичните или дегенериралите клетки често се оцветяват неспецифично.³

Може да се видят неверни позитивни резултати поради неимунологично свързване на протеини или реакционни продукти на субстрата. Те може да са причинени и от ендегенни ензими, като например псевдопероксидаза (еритроцити), ендегенна пероксидаза (цитохром С) или ендегенен биотин (напр. черен дроб, гърда, мозък, бъбрек) в зависимост от типа на използваното имуно оцветяване. За диференциране на ендегенна ензимна активност или неспецифично ензимно свързване от специфична имуна реактивност ексклузивно може да се оцветят допълнителни тъкани от пациента, съответно със субстрат-хромоген или с ензимни комплекси (авидин-биотин, стрептавидин, маркиран полимер) и субстрат-хромоген. Ако се появи специфично оцветяване в негативната тъканна контрола, резултатите от спесимените на пациентите трябва да се считат за невалидни.

Негативна контрола на реагента

Използвайте неспецифична негативна контрола на реагента, вместо първичното антитяло, 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-N-Cad, 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 анализираните клетки/тъкан. Ако се налага, използвайте панел от антитела за идентифициране на фалшиво отрицателни реакции.

Очаквани резултати

Нормални тъкани

Клонинг IAR06 открива протеина N-кадхерин, експресиран в мембраната и в цитоплазмата на клетки в множество тъкани. Експресия се открива в малкия мозък, бъбрека, надбъбречната жлеза, панкреаса, черния дроб, стомаха, далака, яйчника, матката, тестиса, тимуса, парашитовидната жлеза, гърдата, хипофизата, сливицата и сърцето. Експресия се открива и в невралните елементи в редица нормални тъкани. (Общ брой на случаите = 45).

Абнормни тъкани

Клонинг IAR06 открива протеина N-кадхерин в 42/77 оценени тумора, включително 4/9 тумора на гърдата, 5/7 овариални тумора, 3/6 случая на саркома, 3/6 случая на белодробен рак (включително 2/3 аденокарцинома, 1/2 плоскоклетъчни карцинома, 0/1 бронхиоалвеоларни карцинома), 4/4 мезотелиома, 4/4 невроендокринни тумора, 2/4 тумора на бъбреците, 3/3 адренални тумора, 2/3 тумора на ендометриума, 2/3 меланома, 2/3 чернодробни тумора, 1/3 тумора на зародишните клетки, 2/2 астроцитома, 2/2 карцинома на щитовидната жлеза, 1/2 тумора на панкреаса, 1/1 карцинома на тимуса и 1/1 неврален тумор. Не се наблюдава оцветяване при тумори на пикочния мехур (0/3), плоскоклетъчни карциноми (0/3), карциноми на простатата /BPH (0/3), стомашни карциноми (0/2), кожни тумори (0/1), лимфоми (0/1) и карциноми на ободното черво (0/1).

Продуктът NCL-L-N-Cad се препоръчва за откриване на N-кадхерин в нормални и неопластични тъкани.

Общи ограничения

Имунохистохимията е многостъпков диагностичен процес, който се състои от специализирано обучение за избор на подходящи реактиви, 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.⁴ Прекомерното или непълно контраоцветяване може да попречи на правилната интерпретация на резултатите.

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

Антителата от Leica Biosystems Newcastle Ltd са 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. Nadjji 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. Genes and Development. 2006; 20:3199–3214.

Изменения на предишно издание

Състав на реагента. Обща концентрация на протеин, Препоръки за употреба, Предупреждения и предпазни мерки.

Дата на издаване

07 Ноември 2018

Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody N-Cadherin

Termékkód: NCL-L-N-Cad

Alkalmazási terület

In vitro diagnosztikai használatra.

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

Az eljárás elve

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

Klón

IAR06.

Immunogén

A humán N-kadherin molekula C-terminális régiója 160 aminosavból álló szakaszának megfelelő prokarióta eredetű rekombináns fehérje.

Specifitás

Humán N-kadherin.

A reagens összetétele

Az NCL-L-N-Cad egy tartósítószerként nátrium-azidot tartalmazó folyékony szövetkultúra felülúszó.

Ig-osztály

IgG2b.

Összfehérje-koncentráció Total Protein

A sarzsspecifikus összfehérje-koncentrációt lásd az üveg címkéjén.

Antitest-koncentráció

Legalább 95 mg/l, ELISA módszerrel meghatározva. A sarzsspecifikus Ig-koncentrációt lásd az üveg címkéjén.

Felhasználási javaslatok

Immunhisztokémia paraffinos metszeteken.

Hőindukált epitópfeltárás (heat induced epitope retrieval, HIER): Kövesse a Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6 termék használati útmutatóját.

Javasolt hígítás: 1:100, 30 percen át, 25 °C-on. Az adatok csak útmutatásul szolgálnak, a felhasználóknak kell meghatározniuk saját optimális munkaidőket.

Megjelenítés: Kövesse a Novolink™ Polymer Detection Systems rendszerek használati útmutatóját. Ha további termékinformációkra vagy támogatásra van szüksége, forduljon a Leica Biosystems helyi forgalmazójához vagy regionális irodájához, vagy keresse fel a Leica Biosystems weboldalát a www.LeicaBiosystems.com címen.

Tárolás és stabilitás

2–8 °C-on tárolandó. Tilos lefagyasztani. 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 sejtkultúra felülúszójából készült. Mivel biológiai termék, kezelésekor ésszerű körültekintéssel kell eljárni.

Ez a reagens nátrium-azidot tartalmaz. Az anyagbiztonsági adatlap kérésre rendelkezésre áll, vagy letölthető a www.LeicaBiosystems.com oldalról.

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 fertőtlenítésre képes anyagként kell kezelni, és megfelelő körültekintéssel kell ártalmatlanítani.¹ Soha ne pipettázza szájjal a reagenseket, továbbá kerülje a bőr és a nyálkahártyák érintkezését a reagensekkel és a mintákkal. Ha a reagensek vagy minták érzékeny területtel érintkeznek, bő vízzel mossa le az érintett területet. Forduljon orvoshoz.

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

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

Minőség-ellenőrzés

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

Kontrollként friss boncolási/biopsziás/sébészeti mintákat kell használni, amelyeket a lehető leghamarabb a betegmintákkal megegyező módon kell formalinban fixálni, feldolgozni és paraffinvaszba ágyazni.

