Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Delta-Sarcoglycan

Product Code: NCL-d-SARC

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
Á 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.

Gebruiksinstructies
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.

Instrucțiuni de utilizare
Citiți aceste instrucțiuni 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.

www.LeicaBiosystems.com **Rx Only**

Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody Delta-Sarcoglycan

Product Code: NCL-d-SARC

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

NCL-d-SARC is intended for the qualitative identification by light microscopy of Delta-Sarcoglycan by immunohistochemistry. 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

δSarc3/12C1

Immunogen

Synthetic peptide containing amino acids 1-19 at the N-terminus of the human delta-sarcoglycan sequence (Jung D. et al.,1966).

Specificity

Human delta-sarcoglycan (35 kD). Does not react with delta-sarcoglycan in sections of mouse, rat, rabbit, dog, chicken, hamster or pig muscle. Other animal species not tested.

Reagent Composition

NCL-d-SARC is a lyophilized tissue culture supernatant containing sodium azide as a preservative. The user is required to reconstitute the contents of the vial with the correct volume of sterile distilled water as indicated on the vial label.

Ig class

IgG2a

Total Protein Concentration Total Protein

Refer to vial label for lot specific total protein concentration.

Antibody Concentration

Greater than or equal to 24 mg/L. Refer to vial label for batch specific Ig concentration.

Recommendations On Use

Immunohistochemistry (see **Methodology**) on frozen sections. Suggested dilution: 1:25–1:50 for 60 minutes at 25 °C. This is provided as a guide and users should determine their own optimal working dilutions.

Storage and Stability

Store unopened antibody at 2–8 °C. Under these conditions, there is no significant loss in product performance up to the expiry date indicated on the vial label. Do not use after expiration date indicated on the vial label. The reconstituted antibody is stable for at least two months when stored at 2–8 °C. For long term storage, it is recommended that aliquots of the reconstituted antibody are stored frozen at -20 °C (frost-free freezers are not recommended). Repeated freezing and thawing must be avoided. Prepare working dilutions on the day of use. Return to 2–8 °C immediately after use. Storage conditions other than those specified above must be verified by the user.

Specimen Preparation

Freeze specimen tissue blocks in isopentane chilled in liquid nitrogen (see Warnings and Precautions). The specimens do not require further fixation but should be embedded in OCT™ compound (Sakura, Product No. Tissue-Tek 4583).

Warnings and Precautions

Novocastra Lyophilised Antibodies

Contains a mixture of: Sodium Azide (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).

Signal words: Danger.

H302: Harmful if swallowed.
H317: May cause an allergic skin reaction.
H334: May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.
H411: Toxic to aquatic life with long lasting effects.
EUH032: Contact with acids liberates very toxic gas.

P261: Avoid breathing dust/fumes/gas/mist/vapours/spray.
P264: Wash hands thoroughly after handling.
P270: Do not eat, drink or smoke when using this product.
P272: Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.
P273: Avoid release to the environment.
P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/ face protection.
P284: In case of inadequate ventilation wear respiratory protection.
P301+312: IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER/doctor/ if you feel unwell.
P302+352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P304+340: IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing.
P330: Rinse mouth.
P333+313: If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P342+311: If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTER/doctor.
P362+364: Take off contaminated clothing and wash it before reuse.
P391: Collect spillage.
P501: Dispose of contents/container to hazardous or special waste collection point.

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.[1] 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.

Liquid nitrogen due to its excessively cold temperature causes burns and protective clothing, including gloves and visor, should be used when handling. Use in a well ventilated area.

Isopentane is highly flammable and harmful by ingestion and inhalation. It is also irritating to skin and eyes, and is a narcotic in high concentration.

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures.
Controls should be fresh autopsy/biopsy/surgical specimens frozen 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 skeletal muscle.
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 has not been determined.
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-d-SARC 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 dSarc3/12C1 detects the delta-sarcoglycan protein in the sarcolemma of skeletal, cardiac and smooth muscle fibers.

Abnormal Tissues

Clone dSarc3/12C1 has been used in immunohistochemical studies of more than 850 patients to identify a deficiency of the 35 kD dystrophin-associated glycoprotein, delta-sarcoglycan.

NCL-d-SARC is recommended for the identification of human Delta-Sarcoglycan by immunohistochemistry.

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 artefacts, 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Amendments to Previous Issue

Not Applicable.

Date of Issue

19 October 2018

Immunohistochemistry methodology for using Novocastra™ antibodies on frozen muscle tissue.

Reagents required but not supplied

1. Standard solvents used in immunohistochemistry.
2. 50 mM Tris-buffered saline (TBS) pH 7.6.
3. Antibody diluent - normal serum optimally diluted in TBS.
4. Normal serum from the species in which the secondary antibody is raised.
5. Secondary peroxidase-conjugated antibody - use as recommended by manufacturer.
6. 3,3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) - prepare and use as recommended by manufacturer.
7. Mounting medium - use as recommended by manufacturer.

Equipment required but not supplied

1. Incubator set to 25 °C.
2. General immunohistochemistry laboratory equipment.
3. Electric fan for air drying slides.

Antigen retrieval solutions (see Recommendations on Use)

Not applicable to frozen sections.

Methodology

Prior to undertaking this methodology, users must be trained in immunohistochemical techniques.
Users should determine optimal dilutions for antibodies. Unless indicated, all steps are performed at 25 °C.

1. Cut and mount 4–10 µm sections on slides coated with a suitable tissue adhesive and air dry for at least one hour.
2. Incubate sections with optimally diluted primary antibody (see Recommendations on Use).
3. Wash in TBS buffer for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
4. Incubate sections in appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody.
5. Wash in TBS buffer for 2 x 5 minutes with gentle rocking.
6. Incubate the slides in DAB.
7. Rinse the slides in clean water.
8. Dehydrate, clear and mount sections.

Amendments to Previous Issue

Not applicable.

Date of Issue

4 February 2008 (CEprotocol/Frozen Muscle).

Novocastra™ Anticorps Monoclonal Lyophilisé de Souris Delta-Sarcoglycan Référence du Produit: NCL-d-SARC

Utilisation Prévue

Diagnostic in vitro.

Le NCL-d-SARC est destiné à l'identification qualitative par microscopie optique du delta-sarcoglycane par immunohistochimie. 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

δSarc3/12C1

Immunogène

Peptide synthétique contenant les acides aminés 1 à 19 de l'extrémité N-terminale de la séquence delta-sarcoglycane humaine (Jung D. et al.,1966).

Spécificité

Delta-sarcoglycane humaine (35 kD). Il ne réagit pas avec la delta-sarcoglycane dans des coupes de muscles de souris, de rat, de lapin, de chien, de poulet, de hamster ou de porc. Les autres espèces animales n'ont pas été testées.

Composition du Réactif

Le NCL-d-SARC est un surnageant de culture tissulaire lyophilisé contenant une solution d'azide de sodium comme conservateur. L'utilisateur doit reconstituer le contenu du flacon avec un volume correct d'eau distillée stérile comme indiqué sur l'étiquette du flacon.

Classe d'Ig

IgG2a

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 24 mg/L. La concentration totale en Ig, spécifique du lot, figure sur l'étiquette du flacon.

Recommandations d'utilisation

Immunohistochimie (voir **Méthodologie**) sur des coupes congelées. Dilution préconisée : 1:25–1:50 pendant 60 minutes à 25 °C. Ceci n'est donné qu'à titre indicatif et les utilisateurs doivent déterminer leurs propres dilutions de travail optimales.

Conservation et Stabilité

Conserver l'anticorps non ouvert à 2–8 °C. Dans ces conditions il n'y a pas de perte de performance significative du produit jusqu'à la date de péremption qui figure sur l'étiquette du flacon. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du récipient. L'anticorps reconstitué est stable pendant au moins deux mois s'il a été conservé à 2–8 °C. Pour une conservation à long terme, il est recommandé de congeler les aliquotes d'anticorps à -20 °C (l'utilisation de congélateurs à dégivrage automatique n'est pas conseillée). Ne pas congeler et décongeler de façon répétée. Préparer les dilutions de travail le jour même de leur utilisation. Remettre immédiatement à 2–8 °C après utilisation. 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

Congeler les blocs tissulaires dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide (voir Mises en garde et précautions). Les spécimensne nécessitent pas d'autre fixation mais doivent être inclus dans le composé OCT™ (Sakura, réf. produit Tissue-Tek 4583).

Mises en Garde et Précautions

Novocastra Lyophilised Antibodies

Il contient un mélange de: Azoture De Sodium (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%). Mentions d'avertissement: Danger.

H302: Nocif en cas d'ingestion.
H317: Peut provoquer une allergie cutanée.
H334: Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation.
H411: Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
EUH032: Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.

P261: Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P264: Se laver les mains soigneusement après manipulation.
P270: Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit.
P272: Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.
P273: Éviter le rejet dans l'environnement.
P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P284: [Lorsque la ventilation du local est insuffisante] porter un équipement de protection respiratoire.
P301+312: EN CAS D'INGESTION: Appeler un CENTRE ANTIPOISON/un médecin en cas de malaise.
P302+352: EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
P304+340: EN CAS D'INHALATION: transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer.
P330: Rincer la bouche.
P333+313: En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.
P342+311: En cas de symptômes respiratoires: Appeler un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.
P362+364: Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.
P391: Recueillir le produit répandu.
P501: Éliminer le contenu/récipient dans un centre de collecte des déchets dangereux ou spéciaux.

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 appropriées.[1] 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.

Du fait de sa température extrêmement basse, l'azote liquide est susceptible de provoquer des brûlures et un vêtement de protection, comportant des gants et une visière, doit être utilisé lors de sa manipulation. Utiliser dans une zone bien ventilée.

L'isopentane est hautement inflammable et nocif en cas d'ingestion ou d'inhalation. Il est également irritant pour la peau et les yeux, et narcotique à haute concentration.

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, congelés 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 les muscles squelettiques.

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 tissu de contrôle négatif recommandé n'a pas été évalué.

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-d-SARC 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 dSarc3/12C1 détecte la protéine delta-sarcoglycane dans le sarcolemme des fibres des muscles squelettiques, lisses et cardiaques.

Tissus tumoraux

Le clone dSarc3/12C1 a été utilisé lors d'études immunohistochimiques chez plus de 850 patients en vue d'identifier une déficience de la glycoprotéine de 35 kD associée à la dystrophine, la delta-sarcoglycane.

Le NCL-d-SARC est recommandé pour l'identification du delta-sarcoglycane humain par immunohistochimie.

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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.

12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Amendements Apportés à la Version Précédente

Non applicable.

Date de Publication

19 octobre 2018

Méthodologie immunohistochimique pour l'utilisation des anticorps Novocastra™ sur des tissus musculaires congelés.

Réactifs nécessaires mais non fournis

1. Solvants standard utilisés en immunohistochimie.
2. Tampon Tris (TBS) 50 mM, pH 7,6.
3. Diluant anticorps – sérum normal dilué de façon optimale dans du TBS.
4. Sérums normaux provenant de diverses espèces chez lesquelles l'anticorps secondaire est cultivé.
5. Anticorps secondaire conjugué à la peroxydase - utiliser selon les recommandations du fabricant.
6. Tétrachlorhydrate de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) - utiliser selon les recommandations du fabricant.
7. Milieu de montage - utiliser selon les recommandations du fabricant.

Équipements nécessaires mais non fournis

1. Incubateur réglé à 25 °C.
2. Équipements généraux de laboratoire d'immunohistochimie.
3. Ventilateur électrique pour sécher les lames à l'air.

Solutions de restauration des antigènes (voir Recommandations d'utilisation)

Non applicables sur des coupes congelées.

Méthodologie

Avant d'utiliser cette méthodologie, les utilisateurs doivent avoir été formés aux techniques immunohistochimiques.
Les utilisateurs doivent déterminer les dilutions optimales des anticorps. Sauf mention contraire, toutes les étapes sont réalisées à 25 °C.

1. Découper et monter des coupes de 4 à 10 µm sur des lames revêtues d'un adhésif adapté au tissu et laisser sécher à l'air pendant une heure.
2. Incuber les coupes avec l'anticorps primaire dilué de façon optimale (**voir Recommandations d'utilisation**).
3. Laver dans du tampon TBS pendant 2 fois pendant 5 minutes sous agitation légère.
4. Incuber les coupes dans l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase approprié.
5. Laver dans du tampon TBS pendant 2 fois pendant 5 minutes sous agitation légère.
6. Incuber les lames dans le DAB.
7. Rincer les lames à l'eau propre.
8. Déshydrater, assécher et monter les coupes.

Amendements apportés à la version précédente

Non applicable.

Date de publication

5 février 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).

Novocastra™ Anticorpo Monoclonale Murino Liofilizzato Delta-Sarcoglycan Codice Del Prodotto: NCL-d-SARC

Uso Previsto

Per uso diagnostico in vitro.

NCL-d-SARC è destinato all'identificazione qualitativa in microscopia ottica del delta-sarcoglicano mediante immunoistochimica. 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 immunoistochimica (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

δSarc3/12C1

Immunogeno

Peptide sintetico contenente gli aminoacidi 1-19 N-terminali della sequenza del delta-sarcoglicano umano (Jung D. et al.,1966).

Specificità

Delta-sarcoglicano umano (35 kD). Non reagisce con il delta-sarcoglicano nelle sezioni muscolari di topo, ratto, coniglio, cane, pollo, criceto e maiale. Non sono state valutate altre specie animali.

Composizione Del Reagente

NCL-d-SARC è un supernatante liofilizzato di coltura tissutale, contenente di sodio azide come conservante. L'utente deve ricostituire il contenuto del flacone con il volume appropriato di acqua distillata sterile, come indicato sull'etichetta del flacone stesso.

Classe Ig

IgG2a

Concentrazione Proteica Totale Total Protein

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

Concentrazione Anticorpale

Superiore o uguale a 24 mg/L. Consultare l'etichetta del flacone per la concentrazione di Ig specifica del lotto.

Raccomandazioni Per L'uso

Immunoistochimica (vedere **Metodologia**) sulle sezioni in paraffina. Diluizione raccomandata: 1:25–1:50 per 60 minuti a 25 °C. Queste raccomandazioni costituiscono delle semplici linee guida; spetta al singolo utente stabilire la diluizione di lavoro ottimale.

Conservazione E Stabilità

Conservare l'anticorpo, nella confezione ancora integra, a 2–8 °C. In queste condizioni, il prodotto non subisce perdite significative di prestazione fino alla data di scadenza, indicata sull'etichetta del flacone. Non usare dopo la data di scadenza, indicata sull'etichetta del flacone. L'anticorpo ricostituito rimane stabile per almeno due mesi, se conservato a 2–8 °C. Per la conservazione a lungo termine, si raccomanda di congelare aliquote dell'anticorpo a -20 °C (non si raccomanda l'uso di congelatori frost-free, cioè senza brina). Evitare di congelare e scongelare ripetutamente. Preparare le diluizioni di lavoro il giorno stesso dell'utilizzazione. Immediatamente dopo l'uso, raffreddare di nuovo a 2–8 °C. Condizioni di conservazione diverse da quelle sopra specificate vanno verificate dall'utente.

Preparazione Del Campione Biologico

Congelare i blocchetti di tessuto campione in isopentano raffreddato dall'azoto liquido (vedere "Avvertenze e precauzioni"). I campioni biologici non richiedono l'ulteriore fissazione, ma vanno inclusi in OCT™ compound (Sakura, codice del prodotto Tissue-Tek 4583).

Avvertenze E Precauzioni

Novocastra Lyophilised Antibodies

Contiene una miscela di: Azoturo Di Sodio (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%). Avvertenze: Pericolo.

H302: Nocivo se ingerito.
H317: Può provocare una reazione allergica cutanea.
H334: Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.
H411: Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici.

P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P264: Lavare accuratamente mani dopo l'uso.
P270: Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso.
P272: Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.
P273: Non disperdere nell'ambiente.
P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.
P284: [Quando la ventilazione del locale è insufficiente] indossare un apparecchio diprotezione respiratoria.
P301+312: IN CASO DI INGESTIONE: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico in caso di malessere.
P302+352: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.
P304+340: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.
P330: Sciacquare la bocca.
P333+313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P342+311: In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.
P362+364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.
P391: Raccogliere il materiale fuoriuscito.
P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un punto di raccolta rifiuti pericolosi o speciali.

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.[1] 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.

A causa della sua temperatura estremamente bassa, l'azoto liquido può provocare ustioni da freddo; si raccomanda l'uso di indumenti protettivi (es. guanti, visiera). Operare in ambiente ben ventilato.

L'isopentano è facilmente infiammabile e nocivo per ingestione e per inalazione. Inoltre, è irritante per la pelle e per gli occhi e, ad alte concentrazioni, è un narcotico.

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 sui campioni biologici autoptici/bioptici/chirurgici devono essere congelati il più rapidamente possibile, 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 il muscolo scheletrico.

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 non è stato valutato.

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

La colorazione aspecifica, se presente, assume di solito aspetto diffuso. La colorazione sporadica del tessuto connettivo può anche manifestarsi in seguito ad iperfissazione di sezioni di tessuto in formalina. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, usare cellule intatte. Le cellule necrotiche o degenerate si colorano spesso in maniera aspecifica.[3] Si possono osservare risultati falsamente positivi, dovuti a legame non immunologico delle proteine o a prodotti di reazione del substrato. Tali falsi positivi possono essere anche causati da enzimi endogeni quali la pseudoperossidasi (eritrociti), la perossidasi endogena (citocromo C) o la biotina endogena (es. fegato, mammella, cervello, rene), a seconda del tipo di immunocolorazione usato. Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame enzimatico aspecifico dall'immunoreattività specifica, possono essere colorati ulteriori tessuti del paziente esclusivamente con substrato cromogeno o con complessi enzimatici (avidina-biotina, streptavidina, polimero marcato) e substrato cromogeno. Se nel controllo negativo del tessuto compare una colorazione specifica, i risultati sui campioni biologici ottenuti dal paziente devono essere considerati non validi.

Controllo Negativo Del Reagente

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

Tessuto Del Paziente

Successivamente, esaminare i campioni biologici del paziente colorati con NCL-d-SARC. 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 immunoistochimici, 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 dSarc3/12C1 mette in evidenza la proteina delta-sarcoglicano nel sarcolemma delle fibre muscolari scheletriche, cardiache e lisce.

Tessuti tumorali

Il clone dSarc3/12C1 è stato impiegato in studi di immunoistochimica condotti su oltre 850 pazienti, per mettere in evidenza il deficit della glicoproteina da 35 kD associata alla distrofina, il delta-sarcoglicano.

L'uso di NCL-d-SARC è consigliato per l'identificazione del delta-sarcoglicano umano mediante immunoistochimica.

Limitazioni Generali

L'immunoistochimica 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.

11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Modifiche Alla Pubblicazione Precedente

Non applicabile.

Data Di Pubblicazione

19 ottobre 2018

Metodologia immunoistochimica per l'uso di anticorpi Novocastra™ su tessuto muscolare congelato.

Reagenti necessari ma non forniti

1. Solventi standard utilizzati in immunoistochimica.
2. Tampone Tris salino (TBS) 50 mM a pH 7,6.
3. Diluente anticorpale - siero normale diluito in maniera ottimale in TBS.
4. Sieri normali delle specie da cui si è ottenuto l'anticorpo secondario.
5. Anticorpo secondario coniugato con perossidasi - usare secondo le raccomandazioni del produttore.
6. 3,3' diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB) - preparare ed usare secondo le raccomandazioni del produttore.
7. Mezzo di montaggio - usare secondo le raccomandazioni del produttore.

Attrezzature necessarie ma non fornite

1. Set incubatore a 25 °C.
2. Attrezzature di base del laboratorio di immunoistochimica.
3. Ventilatore elettrico per asciugare i vetrini.

Soluzioni per smascheramento antigenico (vedere Raccomandazioni per l'uso)

Non si applica alle sezioni congelate.

Metodologia

Prima di intraprendere questa metodologia, l'utente deve acquisire esperienza con le tecniche immunoistochimiche. Gli utenti devono determinare le diluizioni ottimali degli anticorpi. Se non indicato diversamente, tutte le fasi vanno condotte alla temperatura di 25 °C.