Pozitív szövetkontroll

A megfelelő szövet-előkészítés és festési technikák ellenőrzésére használatos.

Minden tesztelési körülménygyűttes esetében és minden megfestési sorozatban kell alkalmazni egy pozitív szövetkontrollt.

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

A javasolt pozitív kontrollszövet a here.

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

Negatív szövetkontroll

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

A javasolt negatív kontrollszövet a prosztata mirigyes szövete.

Ezenkívül a legtöbb szövetszövetben 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 szövetekből származó metszeteknél a kötőszövet szöványos festődése is megfigyelhető. A festési eredmények értelmezésére ép sejteket használjon. A nekrotizált vagy degenerálódott sejtek gyakran nem specifikusan festődnek meg.³ A fehérjék vagy a szubsztrát reakciótermékeinek nem immunológiai kötődése miatt álpozitív eredmények jelentkezhetnek. Az alkalmazott immunfestés típusától függően álpozitív eredményeket okozhatnak olyan endogén enzimek is, mint a pszeudoperoxidáz (vörösrészejték), endogén peroxidáz (citokróm C), illetve endogén biotin (pl. máj, emlő, agy, vese). Az endogén enzim aktivitásának vagy az enzimek nem specifikus kötődésének a specifikus immunreakcióval való megkülönböztetésére további betegszövetek festhető kizárólag szubsztrát–kromogén oldattal vagy enzimmolekulákkal (avidin–biotin, sztreptavidin, jelölt polimer) és szubsztrát–kromogénnel. Ha a negatív szövetkontroll specifikus festődést mutat, a betegminták eredményeit érvénytelennek kell tekinteni.

Negatív reagenskontroll

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

Betegszövet

Az NCL-L-N-Cad reagenssel festett betegmintákat utolsóként vizsgálja meg. 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 IAR06 klón kimutatta az N-kadherin fehérje expresszióját különböző szövetek sejteinek membránján és citoplazmájában. Expresszió volt kimutatható a kisagyban, vesében, mellékvesében, hasnyálmirigyben, májban, gyomorban, lépben, petefészekben, méhben, herében, csecsemőmirigyben, mellékpajzsmirigyben, emlőben, agyalapi mirigyben, tonsillában és szívben. Expresszió mutatott ki számos normál szövet idegi elemében is. (Összesített esetszám = 45).

Kóros szövetek

Az IAR06 klón kimutatta az N-kadherin fehérjét 42/77 értékelt daganatban, beleértve 4/9 emlődaganat, 5/7 petefészek-daganat, 3/6 szarkóma, 3/6 tüdődaganat (beleértve 2/3 adenokarcinóma, 1/2 laphámsejtes karcinóma, 0/1 bronchioalveoláris karcinóma), 4/4 mezotelióma, 4/4 neuroendokrin daganat, 2/4 vesedaganat, 3/3 mellékvese-daganat, 2/3 endometrium-daganat, 2/3 melanóma, 2/3 májdaganat, 1/3 csírasejtjes daganat, 2/2 asztrocitóma, 2/2 pajzsmirigy-karcinóma, 1/2 hasnyálmirigy-daganat, 1/1 csecsemőmirigy-karcinóma és 1/1 idegrendszeri daganat esetében. Nem volt festődés megfigyelhető húgyhólyag-daganat (0/3), laphámsejtes karcinóma (0/3), prosztatacarcinóma/BPH (0/3), gyomorkarcinóma (0/2), bőrdaganat (0/1), limfóma (0/1) és vastagbél-karcinóma (0/1) esetén.

Az NCL-L-N-Cad az N-kadherin kimutatására ajánlott egészséges és tumoros szövetekben.

Általános korlátozások

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

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

A túlzott vagy hiányos kontrasztfestés ronthatja az eredmények megfelelő értelmezését.

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

A Leica Biosystems Newcastle Ltd által biztosított antitestek specifikus fixálási követelmények mellett, az utasításoknak megfelelően fagyasztott vagy paraffinba ágyazott metszeteken történő felhasználásra szolgálnak. Időnként váratlan antigén-expresszió fordulhat elő,

különösen daganatok esetében. Bármely festett szövetmetszet 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. *Genes and Development*. 2006; 20:3199–3214.

Módosítások az előző változathoz képest

A reagens összetétele, Összfehérje-koncentráció, Felhasználási javaslatok, Figyelmeztetések és óvintézkedések.

Kiadás dátuma

07 november 2018

Novocastra™ Anticorp monoclonal lichid de șoarece N-Cadherin

Cod produs: NCL-L-N-Cad

Utilizare prevăzută

Pentru diagnosticare in vitro.

NCL-L-Cad este destinat identificării calitative, prin intermediul microscopiei optice, a moleculelor de N-caderină 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

IAR06.

Imunogen

Proteină recombinantă procariotică, corespunzând la 160 aminoacizi din C-terminus al moleculei de N-caderină umană.

Specificitate

N-caderină umană.

Compoziția reactivului

NCL-L-N-Cad este un supernatant de cultură tisulară lichid care conține azidă de sodiu drept conservant.

Clasa Ig

IgG2b.

Concentrație proteină totală Total Protein

Consultați eticheta flaconului pentru concentrația proteinelor totale specifică lotului.

Concentrație anticorpi

Mai mare sau egală cu 95 mg/L, așa cum este determinată prin ELISA. Consultați eticheta flaconului pentru concentrația Ig specifică lotului.

Recomandări privind utilizarea

Imunohistochimie pe secțiuni de parafină.

Recuperarea indusă de căldură a epitopilor (HIER): Urmați instrucțiunile de utilizare din Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Diluție sugerată: 1:100 timp de 30 de minute la 25 °C. Aceste informații sunt furnizate cu rol de îndrumare, iar utilizatorul trebuie să-și stabilească singuri propriile diluții de lucru optime.

Vizualizare: Respectați instrucțiunile de utilizare din Novolink™ Polymer Detection Systems. Pentru alte informații cu privire la produs sau asistență, luați legătura cu distribuitorul dvs. local sau cu biroul regional al Leica Biosystems sau, ca alternativă, vizitați site-ul web al Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com.

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.