1. Tagliare e montare sezioni dallo spessore di 4–10 µm su vetrini ricoperti con un adatto adesivo tissutale e lasciar asciugare all'aria per circa un'ora.
2. Incubare le sezioni con anticorpo primario diluito in maniera ottimale (vedere Raccomandazioni per l'uso).
3. Lavare 2 volte in tampone TBS per 5 minuti, scotendo delicatamente.
4. Incubare le sezioni con un appropriato anticorpo secondario coniugato con perossidasi.
5. Lavare 2 volte in tampone TBS per 5 minuti, scotendo delicatamente.
6. Incubare i vetrini in DAB.
7. Sciacquare i vetrini in acqua pulita.
8. Disidratare, pulire e montare le sezioni.

Modifiche alla pubblicazione precedente

Non applicabile.

Data di pubblicazione

5 Febbraio 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).

Novocastra™ Lyophilisierter Monoklonaler Maus-Antikörper Delta-Sarcoglycan Produkt-Nr.: NCL-d-SARC

Verwendungszweck

Für in-vitro-Diagnostik.

NCL-d-SARC ist für den qualitativen Nachweis von Delta-Sarkoglykan mittels Lichtmikroskopie und Immunhistochemie vorgesehen. 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 Waschschritte. 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

δSarc3/12C1

Immunogen

Synthetisches Peptid, das die Aminosäuren 1-19 am N-Terminus der humanen delta-Sarkoglykan-Sequenz enthält (Jung D. et al.,1966).

Spezifität

Humanes delta-Sarkoglykan (35 kDa). Es zeigt keine Reaktion mit delta-Sarkoglykan in Schnitten aus Muskelgewebe von Maus, Ratte, Kaninchen, Hund, Huhn, Hamster und Schwein. Andere Tierarten wurden nicht untersucht.

Reagenzzusammensetzung

NCL-d-SARC ist ein lyophilisierter Gewebekulturüberstand, der Natriumazid als Konservierungsmittel enthält. Der Benutzer muss den Inhalt des Fläschchens mit dem korrekten Volumen sterilen, destillierten Wassers entsprechend den Angaben auf dem Produktetikett rekonstituieren.

Ig-Klasse

IgG2a

Gesamtproteinkonzentration Total Protein

Siehe Angaben auf dem Produktetikett bezüglich der chargenspezifischen Gesamtproteinkonzentration.

Antikörperkonzentration

Größer als oder gleich 24 mg/L. Hinsichtlich der chargenspezifischen Ig-Konzentration siehe Angaben auf dem Produktetikett.

Gebrauchsempfehlungen

Immunhistochemie (siehe **Vorgehensweise**) auf gefrorenen Schnitten. Empfohlene Verdünnung: 1:25–1:50 über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 25 °C. Dies ist nur eine Empfehlung, und die Benutzer sollten ihre eigenen optimalen Arbeitsverdünnungen bestimmen.

Lagerung und Stabilität

Ungeöffneten Antikörper bei 2–8 °C lagern. Unter diesen Bedingungen kommt es bis zum Ablauf des auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatums zu keiner bedeutenden Verschlechterung der Produktleistung. Nach Ablauf des Verfallsdatums (auf dem Behälteretikett) darf das Produkt nicht mehr verwendet werden. Der rekonstituierte Antikörper bleibt bei einer Lagertemperatur von 2–8 °C mindestens zwei Monate lang stabil. Für eine langfristige Lagerung wird empfohlen, Aliquoten des rekonstituierten Antikörpers bei -20 °C einzufrieren (frostfreie Gefrierschränke werden nicht empfohlen). Wiederholtes Einfrieren und Auftauen muss vermieden werden. Die Arbeitsverdünnungen müssen am Tag ihrer Verwendung angesetzt werden. Nach Gebrauch sofort wieder bei 2–8 °C lagern. Lagerbedingungen, die von den oben genannten Bedingungen abweichen, müssen vom Benutzer verifiziert werden.

Probenvorbereitung

Die Blöcke mit den Gewebeproben müssen in Isopentan, das in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, eingefroren werden (siehe Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen). Die Proben erfordern keine weitere Fixierung, sollten jedoch in OCT™-Compound (Sakura, Produkt-Nr. Tissue-Tek 4583) eingebettet werden.

Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

Novocastra Lyophilised Antibodies

Eine Mischung aus: Natriumazid (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).
Signalwörter: Gefahr.

H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H334: Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H411: Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P264: Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
P270: Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P272: Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P284: [Bei unzureichender Belüftung] Atemschutz tragen.
P301+312: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt/anrufen.
P302+352: BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P304+340: BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
P330: Mund ausspülen.
P333+313: Bei Hautreizung oder-ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P342+311: Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
P362+364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
P391: Verschüttete Mengen aufnehmen.
P501: Inhalt/Behälter zu einer Problemabfallentsorgung zuführen.

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

Dieses Reagenz enthält Natriumazid. Ein Materialsicherheits-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.

Flüssiger Stickstoff verursacht aufgrund seiner extrem niedrigen Temperatur Verbrennungen. Daher müssen bei seiner Anwendung Schutzkleidung sowie Handschuhe und Schutzbrille getragen werden. Nur in einem gut belüfteten Bereich anwenden.

Isopentan ist sehr leicht entzündlich und bei Verschlucken und Einatmen gesundheitsschädlich. Es reizt außerdem Haut und Augen und wirkt bei hoher Konzentration wie ein Narkotikum.

Qualitätskontrolle

Unterschiede bei der Gewebebearbeitung 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) eingefroren werden sollten.

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 Skelettmuskelgewebe empfohlen.

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

Negative Gewebekontrolle

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

Für die negative Gewebekontrolle wurde kein Gewebetyp untersucht.

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 Färbeergebnisse 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-d-SARC 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 dSarc3/12C1 weist das delta-Sarkoglykan-Protein im Sarkolemm von Skelett-, Herz- und glatten Muskelfasern nach.

Tumorgewebe

Klon dSarc3/12C1 wurde bei immunhistochemischen Studien mit mehr als 850 Patienten zum Nachweis eines Mangels des dystrophin-assoziierten Glykoproteins delta-Sarkoglykan (35 kDa) verwendet.

NCL-d-SARC wird für den Nachweis von humanem Delta-Sarkoglykan mittels Immunhistochemie 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-Objektträgers 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 wo angezeigt für die Verwendung entweder auf gefrorenen oder in Paraffin eingebetteten Schnitten mit spezifischen Fixierungsanforderungen bestimmt. Es kann insbesondere bei Neoplasmen zu einer unerwarteten Antigenexpression kommen. Die klinische Bewertung eines gefärbten Gewebeschnitts muss eine morphologische Analyse und die Auswertung der entsprechenden Kontrollen einschließen.

Literatur - Allgemein

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.

11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Keine.

Ausgabedatum

19 Oktober 2018

Immunhistochemisches Vorgehen beim Einsatz von Novocastra™-Antikörpern für gefrorenes Muskelgewebe.

Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Reagenzien

1. In der Immunhistochemie übliche Standardlösungsmittel.
2. 50 mmol/l Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (Tris-Buffered Saline, TBS) pH-Wert 7,6.
3. Antikörper-Verdünnungsmittel – optimal in TBS verdünntes Normalserum.
4. Normalseren der Spezies, in denen der sekundäre Antikörper gezüchtet wird.
5. Sekundärer, peroxidase-konjugierter Antikörper – gemäß den Empfehlungen des Herstellers zu verwenden.
6. 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) - gemäß den Empfehlungen des Herstellers anzusetzen und zu verwenden.
7. Eindeckmedium - gemäß den Empfehlungen des Herstellers zu verwenden.

Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Ausrüstung

1. Inkubator, auf 25 °C eingestellt.
2. Übliche immunhistochemische Laborausstattung.
3 Elektroventilator zum Lufttrocknen von Objektträgern.

Antigen-Retrieval-Lösungen (siehe Gebrauchsempfehlungen)

Nicht für gefrorene Schnitte zutreffend.

Vorgehensweise

Vor Anwendung dieser Methodik müssen die Benutzer in immunhistochemischen Techniken unterrichtet werden.

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

1. Schnitte von 4–10 µm schneiden und auf Objektträgern aufbringen, die mit einem geeigneten Gewebehaftmaterial beschichtet sind, und mindestens eine Stunde lang an der Luft trocknen lassen.
2. Die Schnitte mit optimal verdünntem primären Antikörper inkubieren (siehe Gebrauchsempfehlungen)
3. Die Schnitte in TBS-Puffer 2 x 5 Minuten lang mit sanfter Kippbewegung spülen.
4. Die Schnitte mit einem entsprechenden peroxidase-konjugierten, sekundären Antikörper inkubieren.
5. Die Schnitte in TBS-Puffer 2 x 5 Minuten lang mit sanfter Kippbewegung spülen.
6. Die Objektträger in DAB inkubieren.
7. Die Objektträger mit sauberem Wasser abspülen.
8. Die Schnitte dehydrieren, säubern und aufbringen.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Keine.

Ausgabedatum

5. Februar 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).

Novocastra™ Anticuerpos Monoclonal Liofilizado de Ratón Delta-Sarcoglycan
Código De Producto: NCL-d-SARC

Indicaciones De Uso

Para uso diagnóstico in vitro.

NCL-d-SARC está indicado para la identificación cualitativa por microscopía óptica de delta-sarcoglicano mediante inmunohistoquímica. 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 inmunohistocitoquímica (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

δSarc3/12C1

Inmunógeno

Péptido sintético que contiene los aminoácidos 1-19 del extremo aminoterminal de la secuencia del delta-sarcoglicano humano (Jung D. et al., 1996).

Especificidad

Delta-sarcoglicano humano (35 kD). No reacciona con el delta-sarcoglicano presente en secciones de músculo de ratón, rata, conejo, perro, pollo, hámster o cerdo. No se han evaluado otras especies animales.

Composición Del Reactivo

NCL-d-SARC es un sobrenadante de cultivo tisular liofilizado que contiene azida sódica como conservante. El usuario debe reconstituir el contenido del vial con el volumen correcto de agua destilada estéril que se indica en la etiqueta del vial.

Clase de Ig

IgG2a

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 24 mg/L. Consulte en la etiqueta del vial la concentración de Ig específica del lote.

Recomendaciones De Uso

Inmunohistocitoquímica (ver **Metodología**) con secciones congeladas. Dilución sugerida: 1:25–1:50 durante 60 minutos a 25 °C. Ésta es tan solo una pauta y cada usuario debe determinar sus propias diluciones de trabajo óptimas.

Almacenamiento Y Estabilidad

Almacene el anticuerpo sin abrir a una temperatura de 2–8 °C. Bajo estas condiciones, no hay pérdida significativa de la eficacia del producto hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. No lo utilice después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial. El anticuerpo reconstituido es estable durante al menos dos meses si se almacena a una temperatura de 2–8 °C. Para el almacenamiento de larga duración, se recomienda almacenar alícuotas del anticuerpo reconstituido congeladas a -20 °C (no se recomiendan los congeladores libres de escarcha (“frost free”)). Debe evitar congelar y descongelar repetidamente el producto. Prepare las diluciones de trabajo el día en que las vaya a utilizar. Devuélvalo a 2–8 °C inmediatamente después de su uso. Cualesquiera condiciones de almacenamiento que no sean las arriba especificadas deben ser verificadas por el usuario.

Preparación De Las Muestras

Congele los bloques de tejido en isopentano enfriado en nitrógeno líquido (consulte Advertencias y precauciones). Las muestras no requieren mayor fijación, pero deben incluirse en el compuesto OCT™ (Sakura, Nº de producto Tissue-Tek 4583).

Advertencias Y Precauciones

Novocastra Lyophilised Antibodies

Contiene una mezcla de: Aziduro De Sodio (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).
Palabras de advertencia: Peligro

H302: Nocivo en caso de ingestión.
H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
H334: Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.
H411: Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
P264: Lavarse manos concienzudamente tras la manipulación.
P270: No comer, beber ni fumar durante su utilización.
P272: Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.
P273: Evitar su liberación al medio ambiente.
P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P284: [En caso de ventilación insuficiente,] llevar equipo de protección respiratoria.
P301+312: EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGIA/médico/si la persona se encuentra mal.
P302+352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
P304+340: EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración.
P330: Enjuagarse la boca.
P333+313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P342+311: En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGIA/médico.
P362+364: Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
P391: Recoger el vertido.
P501: Eliminar el contenido/el recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.

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.

El nitrógeno líquido, a causa de su temperatura extremadamente baja, causa quemaduras, por lo que debe ponerse ropa protectora, incluidos guantes y visor, para manipularlo. Úsese en un área bien ventilada.

El isopentano es altamente inflamable, y dañino por ingestión e inhalación. Además, irrita los ojos y la piel, y es narcótico a altas concentraciones.

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, congeladas 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 músculo esquelético

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.

No se ha evaluado el tejido de control negativo recomendado.

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-d-SARC 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 inmunohistocitoquímica, 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 dSarc3/12C1 detecta la proteína delta-sarcoglicano en el sarcolema de las fibras musculares esqueléticas, cardíacas y lisas.

Tejidos tumorales

El clon dSarc3/12C1 se ha utilizado en estudios inmunohistoquímicos de más de 850 pacientes a fin de identificar una deficiencia de la glicoproteína asociada a la distrofina, de 35 kD, que es el delta-sarcoglicano.

NCL-d-SARC está recomendado para la identificación de delta-sarcoglicano humano mediante inmunohistoquímica.

Limitaciones Generales

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

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

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

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

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

Bibliografía - General

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.

12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Correcciones A La Publicación Anterior

No aplicable.

Fecha De Publicación

19 de octubre de 2018

Metodología inmunohistoquímica para el uso de anticuerpos Novocastra™ con tejido muscular congelado.

Reactivos necesarios que no se suministran

1. Solventes estándar utilizados en inmunohistoquímica.
2. Solución salina tamponada con Tris 50 mM (TBS), pH 7,6.
3. Diluyente de anticuerpos - suero normal diluido óptimamente en TBS.
4. Sueros normales de la especie en la que se ha producido el anticuerpo secundario.
5. Anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa - utilizado de la forma recomendada por el fabricante.
6. Tetraclorhidrato de 3,3' diaminobenzidina (DAB) - preparado y utilizado de la forma recomendada por el fabricante.
7. Medio de montaje - utilizado de la forma recomendada por el fabricante.

Equipo necesario que no se suministra

1. Incubador ajustado a 25 °C.
2. Equipo de laboratorio utilizado generalmente para inmunohistoquímica.
3. Ventilador eléctrico para secar los portaobjetos al aire.

Soluciones de recuperación de antígenos (consulte las Recomendaciones de uso)

No aplicables a secciones congeladas.

Metodología

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

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

1. Corte y monte secciones de 4-10 µm en portaobjetos revestidos de un adhesivo de tejidos adecuado y seque al aire durante al menos una hora.
2. Incube las secciones con el anticuerpo primario óptimamente diluido (**consulte las Recomendaciones de uso**).
3. Lave en tampón TBS durante 2 x 5 minutos con sacudimiento suave.
4. Incube las secciones en el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa apropiado.
5 Lave en tampón TBS durante 2 x 5 minutos con sacudimiento suave.
6 Incube los portaobjetos en DAB.
7. Lave los portaobjetos en agua limpia.
8. Deshidrate, aclare y monte las secciones.

Correcciones a la publicación anterior

No aplicable.

Fecha de publicación

5 de febrero de 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle)

Novocastra™ Anticorpo Monoclonal Lofilizado de Ratinho Delta-Sarcoglycan
Código Do Produto: NCL-d-SARC

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos in vitro.

NCL-d-SARC destina-se à identificação qualitativa, por microscopia óptica, do delta-sarcoglicano através de imuno-histoquímica. 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

δSarc3/12C1

Imunogénio

Péptido sintético contendo os aminoácidos 1-19 no terminal N da sequência de delta-sarcoglicano humano (Jung D. e outros.,1966).

Especificidade

Delta-sarcoglicano humano (35 kD). Não reage com o delta-sarcoglicano em secções de músculo de ratinho, rato, coelho, cão, galinha, hamster e suíno. Não se testaram outras espécies de animais.

Composição Do Reagente

NCL-d-SARC é um sobrenadante liofilizado de uma cultura de tecido contendo de azida de sódio como produto conservante.
O utilizador deve reconstituir o conteúdo da ampola com o volume correcto de água destilada esterilizada, conforme indicado no rótulo da ampola.

Classe De Ig

IgG2a

Concentração Total De Proteína

Total Protein

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

Concentração De Anticorpo

Maior que ou igual a 24 mg/L. Consultar a etiqueta da ampola para determinar a concentração de Ig do lote específico.

Recomendações Sobre A Utilização

Imunohistoquímica (ver **Metodologia**) em secções congeladas. Diluição sugerida: 1:25–1:50 durante 60 minutos a 25 °C. Esta recomendação é apenas uma directriz e o utilizador deve determinar qual a diluição ideal para o trabalho específico.

Armazenamento E Estabilidade

Armazenar o anticorpo em embalagem não aberta a 2–8 °C. Nessas condições, não se regista uma redução significativa no desempenho do produto até ao prazo de validade indicado no rótulo da ampola. Não utilizar após o prazo de validade indicado no rótulo do recipiente. O anticorpo reconstituído permanece estável durante pelo menos dois meses, desde que seja armazenado a uma temperatura entre 2–8 °C. Em caso de armazenamento a longo prazo, recomenda-se que as alíquotas do anticorpo reconstituído sejam armazenadas congeladas a -20 °C (não se recomenda a utilização de congeladores do tipo auto-descongelador). Deve evitar-se congelar e descongelar repetidamente o produto. Preparar as diluições de trabalho no próprio dia do seu emprego. Retornar à temperatura de 2–8 °C imediatamente após a utilização. As condições de armazenamento que diferirem das que se encontram especificadas acima devem ser verificadas pelo utilizador.

Preparação Das Amostras

Congelar blocos de tecido da amostra em isopentano arrefecido em nitrogénio líquido (ver os Avisos e precauções). As amostras não requerem mais nenhuma fixação, mas devem ser envolvidas no composto OCT™ (Sakura, Produto n.º Tissue-Tek 4583).

Avisos E Precauções

Novocastra Lyophilised Antibodies

Contém uma mistura de: Azoteto De Sodio (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).
Palavras-sinal: Perigo.

H302: Nocivo por ingestão.
H317: Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.
H334: Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias.
H411: Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.
EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.

P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
P264: Lavar mãos cuidadosamente após manuseamento.
P270: Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto.
P272: A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.
P273: Evitar a libertação para o ambiente.
P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P284: [Em caso de ventilação inadequada] usar proteção respiratória.
P301+312: EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.
P302+352: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes.
P304+340: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.
P330: Enxaguar a boca.
P333+313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P342+311: Em caso de sintomas respiratórios: contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.
P362+364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.
P391: Recolher o produto derramado.
P501: Eliminar o conteúdo/recipiente em um local autorizado para a recolha de resíduos perigosos ou especiais.

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.

O nitrogénio líquido causa queimaduras devido à sua temperatura excessivamente fria, e as pessoas que o manusearem devem utilizar vestuário de protecção, incluindo luvas e um visor. Utilizar o material numa área bem ventilada.

O isopentano é altamente inflamável e nocivo por ingestão e inalação. É ainda um irritante dérmico e ocular e, quando muito concentrado, é narcótico.

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, congeladas 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 o músculo esquelético.

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 não foi ainda avaliado.

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-d-SARC 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 dSarc3/12C1 detecta a proteína delta-sarcoglicano no sarcolema das fibras do músculo esquelético, cardíaco e liso.

Tecidos tumorais

O clone dSarc3/12C1 foi utilizado em estudos de imunohistoquímica de mais de 850 doentes para identificar uma deficiência da glicoproteína de 35 kD delta-sarcoglicano, associada à distrofina.

NCL-d-SARC está recomendado para a identificação do delta-sarcoglicano humano através de imuno-histoquímica.

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. 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.

8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Emendas Da Edição Anterior

Não aplicável.

Data De Emissão

19 de Outubro de 2018

Metodologia de imunocitoquímica para utilização de anticorpos Novocastra™ em tecido de músculo congelado.

Reagentes necessários mas não fornecidos

1. Solventes comuns utilizados em imunohistoquímica.
2. 50 mM solução salina tampão Tris (TBS) pH 7,6.
3. Diluente do anticorpo – soro normal diluído em TBS.
4. Soros normais da espécie em que o anticorpo secundário tenha sido desenvolvido.
5. Anticorpo secundário conjugado com peroxidase – preparar conforme recomendado pelo fabricante.
6. 3,3' Tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB) – preparar e utilizar conforme recomendado pelo fabricante.
7. Meio de montagem – usar conforme recomendado pelo fabricante.

Equipamento necessário mas não fornecido

1. Incubador regulado para 25 ºC.
2. Equipamento geral de laboratório de imunohistoquímica.
3. Ventilador eléctrico para secagem das lâminas ao ar.

Soluções de recuperação de antígeno (ver as Recomendações sobre a utilização)

Não se aplica às secções congeladas.

Metodologia

Antes de intentar esta metodologia, o utilizador deve ter recebido a devida formação em técnicas de imunohistoquímica.
O utilizador deve determinar quais as fórmulas de diluição ideais para os anticorpos. A não ser indicação em contrário, todas as etapas devem ser efectuadas a 25 ºC.

1. Cortar e montar secções de 4–10 µm em lâminas revestidas de um tecido adesivo apropriado e secar ao ar durante pelo menos uma hora.
2. Incubar as secções com anticorpo primário optimamente diluído (ver Recomendações sobre a utilização).
3. Lavar em tampão TBX durante 2 x 5 minutos, agitando levemente.
4. Incubar as secções num anticorpo secundário apropriado, conjugado com peroxidase.
5. Lavar em tampão TBX durante 2 x 5 minutos, agitando levemente.
6. Incubar as lâminas em DAB.
7. Enxaguar as lâminas em água limpa.
8. Desidratar, soltar e montar as secções.

Emendas da edição anterior

Não é aplicável.

Data de emissão

5 de Fevereiro de 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).

Novocastra™ Frystorkad Monoklonal Musantikropp Delta-Sarcoglycan Produktkod: NCL-d-SARC

Avsedd Användning

För in vitro diagnostisk användning.

NCL-d-SARC är avsedd för kvalitativ identifiering med ljusmikroskopi av delta-sarkoglykan genom immunhistokemi. 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

δSarc3/12C1

Immunogen

Syntetisk peptid innehållande aminosyror 1-19 vid N-terminus av humant delta-sarkoglykansekvensen (Jung D. et al.,1966).

Specificitet

Humant delta-sarkoglykan (35 kD). Det korsreagerar också med delta-sarkoglykan i snitt från mus-, råtta-, kanin-, hund-, hön-, hamster- eller grismuskel. Andra djurarter har inte testats.

Reagensinnehåll

NCL-d-SARC är en frystorkad supernatant från vävnadsodling som innehåller natriumazid som konserveringsmedel. Användaren måste späda flaskans innehåll med den korrekta volymen sterilt destillerat vatten enligt anvisningarna på flaskans etikett.

Ig-klass

IgG2a

Total Proteinkoncentration Total Protein

Se flaskans etikett för total specifik proteinkoncentration för satsen.

Antikroppskoncentration

Större än eller lika med 24 mg/L. Se flaskans etikett för specifik Ig-koncentration för satsen.

Rekommendationer Vid Användning

Immunhistokemi (se **Metodologi**) på frysta snitt. Föreslagen spädning: 1:25–1:50 i 60 minuter vid 25 °C. Detta är endast en riktlinje och användare bör själva fastställa den optimala bruksspädningen.

Förvaring Och Stabilitet

Förvara oöppnad antikropp vid 2–8 °C. Vid dessa förhållanden sker ingen betydelsefull nedgång i produktens utförande fram till utgångsdatumet på flaskans etikett. Använd ej efter det utgångsdatum som anges på flaskans etikett. Den spädda antikroppen håller sig stabil i minst två månader om den förvaras vid 2–8 °C. Vid långvarig förvaring rekommenderas det att alikvoter av den spädda antikroppen förvaras frysta vid -20 °C (frostfria frys rekommenderas ej). Upprepad nedfrysning och upptinande bör undvikas. Förbered brukslösningar samma dag som de skall användas. Återgå till 2–8 °C direkt efter användning. Förvaringsförhållanden som skiljer sig från de ovannämnda måste kontrolleras av användaren.

Preparation Av Prov

Frys vävnadsprovblocken i isopentan nedkylt i flytande kväve (se Varningar och Försiktighetsåtgärder). Proven kräver ingen ytterligare fixering men bör bäddas in i OCT™-förening (Sakura, produktkod Tissue-Tek 4583).

Varningar Och Försiktighetsåtgärder

Novocastra Lyophilised Antibodies

Innehåller en blandning av: Natriumazid (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).
Signalord: Fara.

H302: Skadligt vid förtäring.
H317: Kan orsaka allergisk hudreaktion.
H334: Kan orsaka allergi- eller astmasymtom eller andningssvårigheter vid inandning.
H411: Giftigt för vattenlevande organismer med långtidseffekter.
EUH032: Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.

P261: Undvik att inandas damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej.
P264: Tvätta händerna grundligt efter användning.
P270: Ät inte, drick inte och rök inte när du använder produkten.
P272: Nedstänkta arbetskläder får inte avlägsnas från arbetsplatsen.
P273: Undvik utsläpp till miljön.
P280: Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P284: [Vid otillräcklig ventilation], använd andningsskydd.
P301+312: VID FÖRTÄRING: Vid obehag, kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN/läkare.
P302+352: VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.
P304+340: VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att andningen underlättas.
P330: Skölj munnen.
P333+313: Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp.
P342+311: Vid besvär i luftvägarna: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN/läkare.
P362+364: Ta av nedstänkta kläder och tvätta dem innan de används igen.
P391: Samla upp spill.
P501: Innehållet/Behållaren lämnas till insamlingsställe för farligt avfall.

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.[1] 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.

Flytande kväve ger brännskador p.g.a. sin ytterst låga temperatur och skyddskläder, inklusive handskar och ögonskydd, skall användas vid hantering. Använd i ett väl ventilerat område.

Isopentan är högst brandfarligt och skadligt vid intagning via mun samt inhalation. Det irriterar också hud och ögon och har narkotisk effekt vid höga koncentrationer.

Kvalitetskontroll

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

Kontroller bör vara färska obduktions-/biopsi-/kirurgiprover som snarast möjligt har frysts på samma sätt som patientprover (s).

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]

Skelettmuskel 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.

Rekommenderad negativ kontrollvävnad har inte utvärderats.

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

Ospecifik färgning, om det förekommer, har ofta ett diffust utseende. Sporadisk färgning av bindväv kan också observeras i snitt från överflödigt formalinfixerade vävnader. Använd intakta celler för tolkning av färgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler färgar ofta ospecifikt.[3] Falskt positiva resultat kan uppstå p.g.a. icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erytrocyter), endogent peroxidas (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-d-SARC 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 dSarc3/12C1 upptäcker delta-sarkoglykanproteinet i skelett-, hjärt- och glattmuskelfibrernas sarkolemma.

Tumörvävnader

Klon dSarc3/12C1 har använts i immunhistokemiska studier på över 850 patienter för att identifiera brist på 35 kD dystrofinassocierat glykoprotein, delta-sarkoglykan.

NCL-d-SARC rekommenderas för identifiering av human delta-sarkoglykan genom immunhistokemi.

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]

Överflödig eller ofullständig kontrastfägning 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 paraffininbäddade snitt med specifika fixeringskrav. Oväntat 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Rättelser Av Tidigare Utgivning

Gäller inte.

Utgivningsdatum

19 oktober 2018

Immunhistokemisk metodologi för användning av Novocastra™ antikroppar på fryst muskelvävnad.

Reagens som krävs men ej tillhandahålls

1. Standardlösningar som används inom immunhistokemi.
2. 50 mM Trisbuffrad saltlösning (TBS) pH 7,6.
3. Antikroppsutspädningsmedel – normalt serum optimalt spätt i TBS .
4. Normala sera från de arter i vilka den sekundära antikroppen odlas.
5. Sekundär peroxidaskonjugerad antikropp – använd enligt tillverkarens rekommendationer.
6. 3,3' Diaminobenzidin tetrahydroklorid (DAB) – bered och använd enligt tillverkarens rekommendationer.
7. Monteringsmedel – bered enligt tillverkarens rekommendationer.

Utrustning som krävs men ej tillhandahålls

1 .Inkubator inställd på 25 °C.
2. Allmän immunhistokemisk laboratorieutrustning.
3. Elektrisk fläkt för lufttorkning av objektglas.

Antigenåtervinningslösningar (se Rekommendationer vid användning)

Gäller ej frysta snitt.

Metodologi

Innan denna metodologi tillämpas måste användare utbildas i immunhistokemiska tekniker. Användare bör fastställa optimal spädning för antikroppar. Alla steg utförs om inget annat anges vid rumstemperatur på 25 °C .

1. Skär och montera 4–10 µm snitt på objektglas täckta med ett lämpligt vävnadsklister och lufttorka i minst en timme.
2. Inkubera snitten med optimalt spädd primär antikropp (se Rekommendationer vid användning).
3. Tvätta snitten i TBS-buffert i 2 x 5 minuter och gunga försiktigt.
4. Inkubera snitten i lämplig peroxidaskonjugerad sekundär antikropp.
5. Tvätta snitten i TBS-buffert i 2 x 5 minuter och gunga försiktigt.
6. Inkubera objektglasen i DAB.
7. Skölj objektglasen i rent vatten.
8. Dehydratisera, klargör och montera snitten.

Rättelser av tidigare utgivning

Gäller inte.

Utgivningsdatum

5 februari 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).

Novocastra™ Λυοφιλοποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού Delta-Sarcoglycan Κωδικός είδους: NCL-d-SARC

Χρήση Για Την Οποία Προορίζεται

Για in vitro διαγνωστική χρήση.

Το NCL-d-SARC προορίζεται για την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός της δ-σαρκογλυκάνης με ανοσοϊστοχημεία. 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

δSarc3/12C1

Ανοσογόνο

Συνθετικό πεπτίδιο που περιέχει τα αμινοξέα 1-19 στο N-τελικό άκρο της αλληλουχίας της ανθρώπινης δ-σαρκογλυκάνης (Jung D. et al.,1966).

Ειδικότητα

Ανθρώπινη δ-σαρκογλυκάνη (35 kD). Δεν αντιδρά με τη δ-σαρκογλυκάνη σε τομές μυών από ποντικό, αρουραίο, κουνέλι, σκύλο, όρνιθα, χάμστερ ή χοίρο. Δεν έχουν εξεταστεί άλλα είδη ζώων.

Σύνθεση Αντιδραστηρίου

Το NCL-d-SARC είναι ένα λυοφιλοποιημένο υπερκείμενο ιστοκαλλιέργειας που περιέχει αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό.
Ο χρήστης χρειάζεται να ανασυστήσει το περιεχόμενο του φιαλιδίου με τον σωστό όγκο αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού, όπως υποδεικνύεται στην ετικέτα του φιαλιδίου.

Τάξη Ig

IgG2a

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 24 mg/L. Για τη συγκέντρωση Ig που είναι ειδική για την εκάστοτε παρτίδα, ανατρέξτε στην ετικέτα του φιαλιδίου.

Συστάσεις Για Τη Χρήση

Ανοσοϊστοχημεία (δείτε **Μεθοδολογία**") σε τομές κατεψυγμένες. Προτεινόμενη αραίωση: 1:25–1:50 επί 60 λεπτά στους 25 °C. Αυτό παρέχεται ως οδηγός και οι χρήστες θα πρέπει να προσδιορίζουν τις δικές τους βέλτιστες αραιώσεις εργασίας.

Φύλαξη Και Σταθερότητα

Φυλάσσετε το μη ανοιγμένο αντίσωμα στους 2–8 °C. Υπό τις συνθήκες αυτές, δεν υπάρχει σημαντική απώλεια στην απόδοση του προϊόντος έως την ημερομηνία λήξης που υποδεικνύεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Μη χρησιμοποιείτε μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Το ανασυσταθέν αντίσωμα είναι σταθερό επί δύο μήνες τουλάχιστον, εφόσον φυλάσσεται στους 2–8 °C. Για μακροχρόνια φύλαξη, συνιστάται τα κλάσματα του ανασυσταθέντος αντισώματος να φυλάσσονται κατεψυγμένα στους -20 °C (δε συνιστάται η χρήση καταψυκτών χωρίς πάγο). Θα πρέπει να αποφεύγονται οι επανειλημμένοι κύκλοι κατάψυξης και απόψυξης. Παρασκευάζετε αραιώσεις εργασίας την ημέρα της χρήσης. Επαναφέρετε στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Τυχόν συνθήκες φύλαξης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται παραπάνω πρέπει να επαληθεύονται από το χρήστη.

Παρασκευή Δείγματος

Καταψύξτε τεμάχια ιστών δειγμάτων σε ισοπεντάνιο που έχει ψυχθεί σε υγρό άζωτο (δείτε την ενότητα "Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις"). Τα δείγματα δε χρειάζονται περαιτέρω μονιμοποίηση, αλλά πρέπει να εγκλείονται στην ένωση OCT™ (Sakura, κωδικός είδους Tissue-Tek 4583).

Προειδοποιήσεις Και Προφυλάξεις

Novocastra Lyophilised Antibodies

Περιέχει ένα μείγμα από: Sodium Azide (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).
Προειδοποιητές λέξεις:
Κύνδυνος.

H302: Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης.
H317: Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.
H334: Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής.
H411: Τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.
EUH032: Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια.

P261: Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα.
P264: Πλύνετε χέρια σχολαστικά μετά το χειρισμό.
P270: Μην τρώτε, πίνετεή καπνίζετε, όταν χρησιμοποιείτε αυτό το προϊόν.
P272: Τα μολυσμένα ενδύματα εργασίας δεν πρέπει να βγαίνουν από το χώρο εργασίας.
P273: Να αποφεύγεται η ελευθέρωση στο περιβάλλον.
P280: Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.
P284: ΫΣε περίπτωση ανεπαρκούς αερισμούέ χρησιμοποιείστε μέσα ατομικής προστασίας της αναπνοής.
P301+312: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑΠΟΣΗΣ: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό/ εάν αισθανθείτε αδιαθεσία.
P302+352: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό και σαπούνι.
P304+340: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ: Μεταφέρατε τον παθόντα στον καθαρό αέρα και αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή.
P330: Ξεπλύνετε το στόμα.
P333+313: Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό.
P342+311: Εάν παρουσιάζονται αναπνευστικά συμπτώματα: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό.
P362+364: Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύντε τα πριν τα ξαναχρησιμοποιήσετε.
P391: Μαζέψτε τη χυμένη ποσότητα.
P501: Διάθεση του περιεχομένου/περιέκτη σε χώρο συλλογής επικινδύνων ή ειδικών αποβλήτων.

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 δυνητικώς 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 ιατρού.

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

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

Το υγρό άζωτο λόγω της υπερβολικά ψυχρής θερμοκρασίας του προκαλεί εγκαύματα και κατά το χειρισμό του πρέπει να φοράτε προστατευτικό ρουχισμό, συμπεριλαμβανομένων γαντιών και προσωπίδας. Χρησιμοποιείτε σε καλά αεριζόμενο χώρο.

Το ισοπεντάνιο είναι ιδιαίτερα εύφλεκτο και επιβλαβές με κατάποση και εισπνοή. Είναι επίσης ερεθιστικό στο δέρμα και τα μάτια, καθώς και ναρκωτικό σε υψηλή συγκέντρωση.

Ποιοτικός Έλεγχος

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

Οι μάρτυρες θα πρέπει να είναι φρέσκα δείγματα νεκροψίας/βιοψίας/χειρουργικά δείγματα, τα οποία καταψύχονται το συντομότερο δυνατό με τον ίδιο τρόπο όπως το(α) δείγμα(τα) του ασθενούς.

Θετικός Μάρτυρας Ιστού

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

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

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

Συνιστώμενος ιστός θετικού μάρτυρα είναι ο σκελετικός μυς.

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

Αρνητικός Μάρτυρας Ιστού

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

Συνιστώμενος ιστός αρνητικού μάρτυρα δεν έχει αξιολογηθεί.

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 συνδετικού ιστού σε τομές από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με υπερβολική ποσότητα φορμόλης. Χρησιμοποιείτε άθικτα κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης. Νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα παρουσιάζουν συχνά μη ειδική χρώση.[3] Ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ανοσολογικής δέσμευσης των πρωτεϊνών ή των προϊόντων αντίδρασης του

υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδοϋπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός) ανάλογα με τον τύπο ανοσοχρώσης που χρησιμοποιείται. Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστικότητας ή της μη ειδικής δέσμευσης των ενζύμων από ειδική ανοσοαντιδραστικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπλέον ιστοί ασθενών με χρωμογόνο υποστρώματος ή ενζυμικά σύμπλοκα (αβιδίνη-βιοτίνη, στρεπταβιδίνη, σημασμένο πολυμερές) και υπόστρωμα-χρωμογόνο, αντίστοιχα. Εάν παρουσιαστεί ειδική χρώση στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενούς θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Αρνητικός Μάρτυρας Αντιδραστηρίου

Χρησιμοποιείτε έναν μη ειδικό αρνητικό μάρτυρα αντιδραστηρίου αντί του 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-d-SARC. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκτιμάται στα πλαίσια τυχόν μη ειδικής χρώσης υποβάθρου του αρνητικού μάρτυρα αντιδραστηρίου. Όπως συμβαίνει με οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική εξέταση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν 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 δSarc3/12C1 ανιχνεύει την πρωτεΐνη δ-σαρκογλυκάνη στο σαρκείλημμα των σκελετικών, καρδιακών και λείων μυϊκών ινών.

Καρκινικοί ιστοί

Ο κλώνος δSarc3/12C1 έχει χρησιμοποιηθεί σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε περισσότερους από 850 ασθενείς για την ταυτοποίηση μιας ανεπάρκειας της σχετιζόμενης με τη δυστροφίνη γλυκοπρωτεΐνης 35 kD, δ-σαρκογλυκάνης.

Το NCL-d-SARC συνιστάται για την ταυτοποίηση της ανθρώπινης δ-σαρκογλυκάνης με ανοσοϊστοχημεία.

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, απόψυξη, πλύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να παράγει μορφώματα, παγίδευση αντισώματος ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τυχόν ασυνεπή αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται σε παραλλαγές των μεθόδων μονιμοποίησης και εγκλεισμού ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.[4]

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

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

Τα αντισώματα που παρέχονται από την Leica Biosystems Newcastle Ltd προορίζονται για χρήση, όπως υποδεικνύεται, είτε σε κατεψυγμένες είτε σε εγκλεισμένες σε παραφίνη τομές, με ειδικές απαιτήσεις μονιμοποίησης. Ενδέχεται να παρουσιαστεί μη αναμενόμενη έκφραση αντιγόνου, ειδικά σε νεοπλάσματα. 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Τροποποιήσεις Στην Προηγούμενη Έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

Ημερομηνία Έκδοσης

19 Οκτωβρίου 2018

Μεθοδολογία ανοσοϊστοχημείας για χρήση αντισωμάτων Novocastra™ σε κατεψυγμένο μυϊκό ιστό.

Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Πρότυποι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην ανοσοϊστοχημεία.
2. 50 mM αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος Tris (TBS) pH7,6.
3. Αραιωτικό αντισώματος - φυσιολογικός ορός βέλτιστα αραιωμένος σε TBS.
4. Φυσιολογικοί οροί από το είδος στο οποίο αναπτύσσεται το δευτεροταγές αντίσωμα.
5. Δευτεροταγές αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση - χρησιμοποιείτε όπως συνιστάται από τον κατασκευαστή.
6. Τετραϋδροχλωρική 3,3' διαμινοβενζιδίνη (DAB) - παρασκευάζετε και χρησιμοποιείτε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
7. Μέσο στερέωσης – χρησιμοποιείτε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

1. Θάλαμος επώασης ρυθμισμένος στους 25 °C.
2. Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός ανοσοϊστοχημείας.
3. Ηλεκτρικός ανεμιστήρας για στέγνωμα των αντικειμενοφόρων πλακών με αέρα.

Διαλύματα ανάκτησης αντιγόνου (δείτε την ενότητα "Συστάσεις για τη χρήση")

Δεν ισχύει για κατεψυγμένες τομές.