Acest reactiv conține azidă de sodiu. O Fișă tehnică de securitate a materialului este disponibilă la cerere sau pe site-ul www.LeicaBiosystems.com

Consultați reglementările naționale sau locale pentru informații privind eliminarea la deșeurile a tuturor componentelor potențial toxice. 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.¹ Nu pipetați niciodată reactivii cu gura și evitați contactul reactivilor și specimenelor cu pielea și membranele mucoase. Dacă reactivii sau probele vin în contact cu suprafețele sensibile, spălați cu apă din abundență. Solicitați asistență medicală.

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

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

Controlul calității

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

Țesutul de control pozitiv

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

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

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

Țesutul de control pozitiv recomandat este cel testicular.

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.

Țesutul de control negativ recomandat este cel al glandelor prostatei.

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

Colorația nespecifică, dacă este prezentă, are, de obicei, un aspect difuz. Colorația sporadică a țesutului conjunctiv poate fi observată, de asemenea, în secțiuni de țesuturi fixate în mod excesiv în formalină. Folosiți celule intacte pentru interpretarea rezultatelor de colorare. Celulele necrotice sau degenerate se colorează deseori într-un mod nespecific.³ Se pot observa rezultate fals pozitive ca urmare a legărilor 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 speciemenle pacientului colorate cu NCL-L-Cad 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 IAR06 a detectat proteina de N-caderină exprimată pe membrană și în citoplasma celulelor dintr-o varietate de țesuturi. A fost detectată expresia în creier, rinichi, glanda suprarenală, pancreas, ficat, stomac, splină, ovar, uter, testicul, timus, paratiroidă, sân, pituitară, amigdală și cord. A fost de asemenea detectată expresia în elementele neurale din diverse țesuturi normale. (Număr total al cazurilor = 45).

Țesuturi anormale

Clona IAR06 a detectat proteina N-caderină în 42/77 tumori evaluate incluzând 4/9 tumori mamare, 5/7 tumori ovariene, 3/6 sarcoame, 3/6 cancere pulmonare (incluzând 2/3 adenocarcinoame, 1/2 carcinoame scuamoase, 0/1 carcinom bronhioalveolar), 4/4 mezoteliome, 4/4 tumori neuroendocrine, 2/4 tumori renale, 3/3 tumori suprarenale, 2/3 tumori endometriale, 2/3 melanoame, 2/3 tumori hepatice, 1/3 tumori cu celule germinale, 2/2 astrocitoame, 2/2 carcinoame ale tiroidei, 1/2 tumori pancreatice, 1/1 carcinoame ale timusului și 1/1 tumoare neurală. Nu a fost observată vreo colorare în tumori ale vezicii urinare (0/3), carcinoame cu celule scuamoase (0/3), carcinoame ale prostatei/BPH (0/3), carcinoame gastrice (0/2), tumori ale pielii (0/1), limfoame (0/1) și carcinoame ale colonului (0/1).

NCL-L-N-Cad este recomandat pentru utilizare în detectarea N-caderinei în țesuturi normale și neoplazice.

Limitări generale

Imunohistochimia este un proces 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.⁴

Contracolorația excesivă sau incompletă poate compromite interpretarea adecvată a rezultatelor.

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

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

Bibliografie - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. *Genes and Development*. 2006; 20:3199–3214.

Amendamente la ediția anterioară

Compoziția reactivului, Concentrația totală de proteine, Recomandări pentru utilizare, Avertizări și măsuri de precauție.

Data publicării

07 noiembrie 2018

Жидкая форма моноклональных антител мыши Novocastra™ N-Cadherin

Код продукта: NCL-L-N-Cad

Назначение

Для диагностики in vitro

Препарат NCL-L-N-Cad предназначен для качественной идентификации молекул N-Cadherin 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

IAR06.

Иммуноген

Прокариотный рекомбинантный белок, соответствующий 160 аминокислотам C-концевого молекулы N-Cadherin человека.

Специфичность

N-Cadherin человека.

Состав реактива

NCL-L-N-Cad является супернатантом жидкой культуры тканей, содержащим азид натрия в качестве консерванта.

Класс иммуноглобулинов

IgG2b.

Общая концентрация белка Total Protein

Общая концентрация белка в каждой партии указана на этикетке флакона.

Концентрация антитела

Не менее 95 мг/л при измерении методом ИФА. Общая концентрация иммуноглобулина в каждой партии указана на этикетке флакона.

Рекомендации по применению

Иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов.

Тепловая демаскировка эпитопа (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER): выполняйте инструкцию по применению, прилагаемую к препарату Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Рекомендуемое разведение: 1:100 в течение 30 минут при температуре 25 °С. Данная информация носит рекомендательный характер, и пользователям следует самостоятельно определять оптимальные рабочие разведения.

Визуализация: Следуйте инструкции по применению, которые прилагаются к системам визуализации Novolink™ Polymer Detection Systems. Для получения дополнительной информации о продукции и технической поддержке обратитесь к местному дистрибьютору или в региональный офис компании Leica Biosystems либо, в качестве альтернативы, посетите веб-сайт компании Leica Biosystems: www.LeicaBiosystems.com

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.

Этот реактив содержит азид натрия. Паспорт безопасности химической продукции предоставляется по запросу или доступен на сайте www.LeicaBiosystems.com

В отношении утилизации любых потенциально опасных компонентов следуйте требованиям федеральных, региональных и местных нормативных документов.

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

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.²

В качестве положительного контроля рекомендуется использовать ткани яичек.

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.

В качестве отрицательного контроля рекомендуется использовать ткань железы простаты.

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

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

Отрицательный контроль реактива

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

Ткань, полученная у пациента

Исследуйте полученные у пациентов образцы, окрашенные NCL-L-N-Cad, в последнюю очередь. Интенсивность положительного результата окрашивания следует оценивать с учетом любого неспецифического фонового окрашивания реактива, представляющего собой отрицательный контроль. 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 IAR06 обнаружил белок N-Cadherin на мембране и в цитоплазме клеток различных тканей. Экспрессия была обнаружена в мозечке, почках, надпочечниках, поджелудочной железе, печени, желудке, селезенке, яичниках, матке, яичке, вилочковой железе, паращитовидной железе, молочной железе, гипофизе, миндалине и сердце. Экспрессия также была обнаружена в невральных элементах различных нормальных тканей. (Общее число случаев = 45.)