Μεθοδολογία

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

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

1. Κόψτε και στερεώστε τομές 4–10 μm σε αντικειμενοφόρους πλάκες επικαλυμμένες με κατάλληλο συγκολλητικό ιστών και στεγνώστε με αέρα επί μία ώρα τουλάχιστον.
2. Επωάστε τις τομές με βέλτιστα αραιωμένο πρωτοταγές αντίσωμα (δείτε την ενότητα "Συστάσεις για τη χρήση").
3. Πλύνετε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS επί 2 x 5 λεπτά με απαλή ανακίνηση.
4. Επωάστε τις τομές σε κατάλληλο δευτεροταγές αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση.
5. Πλύνετε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS επί 2 x 5 λεπτά με απαλή ανακίνηση.
6. Επωάστε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε DAB.
7. Εκπλύντε τις αντικειμενοφόρους πλάκες σε καθαρό νερό.
8. Αφυδατώστε, καθαρίστε και στερεώστε τις τομές.

Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Δεν έχει εφαρμογή.

Ημερομηνία έκδοσης

5 Φεβρουαρίου 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).

Novocastra™ Lyophiliseret Monoklonalt Museantistof Delta-Sarcoglycan Produktkode: NCL-d-SARC

Tilsigtet Anvendelse

Til in vitro diagnostisk anvendelse.

NCL-d-SARC er beregnet til kvalitativ identifikation ved hjælp af lysmikroskopi af delta-sarcoglycan med immunhistokemi. Klinisk fortolkning af farvning eller mangel derpå skal suppleres med morfologiske undersøgelser under anvendelse af passende kontroller og bør evalueres i sammenhæng med patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests af en kvalificeret patolog.

Procedureprincip

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

Klon

δSarc3/12C1

Immunogen

Syntetisk peptid indeholdende aminosyre 1-19 fra N-terminalen af den humane delta-sarcoglycansekvens (Jung D. et al.,1966).

Specificitet

Humant delta-sarcoglycan (35 kD). Krydsreagerer ikke med delta-sarcoglycan i vævssnit af muskel fra mus, rotte, kanin, hund, kylling, hamster og svin. Der er ikke testet andre dyrearter.

Reagenssammensætning

NCL-d-SARC er en lyophiliseret vævskultursupernatant indeholdende natriumazid som konserveringsmiddel. Brugeren skal rekonstituere indholdet i hætteflasken med det korrekte volumen sterile destillerede vand som angivet på hætteflaskens etikette.

Ig-klasse

IgG2a

Totalproteinkoncentration Total Protein

Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik totalproteinkoncentration.

Antistofkoncentration

Større end eller lig med 24 mg/L. Se etiketten på hætteflasken for lotspecifik Ig-koncentration.

Anbefalinger Vedrørende Anvendelse

Immunhistokemi (se **Metodologi**) på frosne snit. Foreslået fortynding: 1:25–1:50 ved 60 minutter ved 25 °C. Disse retningslinier er vejledende, og brugeren bør selv bestemme egne optimale brugsopløsninger.

Opbevaring Og Holdbarhed

Opbevar det uåbnede antistof ved 2–8 °C. Under disse betingelser er der ingen betydende tab af produktets ydeevne indtil udløbsdatoen angivet på hætteflaskens etikette. Må ikke anvendes efter udløbsdatoen angivet på hætteflaskens etikette. Det rekonstituerede antistof er stabilt i mindst to måneder når opbevaret ved 2–8 °C. Ved langtidsopbevaring anbefales det at udportionere det rekonstituerede antistof og opbevare portionerne nedfrosset ved -20 °C (frostfri frysere anbefales ikke). Gentagen optøning og frysning skal undgås. Fremstil brugsopløsninger på dagen for anvendelsen. Sættes tilbage til 2–8 °C umiddelbart efter brug. Andre opbevaringsbetingelser end de ovenfor angivne skal verificeres af brugeren.

Prøveklargøring

Frys prøver af vævsblokke i isopentan lynkølet i flydende nitrogen (se Advarsler og forholdsregler). Prøverne kræver ikke yderligere fiksering, men bør indstøbes i OCT™ (Sakura, produkt nr. Tissue-Tek 4583).

Advarsler Og Forholdsregler

Novocastra Lyophilised Antibodies

Indeholder en blanding af: Natriumazid (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).
Signalord: Fare.

H302: Farlig ved indtagelse.
H317: Kan forårsage allergisk hudreaktion.
H334: Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding.
H411: Giftig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger.
EUH032: Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre.

P261: Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray.
P264: Vask hænder grundigt efter brug.
P270: Der må ikke spises, drikkes eller ryges under brugen af dette produkt.
P272: Tilsmudset arbejdstøj bør ikke fjernes fra arbejdspladsen.
P273: Undgå udledning til miljøet.
P280: Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.
P284: [I tilfælde af utilstrækkelig ventilation], anvend åndedrætsværn.
P301+312: I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: I tilfælde af ubehag, ring til en GIFTINFORMATION/læge.
P302+352: VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt sæbe og vand.
P304+340: VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vejrtrækningen lettes.
P330: Skyl munden.
P333+313: Ved hudirritation eller udslet: Søg lægehjælp.
P342+311: Ved luftvejssymptomer: Ring til en GIFTINFORMATION/læge.
P362+364: Alt tilsmudset tøj tages af og vaskes inden genanvendelse.
P391: Udslip opsamles.
P501: Indholdet/Beholderen bortskaffes i et indsamlingssted for farligt affald og problemaffald.

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 forholdsregler[1]. 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.

Flydende nitrogen forårsager på grund af dets meget kolde temperatur forbrændinger, og der bør bæres beskyttelsesdragt inklusive handsker og visir under arbejde med dette. Arbejd i et velventileret område.

Isopentan er meget brandfarligt og skadeligt ved indtagelse eller indånding. Det irriterer ligeledes øjne og hud og er et narkotikum i høj koncentration.

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 nedfrosset 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 skeletmuskel.

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 ikke blevet evalueret.

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

Uspecifik farvning har, hvis til stede, ofte et diffust udseende. Sporadisk farvning af bindevæv kan ligeledes observeres i vævssnit af væv, der er fikseret for kraftigt i formalin. Anvend intakte celler til fortolkning af farvningsresultaterne. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte mere uspecifikt.[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 (erytrocytter), endogen peroxidase (cytochrom C) eller endogent biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre) afhængigt af den anvendte type immunfarve. For at differentiere mellem endogen enzymaktivitet eller uspecifik enzymbinding og specifik immunreaktivitet kan yderligere patientvæv eventuelt farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen eller enzymkomplekser (avidin-biotin, streptavidin, mærket polymer) og substratkromogen. Hvis der optræder specifik farvning i den negative vævskontrol, skal resultaterne af patientprøverne kasseres.

Negativ Reagenskontrol

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

Patientvæv

Eksaminer patientprøver farvet med NCL-d-SARC 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 dSarc3/12C1 påviser delta-sarcoglycanproteinet i sarcolemma fra skelet- og hjertemuskelfibre og muskelfibre fra glatte muskler.

Tumorvæv

Klon dSarc3/12C1 er blevet anvendt i immunhistokemiske studier af mere end 850 patienter til identifikation af mangel på det 35 kD store dystrophinassocierede glykoprotein, delta-sarcoglycan.

NCL-d-SARC anbefales til identifikation af humant delta-sarcoglycan med immunhistokemi.

Generelle Begrænsninger

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

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

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

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

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

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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Rettelser Til Tidligere Udgave

Ingen rettelser.

Udgivelsesdato

19 oktober 2018

Immunhistokemisk fremgangsmåde til anvendelse af Novocastra™ antistoffer på frossent muskelvæv.

Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

1. Standardopløsningsmidler anvendt i immunhistokemi.
2. 50 mM Tris-bufferjusteret saltvandsopløsning (TBS) pH7,6.
3. Antistofdiluent - normalt serum optimalt fortyndet i TBS.
4. Normale sera fra de arter, i hvilke det sekundære antistof opformeres.
5. Sekundært peroxidasekonjugeret antistof - anvendes ifølge producentens anbefalinger.
6. 3,3' diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) - fremstilles ifølge producentens anbefalinger.
7. Monteringsmedium - fremstilles ifølge producentens anbefalinger.

Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

1. Inkubator indstillet til 25 °C.
2. Almindeligt laboratorieudstyr til immunhistokemi.
3. Elektrisk ventilator til tørring af objektglas.

Antigengenfindingsopløsninger (se Anbefalinger vedrørende anvendelse)

Ikke anvendelig til frosne vævssnit.

Metodologi

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

Brugeren bør bestemme de optimale fortyndinger for antistoffer. Med mindre andet er anført, skal alle trin udføres ved 25 °C.

1. Snit og monter 4–10 µm tykke vævssnit på objektglas coatet med et passende vævsadhæsiv og lufttør i mindst en time.
2. Inkuber vævsnittene i optimalt fortyndet primært antistof (se Anbefalinger vedrørende anvendelse).
3. Vask i TBS i 2 x 5 minutter, mens de vugges forsigtigt.
4. Inkuber vævssnittene med et passende peroxidasekonjugeret sekundært antistof.
5. Vask i TBS i 2 x 5 minutter, mens de vugges forsigtigt.
6. Inkuber vævssnittene i DAB.
7. Skyl vævssnittene i rent vand.
8. Tør, klar og monter vævssnittene.

Rettelser til tidligere udgave

Ingen rettelser.

Udgivelsesdato

5. februar 2004 (CEprotocol/Frozen Muscle).

Novocastra™ Gelyofiliseerd Muis Monoklonaal Antilichaam Delta-Sarcoglycan
Productcode: NCL-d-SARC

Beoogd Gebruik

Voor gebruik bij in-vitro-diagnostiek.
NCL-d-SARC is bedoeld voor de kwalitatieve identificatie, met behulp van lichtmicroscopie, van delta-sarcoglycaan door middel van immunohistochemie. De klinische interpretatie van iedere kleuring of de afwezigheid ervan moet worden aangevuld met morfologisch onderzoek en goede controles. De interpretatie moet worden geëvalueerd door een vakkundige patholoog binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en eventueel ander diagnostisch onderzoek.

Beginsel van de Procedure

Immunohistochemische (IHC) kleuringstechnieken maken de visualisatie van antigenen mogelijk via de sequentiële toepassing van een specifiek antilichaam naar het antigen (primaire antilichaam), het secundaire antilichaam naar het primaire antilichaam en een enzymcomplex met een chromogeen substraat met ingevoegde wasstappen. De enzymatische activering van de chromogeenresultaten in een zichtbaar reactieproduct op de antigene plaats. De monsters kunnen dan tegengekleurd en afgedekt zijn. De resultaten worden geïnterpreteerd met een lichtmicroscoop en hulpmiddelen in de differentiële diagnose van pathofysiologische processen, die wel of niet met een specifiek antigen geassocieerd kunnen worden.

Kloon

δSarc3/12C1

Immunogeen

Synthetische peptide die aminozuur 1-19 aan de N-terminus van de humane delta-sarcoglycaansequentie bevat (Jung D. et al., 1966).

Specificiteit

Humaan delta-sarcoglycaan (35 kD). Vertoont geen reactie met delta-sarcoglycaan in spiercoupes van muizen, ratten, konijnen, honden, kippen, hamsters of varkens. Andere diersoorten zijn niet getest.

Reagentiasamenstelling

NCL-d-SARC is een gelyofiliseerde bovendrijvende weefselkweek die natriumazide bevat als conserveringsmiddel. De gebruiker moet de inhoud van de flacon reconstitueren met het correcte volume van steriel gedistilleerd water, zoals aangegeven op het etiket van de flacon.

Ig-klasse

IgG2a

Totale Proteïneconcentratie

Total Protein

Raadpleeg het etiket op de flacon voor de specifieke totale proteïneconcenstratie.

Antilichaamconcentratie

Groter of gelijk aan 24 mg/L zoals bepaald door ELISA. Raadpleeg het etiket op de flacon voor de specifieke Ig-concenstratie.

Aanbevelingen over het Gebruik

Immunohistochemie (zie **Methodologie**) op ingevroren coupes. Voorgestelde verdunning: 1:25–1:50 gedurende 60 minuten bij 25 °C. Dit is een richtsnoer en gebruikers moeten zelf de voor hen optimale werkverdunning bepalen.

Opslag en Stabiliteit

Sla een niet geopend antilichaam op bij een temperatuur van 2–8 °C. Onder deze condities is er geen significant verlies van de productprestatie tot de expiratiedatum die op het etiket van de flacon staat. Gebruik het product niet meer na de expiratiedatum die op de flacon staat. Het gereconstitueerde antilichaam is minstens twee manden stabiel wanneer het wordt opgeslagen bij een temperatuur van 2–8 °C. Als het product langer moet worden opgeslagen, is het raadzaam dat gedeeltes van het gereconstitueerde antilichaam opgeslagen worden bij een temperatuur van -20 °C (vorstvrije vriezers worden niet aanbevolen). Herhaaldelijke bevriezingen en ontdooiingen moeten voorkomen worden. Bereid het werken met verdunningen voor op de dag dat u ze gebruikt. Laat het systeem direct na gebruik terugkeren naar een temperatuur van 2–8 °C. Opslagcondities andere dan degene die hierboven gespecificeerd zijn, dienen door de gebruiker geverifieerd te.

Voorbereiding van Monsters

Freeze specimen weefsel blokken in isopentaan gekoeld in vloeibare stikstof (zie waarschuwingen en voorzorgen). De monsters hoeven niet verder te fixeren, maar moet worden ingebed in OCT™ verbinding (Sakura, Product No. Tissue-Tek 4583).

Waarschuwingen en Voorzorgsmaatregelen

Novocastra Lyophilised Antibodies

Bevat een mengsel van: Natriumazide (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%). Signaalwoorden: Gevaar.

H302: Schadelijk bij inslikken.
H317: Kan een allergische huidreactie veroorzaken.
H334: Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken.
H411: Giftig voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen.
EUH032: Vormt zeer giftig gas in contact met zuren.

P261: Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden.
P264: Na het werken met dit product handen grondig wassen.
P270: Niet eten, drinken of roken tijdens het gebruik van dit product.
P272: Verontreinigde werkkleding mag de werkruimte niet verlaten.
P273: Voorkom lozing in het milieu.
P280: Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming dragen.
P284: [Bij ontoereikende ventilatie] adembescherming dragen.
P301+312: NA INSLIKKEN: bij onwel voelen een ANTIGIFCENTRUM/arts/raadplegen.
P302+352: BIJ CONTACT MET DE HUID: met veel water en zeep wassen.
P304+340: NA INADEMING: de persoon in de frisse lucht brengen en ervoor zorgen dat deze gemakkelijk kan ademen.
P330: De mond spoelen.
P333+313: Bij huidirritatie of uitslag: een arts raadplegen.
P342+311: Bij ademhalingssymptomen: Een ANTIGIFCENTRUM/arts/raadplegen.
P362+364: Verontreinigde kleding uittrekken en wassen alvorens deze opnieuw te gebruiken.
P391: Gelekte/gemorste stof opruimen.
P501: Zich ontdoen van inhoud/Verpakking afvoeren naar inzamelpunt voor gevaarlijk of bijzonder afval.

Deze reagens is voorbereid van het supernatant van de celkweek. Aangezien het biologisch product is, dient u bij het gebruik ervan voorzichtig te werk te gaan.

Deze reagens bevat natriumazide. Een materiaalveiligheidsblad is op verzoek verkrijgbaar bij www.LeicaBiosystems.com

Raadpleeg de richtlijnen van de lokale of nationale overheid voor het afdanken van potentieel giftige componenten.

Monsters moeten voor en na fixatie worden behandeld als potentiële overdragers van infecties en volgens de juiste voorzorgsmaatregelen worden afgedankt. Dit geldt tevens voor alle materialen die aan de monsters zijn blootgesteld.[1]

Reagentia mogen nooit met de mond worden gepipetteerd. Daarnaast moet contact tussen de huid en het slijmvlies met reagentia en monsters worden vermeden.

Als reagentia of monsters in contact komen met gevoelige gebieden, moet u deze gebieden wassen met een ruime hoeveelheid water. Neem contact op met een arts.

Minimaliseer de kans van microbacteriële contaminatie van reagentia. Als u dit niet doet, kan er een toename van niet-specifieke kleuring optreden.

Incubatietijden of temperaturen die afwijken van degenen die gespecificeerd zijn, kunnen tot onjuiste resultaten leiden. Iedere dergelijke verandering moet door de gebruiker gevalideerd worden.

Kwaliteitscontrole

Verschillen in het verwerken van weefsel en technische procedures in het laboratorium van de gebruiker kunnen zorgen voor een aanzienlijke variabiliteit van de resultaten. Dit vereist een regulier gebruik van bedrijfseigen controles naast de volgende procedures.

De controles moeten verse autopsie-, biopsie-, of chirurgische monsters omvatten, en zo snel mogelijk formaline gefixeerd en in paraffinewax ingebed worden, op dezelfde manier als de patiëntmonster(s).

Positieve Weefselcontrole

Wordt gebruikt om correct voorbereide weefsels en goede kleuringstechnieken aan te duiden.

Er dient een positieve weefselcontrole opgenomen te worden voor iedere set testcondities in iedere kleuringsrun.

Voor een optimale kwaliteitscontrole en voor het detecteren van geringe niveaus van reagensdegredatie, is weefsel met zwakke positieve kleuring beter geschikt dan weefsel met sterke positieve kleuring.[2]

Aanbevolen positief controleweefsel is skeletspierweefsel.

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

Negatieve Weefselcontrole

Dient onderzocht te worden na de positieve weefselcontrole om de specificiteit te verifiëren van de labeling van het doelantigen door het primaire antilichaam.

Aanbevolen negatief controleweefsel is niet bepaald.

Daarnaast leveren de verscheidenheid aan celtypen, die in de meeste weefselcoupes aanwezig zijn, regelmatig negatieve controlelocaties op, maar dit dient door de gebruiker geverifieerd te worden. Niet-specifieke kleuring, indien aanwezig, heeft meestal een diffuus uiterlijk.

Daarnaast kan in coupes sporadische kleuring van bindweefsel worden geobserveerd. Dit treedt op als gevolg van overdadig fixeren van weefsel met formaline. Maak voor de interpretatie van kleuringsresultaten gebruik van intacte cellen. Necrotische of gedegenereerde cellen kunnen vaak een niet-specifieke kleuring vertonen.[3]

Er kan sprake zijn van fout-positieven als gevolg van niet-immunologische binding van eiwitten of substraatreactieproducten. Zij kunnen ook veroorzaakt worden door endogene enzymen zoals pseudoperoxidase (erythrocyten), endogene peroxidase (cytochroom C), of endogene biotine (bijv. lever, borst, hersenen, nieren), afhankelijk van het type immunokleuring dat gebruikt wordt.

Negatieve Reagenscontrole

Gebruik een niet-specifieke negatieve reagenscontrole in plaats van het primaire antilichaam met een coupe van ieder patiëntmonster, om een niet-specifieke kleuring te evalueren en een betere interpretatie te krijgen van de specifieke kleuring op de antigene plaats.

Patiëntweefsel

Onderzoek de gekleurde patiëntmonsters met NCL-d-SARC. De positieve kleuringsintensiteit moet worden geëvalueerd binnen de context van iedere niet-specifieke achtergrondkleuring van de negatieve reagenscontrole. Net zoals bij elke immunohistochemische test betekent een negatief resultaat dat het antigeen niet is gedetecteerd. Het betekent dus niet dat het antigeen afwezig was in de geanalyseerde cellen/het geanalyseerde weefsel. Gebruik een panel van antilichamen om de verkeerd-negatieve reacties te identificeren.

Verwachte Resultaten

Normale Weefsels

Kloon dSarc3/12C1 detecteert het delta-sarcoglycaaneiwit in het sarcolemma van skelet-, hart- en gladdespiervezels.

Abnormale Weefsels

Kloon dSarc3/12C1 is gebruikt bij immunohistochemische studies bij meer dan 850 patiënten ter vaststelling van een tekort aan het met 35 kD dystrofine geassocieerde glycoproteïne delta-sarcoglycaan.

NCL-d-SARC wordt aanbevolen voor de identificatie van humaan delta-sarcoglycaan door middel van immunohistochemie.

Algemene Beperkingen

Immunohistochemie is een diagnoseproces van meerdere stappen dat uit een gespecialiseerde training bestaat in het selecteren van de desbetreffende reagentia; weefselselectie, fixatie en verwerking; voorbereiding van de IHC-objectglaasjes; en de interpretatie van de kleuringsresultaten. Weefselkleuring is afhankelijk van het gebruik en de verwerking van het weefsel vóór het aanbrengen van de kleuring. Een onjuiste manier van fixeren, invriezen, ontdooien, wassen, drogen, verwarmen en opdelen of contaminatie met andere weefsels of vloeistoffen kunnen leiden tot artefacten, het vastzitten van antilichamen of fout-negatieven. Inconsistente resultaten kunnen het gevolg zijn variaties in de methoden die voor het fixeren en inbedden worden gebruikt of van inherente onregelmatigheden binnen het weefsel.[4]

Overmatige of onvolledige tegenkleuring kan een correcte interpretatie van de resultaten in te weg zitten.

De klinische interpretatie van iedere kleuring of de afwezigheid ervan moet worden aangevuld met morfologisch onderzoek en goede controles. De interpretatie moet worden geëvalueerd door een vakkundige patholoog binnen de context van de klinische geschiedenis van de patiënt en eventueel ander diagnostisch onderzoek.

Antilichamen van Leica Biosystems Newcastle Ltd zijn bedoeld voor gebruik, zoals aangegeven, op bevroren of paraffine ingebedde coupes met specifieke fixatie-eisen. Er kan een onverwachte antigenexpressie optreden, met name in neoplasma's. De klinische interpretatie van ieder gekleurde weefselcoupe moet morfologische analyses bevatten en de evaluatie van de juiste controles.

Algemene Literatuurlijst

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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscleeye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Aanpassingen ten opzichte van Vorige Editie

Niet toepasbaar.

Publicatiedatum

18 oktober 2018

Immunohistochemische methodologie voor het gebruik van Novocastra™ antilichamen bij ingevroren spierweefsel.

Benodigde, maar niet inbegrepen reagentia

1. Standaard oplossingen gebruikt in de immunohistochemie.
2. 50 mM Tris-gebufferde zoutoplossing (TBS), pH 7,6.
3. Antilichaamverdunningsmiddel - normaal serum optimaal verdund in TBS.
4. Normaal serum van de soort waarbij het secundaire antilichaam wordt nopgewekt.
5. Secundair peroxidase-geconjugeerd antilichaam - gebruiken volgens de aanbevelingen van de fabrikant.
6. 3,3' diaminobenzidinetetrahydrochloride (DAB) - bereiden en gebruiken volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

7 Inbedmiddel - gebruiken volgens de aanbevelingen van de fabrikant

Benodigde, maar niet inbegrepen apparatuur

1. Incubator ingesteld op 25 °C.
2. Algemene uitrusting van immunohistochemisch laboratorium.
3. Elektrische ventilator voor het met aan lucht drogen van objectglaasjes.

Antigeenhersteloplossingen (zie Aanbevelingen voor het gebruik)

Niet van toepassing op ingevroren coupes.

Methodologie

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

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

1. Snij coupes van 4-10 µm, breng ze aan op objectglaasjes waarop een geschikt weefselhechtmiddel is aangebracht en droog ze ten minste een uur lang aan de lucht.
2. Incubeer de coupes met optimaal verdund primair antilichaam (zie Aanbevelingen voor het gebruik).
3. Was gedurende 2 x 5 minuten in TBS-buffer onder zachtjes wiebelen.
4. Incubeer de coupes in het juiste peroxidase-geconjugeerde secundaire antilichaam.
5. Was gedurende 2 x 5 minuten in TBS-buffer onder zachtjes wiebelen.
6. Incubeer de objectglaasjes in DAB.
7. Spoel de objectglaasjes af met schoon water.
8. Dehydrateer en klaar de coupes en breng ze aan op de objectglaasjes.

Aanpassingen ten opzichte van de vorige uitgave

Niet van toepassing.

Datum uitgave

4 februari 2008 (CE-protocol/ingevroren spierweefsel).

Novocastra™ Lyofilisert Monoklonalt Antistoff Fra Mus Delta-Sarcoglycan
Produktkode: NCL-d-SARC

Tiltenkt Bruk

Til in vitro-diagnostisk bruk.
NCL-d-SARC er tiltenkt for kvalitativ identifisering med lysmikroskopi av delta-sarkoglykan gjennom immunhistokjemi.Den kliniske tolkningen av farge eller manglende farge skal suppleres med morfologiske undersøkelser og bruk av egnede kontroller, og bør evalueres av en kvalifisert patolog i lys av pasientens kliniske historie og eventuelle andre diagnostiske tester.

Prosedyreprinsipp

Immunhistokjemiske (IHC) fargingsteknikker gjør det mulig å se antigener via en sekvensiell tilsetning av et bestemt antistoff mot antigenet (primært antistoff), et sekundært antistoff mot det primære antistoffet og et enzymkompleks med et kromogent substrat med innskutte vasketrinn. Den enzymatiske aktiveringen av kromogenet gir et synlig reaksjonsprodukt på antigenstedet. Prøven kan deretter kontrastfarges og dekkes med et dekkglass. Resultatene fortolkes ved hjelp av et lysmikroskop og medvirker til differensialdiagnose av patofysiologiske prosesser som muligens kan være assosiert med et bestemt antigen.

Klon

δSarc3/12C1

Immunogen

Syntetisk peptid som inneholder aminosyrer 1–19 ved N-terminalen i sekvensen for humant delta-sarkoglykan (Jung D. et al., 1966).

Spesifisitet

Humant delta-sarkoglykan (35 kD). Reagerer ikke med delta-sarkoglykan i snitt av muskel fra mus, rotte, kanin, hund, høne, hamster eller gris. Andre dyrearter er ikke testet.

Reagenssammensetning

NCL-d-SARC er en lyofilisert vevskultursupernatant som inneholder natriumazid som konserveringsmiddel. Brukeren skal rekonstituere innholdet i hetteglasset med riktig mengde sterilt, destillert vann slik det er angitt på produktmerkingen.

Ig-klasse

IgG2a

Totalproteinkonsentrasjon Total Protein

Se etiketten på hetteglasset for lotspesifikk totalproteinkonsentrasjon.

Antistoffkonsentrasjon

Større enn eller tilsvarende 24 mg/l i henhold til ELISA. Se etiketten på hetteglasset for lotspesifikk Ig-konsentrasjon.

Anbefalinger for Bruk

Immunhistokjemi (se **Metode**) på frosne snitt. Foreslått fortynning: 1:25–1:50 i 60 minutter ved 25 °C. Dette er kun veiledende, og brukerne bør fastslå egne optimale fortynninger for sitt arbeid.

Oppbevaring og Stabilitet

Uåpnet antistoff skal oppbevares ved 2–8 °C. Da vil produktytelsen holde seg frem til utløpsdatoen angitt på produktmerkingen. Må ikke brukes etter utløpsdatoen angitt på produktetiketten. Det rekonstituerte antistoffet er stabilt i minst to måneder dersom det oppbevares ved 2–8 °C. For langtidsoppbevaring er det anbefalt at deler av det rekonstituerte antistoffet oppbevares i fryst tilstand ved –20 °C (frostfrie frysere anbefales ikke). Gjentatte fryse- og tinesykluser må unngås. Preparer aktive fortynninger til den dagen de skal brukes. Returneres til 2–8 °C umiddelbart etter bruk. Andre oppbevaringsbetingelser må valideres av brukeren.

Klargjøring av Prøver

Fryse prøve vevsblokker i isopentan kjølt i flytende nitrogen (se Advarsler og forsiktighetsregler). Prøvene krever ikke ytterligere fiksering , men bør være forankret i OCT™ forbindelse (Sakura, Product No. Tissue-Tek 4583).

Advarsler og Forholdsregler

Novocastra Lyophilised Antibodies Inneholder en blanding av: Sodium Azide (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%). Signalord: Fare.	H302: Farlig ved svelging. H317: Kan utløse en allergisk hudreaksjon. H334: Kan gi allergi eller astmasymptomer eller pustevansker ved innånding. H411: Giftig, med langtidsvirkning, for liv i vann. EUH032: Ved kontakt med syrer utvikles meget giftig gass.	P261: Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damp/aerosoler. P264: Vask hender grundig etter bruk. P270: Ikke spis, drikk eller røyk ved bruk av produktet. P272: Tilsølte arbeidsklær må ikke fjernes fra arbeidsplassen. P273: Unngå utslipp til miljøet. P280: Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. P284: Bruk åndedrettsvern. P301+312: VED SVELGING: Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER eller lege ved ubehag. P302+352: VED HUDKONTAKT: Vask med mye såpe og vann. P304+340: VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende hviler i en stilling som letter åndedrettet. P330: Skyll munnen. P333+313: Ved hudirritasjon eller utslett: Søk legehjelp. P342+311: Ved symptomer i luftveiene: Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER eller lege. P362 + p364: Ta av tilsølte klær og vask dem før ny bruk. P391: Samle opp spill. P501: Innhold/Beholder leveres til godkjent avfallsbehandlingsanlegg.

Denne reagensen er laget av supernatanten fra en cellekultur. Dette er et biologisk produkt som må behandles deretter.

Denne reagensen inneholder natriumazid. Dataark om materialsikkerhet (MSDS) er tilgjengelig på forespørsel eller kan lastes ned fra www.LeicaBiosystems.com

Følg nasjonale og lokale forskrifter for avhending av komponenter som kan være giftige.

Prøver (før og etter fiksering) og alt materiale som eksponeres for dem, skal behandles som potensielt smittefarlig og kasseres i samsvar med gjeldende forholdsregler.[1]

Hold aldri pipetter med reagens i munnen, og unngå at hud og slimhinner kommer i kontakt med reagenser og prøver.

Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skal de skylles med rikelig vann. Kontakt lege.

Reduser mikrobiell kontaminering av reagensene til et minimum, ellers kan det forekomme økt uspesifisert farging.

Inkubasjonstider eller temperaturer som er annerledes enn det som er angitt, kan gi unøyaktige resultater. Slike endringer må valideres av brukeren.

Kvalitetskontroll

Forskjeller i behandlingen av vev og forskjeller i tekniske prosedyrer i brukerens laboratorium kan gi signifikant varierte resultater, og det kan være nødvendig å foreta kontroller på stedet i tillegg til prosedyrene angitt nedenfor.
Kontrollene skal være nye autopsi-/biopsi-/kirurgiske prøver, formalinfikserte, behandlede og parafinlagrede så snart som mulig, på samme måte som pasientprøver.

Positiv Vevskontroll

Brukes for å påvise korrekt vevspreparering og fargeteknikker.

Én positiv vevskontroll 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 skjelettmuskulatur.

Hvis den positive vevskontrollen ikke viser positiv farging, skal resultatene til testprøvene anses som ugyldige.

Negativ Vevskontroll

Skal undersøkes etter den positive vevskontrollen for å sikre at det primære antistoffet merker målantigenet spesifikt.

Anbefalt negativt kontrollvev har ikke blitt fastslått.

Alternativt har de mange ulike celletypene som finnes i de fleste vevssnittene ofte negative kontrollsteder, men dette må verifiseres av brukeren. Uspesifikk farging, hvis dette er aktuelt, har ofte et diffust utseende.

Sporadisk farging av bindevev kan på samme måte observeres i snitt fra vev som er fiksert for kraftig i formalin. Bruk intakte celler for å tolke fargeresultatene. Nekrotiske eller degenererte celler kan ofte farges uspesifikt.[3] Falske positive resultater kan skyldes ikke-immunologisk binding av proteiner eller substratreaksjonsprodukter. Dette kan også skyldes endogene enzymer som pseudoperoksidase (erytrocytter), endogen peroksidase (cytokrom C) eller endogent biotin (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre), avhengig av anvendt type immunfarge. For å differensiere endogen enzymaktivitet eller uspesifikk enzymbinding og spesifikk immunreaktivitet kan ytterligere pasientvev eventuelt farges kun med henholdsvis substratkromogen eller enzymkomplekser (avidin-biotin, streptavidin, merket polymer) og substratkromogen. Hvis det skjer spesifikk farging i den negative vevskontrollen, må resultatene for pasientprøvene anses som ugyldige.

Negativ Reagenskontroll

Bruk en uspesifikk negativ reagenskontroll i stedet for det primære antistoffet på et snitt av hver pasientprøve for å vurdere uspesifikk farging og for å muliggjøre bedre fortolkning av spesifikk farging på antigenstedet.

Pasientvev

Undersøk pasientprøver farget med NCL-d-SARC sist. Intensiteten av positiv farging bør vurderes i sammenheng med eventuell uspesifikk bakgrunnsfarging av den negative reagenskontrollen. Som med alle immunhistokjemiske tester, betyr et negativt resultat at antigenet ikke ble påvist, ikke at antigenet var fraværende i de analyserte cellene/vevet. Om nødvendig kan man bruke et panel av antistoffer for å identifisere falske negative reaksjoner.

Forventede Resultater

Normalt Vev

Klon dSarc3/12C1 påviser proteinet delta-sarkoglykan i sarkolemma i skjelett-, hjerte- og glattmuskelfibre.

Abnormalt Vev

Klon dSarc3/12C1 har blitt brukt i immunhistokjemiske studier av mer enn 850 pasienter for å identifisere en mangel på det 35 kD dystrofinassosierte glykoproteinet delta-sarkoglykan.

NCL-d-SARC er anbefalt for identifisering av humant delta-sarkoglykan gjennom immunhistokjemi.

Generelle Begrensninger

Immunhistokjemi er en diagnostisk prosess i flere trinn som omfatter spesialutdanning i valg av egnede reagenser, vevsseleksjon, -fiksering og -behandling samt preparering av IHC-objektglass og tolking av fargeresultater.Vevsfarging avhenger av håndteringen og behandlingen av vevet før fargingen. Feil fiksering, frysing, tining, vasking, tørking, oppvarming, snitting eller kontaminering med annet vev eller væsker kan gi artefakter, innfanging av antistoffer eller falske negative resultater. Inkonsekvente resultater kan skyldes variasjoner ved fiksering eller innstøpningsmetoder eller iboende uregelmessigheter i vevet.[4]

Overdreven eller ufullstendig motfarging kan også gjøre det vanskelig å tolke resultatene riktig.

Den kliniske tolkningen av farge eller manglende farge skal suppleres med morfologiske undersøkelser og bruk av egnede kontroller, og bør evalueres av en kvalifisert patolog i lys av pasientens kliniske historie og eventuelle andre diagnostiske tester.

Antistoffer fra Leica Biosystems Newcastle Ltd skal brukes, som angitt, på enten frosne eller parafinlagrede snitt med spesifikke krav til fiksering. Uventet antigenekspresjon kan forekomme, spesielt i neoplasma. Den kliniske tolkningen av fargede vevssnitt må omfatte morfologiske analyser 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscleeye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Endringer i forhold til Forrige Utgave

Ikke relevant.

Utgivelsesdato

19 oktober 2018

Immunhistokjemisk metode for bruk av Novocastra™-antistoffer på frosset muskelvev.

Nødvendige reagenser som ikke følger med

1. Standard løsemidler som brukes innen immunhistokjemi.
2. 50 mM tris-bufret saltvann (TBS) pH 7,6.
3. Antistoffortynner – normalt serum optimalt fortynnet i TBS.
4. Normalt serum fra artene hvor det sekundære antistoffet er hevet.
5. Sekundært peroksidase-konjugert antistoff – bruk som anbefalt av produsenten.
6. 3,3'-diaminbenzidin-tetrahydroklorid (DAB) – klargjør og bruk som anbefalt av produsenten.
7. Monteringsmedium – bruk som anbefalt av produsenten.

Nødvendig utstyr som ikke følger med

1. Inkubator stilt til 25 °C.
2. Generelt immunhistokjemisk laboratorieutstyr.
3. Elektrisk vifte for lufttørking av objektglass.

Antigen-demaskeringsløsninger (se Anbefalinger for bruk)

Gjelder ikke for frosne snitt.

Metode

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

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

1. Kutt og monter 4–10 µm snitt på objektglass belagt med et egnet vevlim, og lufttørk i minst én time.
2. Inkuber snittene med optimalt fortynnet primært antistoff (se Anbefalinger for bruk).
3. Vask i TBS-buffer i 2 x 5 minutter med forsiktig vugging.
4. Inkuber snittene i egnet peroksidase-konjugert sekundært antistoff.
5. Vask i TBS-buffer i 2 x 5 minutter med forsiktig vugging.
6. Inkuber objektglassene i DAB.
7. Skyll objektglassene i rent vann.
8. Dehydrer, klarer og monter snitt.

Endringer på tidligere utgave

Ikke relevant.

Utstedelsesdato

4. februar 2008 (CE-protokoll / frosset muskelvev).

Novocastra™ Liyofilize Monoklonal Fare Antikor Delta-Sarcoglycan
Ürün Kodu: NCL-d-SARC

Kullanım Amacı

In vitro diagnostik kullanımı için.
NCL-d-SARC, Delta-Sarkoglikan'ın immünohistokimya yoluyla ışık mikroskopisi ile nitel belirlenmesi için amaçlanmıştır.
Herhangi bir boyamanın mevcut olması veya olmaması ile ilgili klinik yorumlama, uygun kontroller kullanılarak morfolojik çalışmalarla tamamlanmalıdır ve hastanın klinik geçmişi ve diğer diagnostik testler kapsamında kalifiye bir patolojist tarafından değerlendirilmelidir.

Prosedür Prensibi

İmmünohistokimyasal (IHC) boyama teknikleri, spesifik bir antikorun antijene (primer antikor), ikincil bir antikorun primer antikora ve bir enzim kompleksinin kromojenik bir substrat ile arada yıkama adımları olacak şekilde sekansiyel olarak uygulanmasıyla antijenlerin görselleştirilmesini sağlar. Kromojenin enzimatik aktivasyonu, antijen bölgede görünür bir reaksiyon prodüktü ile sonuçlanır. Numune bu durumda karşıt boyanabilir ve lamellenebilir. Sonuçlar, bir ışık mikroskopu kullanılarak yorumlanır ve özel bir antijenle birleştirilebilen veya birleştirilemeyen patofizyolojik işlemlerin ayırıcı tanısına yardımcı olur.

Clone

δSarc3/12C1

İmmünojen

İnsan delta-sarkoglikan sekansının N ucundaki 1-19 amino asidi içeren sentetik peptid (Jung D. et al.,1966).

Spesifite

İnsan delta-sarkoglikan (35 kD). Fare, sıçan, tavşan, köpek, tavuk, hamster veya domuz kas kesitlerindeki delta-sarkoglikan ile reaksiyona girmez. Diğer hayvan türleri test edilmemiştir.

Reagent Kompozisyonu

NCL-d-SARC, prezervatif olarak sodyum azit içeren supernatant bir liyofilize doku kültürüdür. Kullanıcı, viyal etiketinde belirtildiği gibi viyal içeriğini doğru steril distile su hacmi ile yeniden oluşturmalıdır.

Ig Sınıfı

IgG2a

Toplam Protein Konsantrasyonu Total Protein

Lota özel toplam protein konsantrasyonu için viyal etiketine başvurun.

Antikor Konsantrasyonu

ELISA tarafından belirlendiği gibi 24 mg/L'ye eşit veya bu değerden yüksek. Lota özel Ig konsantrasyonu için viyal etiketine başvurun.

Kullanım Tavsiyeleri

Donmuş kesitlerde immünohistokimya (bkz **Yöntem**). Önerilen dilüsyon: 25 °C'de 60 dakika için 1:25–1:50. Bu, bir kılavuz olarak sağlanmıştır ve kullanıcılar kendi optimal çalışma dilüsyonlarını kendileri belirlemelidirler.