Патологически измененные ткани

Клон IAR06 обнаружил белок N-Cadherin в 42/77 исследованных опухолях, включая 4/9 случаев опухоль молочной железы, 5/7 случаев опухоли яичников, 3/6 саркомы, 3/6 случаев рака легких (включая 2/3 случаев аденокарциномы, 1/2 случаев плоскоклеточной карциномы), 0/1 случая бронхоальвеолярной карциномы, 4/4 случаев мезотелиомы, 4/4 случаев нейроэндокринной опухоли, 2/4 случаев опухоли почек, 3/3 случаев опухоли надпочечников, 2/3 случаев эндометриальной опухоли, 2/3 случаев меланомы, 2/3 случаев опухоли печени, 1/3 случаев опухоли зародышевых клеток, 2/2 случаев астроцитомы, 2/2 случаев карциномы щитовидной железы, 1/2 случаев опухоли поджелудочной железы, 1/1 случая карциномы вилочковой железы и 1/1 случая невральной опухоли. Окрашивание не было обнаружено в опухоли мочевого пузыря (0/3),

плоскоклеточной карциноме (0/3), карциномах простаты/ДГП (0/3), карциномах желудка (0/2), опухолях кожи (0/1), лимфомах (0/1) и карциномах толстого кишечника (0/1).

NCL-L-N-Cad рекомендуется использовать для обнаружения молекул N-Cadherin 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.⁴

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

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

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

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. Nadjji 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. Genes and Development. 2006; 20:3199–3214.

Дополнения к предыдущему выпуску

Состав реактивов, Суммарная концентрация белка, Рекомендации по использованию, Предупреждения и меры предосторожности.

Дата выпуска

07 Ноябрь 2018

Płynne mysie przeciwciało monoklonalne Novocastra™

N-Cadherin

Kod produktu: NCL-L-N-Cad

Przeznaczenie

Do diagnostyki *in vitro*.

Produkt NCL-L-N-Cad jest przeznaczony do jakościowej identyfikacji za pomocą mikroskopii świetlnej cząsteczek N-kadheryny w skrawkach parafinowych. Kliniczną interpretację barwienia lub jego braku należy uzupełnić badaniami morfologicznymi oraz odpowiednimi kontrolami. Ocenę powinien przeprowadzić wykwalifikowany patolog w kontekście historii choroby pacjenta oraz innych badań diagnostycznych.

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

IAR06.

Immunogen

Prokariotyczne białko rekombinowane odpowiadające 160 aminokwasom C-końca ludzkiej cząsteczki N-kadheryny.

Swoistość

Ludzka N-kadheryna

Skład odczynnika

NCL-L-N-Cad jest płynnym supernatantem hodowli tkankowej konserwowanym azydkiem sodu.

Klasa Ig

IgG2b.

Całkowite stężenia białka Total Protein

Całkowite stężenie białka w danej serii podano na etykiecie fiolki.

Stężenie przeciwciał

Większe lub równe 95 mg/L oznaczone za pomocą testu ELISA. Stężenie Ig w danej serii podano na etykiecie fiolki.

Zalecenia dotyczące stosowania

Badanie immunohistochemiczne skrawków zatopionych w parafinie.

Ciepłe odmaskowywanie epitopu (HIER): Należy postępować zgodnie z instrukcją stosowania załączoną do roztworu Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Sugerowane rozcieńczenie: 1:100 przez 30 minut w temperaturze 25 °C. Te informacje stanowią jedynie wskazówkę – użytkownicy powinni sami określić swoje optymalne rozcieńczenie robocze.

Wizualizacja: Należy postępować zgodnie z instrukcją stosowania dołączoną do Novolink™ Polymer Detection Systems. W sprawie dodatkowych informacji o produkcie lub w celu uzyskania pomocy należy kontaktować się z lokalnym dystrybutorem lub z regionalnym biurem firmy Leica Biosystems lub odwiedzić stronę firmy Leica Biosystems www.LeicaBiosystems.com.

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.

Ten odczynnik zawiera azydki sodu. Karta charakterystyki jest dostępna na żądanie lub dostępna na stronie www.LeicaBiosystems.com. Wszelkie potencjalnie toksyczne składniki należy utylizować zgodnie z krajowymi lub lokalnymi przepisami.

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

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

Zastosowanie okresów inkubacji i temperatur innych niż 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 wewnętrznych.

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

Tkankowa kontrola pozytywna

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

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

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

Tkankowa kontrola pozytywna powinna obejmować jądra.

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 antygenu przez przeciwciała pierwszorzędowe.

Tkankowa kontrola negatywna powinna obejmować gruczoły prostaty.

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

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

Negatywna kontrola odczynnika

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

Tkanka pacjenta

Próbki pacjenta wybarwione testem NCL-L-N-Cad należy badać jako ostatnie. Intensywność barwienia pozytywnego należy oceniać w kontekście ewentualnego barwienia niespecyficznego tła w 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 wykorzystywać panel przeciwciał.

Oczekiwane wyniki

Tkanki prawidłowe

Klon IAR06 wykrył białko N-kadheryny, którego ekspresja występuje na błonie oraz w cytoplazmie komórek w różnych tkankach. Ekspresję wykryto w mózdzku, nerce, nadnerczu, trzustce, wątrobie, żołądku, śledzionie, jajniku, macicy, jądrach, grasicy, przytarczycy, piersi, przysadce, migdałkach i sercu. Ekspresję wykryto również w elementach nerwowych w prawidłowych tkankach. (Łączna liczba przypadków = 45).

Tkanki nieprawidłowe

Klon IAR06 wykrył białko N-kadheryny w ocenianych 42/77 guzach, w tym 4/9 guzach sutka, 5/7 guzach jajnika, 3/6 mięsach, 3/6 rakach płuc (w tym 2/3 gruczolakorakach, 1/2 raku płaskonabłonkowym, 0/1, rakach oskrzelowo-pęcherzykowych), 4/4 międzybłoniakach, 4/4 guzach neuroendokrynnych, 2/4 guzach nerek, 3/3 guzach nadnerczy, 2/3 guzach endometrium, 2/3 czerniakach, 2/3 guzach wątroby, 1/3 guzie zarodkowym, 2/2 gwiaździakach, 2/2 guzach tarczycy, 1/2 guzie trzustki, 1/1 raku grasicy i 1/1 guzie neuronalnym. Nie stwierdzono barwienia w guzach pęcherza moczowego (0/3), raku płaskonabłonkowym (0/3), raku/przerście gruczolowego krokowego (0/3), raku żołądka (0/2), nowotworach skóry (0/1), chłoniakach (0/1) i rakach jelita grubego (0/1).