Saklama ve Dayanıklılık

Açılmamış antikoru 2–8 °C'de saklayın. Bu koşullar altında viyal etiketinin üzerinde belirtilen son kullanım tarihine kadar ürün performansında önemli bir kayıp olmaz. Viyal etiketinin üzerinde belirtilen son kullanım tarihinden sonra kullanmayın. Yeniden oluşturulan antikor, 2–8 °C'de saklandığında en az iki ay boyunca sabit kalır. Uzun süreli saklama için yeniden oluşturulan antikorun alikuotlarının dondurulmuş olarak -20 °C'de saklanması önerilir (buzsuz dondurucular önerilmez). Dondurma ve eritme işlemlerinin tekrarlanmasından kaçınılmalıdır. Çalışma dilüsyonlarını, kullanım gününde hazırlayın. Kullanımdan hemen sonra 2–8 °C'ye dönün. Yukarıda belirtilenlerin dışındaki saklama koşullarının, kullanıcı tarafından kontrol edilmesi gerekir.

Numune Hazırlığı

Sıvı azot içinde soğutulmuş izopentan içinde örnek doku blokları (bkz Uyarılar ve Önlemler) dondurun. numuneler ayrıca tespiti gerektiren yok ama OCT™ bileşik (Sakura, Ürün No. Doku-Tek 4583) gömülü olmalıdır.

Uyarılar ve Önlemler

Novocastra Lyophilised Antibodies

Oluşan bir karışımı içerir: Sodium Azide (<10%), Benzylpenicillin Sodium (<10%), Streptomycin Sulphate (<10%).
Isaret kelimesi: Tehlike.

H302: Yutulmasi halinde sagliga zararlidir.
H317: Alerjik cilt reaksiyonlarina neden olabilir.
H334: Solunum halinde alerji, astim belirtileri veya solunum sikayetlerine neden olabilir.
H411: Uzun vadeli olarak, sudaki organizmalar için toksik.
EUH032: Asit ile temas halinde çok toksik gaz gelistirir.

P261: Toz/duman/gaz/sis/buhar/aerosol solunumundan kaçinininiz.
P264: Kullandiktan sonra ellerinizi iyice yikayiniz.
P270: Kullanim sirasinda yemek yemeyiniz, içecek içmeyiniz veya sigara içmeyiniz.
P272: Kirli is kiyafetlerini isyeri disinda kullanmayiniz.
P273: Çevreye kontrolsüz verilmesinden kaçinininiz.
P280: koruyucu eldiven/koruyucu elbise/göz koruyucu/yüz siperi kullaniniz.
P284: Solunum koruma aleti kullaniniz.
P301+312: YUTMA DURUMUNDA: Kendinizi iyi hissetmiyorsanız bir ZEHIR MERKEZİ / doktora başvurunuz.
P302+352: CILT ILE TEMAS HALINDE: Bol miktarda su ve sabunla yikayiniz.
P304+340: SOLUNUM HALINDE: Temiz havaya çikariniz ve nefes alip vermeyi kolaylastiran bir pozisyon saglayiniz.
P330: Ağzı çalkalayınız.
P333+313: Cilt tahrisinde veya döküntüsünde: Tıbbi tavsiye / bakım alın.
P342+311: Solunum yolu belirtilerinde: ZEHIR DANISMA MERKEZINI arayiniz veya bir doktora basvurunuz.
P362 + p364: Kirlenmiş giysileri çıkarın ve tekrar kullanmadan önce yıkayın.
P391: Yiginti kitleyi kaldiriniz.
P501: Içerik/Kap tehlikeli veya özel atik toplama yerlerinde saglayiniz.

Bu reagent, hücre kültürünün supernatantından hazırlanmıştır confirm. Bu bir biyolojik ürün olduğundan işlem yaparken özel dikkat gerektirir.

Bu reagent, sodyum azit içerir. Talep üzerine veya www.LeicaBiosystems.com'dan bir Material Safety Data Sheet (Malzeme Güvenlik Veri Sayfası) elde edilebilir.

Potansiyel tüm toksik komponentlerin imhası için federal, ulusal veya lokal düzenlemelere başvurun.

Fikse etme işleminden önce ve sonra numuneler ve bunlara maruz kalan tüm materyaller, enfeksiyon yayabilecek gibi ele alınmalı ve doğru önlemler alınarak atığa çıkartılmalıdır.[1]

Reagent'lar asla ağızla pipetlenmemeli ve cildin ve muköz membranların reagent ve numunelerle temasından kaçınılmalıdır.

Reagent veya numunelerin hassas alanlarla temas etmesi durumunda bu alanları bol su ile yıkayın. Doktora başvurun.

Reagent'ların mikrobiyal kontaminasyonunu minimize edin, aksi durumda nonspesifik boyamada bir artış ortaya çıkabilir.

Belirtilenlerin dışında inkübasyon süreleri veya sıcaklıkları, hatalı sonuçlara neden olabilir. Tüm değişiklikler, kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Kalite Kontrol

Kullanıcının laboratuvarındaki doku işleme ve teknik prosedürlerdeki değişiklikler, sonuçlarda önemli farklılıklara neden olabilir ve aşağıdaki prosedürlere ek olarak dahili kontrollerin düzenli şekilde yapılmasını gerektirir.

Kontroller, mümkün olan en kısa sürede ve hasta örneği (örnekleri) ile aynı şekilde formalinle fikse edilmiş, işlenmiş ve parafin mumuna gömülmüş taze otopsi/biyopsi/cerrahi numune olmalıdır.

Pozitif Doku Kontrolü

Doğru hazırlanmış dokuları ve düzgün boyama tekniklerini belirtmek için kullanılır.

Bir pozitif doku kontrolü, her boyama çalıştırmasında test koşullarının her seti için dahil edilmelidir.

Optimal kalite kontrol için ve reagent degradasyonunun minör düzeylerini tespit etmek için zayıf pozitif boyamaya sahip bir doku, güçlü pozitif boyamaya sahip bir dokudan daha uygundur.[2]

Önerilen pozitif kontrol dokusu iskelet kasıdır.

Pozitif doku kontrolü, pozitif boyamayı göstermezse test numuneleri ile elde edilen sonuçlar geçersiz olarak ele alınmalıdır.

Negatif Doku Kontrolü

Pozitif doku kontrolünden sonra hedef antijenin etiketleme spesifitesini primer antikorla kontrol etmek için gerçekleştirilmelidir.

Önerilen negatif kontrol dokusu belirlenmemiştir.

Pek çok doku seksiyonunda bulunan farklı hücre tiplerinin çeşitliliği, genelde negatif kontrol bölgeleri sağlar ancak bu, kullanıcı tarafından kontrol edilmelidir. Nonspesifik boyama, mevcutsa genelde difüz bir görünüme sahiptir.

Bağ dokusu sporadik boyama, aşırı formalinle fikse edilmiş dokulardan seksiyonlarda da gözlemlenebilir. Boyama sonuçlarının yorumlanması için intakt hücreler kullanın. Nekrotik veya dejenere hücreler, genelde belirsiz şekilde boyanabilir.[3]

Yanlış pozitif sonuçlar, substrat reaksiyon ürünleri veya proteinlerin immünolojik olmayan protein bağlanması nedeniyle görülebilir. Bunlar, kullanılan immüno boyamanın tipine bağlı olarak psödoperoksidaz (eritrositler), endojen peroksidaz (sitokrom C) veya endojen biotin (örn. karaciğer, meme, beyin, böbrek) gibi endojen enzimler nedeniyle de ortaya çıkabilir.

Endojen enzim aktivitesini veya enzimlerin nonspesifik bağlanmasını, spesifik immünreaktiviteden ayırt etmek için ilave hasta dokuları, sadece sırasıyla substrat kromojen veya enzim kompleksleriyle (avidin biotin, streptavidin, etiketli polimer) ve substrat kromojen ile boyanabilir. Spesifik boyamanın, negatif doku kontrolünde ortaya çıkması durumunda hasta numuneleri ile elde edilen sonuçlar geçersiz olarak ele alınmalıdır.

Negatif Reagent Kontrolü

Antijen bölgede nonspesifik boyamanın değerlendirilmesi ve spesifik boyamanın daha iyi yorumlanmasını sağlamak amacıyla her hasta numunesinin bir seksiyonu ile primer antikorun yerine bir nonspesifik negatif reagent kontrolü kullanın.

Hasta Dokusu

NCL-d-SARC ile boyanan son hasta numunelerini inceleyin. Pozitif boyama intensitesi, negatif reagent kontrolünün herhangi bir nonspesifik arka plan boyamasının kapsamında değerlendirilmelidir. Herhangi bir immünohistokimyasal test ile negatif bir sonuç, antijenin tespit edilmediği anlamına gelir; antijenin test edilen hücrelerde/dokuda mevcut olmadığı anlamına gelmez. Gerekiyorsa yanlış negatif reaksiyonları belirlemek için bir antikor paneli kullanın.

Öngörülen Sonuçlar

Normal Dokular

Klon dSarc3/12C1, iskelet, kardiyak ve düz kas liflerinin sarkolemmasındaki delta-sarkoglikan proteinini tespit eder.

Anormal Dokular

Klon dSarc3/12C1, 35 kD distrofin-ilişkili glikoprotein, delta-sarkoglikan eksikliğini belirlemek amacıyla 850'den fazla hastanın immünohistokimyasal çalışmalarında kullanılmıştır.

NCL-d-SARC, insan Delta-Sarkoglikanının immünohistokimya yoluyla belirlenmesi için önerilir.

Genel Sınırlamalar

İmmünohistokimya uygun reagent'ların seçilmesinde; dokunun seçilmesi, fikse edilmesi ve işlenmesinde; IHC lamının hazırlanmasında ve boyama sonuçlarının yorumlanmasında uzmanlık eğitimi gerektiren çok adımlı bir diagnostik işlemidir. Doku boyama, boyamadan önce dokunun ele alınması ve işlenmesine bağlıdır. Diğer dokularla veya akışkanlarla hatalı fikse etme, dondurma, eritme, yıkama, kurutma, ısıtma, seksiyonlama veya kontaminasyon artefakt, antikor trapping veya yanlış negatif sonuçlar oluşturabilir. Doku içerisinde fikse etme ve gömme yöntemleri veya inherent aksaklıklar nedeniyle tutarsız sonuçlar ortaya çıkabilir.[4]
Aşırı veya inkomplet karşıt boya, sonuçların doğru yorumlanmasına engel olabilir.
Herhangi bir boyamanın mevcut olması veya olmaması ile ilgili klinik yorumlama, uygun kontroller kullanılarak morfolojik çalışmalarla tamamlanmalıdır ve hastanın klinik geçmişi ve diğer diagnostik testler kapsamında kalifiye bir patolojist tarafından değerlendirilmelidir. Leica Biosystems Newcastle Ltd antikorları, belirtildiği gibi spesifik fikse etme işlemleri gerektiren dondurulmuş veya parafine gömülmüş seksiyonlarda kullanılmak içindir. Özellikle neoplazmalarda beklenmedik antijen ekspresyonu ortaya çıkabilir. Boyanan doku seksiyonunun klinik yorumu, morfolojik analiz ve uygun kontrollerin değerlendirmesini 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscleeye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Önceki Baskıya göre Değişiklikler

Uygulanamaz.

Yayım Tarihi

19 Ekim 2018

Donmuş kas dokusunda Novocastra™ antikorları kullanmak için immünohistokimya yöntemi.

Gereken ama sağlanmayan reaktifler

1. İmmünohistokimyada kullanılan standart çözücüler.
2. 50 mM Tris tamponlu salin (TBS) pH 7,6.
3. Antikor seyreltici - TBS'de optimal olarak seyreltilmiş normal serum.
4. Sekonder antikorun yetiştirilmiş olduğu türlerden normal serum.
5. Sekonder peroksidaz konjuge antikor - üreticinin önerdiği şekilde kullanın.
6. 3,3' Diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) - üreticinin önerdiği şekilde hazırlayın ve kullanın.
7. Monte etme solüsyonu - üreticinin önerdiği şekilde kullanın.

Gereken ama sağlanmayan ekipman

1. 25 °C'ye ayarlı inkübatör.
2. Genel immünohistokimya laboratuvar ekipmanı.
3. Slaytları havayla kurutmak için elektrikli fan.

Antijen geri kazanma solüsyonları (bkz. Kullanım Önerileri)

Donmuş kesitler için geçerli değildir.

Yöntem

Bu yönteme başlamadan önce kullanıcılar immünohistokimya teknikleri konusunda eğitimli olmalıdır.

Antikorlar için optimal dilüsyonları kullanıcıların kendileri belirlemelidir. Aksi belirtilmedikçe tüm adımlar 25 °C'de yapılır.

1. 4–10 µm kesitler halinde kesin ve uygun doku yapışkanıyla kaplı lamlara monte edin ve en az bir saat boyunca havayla kurutun.
2. Kesitleri, optimum şekilde seyreltilmiş primer antikorla inkübe edin (bkz. Kullanım Önerileri).
3. TBS tamponda hafif sallamayla 2 x 5 dakika yıkayın.
4. Kesitleri, uygun peroksidaz konjuge sekonder antikorda inkübe edin.
5. TBS tamponda hafif sallamayla 2 x 5 dakika yıkayın.
6. Slaytları DAB'da inkübe edin.
7. Slaytları temiz suda durulayın.
8. Kesitleri dehidrate edin, saydamlaştırın ve monte edin.

Önceki Sayıdan Değişiklikler

Geçerli değildir.

Yayın Tarihi

4 Şubat 2008 (CE protokolü/Donmuş Kas).

Лиофилизирано мише моноклонално антитяло Novocastra™ Delta-Sarcoglycan

Код на продукта: NCL-d-SARC

Предназначение

За употреба при in vitro диагностика.
Продуктът NCL-d-SARC е предназначен за качествено идентифициране посредством оптична микроскопия на делта-саркогликан чрез имунохистохимия. 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 (IHC) 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 патофизиологични процеси, които може да са или да не са свързани с определен антиген.

Клонинг

δSarc3/12C1

Имуноген

Синтетичен пептид, съдържащ аминокиселини 1 – 19 в N-термина на секвенция човешки делта-саркогликан (Jung D. et al.,1966).

Специфичност

Човешки делта-саркогликан (35 kD). Не реагира с делта-саркогликан в срези на мускул от мишка, плъх, заек, куче, пиле, хамстер и прасе. Не са тествани други животински видове.

Състав на реагента

NCL-d-SARC е лиофилизиран супернатант от тъканна култура, съдържащ натриев азид като консервант. Потребителят трябва да разтвори съдържанието на флакона с точното количество стерилна дестилирана вода, както е указано на етикета на флакона.

Имуноглобулинов клас

IgG2a

Обща концентрация на протеин Total Protein

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

Концентрация на антитела

По-голяма или равна на 24 mg/L. Вижте етикета на флакона относно специфичната за партидата концентрация на имуноглобулин.

Препоръки за употреба

Имунохистохимия (вж **Методология**) върху замразени срези. Предложение за разреждане: 1:25 – 1:50 за 60 минути при температура 25°C. Това е дадено като указание, като потребителите трябва сами да определят техни собствени оптимални работни разреждания.

Съхранение и стабилност

Съхранявайте неотвореното антитяло при температура 2 – 8°C. При тези условия няма съществена загуба в характеристиките на продукта до изтичане на срока на годност, посочен на етикета на флакона. Да не се използва след срока на годност, отбелязан върху етикета на флакона. Разтвореното антитяло е стабилно за най-малко два месеца, когато се съхранява при 2 – 8°C. За дългосрочно съхранение е препоръчително аликвотите на разтвореното антитяло да се съхраняват замразени при -20°C (не се препоръчват фризери със система срещу обледяване). Трябва да се избягва повтарящо се замразяване и размразяване. Подготвяйте работните разтвори в деня на употребата им. Да се върне на температура 2 – 8°C веднага след употреба. Други условия на съхранение, освен посочените по-горе, трябва да бъдат проверени от потребителя.

Подготовка на спесимени

Замразете блокове от тъкан на спесимена в изопентан, охладен в течен азот (вж. Предупреждения и предпазни мерки). Спесимените не изискват допълнителна фиксация, но трябва да се вградят в съединението OCT™ (Sakura, Product No. Tissue-Tek 4583).

Предупреждения и предпазни мерки

Лиофилизирани антитела Novocastra

Съдържа смес от: Натриев азид (<10%), натриев бензилпеницилин (<10%), стрептомицин сулфат (<10%).

Сигнални думи: Опасност.

H302: Вреден при поглъщане.H317: Може да причини алергична кожна реакция.H334: Може да причини алергични или астматични симптоми или затруднения в дишането при вдишване.
H411: Токсичен за водните организми, с дълготраен ефект.
EUH032: При контакт с киселини се отделя силно токсичен газ.

P261: Избягвайте вдишване на прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли.
P264: Измийте ръцете си старателно след употреба.
P270: Да не се яде, пие или пуши при употреба на продукта.
P272: Да не се изнася замърсено работно облекло извън работното помещение.
P273: Да се избягва изпускане в околната среда.
P280: Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.
P284: В случай на лоша вентилация носете респираторни предпазни средства.
P301+312: ПРИ ПОГЛЪЩАНЕ: Ако се чувствате зле, обадете се на ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ /лекар/.
P302+352: ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно със сапун и вода.
P304+340: ПРИ ВДИШВАНЕ: Изведете лицето на чист въздух и го поставете в позиция, улесняваща дишането.
P330: Изплакнете устата.
P333+313: При поява на кожно дразнене или обрив на кожата: Потърсете медицински съвет/помощ.
P342+311: При симптоми на затруднено дишане: Обадете се на ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ/лекар.
P362+364: Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба.
P391: Съберете разлятото.
P501: Съдържанието/контейнерът да се изхвърли в пункт за събиране на опасни или специални отпадъци.

Този реагент е приготвен от супернатант от клетъчна култура. Тъй като е биологичен продукт, необходимо е повишено внимание при работа с него.
Този реагент 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. При контакт на реагенти или спесимени с чувствителни зони измийте зоните с обилно количество вода. Потърсете медицинска помощ.
Свеждайте до минимум микробната контаминация на реагентите, в противен случай може да се появи увеличаване на неспецифичното оцветяване.
Инкубационни времена или температури, различни от посочените, могат да доведат до грешни резултати. Всички подобни промени трябва да бъдат валидирани от потребителя.

Течният азот поради изключително ниската си температура причинява изгаряния и при боравене с него трябва да се носи предпазно облекло, включително ръкавици и маска. Използвайте в добре проветрени помещения.

Изопентанът е лесно възпламеним и вреден при поглъщане и вдишване. Той също така дразни кожата и очите и е наркотичен при висока концентрация.

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, замразени възможно най-бързо по същия начин, като пробата(ите) на пациента(ите).

Позитивна тъканна контрола

Използва се, за да се покажат правилно приготвени тъкани и правилни техники на оцветяване.
Една позитивна тъканна контрола трябва да бъде включена за всеки сет с тестови условия при всяка серия проби за оцветяване.
Тъкан със слабо позитивно оцветяване е по-подходяща от тъкан със силно позитивно оцветяване за оптимален качествен контрол и за откриване на по-малки нива на деградация на реагента.[2]

Препоръчителната тъкан за позитивна контрола е скелетен мускул.
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 белязването на таргетния антиген от първичното антитяло.
Препоръчителната тъкан за негативна контрола не е определена.
Алтернативно, разнообразието от различни видове клетки, присъстващи в повечето тъканни срези, често предлага места за негативна контрола, но това трябва да се провери от потребителя.

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

Негативна контрола на реагента

Използвайте неспецифична негативна контрола на реагента, вместо първичното 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-d-SARC, 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 dSarc3/12C1 открива протеина делта-саркогликан в сарколемата на фибрите на скелетния, сърдечния и гладкия мускул.

Абнормни тъкани

Клонинг dSarc3/12C1 е използван в имунохистохимични изследвания на повече от 850 пациенти, за да се идентифицира дефицит на свързания с 35 kD дистрофин гликопротеин делта-саркогликан.

Продуктът NCL-d-SARC се препоръчва за идентифициране на човешки делта-саркогликан чрез имунохистохимия.

Общи ограничения

Имунохистохимията е многостъпков диагностичен процес, който се състои от специализирано обучение за избор на подходящи реагенти, избор на тъкани, фиксация и обработка, подготовка на IHC 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, срязване или контаминацията с други тъкани или течности може да причини поява на артефакти, блокиране на антителата или фалшиво негативни 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. 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.

11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Изменения на предишно издание

Не е приложимо.

Дата на издаване

13 октомври 2018

Имунохистохимична методология за използване на антитела Novocastra™ на замразена мускулна тъкан.

Необходими, но непредоставени реагенти

1. Стандартни разтворители, използвани с имунохистохимията.
2. 50 mM трометамин-буфериран физиологичен разтвор (TBS) pH 7,6.
3. Разредител за антитела – нормален серум, оптимално разреден в TBS (трометамин-буфериран физиологичен разтвор).
4. Нормален серум от видовете, от които се генерира вторично антитяло.
5. Вторично конюгирано в пероксидаза антитяло – използвайте според препоръките на производителя.
6. 3,3' диаминобензидин тетрахидрохлорид (DAB) – подгответе и използвайте според препоръките на производителя.
7. Микроскопски препарат – използвайте според препоръките на производителя.

Необходимо, но непредоставено оборудване

1. Инкубатор, настроен на температура 25°C.
2. Общо имунихистохимично лабораторно оборудване.
3. Електрически вентилатор за въздушно изсушаване на предметни стъкла.

Разтвори за извличане на антиген (вж. Препоръки за употреба)

Не се прилага към замразени срези.

Методология

Преди прилагането на тази методология потребителите трябва да бъдат обучени за имунохистохимичните техники. Потребителите трябва да определят оптималните разтвори за антитела. Освен ако не е указано друго, всички стъпки се извършват при температура от 25°C.

1. Отрежете и поставете 4 – 10 µm срези върху предметни стъкла, покрити с подходящ тъканен адхезив и сушете с въздух най-малко един час.
2. Инкубирайте срезите с оптимално разредено първично антитяло (вж. Препоръки за употреба).
3. Промийте в трометамин-буфериран физиологичен разтвор (TBS) буфер за 2 x 5 минути, разклащайки внимателно.
4. Инкубирайте срезите в подходящо конюгирано с пероксидаза вторично антитяло.
5. Промийте в трометамин-буфериран физиологичен разтвор (TBS) буфер за 2 x 5 минути, разклащайки внимателно.
6. Инкубирайте предметните стъкла в DAB.
7. Изплакнете предметните стъкла с чиста вода.
8. Дехидрирайте, изчистете и поставете срезите върху предметното стъкло.

Изменения на предишно издание

Не е приложимо.

Дата на издаване

4 февруари 2008 г. (CEprotocol/Frozen Muscle).

Novocastra™ liofilizált egér monoklonális antitest Delta-Sarcoglycan

Termékkód: NCL-d-SARC

Alkalmazási terület

In vitro diagnosztikai használatra.
Az NCL-d-SARC a delta-szarkoglikán immunhisztokémia segítségével történő fénymikroszkópiájának az alkalmazásával végrehajtott kvalitatív azonosítására szolgál. Minden festődés meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését morfológiai vizsgálatokkal és megfelelő kontrollokkal kell kiegészíteni, valamint az értékelést a beteg klinikai kórtörténete és egyéb diagnosztikai vizsgálatok figyelembevételével, képzett patológusnak kell elvégeznie.

Az eljárás elve

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

Klón

δSarc3/12C1

Immunogén

A humán delta-szarkoglikán szekvencia N-terminusánál az 1-től 19-ig terjedő aminosavakból álló szintetikus peptid. (Jung D. et al., 1966).

Specificitás

Humán delta-szarkoglikán (35 kD). Nem lép reakcióba az egér-, patkány-, nyúl-, kutya-, csirke-, aranyhörcsög-, illetve sertés-izommetszetekben található delta-szarkoglikánnal. Más állatfajokat nem vizsgáltunk.

A reagens összetétele

Az NCL-d-SARC egy tartósítószerként nátrium-azidot tartalmazó liofilizált szövetkultúra felülúszó. A felhasználónak újra kell oldania az injekciós üveg tartalmát steril desztillált víz megfelelő mennyiségével az injekciós üveg címkéjén feltüntetettek szerint.

Ig-osztály

IgG2a

Összfehérje-koncentráció Total Protein

A sarzsspecifikus összfehérje-koncentrációt lásd az üveg címkéjén.

Antitest-koncentráció

Legalább 24 mg/l. A sarzsspecifikus Ig-koncentrációt lásd az üveg címkéjén.

Felhasználási javaslatok

Immunhisztokémia (lásd **Módszertan**) a fagyasztott metszeteken. Javasolt hígítás: 1:25–1:50, 60 percen át, 25 °C-on. Az adatok csak útmutatásul szolgálnak, a felhasználóknak kell meghatározniuk saját optimális munkaoldataikat.

Tárolás és stabilitás

A bontatlan antitestet 2–8 °C-on kell tárolni. Ilyen körülmények között nem jelentkezik jelentős veszteség a termék teljesítményében, egészen az injekciós üveg címkéjén feltüntetett lejárati dátumig. Ne használja az üveg címkéjén feltüntetett lejárati dátum után.
Az újraoldott antitest 2–8 °C-on tárolva legalább két hónapig stabil. Hosszú távú tároláskor ajánlott az újraoldott antitest aliquotjait fagyasztva tárolni -20 °C-on (nem javasolt a jegesedésmentes hűtőszekrények alkalmazása). Mindenképpen kerülendő az ismételt fagyasztás és olvasztás. A munkaoldatokat a felhasználás napján kell elkészíteni. Felhasználás után azonnal tegye vissza 2–8 °C közötti hőmérsékletre. A fentiekben előírtaktól eltérő tárolási feltételeket a felhasználónak ellenőriznie kell.

A minták előkészítése

A szövetmintát tartalmazó blokkokat olyan izopentánban kell fagyasztani, amelyet folyékony nitrogénben hűtöttek (lásd itt: Figyelmeztetések és óvintézkedések). A minták nem igényelnek további fixálást, de azokat OCT™ vegyületbe kell ágyazni (Sakura; cikkszám: Tissue-Tek 4583).

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Novocastra liofilizált antitestek

A következőkből álló keveréket tartalmazza: Nátrium-azid (<10%), benzilpenicillin-nátrium (<10%) sztreptomicin-szulfát (<10%).

Jelzőszók: Veszély.

H302: Lenyelve ártalmas.
H317: Allergiás bőrreakciót válthat ki. H334: Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat.
H411: Mérgező a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.
EUH032: Savval érintkezve nagyon mérgező gázok képződnek.

P261: Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését.
P264: A használatot követően a kezet alaposan meg kell mosni.
P270: A termék használata közben tilos enni, inni vagy dohányozni.
P272: Szennyezett munkaruhát tilos kivinni a munkahely területéről.
P273: Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását.
P280: Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.
P284: Nem megfelelő szellőzés esetén légzésvédelem kötelező.
P301+312: LENYELÉS ESETÉN: Rosszullét esetén forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.
P302+352: HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő szappanos vízzel.
P304+340: BELÉLEGZÉS ESETÉN: Az érintett személyt friss levegőre kell vinni és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni.
P330: A szájat ki kell öblíteni.
P333+313: Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni.
P342+311: Légzési problémák esetén: Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.
P362+364: A szennyezett ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni.
P391: A kiömlött anyagot össze kell gyűjteni.
P501: A tartalom/edény elhelyezése hulladékként: a veszélyes vagy különleges hulladékok gyűjtőhelyén.

Ez a reagens a sejtkultúra felülúszójából készült. Mivel biológiai termék, kezelésekor észszerű körültekintéssel kell eljárni.
Ez a reagens nátrium-azidot tartalmaz. Az anyagbiztonsági adatlapot igény esetén rendelkezésre bocsátjuk, vagy elérheti a www.LeicaBiosystems.com weboldalon.
Minden potenciálisan toxikus összetevő ártalmatlanításával kapcsolatban kövesse a szövetségi, állami és helyi előírásokat.
A mintákat fixálás előtt és után, valamint a velük érintkező összes anyagot fertőzések terjesztésére képes anyagként kell kezelni, és megfelelő körültekintéssel kell ártalmatlanítani.[1] Soha ne pipettázza szájjal a reagenseket, továbbá kerülje a bőr és a nyálkahártyák érintkezését a reagensekkel és a mintákkal. Ha a reagensek vagy minták érzékeny területtel érintkeznek, bő vízzel mossa le az érintett területet. Forduljon orvoshoz.
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.

A folyékony nitrogén, rendkívül hideg hőmérséklete következtében, égési sérülést okoz, ezért kezelésekor – a kesztyűt és szemellenzőt is beleértve – kell használni. Csak jól szellőzött területen szabad használni.

Az izopentán fokozottan tűzveszélyes, lenyelve és belélegezve pedig káros. A bőrt és a szemet is izgatja, nagy koncentrációban pedig kábító hatású.

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.
A kontrollok legyenek friss boncolási/biopsziás/sebészeti minták, amelyeket – amint lehet – ugyanúgy fagyasztottak, mint a betegmintá(ka)t.

Pozitív szövetkontroll

A megfelelő szövet-előkészítés és festési technikák ellenőrzésére használatos.
Minden tesztelési körülményegyüttes 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 vázizom.
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 kontrollszövetet még nem határoztuk meg.
Ezenkívül a legtöbb szövetmetszetben 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 szórványos 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. Okozhatják ezt olyan endogén enzimek is, mint a pszeudoperoxidáz (eritrociták), endogén peroxidáz (citokróm C), illetve endogén biotin (pl. máj, mell, agy, vese), az alkalmazott immunmegfestés típusától függően. Az endogén enzim aktivitásának vagy az enzimek nem specifikus kötődésének a specifikus immunreakciótól való megkülönböztetésére további betegszövetek festhetők kizárólag szubsztrát–kromogén oldattal vagy enzimkomplexekkel (avidin-biotin, sztreptavidin, jelölt

polimer) és szubsztrát–kromogénnel. Ha a negatív 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-d-SARC reagenssel festett betegmintákat vizsgálja meg utolsóként. A pozitív festődés intenzitását a negatív reagenskontroll esetleges nem specifikus háttérfestődésének viszonylatában értékelje. Mint minden immunhisztokémiai vizsgálatnál, a negatív eredmény azt jelenti, hogy az antigén nem volt kimutatható, nem pedig azt, hogy az antigén nem volt jelen a vizsgált sejtekben/szövetben. Szükség esetén az álnegatív reakciók azonosítására használjon antitestpanelt.

Várható eredmények

Normál szövetek

A dSarc3/12C1 klón érzékeli a delta-szarkoglikán fehérjét a váz-, szív- és simaizomrostok szarkolemmájában.

Kóros szövetek

A dSarc3/12C1 klónt több mint 850 beteg immunhisztokémiai vizsgálata során alkalmaztuk a disztrofinhoz kapcsolható 35 kD glikoprotein, vagyis a delta-szargoglikán hiányának az azonosításához.

Az NCL-d-SARC-t javasoljuk a humán delta-szarkoglikán immunhisztokémia segítségével történő azonosítására.

Általános korlátozások

Az immunhisztokémia több lépésből álló diagnosztikai folyamat, amely a következőket foglalja magában: speciális képzés alapján a megfelelő reagensek 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, fagyasztás, olvasztás, mosás, szárítás, melegítés, metszetkészítés vagy a más szövetekkel, illetve folyadékokkal történő szennyezés csökkentheti műtermékeket, az antitestek csapdába kerülését, illetve hamis negatív eredményeket produkálhat. 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Módosítások az előző változathoz képest

Nem alkalmazható.

Kiadás dátuma

19 október 2018

A Novocastra™ antitestek fagyasztott izomszöveten történő felhasználásának immunhisztokémiai módszere.

Szükséges, de nem biztosított reagensek

1. Az immunhisztokémiában alkalmazott standard oldószerek.
2. 50 mM tris-pufferelt sóoldat (Tris-buffered saline, TBS), pH 7,6.
3. Antitesthígító – TBS-ben optimálisan hígított normál szérum.
4. Azokból a fajokból származó normál szérum, amelyekben a másodlagos antitest termelődött.
5. Másodlagos, peroxidázzal konjugált antitest – használata a gyártó javaslatának megfelelően történik.
6. 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid (DAB) – a gyártó javaslatának megfelelően készítendő el és használandó fel.
7. Fedőanyag – a gyártó javaslatának megfelelően használandó.

Szükséges, de nem biztosított felszerelés

1. 25 °C-ra beállított inkubátor.
2. Általános immunhisztokémiai laboratóriumi felszerelés.
3. Elektromos ventilátor a tárgylemezek levegőn történő szárításához.

Antigénfeltáró oldatok (lásd itt: Felhasználási javaslatok)

Fagyasztott metszeteknél nem alkalmazható.

Módszer

A módszer végrehajtása előtt a felhasználóknak képzésben kell részesülniük az immunhisztokémiai módszerekkel kapcsolatban.
A felhasználóknak kell meghatározniuk az optimális antitesthígításokat. Ha nincs másként feltüntetve, minden lépést 25 °C-on kell végrehajtani.

1. Készítse el és tegye fel alkalmas szövegragasztóval bevont tárgylemezekre, majd szárítsa levegőn legalább egy órán át a 4–10 µm-es metszeteket.
2. Optimálisan hígított elsődleges antitesttel inkubálja a metszeteket (lásd Felhasználási javaslatok).
3. Finoman rázogatva mossa őket 2 x 5 percig TBS pufferben.
4. Peroxidázzal megfelelően konjugált másodlagos antitestben inkubálja a metszeteket.
5. Finoman rázogatva mossa őket 2 x 5 percig TBS pufferben.
6. Inkubálja a tárgylemezeket DAB-ben.
7. Öblítse le a tárgylemezeket tiszta vízben.
8. Víztelenítse és tisztítsa meg a metszeteket, majd helyezze őket tárgylemezre.

Módosítások az előző változathoz képest

Nem alkalmazható..

Kiadás dátuma

2008. február 4. (CE-protokoll/fagyasztott izomszövet).

Novocastra™ Anticorp monoclonal liofilizat de șoarece Delta-Sarcoglycan

Cod produs: NCL-d-SARC

Utilizare prevăzută

Pentru diagnosticare in vitro.

NCL-d-SARC este conceput pentru identificarea calitativă prin microscopia optică a delta-sarcoglicanului în imunohistochimie. 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

Tehnicile 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

δSarc3/12C1

Imunogen

Peptidă sintetică ce conține aminoacizii 1-19 la terminalul N al secvenței delta-sarcoglicanului uman (Jung D. et al.,1966).

Specificitate

Delta-sarcoglican uman (35kD). Nu reacționează cu delta-sarcoglicanul în secțiunile musculare provenite de la șoarece, șobolan, iepure, câine, pui, hamster sau porc. Alte specii de animale nu au fost testate.

Compoziția reactivului

NCL-d-SARC este un supernatant de cultură tisulară liofilizat, care conține azidă de sodiu drept conservant. Utilizatorul trebuie să reconstituie conținutul flaconului cu volumul corect de apă distilată sterilă, așa cum se indică pe eticheta flaconului.

Clasa Ig

IgG2a

Concentrație proteină totală Total Protein

Consultați eticheta flaconului pentru concentrația proteinelor totale specifică lotului.

Concentrație anticorpi

Mai mare decât sau egală cu 24 mg/L. Consultați eticheta flaconului pentru concentrația Ig specifică lotului.

Recomandări privind utilizarea

Imunohistochimie (consultați **Metodologie**) pe secțiuni congelate. Diluție sugerată: 01:25–1:50 timp de 60 minute la 25 °C. Aceste informații sunt furnizate cu rol de îndrumare, iar utilizatorii trebuie să-și stabilească singuri propriile diluții de lucru optime.

Depozitare și stabilitate

A se depozita anticorpul nedeschis la 2–8 °C. În aceste condiții, nu există o pierdere semnificativă a performanței produsului până la data de expirare indicată pe eticheta flaconului. A nu se utiliza după data expirării indicată pe eticheta flaconului. Anticorpul reconstituit este stabil timp de cel puțin două luni atunci când este depozitat la 2–8 °C. Pentru depozitarea pe termen lung, se recomandă ca alicotele de anticorp reconstituit să fie depozitate congelate la -20 °C (nu se recomandă congelatoarele fără gheață). Trebuie să se evite congelarea și dezghețarea repetate. Preparați diluțiile de lucru în ziua utilizării. A se returna la 2–8 °C imediat după utilizare. Alte condiții de depozitare decât cele specificate mai sus trebuie verificate de către utilizator.

Pregătirea specimenului

Congelați blocurile de probă tisulară în izopentan înghețat în nitrogen lichid (consultați Avertismente și precauții). Specimenele nu necesită fixarea suplimentară, dar trebuie încorporate în compusul OCT™ (Sakura, nr. produs Tissue-Tek 4583).

Avertismente și precauții

Novocastra Anticorpi liofilizaţi

Conține un amestec de: azidă de sodiu (<10%), benzilpenicilină sodică (<10%), sulfat de streptomicină (<10%).

Cuvinte de avertizare: Pericol.

H302: Nociv în caz de înghiţire.H317: Poate provoca o reacţie alergică a pielii.
H334: Poate provoca simptome de alergie sau astm sau dificultăţi de respiraţie în caz de inhalare.
H411: Toxic pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung.
EUH032: În contact cu acizi degajă un gaz foarte toxic.

P261: Evitați să inspirați praful/fumul/gazul/ceața/ vaporii/spray-ul.
P264: Spălați-vă bine mâinile după manipulare.
P270: A nu mânca, bea sau fuma în timpul utilizării produsului.
P272: Nu scoateți îmbrăcămintea de lucru contaminată în afara locului de muncă.
P273: Evitați dispersarea în mediu.
P280: Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/ echipament de protecție a feței.
P284: În cazul în care ventilarea este insuficientă, purtați echipament de protecție respiratorie.
P301+312: ÎN CAZ DE ÎNGHIȚIRE: Sunați la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau un medic, dacă nu vă simțiți bine.
P302+352: ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA: Spălați cu multă apă și săpun.
P304+340: ÎN CAZ DE INHALARE: Transportați victima la aer liber și mențineți-o în stare de repaus, într-o poziție confortabilă pentru respirație.
P330: Clătiți gura.
P333+313: În caz de iritare a pielii sau de erupție cutanată: Consultați medicul.
P342+311: În caz de simptome respiratorii: Sunați la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau un medic.
P362+364: Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare.
P391: Colectați scurgerile de produs.
P501: Eliminați conținutul/recipientul la punctul de colectare pentru deșeuri periculoase sau speciale.

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 poate fi obținută de pe site-ul www.LeicaBiosystems.com
Consultați reglementările naționale, județene sau locale pentru informații privind eliminarea tuturor componentelor potențial toxice.
Specimenele, înainte și după fixare, precum și toate materialele expuse la acestea, trebuie manipulate ca și când ar avea potențialul de a transmite infecții și trebuie eliminate la deșeuri luând măsurile de precauție adecvate.[1] Nu pipetați niciodată reactivii pe gură 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.

Nitrogenul lichid, date fiind temperaturile sale excesiv de scăzute, poate cauza arsuri și trebuie să se utilizeze îmbrăcăminte de protecție, incluziv mănuși și vizieră, la manevrarea sa. Utilizați într-o zonă ventilată corespunzător.

Izopentantul este puternic inflamabil și nociv în cazul ingerării și inhalării. De asemenea, este iritant pentru tegumente și ochi și are efect narcotic în concentrații mari.

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, congelate cât mai curând posibil și în aceeași manieră ca și probele pacientului.

Țesutul de control pozitiv

Folosit pentru a indica țesuturile pregătite corect și tehnicile de colorare adecvate.
O probă de țesut de control pozitiv trebuie să fie inclusă pentru fiecare set de condiții de testare în fiecare etapă de colorare.
Un țesut cu colorare pozitivă slabă este mai adecvat decât un țesut cu colorare pozitivă puternică în vederea unui control optim al calității și pentru a detecta nivelurile minore de degradare a reactivului.[2]

Țesutul de control pozitiv recomandat este mușchiul scheletic.
Dacă țesutul de control pozitiv nu demonstrează coloraţia pozitivă, rezultatele obținute cu acele probe de testare trebuie considerate nevalide.