Zaleca się stosowanie NCL-L-N-Cad do wykrywania N-kadheryny w tkankach prawidłowych i nowotworowych.

Ograniczenia ogólne

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

Barwienie tkanek zależy od postępowania z tkanką i jej przetwarzania przed barwieniem. Nieprawidłowe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, podgrzewanie, ścinanie skrawków lub skażenie innymi tkankami lub płynami może powodować artefakty, zatrzymywanie przeciwciał lub wyniki fałszywie negatywne. Niespójne wyniki mogą wynikać z różnic w metodach utrwalania i zatapiań lub nieprawidłowości związanej z tkanką.⁴ 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. Oceny 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. *Genes and Development*. 2006; 20:3199–3214.

Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Skład odczynnika, Całkowite stężenie białka, Zalecenia dotyczące stosowania, Ostrzeżenia i środki ostrożności.

Data publikacji

07 listopada 2018

Tekoče mišje monoklonsko protitelo Novocastra™

N-Cadherin

Koda izdelka: NCL-L-N-Cad

Predvidena uporaba

Za *diagnostično uporabo in vitro*.

Izdelek NCL-L-N-Cad je namenjen za kvalitativno identifikacijo molekul N-kaderina v parafinskih rezinah s pomočjo svetlobne mikroskopije. Klinično razlago obarvanja ali odsotnosti le-tega morajo dopoljevati morfološke študije ustreznih kontrolnih vzorcev, ki jih v okviru klinične anamneze bolnika in drugih diagnostičnih testov oceni usposobljen patolog.

Načelo postopka

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

Klon

IAR06

Imunogen

Prokariontski rekombinantni protein, ki ustreza 160 aminokislaminam C-terminalne domene molekule humanega N-kaderina.

Specifičnost

Človeški N-kaderin.

Sestava reagenta

NCL-L-N-Cad je tekočinski supernatant kulture tkiva in vsebuje natrijev azid kot konzervans.

Razred Ig

IgG2b

Skupna koncentracija beljakovin Total Protein

Skupna koncentracija beljakovin v določeni seriji je navedena na oznaki na viali.

Koncentracija protiteles

Višja ali enaka 95 mg/l, določena s testom ELISA. Glejte oznako na viali za koncentracijo Ig določene serije.

Priporočila za uporabo

Imunohistokemija parafinskih rezin.

Toplotno pridobivanje epitopa (HIER): Upošteвайте navodila za uporabo raztopine za pridobivanje epitopov Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Predlagano redčenje: 1:100 za 30 minut pri 25 °C. To so samo smernice; uporabniki naj poiščejo svoje lastne najbolj učinkovite delovne razredčine.

Vizualizacija: Upošteвайте navodila za uporabo sistemov za zaznavanje polimerov Novolink™ Polymer Detection Systems. Za več podatkov o izdelku ali podporo se obrnite na svojega lokalnega distributerja ali regionalno pisarno podjetja Leica Biosystems, lahko pa tudi obiščete spletno mesto podjetja Leica Biosystems na www.LeicaBiosystems.com.

Shranjevanje in stabilnost

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

Priprava vzorcev

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

Opozorila in previdnostni ukrepi

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

Ta reagent vsebuje natrijev azid. Varnostni list je na voljo na zahtevo ali na naslovu www.LeicaBiosystems.com. Upošteвайте zvezne, državne ali lokalne predpise za odstranjevanje vseh morebitnih strupenih sestavin.

Z vzorci, pred fiksiranjem in po njem, in vsemi materiali, s katerimi so prišli v stik, morate rokovati, kot da bi lahko prenašali okužbe, in pri njihovem odstranjevanju slediti ustreznim previdnostnim ukrepom.¹ Nikoli ne pipetirajte reagentov z usti; 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 razkroja reagenta je bolj primerno uporabiti tkivo s šibkim pozitivnim obarvanjem kot tkivo z močnim pozitivnim obarvanjem.²

Za pozitivni kontrolni vzorec tkiva priporočamo tkivo testisa.

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

Negativni kontrolni vzorci tkiva

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

Za negativni kontrolni vzorec tkiva priporočamo žleze prostate.

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

Nespecifično barvanje, če je prisotno, je običajno razpršeno. Opazite lahko tudi posamično obarvanje vezivnega tkiva v rezinah tkiv, kot posledica premočnega fiksiranja s formalinom. Za razlago rezultatov obarvanja uporabite nespremenjene celice. Obarvanje nekrotičnih ali degeneriranih celic je pogosto nespecifično.³ Lažno pozitivni rezultati se lahko pojavijo zaradi 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 imunske reaktivnosti, lahko barvate dodatna tkiva bolnika izključno ali s kromogenim substratom ali encimskimi kompleksi (avidin-biotin, streptavidin, označeni polimer) in kromogenim substratom. Če pride do specifičnega obarvanja negativnih kontrolnih vzorcev tkiva, morate rezultate vzorcev bolnika zavreči kot neveljavne.

Negativni kontrolni reagent

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

Bolnikovo tkivo

Nazadnje preglejte bolnikove vzorce, obarvane z izdelkom NCL-L-N-Cad. 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 IAR06 je zaznal protein N-kaderin, izražen na membrani in v citoplazmi celic različnih tkiv. Izražanje so opazili v malih možganih, ledvicah, nadledvični žlezi, trebušni slinavki, jetrih, želodcu, vranici, jajčniku, maternici, testisih, priželjcu, obščitnici, dojkah, hipofizi, tonzili in srcu. Izražanje so opazili tudi pri živih vrste normalnih tkiv. (Skupno število primerov = 45).

Neormalna tkiva

Klon IAR06 je zaznal protein N-kaderin pri 42/77 ocenjenih tumorjev, vključno s 4/9 tumorjev dojk, 5/7 tumorjev jajčnikov, 3/6 sarkomov, 3/6 pljučnih rakov (vključno z 2/3 adenokarcinomov, 1/2 ploščatoceličnih karcinomov, 0/1 bronhioalveolarnega karcinoma), 4/4 mezoteliomov, 4/4 nevroendokrinih tumorjev, 2/4 ledvičnih tumorjev, 3/3 tumorjev nadledvične žleze, 2/3 endometrijskih tumorjev, 2/3 melanomov, 2/3 jetrnih tumorjev, 1/3 tumorjev zarodnih celic, 2/2 astrocitomov, 2/2 karcinomov ščitnice, 1/2 tumorjev trebušne slinavke, 1/1 karcinoma priželjca in 1/1 nevralnega tumorja. Obarvanja niso opazili pri tumorjih sečnega mehurja (0/3), ploščatoceličnih karcinomih (0/3), karcinomih prostate/BPH (0/3), želodčnih karcinomih (0/2), kožnih tumorjih (0/1), limfomih (0/1) in karcinomu kolona (0/1).

Izdelek NCL-L-N-Cad se priporoča za zaznavanje N-kaderina v normalnih in neoplastičnih tkivih.

Spošne 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.⁴ Prekomerno ali nepopolno nasprotno barvanje lahko neugodno vpliva na pravilno tolmačenje rezultatov.

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

Spošna 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. *Genes and Development*. 2006; 20:3199–3214.

Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji

Sestava reagentov, Skupna koncentracija beljakovin, Priporočila za uporabo, Opozorila in previdnostni ukrepi.

Datum izdaje

07 november 2018

Novocastra™ Tekutá myší monoklonální protilátka N-Cadherin

Kód výrobku: NCL-L-N-Cad

Zamýšlené použití

Pro diagnostické použití in vitro.

NCL-L-N-Cad je určen ke kvalitativnímu stanovení molekul N-kadherinu světelnou mikroskopií na parafinových řezech. Klinickou interpretaci jakéhokoliv barvení nebo jeho nepřítomnosti je nutné doplnit morfologickým vyšetřením s použitím správných kontrol a zhodnotit je musí kvalifikovaný patolog v kontextu s klinickou anamnézou pacienta a jinými diagnostickými testy.

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 světelném mikroskopu; jsou pomůckou v diferenciální diagnostice patofyziologických procesů, které mohou, ale nemusí, souviset s příslušným antigenem.

Klon

IAR06.

Imunogen

Prokaryotický rekombinantní protein odpovídající oblasti se 160 aminokyselinami na C-terminu molekuly lidského N-kadherinu.

Specifita

Lidský N-kadherin.

Složení reagentie

Produkt NCL-L-N-Cad je tekutý supernatant z tkáňové kultury obsahující jako konzervační prostředek azid sodný.

Třída Ig

IgG2b.

Koncentrace celkového proteinu Total Protein

Koncentrace celkového proteinu specifická pro šarži je uvedena na štítku na lahvičce.

Koncentrace protilátek

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

Doporučení k použití

Imunohistochemické vyšetření na parafinových řezech.

Teplem indukované odmaskování epitopu (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER): Postupujte podle pokynů k použití k roztoku Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Doporučené ředění: 1:100 po dobu 30 minut při 25 °C. Toto doporučení je uvedeno jako vodítko; uživatelé musí stanovit vlastní optimální pracovní ředění.

Vizualizace: Postupujte podle návodu k použití k systémům pro detekci polymerů Novolink™. Další informace o produktu nebo podporu si vyžádejte od místního distributora nebo regionální kanceláře společnosti Leica Biosystems, nebo alternativně navštivte web Leica Biosystems, www.LeicaBiosystems.com

Skladování a stabilita

Skladujte 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 řezu 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.

Tato reagentie obsahuje azid sodný. Bezpečnostní list materiálu je k dispozici na požádání nebo je dostupný na webu www.LeicaBiosystems.com

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

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

Minimalizujte mikrobiální kontaminaci reagentií, mohlo by dojít ke zvýšení výskytu nespecifického barvení.

Inkubační doby nebo teploty jiné než předepsané mohou vést k chybným výsledkům. Všechny takové změny musí být uživatelem validovány.

Kontrola jakosti

Rozdíly ve zpracování tkání a v technických postupech v laboratoři uživatele mohou způsobit významnou variabilitu výsledků, což vyžaduje kromě níže uvedených postupů i pravidelné provádění kontrol v laboratoři.

Kontroly musí být čerstvé pitevni/bioptické/operační vzorky co nejdříve fixované formálním, zpracované a zalité do parafinového vosku, stejným způsobem jako vzorek/vzorky pacienta.

Positivní tkáňová kontrola

Používá se k průkazu správně připravených tkání a správných barvicích technik.

V každém barvicím cyklu musí být použita jedna pozitivní tkáňová kontrola pro každý soubor testovacích podmínek.

Pro optimální kontrolu jakosti a k detekci menšího stupně degradace reagenzie je vhodnější tkáň se slabým pozitivním barvením než tkáň se silným pozitivním barvením.²

Doporučená pozitivní tkáňová kontrola je varle.

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.

Doporučená negativní tkáňová kontrola je prostatická žláza.

Alternativně často představuje místa negativní kontroly řada různých typů buněk přítomných ve většině tkáňových řezů, to ale musí uživatel validovat.

Nespecifické barvení, je-li přítomno, má obvykle difúzní vzhled. V řezech ze tkání nadměrně fixovaných formálním může být také zjištěno sporadické barvení pojivové tkáně. K interpretaci výsledků barvení použijte neporušené buňky. Nekrotické nebo degenerované buňky se často barví nespecificky.³ Falešně pozitivní výsledky mohou být důsledkem imunologické vazby proteinů nebo produktů reakčního substrátu. Mohou být také způsobeny endogenními enzymy, jako je např. pseudoperoxidáza (erythrocyty), endogenní peroxidáza (cytochrom C) nebo endogenní biotin (např. játra, prs, mozek, ledviny), podle typu použitého imunobarviva. K odlišení aktivity endogenních enzymů či nespecifické vazby enzymů od specifické imunoreaktivity mohou být barveny další tkáň pacienta vylučně chromogenním substrátem, případně enzymovými komplexy (avidin-biotin, streptavidin, značený polymer) a chromogenním substrátem. Pokud dojde v negativní tkáňové kontrole ke specifickému barvení, musí být výsledky vzorků pacienta považovány za neplatné.

Negativní reagenční kontrola

K vyhodnocení nespecifického barvení a umožnění lepší interpretace specifického barvení v místě antigenu použijte na řezu z každého vzorku pacienta nespecifickou negativní reagenční kontrolu místo primární protilátky.

Tkáň pacienta

Nakonec vyšetřete vzorky pacienta barvené pomocí NCL-L-N-Cad. Intenzita pozitivního barvení musí být zhodnocena v kontextu se vším nespecifickým barvením pozadí u negativní reagenční kontroly. Jako u každého imunohistochemického vyšetření, negativní výsledek znamená, že antigen nebyl zjištěn, nikoli, že antigen není ve vyšetřovaných buňkách/tkáňích přítomen. V případě potřeby použijte k identifikaci falešně negativních reakcí panel protilátek.

Očekávané výsledky

Normální tkáň

Klon IAR06 detekoval protein N-kadherin na membráně a v cytoplazmě buněk různých tkání. Expres byla zjištěna u mozečku, ledvin, nadledvin, pankreatu, jater, žaludku, sleziny, vaječníků, dělohy, varlat, brzlíku, příštítiných tělísek, prsu, hypofýzy, tonzily a srdce. Expres byla rovněž zjištěna u neurálních prvků u řady normálních tkání. (Celkový počet tkání = 45).

Abnormální tkáň

Klon IAR06 detekoval protein N-kadherin u 42/77 vyšetřovaných vzorků nádorů, včetně 4/9 nádorů prsu, 5/7 ovariálních nádorů, 3/6 sarkomů, 3/6 karcinomů plic (včetně 2/3 adenokarcinomů, 1/2 skvamózních karcinomů, 0/1 bronchioalveolárních karcinomů), 4/4 mezoteliomů, 4/4 neuroendokrinních nádorů, 2/4 nádorů ledvin, 3/3 nádorů nadledvin, 2/3 nádorů endometria, 2/3 melanomů, 2/3 nádorů jater, 1/3 nádorů germinálních buněk, 2/2 astrocytomů, 2/2 karcinomů štítné žlázy, 1/2 nádorů pankreatu, 1/1 karcinomu brzlíku a 1/1 neurálního nádoru. Barvení nebylo pozorováno u nádorů močového měchýře (0/3), karcinomů skvamózních buněk (0/3), karcinomu prostaty /BPH (0/3), gastrických karcinomů (0/2), nádor kůže (0/1), lymfomu (0/1) a karcinomu tlustého střeva (0/1).

NCL-L-N-Cad doporučuje použít při stanovení N-kadherinu u normálních a neoplastických tkání.

Obecná omezení

Imunohistochemické vyšetření je víceokrový 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, nebo přirozených odchylek ve tkáni.⁴ Nadměrné nebo nedostatečné kontrastní barvení může narušit správnou interpretaci výsledků.

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

Protilátky společnosti Leica Biosystems Newcastle Ltd se používají, jak bylo uvedeno, u zmrazených nebo u parafinových řezů se specifickými požadavky na fixaci. Může dojít k expresi neočekávaných antigenů, zejména u nádorů. Klinická interpretace jakéhokoliv barveného tkáňového řezu musí zahrnovat morfologickou analýzu a zhodnocení příslušných kontrol.

Literatura - všeobecná

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.

2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. *Genes and Development*. 2006; 20:3199–3214.

Opravy předchozího vydání

Složení reagentie, Koncentrace celkového proteinu, Doporučení k použití, Varování a bezpečnostní opatření.

Datum vydání

07 listopad 2018

Tekutá myšia monoklonálna protilátka Novocastra™

N-Cadherin

Kód produktu: NCL-L-N-Cad

Zamýšľané použitie

Na diagnostické použitie *in vitro*.

NCL-L-N-Cad slúži na kvalitatívnu identifikáciu molekúl N-kadherínu v parafínových rezoch pomocou svetelnej mikroskopie.

Klinická interpretácia akéhokoľvek zafarbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými vyšetreniami pri použití zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a ďalších 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

IAR06.

Imunogén

Prokaryotický rekombinantný proteín zodpovedajúci 160 aminokyselínám C-konca ľudskej molekuly N-kadherínu.

Špecificita

Ľudský N-kadherín.

Zloženie činidla

NCL-L-N-Cad je tekutý supernatant na tkanivovú kultiváciu obsahujúci azid sodný ako konzervačnú látku.

Trieda Ig

IgG2b.

Celková koncentrácia proteínov Total Protein

Celkovú koncentráciu proteínov špecifických pre šaržu nájdete na štítku fľaštičky.

Koncentrácia protilátok

Vyššia alebo rovná 95 mg/l podľa ELISA. Koncentráciu Ig špecifických pre šaržu nájdete na štítku fľaštičky.

Odporúčania na použitie

Imunohistochemia parafínových rezov.

Záchyt epitopov s tepelnou indukciou (HIER): Postupujte podľa návodu na použitie systému Novocastra Epitope Retrieval Solution pH 6.

Odporúčané riedenie: 1 : 100 po dobu 30 minút pri teplote 25 °C. Táto hodnota je orientačná, používatelia si musia stanoviť svoje vlastné optimálne pracovné riedenia.

Vizualizácia: Postupujte podľa návodu na použitie systémov Novolink™ Polymer Detection Systems. Ďalšie informácie o produkte alebo podporu vám poskytne váš miestny distribútor alebo lokálne zastúpenie spoločnosti Leica Biosystems. Takisto môžete navštíviť internetovú stránku spoločnosti Leica Biosystems: www.LeicaBiosystems.com

Uskladnenie a stabilita

Skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Nezmrazujte. Okamžite po použití vráťte do teploty 2 – 8 °C. Nepoužívajte po uplynutí dátumu expirácie uvedeného na štítku fľaštičky. Iné než vyššie uvedené podmienky skladovania si vyžadujú validáciu používateľom.

Príprava vzorky

Odporúčaný 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.

Toto činidlo obsahuje azid sodný. Materiálový bezpečnostný list je k dispozícii na požiadanie alebo na stránke www.LeicaBiosystems.com.

Likvidáciu prípadných potenciálne toxických súčastí definujú federálne, štátne alebo miestne predpisy.

So vzorkami pred fixáciou a po nej a všetkými materiálmi, ktoré s nimi prišli do kontaktu, je nutné manipulovať ako s potenciálne infekčnými a zlikvidovať ich pri dodržaní zodpovedajúcich bezpečnostných opatrení.¹ Činidlá nikdy nepipetujte ústami a zabráňte kontaktu činidiel a vzoriek s kožou a sliznicami. Ak sa činidlá alebo vzorky dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, umyte ich veľkým množstvom vody. Vyhľadajte lekársku pomoc.

Minimalizujte mikrobiálnu kontamináciu činidiel. V opačnom prípade môže dôjsť k zvýšeniu nešpecifického zafarbenia.

Nedodržanie predpísaných inkubačných 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 pitevne/bioptické/chirurgické vzorky fixované čo najskôr formálnom a spracované zatiaľ čo parafínou rovnakým spôsobom ako vzorky pacienta.

Pozitívna kontrola tkanivom

Identifikuje správne pripravené tkanivá a správne techniky zafarbenia.

Každá súprava testových podmienok v každom cykle zafarbenia musí obsahovať jednu pozitívnu kontrolu tkanivom.

Tkanivo so slabým pozitívnym farbením je pre optimálnu kontrolu kvality a na detekciu slabšej degradácie činidla vhodnejšie než tkanivo so silným pozitívnym farbením.²

Odporúčané tkanivo na pozitívnu kontrolu je semenník.

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

Negatívna kontrola tkanivom

Nutné vyšetriť po pozitívnej kontrole tkanivom s cieľom overiť špecifickú značku cieľového antigénu primárnou protilátkou.

Odporúčané tkanivo na negatívnu kontrolu je prostatická žľaza.

Ako negatívnu kontrolu je možné použiť aj rôzne typy buniek prítomné vo väčšine tkanivových rezov, takýto postup si však vyžaduje validáciu používateľom.

Prípadné nešpecifické farbenie má obvykle difúzný vzhľad. V rezoch tkanív silne fixovaných formálnom môže byť pozorované sporadické farbenie spojiva. Na interpretáciu výsledkov farbenia používajte intaktné bunky. Nekrotické alebo degenerované bunky sa často farbja nešpecificky.³ Falošne pozitívne výsledky môžu byť pozorované v dôsledku neimunologickej väzby proteínov alebo produktov reakcie substrátu. Môžu byť spôsobené aj endogénnymi enzýmami, ako napr. pseudoperoxidázou (erytrocyty), endogénnou peroxidázou (cytochróm C) alebo endogénnym biotínom (napr. peččeň, mozog, oblička) v závislosti od typu imunologického farbenia. S cieľom diferencovať endogénnu enzymatickú aktivitu alebo nešpecifickú väzbu enzýmov od špecifickej imunoreaktivity môžete nafaibriť 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-N-Cad preskúmajte ako posledné. Intenzitu pozitívneho farbenia je nutné vyhodnotiť v kontexte prípadného nešpecifického zafarbenia negatívnej kontroly činidlom na pozadí. Podobne ako pri všetkých imunohistochemických testoch znamená negatívny výsledok, že antigén nebol detegovaný. Nepotvrzuje jeho absenciu v testovaných bunkách/tkanivách. V prípade potreby identifikujte falošne negatívne reakcie pomocou panelu protilátok.

Očakávaný výsledky

Normálne tkanivá

Klon IAR06 detegoval proteín N-kadherínu exprimovaný na membráne a v cytoplazme buniek rôznych tkanív. Expressia bola detegovaná v mozoch, obličkách, nadobličkách, pankrease, pečeni, žalúdku, slezine, vaječníkoch, maternici, semenníkoch, týmuse, prísitnej žľazy, prsníku, hypofýze, tonzilách a srdci. Expressia bola detegovaná aj v nervových prvkoch v rôznych normálnych tkanivách. (Celkový počet prípadov = 45).

Abnormálne tkanivá

Klon IAR06 detegoval proteín N-kadherínu v 42/77 hodnotených nádoroch vrátane 4/9 nádorov prsníka, 5/7 nádorov vaječníkov, 3/6 sarkómov, 3/6 karcinómov pľúc (vrátane 2/3 adenokarcinómov, 1/2 skvamocelulárnych karcinómov, 0/1 bronchioalveolárneho karcinómu), 4/4 mezoteliómov, 4/4 neuroendokrinných nádorov, 2/4 nádorov obličiek, 3/3 nádorov nadobličiek, 2/3 nádorov endometria, 2/3 melanómov, 2/3 nádorov pečene, 1/3 nádorov zárodočných buniek, 2/2 karcinómov štítnej žľazy, 1/2 nádorov pankreasu, 1/1 karcinómu týmusa a 1/1 neurálneho nádoru. Žiadne zafarbenie nebolo pozorované pri nádoroch močového mechúra (0/3), skvamocelulárnych karcinómoch (0/3), karcinómoch prostaty/BPH (0/3), karcinómoch žalúdka (0/2), nádoroch kože (0/1), lymfómoch (0/1) ani karcinómoch hrubého čreva (0/1).

NCL-L-N-Cad sa odporúča na detekciu N-kadherínu 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 negatívnym výsledkom. Inkonzistentné výsledky môžu byť spôsobené zmenami metód fixácie a montáže preparátov alebo inherentnými nepravidelnosťami v tkanive.⁴

Nadmerné alebo neúplné kontrastné farbenie môže narušiť správnu interpretáciu výsledkov.

Klinická interpretácia akéhokoľvek zafarbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfológickými vyšetreniami pri použití zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a ďalších diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.

Protilátky spoločnosti Leica Biosystems Newcastle Ltd sú určené na použitie na zmrazených rezoch alebo rezoch zatiaľ čo 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. Agiostratidou G, Hult J, Phillips G, et al. Differential cadherin expression: potential markers for epithelial to mesenchymal transformation during tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2007; 12:127–133.
6. Mol A, Geldof A, Meijer G, et al. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2007; 133:687–695.
7. Halbleib J and Nelson W. Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. *Genes and Development*. 2006; 20:3199–3214.

Úpravy predchádzajúceho vydania

Zloženie činidla, Celková koncentrácia proteínu, Odporúčania na použitie, Varovania a bezpečnostné opatrenia.

Dátum vydania

07 november 2018

Leica Biosystems Newcastle Ltd
Balliol Business Park West
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