Țesutul de control negativ

Trebuie examinat după țesutul de control pozitiv pentru a verifica specificitatea informațiilor de etichetare ale antigenului țintă în funcție de anticorpul primar.
Țesutul de control negativ recomandat nu a fost stabilit.
Ca alternativă, varietatea de tipuri diferite de celule prezente în majoritatea secțiunilor tisulare oferă frecvent locuri de control negativ, dar acest lucru trebuie verificat de către utilizator.
Colorația nespecifică, dacă este prezentă, are, de obicei, un aspect difuz. Colorația sporadică a țesutului conjunctiv poate fi observată, de asemenea, în secțiuni de țesuturi fixate în mod excesiv în formalină. Folosiți celule intacte pentru interpretarea rezultatelor de colorare. Celulele necrotice sau degenerate se colorează deseori într-un mod nespecific.[3] Se pot observa rezultate fals pozitive ca urmare a legării non-imunologice 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 enzimatice (avidină-biotină, streptavidină, polimer etichetat) și substrat-cromogen. În cazul în care colorația specifică are loc în țesutul de control negativ, rezultatele obținute pe probele pacientului trebuie să fie considerate nevalide.

Reactivul de control negativ

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

Țesutul pacientului

Examinați probele pacientului colorate cu NCL-d-SARC 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 dSarc3/12C1 detectează proteina delta-sarcoglican în sarcolemul fibrelor mușchilor scheletici, cardiaci și netezi.

Țesuturi anormale

Clona dSarc3/12C1 s-a utilizat în studiile imunohistochimice efectuate la peste 850 de pacienți pentru identificarea unei deficiențe a glicoproteinei asociate distrofinei 35kD, delta-sarcoglican.

NCL-d-SARC este recomandat pentru identificarea delta-sarcoglicanului uman prin imunohistochimie.

Limitări generale

Imunohistochimia este un proces de diagnostic cu mai multe etape, care constă din instruirea specializată în ceea ce privește alegerea reactivilor adecvați; alegerea, fixarea și procesarea țesutului; prepararea lamei IHC; și interpretarea rezultatelor de colorare.
Colorarea tisulară depinde de manipularea și procesarea țesutului înainte de colorare. Fixarea, congelarea, dezghețarea, spălarea, uscarea, încălzirea, secționarea necorespunzătoare sau contaminarea cu alte țesuturi ori fluide poate 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Amendamente la ediția anterioară

Nu este cazul.

Data publicării

19 octombrie 2018

Metodologie de imunohistochimie pentru utilizarea anticorpilor Novocastra™ pe țesut muscular congelat.

Reactivi necesari care nu sunt însă furnizați

1. Solvenți standard folosiți în imunohistochimie.
2. soluție salină tamponată cu trometamină (SSTT) 50 mM, pH 7,6.
3. Diluant anticorp - ser normal optim diluat în TBS.
4. Ser normal de la speciile în care a fost crescut anticorpul secundar.
5. Anticorp secundar conjugat cu peroxidază - utilizați conform recomandărilor producătorului.
6. 3,3' tetrahidroclorură de diaminobenzidină (DAB) - pregătiți și utilizați conform recomandărilor producătorului.
7. Mediu de montare - a se utiliza conform recomandărilor producătorului.

Echipamente necesare care nu sunt însă furnizate

1. Incubator setat la 25 °C.
2. Echipament de laborator general pentru imunohistochimie.
3. Ventilator electric pentru uscarea la aer a lamelor.

Soluții de recuperare a antigenului (consultați Recomandări de utilizare)

Nu este cazul pentru secțiunile congelate.

Metodologie

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

1. Tăiați și montați secțiuni de 4–10 µm pe lamele acoperite cu un adeziv tisular adecvat și uscați la aer timp de cel puțin o oră.
2. Incubați secțiunile cu anticorp primar diluat optim (a se vedea Recomandări de utilizare).
3. Spălați în soluție tampon SSTT timp de 2 x 5 minute, înclinându-le ușor de-o parte și de cealaltă.
4. Incubați secțiunile în anticorpul secundar conjugat cu peroxidază adecvat.
5. Spălați în soluție tampon SSTT timp de 2 x 5 minute, înclinându-le ușor de-o parte și de cealaltă.
6. Incubați lamele în DAB.
7. Clătiți lamele în apă curată.
8. Deshidratați, curățați și montați secțiunile.

Amendamente la ediția anterioară

Nu este cazul.

Data publicării

4 februarie 2008 (CEprotocol/Mușchi congelat).

Лиофилизированная форма моноклональных антител мыши Novocastra™ Delta-Sarcoglycan

Код продукта: NCL-d-SARC

Назначение

Для диагностики in vitro

Препарат NCL-d-SARC предназначен для качественной идентификации Delta-Sarcoglycan методом световой микроскопии при иммуногистохимическом анализе. 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

δSarc3/12C1

Иммуноген

Синтетический пептид, содержащий аминокислоты 1–19 в N-концевой области последовательности дельта-саркогликана человека (Юнг Д. (Jung D.) и соавт.,1966).

Специфичность

Дельта-саркогликан человека (35 кД). Не реагирует с дельта-саркогликаном в срезах мышц мыши, крысы, кролика, собаки, курицы, хомяка или свиньи. Испытания на других видах животных не проводили.

Состав реактива

NCL-d-SARC является супернатантом лиофилизированной культуры тканей, содержащим азид натрия в качестве консерванта. Пользователю необходимо <u>развести содержимое виалы правильным объемом стерильной дистиллированной воды согласно указаниям на этикетке виалы.</u>

Класс иммуноглобулинов

IgG2a

Общая концентрация белка Total Protein

Общая концентрация белка в каждой партии указана на этикетке флакона.

Концентрация антитела

Концентрация выше или эквивалентна 24 мг/л. Концентрация иммуноглобулина, соответствующая данной серии, указана на этикетке флакона.

Рекомендации по применению

Иммуногистохимия замороженных срезов (смотрите **Методология**). Рекомендуемое разведение: 1:25–1:50 в течение 60 минут при температуре 25 °C. Данная информация носит рекомендательный характер, и пользователям следует самостоятельно определять оптимальные рабочие разведения.

Хранение и стабильность

Хранить неоткрытое антитело при температуре 2–8 °C. В этих условиях не происходит значительного ухудшения характеристик продукта вплоть до истечения срока годности, указанного на этикетке виалы. Не использовать после указанной на этикетке флакона даты истечения срока годности. Разведенное антитело стабильно в течение минимум двух месяцев при хранении при 2–8 °C. При необходимости длительного хранения рекомендуется хранить аликвоты разведенного антитела замороженными при температуре -20 °C (не рекомендуется использовать низкотемпературные холодильники с необмерзающим испарителем). Необходимо избегать повторного замораживания и оттаивания. Приготавливать рабочие разведения в день использования. После использования незамедлительно вернуть на хранение при температуре 2–8 ˚C. Условия хранения, отличающиеся от указанных выше, должны быть проверены пользователем.

Подготовка образцов

Замороженные образцы ткани блокируются в изопентане, охлажденном в жидком азоте (см. раздел «Предупреждения и меры предосторожности»). Образцам не требуется дальнейшая фиксация, но они должны быть залиты в раствор OCT™ (Sakura, изделие № Tissue-Tek 4583).

Предупреждения и меры предосторожности

Лиофилизированные антитела Novocastra

Содержит смесь веществ: натрия азид (<10 %), бензилпенициллина натриевая соль (<10 %), стрептомицина сульфат (<10 %).

Сигнальное слово: Опасно.

H302: Вредно при проглатывании.
H317: Может вызвать аллергическую реакцию на коже. H334: При вдыхании может вызывать аллергические реакции, астматические симптомы или затруднение дыхания.
H411: Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями.
EUH032: При контакте с кислотой выделяется высокотоксичный газ.

P261: Не вдыхайте пыль, дым, газ, туман, пары, распыления.
P264: После обращения с веществом тщательно вымойте руки.
P270: При использовании данной продукции не курите и не употребляйте пищу и напитки.
P272: Загрязненную рабочую одежду не следует выносить за пределы рабочего места.
P273: Избегайте выбросов в окружающую среду.
P280: Используйте защитные перчатки, защитную одежду, защиту глаз и лица.
P284: В случае недостаточного проветривания используйте средства защиты органов дыхания.
P301+312: В СЛУЧАЕ ПРОГЛАТЫВАНИЯ: При недомогании немедленно обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или за медицинской помощью.
P302+352: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: Промойте большим количеством воды с мылом.
P304+340: ПРИ ВДЫХАНИИ: Переместите пострадавшего на свежий воздух и обеспечьте комфортные условия для дыхания.
P330: прополощите рот.
P333+313: В случае возникновения раздражения кожи или высыпания: обратитесь за медицинской помощью.
P342+311: Если отмечаются признаки поражения дыхательной системы: Обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или за медицинской помощью.
P362+364: Снимите загрязненную одежду и выстирайте перед повторным использованием.
P391: Соберите пролитый материал.
P501: Утилизируйте содержимое/контейнер в пункте, предназначенном для сбора специальных или опасных отходов.

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.

Жидкий азот из-за чрезмерно низкой температуры может привести к ожогам, поэтому при работе с ним обязательно надевайте средства индивидуальной защиты, включая перчатки и защиту для лица. Используйте его в хорошо проветриваемом помещении.

Изопентан является легковоспламеняющимся веществам, а также опасным для здоровья при проглатывании и вдыхании. Он также вызывает раздражения кожи и глаз, наркотическое воздействие при использовании в больших количествах.

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 внутрилабораторных контролей в дополнение к указанным ниже процедурам.
В качестве контролей следует использовать свежие образцы, полученные при аутопсии, биопсии или хирургических процедурах, замороженными как только 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 скелетных мышц.
При отсутствии положительного окрашивания ткани, использующейся 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.
Рекомендованная ткань для отрицательного контроля еще не определена.
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 C) 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 иммунореактивности, 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-d-SARC, в последнюю очередь. Интенсивность положительного окрашивания следует оценивать с учетом любого неспецифического фонового окрашивания отрицательного контроля реактива. Как и при любом иммуногистохимическом исследовании, отрицательный результат означает необнаружение антигена, но не его отсутствие в исследованных клетках или ткани. При необходимости следует использовать панель антител для выявления ложноотрицательных реакций.

Ожидаемые результаты

Нормальные ткани
Клон dSarc3/12C1 обнаружил белок дельта-саркогликан в сарколемме скелетных, сердечных и гладкомышечных волокон.

Патологически измененные ткани
Клон dSarc3/12C1 использовался в иммуногистохимических исследованиях при участии свыше 850 пациентов, чтобы определить недостаточность 35 кД дистрофин-ассоциированного гликопротеина, дельта-саркогликана.

NCL-d-SARC рекомендуется для идентификации Delta-Sarcoglycan человека методом иммуногистохимического анализа.

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. 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.

6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Дополнения к предыдущему выпуску

Не применимо.

Дата выпуска

19 октября 2018

Иммуногистохимические методы использования антител Novocastra™ на замороженных мышечных тканях.

Необходимые реактивы, не входящие в комплект поставки

1. Стандартные растворители, использующиеся в иммуногистохимических исследованиях.
2. 50 мМ трис-буферный солевой раствор (Tris-buffered saline (TBS)), pH 7,6.
3. Разбавитель антител — нормальная сыворотка, оптимально разведенной в TBS.
4. Нормальная сыворотка, полученная от видов, использующихся для формирования вторичных антител.
5. Вторичные пероксидаз-конъюгированные антитела: использовать в соответствии с рекомендациями производителя.
6. 3,3'-Диаминобензидина тетрагидрохлорид (DAB): приготовить и использовать в соответствии с рекомендациями производителя.
7. Среда для заливки препаратов: используйте в соответствии с рекомендациями производителя.

Необходимое оборудование, не входящее в комплект поставки

1. Инкубатор, установленный на 25 °C.
2. Стандартное лабораторное оборудование для иммуногистохимических исследований.
3. Электрический вентилятор для воздушной просушки предметных стекол.

Растворы для демаскировки антигенов: см. рекомендации по использованию

Не применимо к замороженным срезам.

Методика

Прежде чем применять эту методику, пользователи должны научиться проводить иммуногистохимические исследования. Пользователи должны определить оптимальные разведения препаратов антител. Если не указано иное, выполняйте все этапы при температуре 25 ˚C.

1. Срежьте и поместите срезы размером 4–10 мкм на предметные стекла, покрытые подходящей тканью, и выполняйте воздушную просушку в течение как минимум одного часа.
2. Инкубируйте срезы с использованием оптимально разведенных первичных антител (смотрите Рекомендации по использованию).
3. 2 раза по 5 минут промывайте препараты в буферном растворе TBS, осторожно покачивая.
4. Инкубируйте срезы с использованием соответствующих вторичных пероксидаз-конъюгированных антител.
5. 2 раза по 5 минут промывайте препараты в буферном растворе TBS, осторожно покачивая.
6. Инкубируйте предметные стекла с использованием DAB.
7. Промойте предметное стекло чистой водой.
8. Дегидратируйте, очистите и закрепите срезы.

Дополнения к предыдущему выпуску

Не применимо.

Дата выпуска

4 февраля 2008 г. (CEprotocol/Замороженная мышца).

Liofilizowane mysie przeciwciało monokloidalne Novocastra™ Delta-Sarcoglycan

Kod produktu: NCL-d-SARC

Przeznaczenie

Do diagnostyki in vitro.

Preparat NCL-d-SARC jest przeznaczony do jakościowej identyfikacji za pomocą mikroskopii świetlnej sarkoglikanu delta w ramach metod immunohistochemicznych. 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 postepowania

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 przemywania. Aktywacja enzymatyczna chromogenu prowadzi do wytworzenia widocznego produktu reakcji w miejscu antygenu. Następnie można wykonać barwienie kontrastowe próbki i zakryć ją szkiełkiem nakrywkowym. Wyniki są interpretowane przy użyciu mikroskopu świetlnego i pomagają w diagnostyce różnicowej procesów patofizjologicznych, które mogą mieć związek z określonym antygenem.

Klon

δSarc3/12C1

Immunogen

Synthetic peptide containing amino acids 1-19 at the N-terminus of the human delta-sarcoglycan sequence (Jung D. et al.,1966).

Swoistość

Ludzki sarkoglikan delta (35 kD). Nie reaguje z sarkoglikanem delta w skrawkach mięśni pobranych od myszy, szczurów, królików, psów, kurcząt, chomików lub świń. Nie prowadzono badań na innych gatunkach zwierząt.

Skład odczynnika

NCL-d-SARC jest płynnym supernatantem hodowli tkankowej zawierającym azydek sodu jako substancję konserwującą. Użytkownik musi uzupełnić zawartości fiolki przy pomocy odpowiedniej objętości sterylnej wody destylowanej zgodnie z informacją na etykiecie fiolki.

Klasa Ig

IgG2a

Całkowite stężenia białka Total Protein

Całkowite stężenie białka w danej serii podano na etykiecie fiolki.

Stężenie przeciwciał

Większe lub równe 24 mg/l. Stężenie Ig w danej serii podano na etykiecie fiolki.

Zalecenia dotyczące stosowania

Badanie immunochemiczne (zob **Metodologia**) zamrożonych skrawków. Sugerowane rozcieńczenie: 01:25–1:50 przez 60 minut w temperaturze 25 °C. Te informacje stanowią jedynie wskazówkę – użytkownicy powinni sami określić swoje optymalne rozcieńczenie robocze.

Przechowywanie i trwałość

Nieotwarte przeciwciało przechowywać w temperaturze 2–8°C. W takich warunkach produkt nie traci swojej skuteczności przed upływem terminu ważności podanego na etykiecie fiolki. Nie używać po upływie daty ważności podanej na etykiecie fiolki. Roztwór roboczy jest stabilny do 2 miesięcy przy przechowywaniu w temperaturze 2-8°C. W przypadku długotrwałego przechowywania zaleca się mrożenie porcji odtworzonego przeciwciała w temperaturze -20°C (nie zaleca się stosowania zamrażarek bezszronowych). Należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania. Rozcieńczenia robocze należy przygotować w dniu użycia. Niezwłocznie po użyciu ponownie umieścić w temperaturze 2–8°C. Przechowywanie w warunkach innych od wskazanych powyżej wymaga weryfikacji użytkownika.

Przygotowanie próbek

Zamrożone bloczki tkankowe należy przechowywać w izopentanie chłodzonym w ciekłym azocie (patrz Ostrzeżenia i środki ostrożności). Próbki nie wymagają dalszego utrwalania, ale powinny być wbudowane w związek OCT™ (Sakura, nr produktu Tissue-Tek 4583).

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Liofilizowane przeciwciała Novocastra

Zawiera mieszaninę: Azydku sodu (<10%), benzylopenicyliny sodu (<10%), siarczanu streptomycyny (<10%).

Słowa sygnalizujące: Niebezpieczeństwo.

H302: Działa szkodliwie po połknięciu.H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry.H334: Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.
H411: Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.
EUH032: W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy.

P261: Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.
P264: Dokładnie umyć ręce po użyciu.
P270: Nie jeść, nie pić i nie palić podczas używania produktu.
P272: Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wynosić poza miejsce pracy.
P273: Unikać uwolnienia do środowiska.
P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
P284: W przypadku niedostatecznej wentylacji stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych.
P301+312: W PRZYPADKU POŁKNIĘCIA: Skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem w przypadku złego samopoczucia.
P302+352: W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Przemyć dużą ilością wody z mydłem.
P304+340: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: Wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.
P330: Wypłukać usta.
P333+313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady lekarza.
P342+311: W przypadku w przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: Skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem.
P362+364: Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem.
P391: Zebrać wyciek.
P501: Zawartość/pojemnik zutylizować w punkcie zbiórki odpadów niebezpiecznych lub specjalnych.

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

Ze względu na zbyt niską temperaturę ciekły azot powoduje oparzenia, dlatego podczas korzystania z niego należy stosować ubranie ochronne, w tym rękawice i osłonę twarzy. Stosować wyłącznie w warunkach dobrej wentylacji.

Izopentan jest wysoce łatwopalny i szkodliwy w przypadku spożycia i wdychania. Działa drażniąco na skórę i oczy i w dużym stężeniu działa narkotycznie.

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 na świeżych próbkach z autopsji/biopsji/operacji chirurgicznej, zamrożonych tak szybko, jak to możliwe taką samą metodą, jaką badane są tkanki pobrane od pacjenta.

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 mięśnie szkieletowe.
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 przeciwciało pierwszorzędowe.
Tkankowa kontrolna negatywna nie została oceniona.
Ewentualnie tkankowa kontrola negatywna może obejmować różne typy komórek obecne w większości skrawków tkankowych, jednak powinno to zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Barwienie niespecyficzne, jeżeli jest obecne, zwykle ma charakter rozproszony. Na skrawkach wykonanych z materiału tkankowego nadmiernie utrwalonego w formalinie można również zaobserwować sporadyczne barwienie tkanki łącznej. Do interpretacji wyników barwienia należy używać nieuszkodzonych komórek. Komórki martwicze lub zdegenerowane często powodują barwienie niespecyficzne.[3] Wyniki fałszywie pozytywne mogą pojawić się w następstwie nieimmunologicznego wiązania białek lub występowania produktów reakcji substratów. Mogą być również spowodowane przez endogenne enzymy, takie jak pseudoperoksydaza (erytrocyty), endogenna peroksydaza (cytochrom C) lub endogenna biotyna (np. wątroba, piersi, mózg, nerki), w zależności od zastosowanego barwnika immunohistochemicznego. Aby odróżnić endogenną aktywność enzymatyczną lub niespecyficzne wiązanie enzymów od swoistej immunoreaktywności, dodatkowe tkanki pacjenta mogą być barwione wyłącznie substratem chromogenem lub kompleksem enzymatycznych (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-d-SARC 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 wykorzystać panel przeciwciał.

Oczekiwane wyniki

Tkanki prawidłowe

Klon dSarc3/12C1 wykrywa białko sarkoglikanu delta w sarkolemie włókien mięśni szkieletowych, sercowych i gładkich.

Tkanki nieprawidłowe

Klon dSarc3/12C1 był stosowany w badaniach immunohistochemicznych ponad 850 pacjentów mających na celu identyfikację niedoboru sarkoglikanu delta - glikoproteiny 35 kD związanej z dystrofiną.

Preparat NCL-d-SARC jest przeznaczony do jakościowej identyfikacji za pomocą mikroskopii świetlnej sarkoglikanu delta w ramach metod immunohistochemicznych.

Ograniczenia ogólne

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

Barwienie tkanek zależy od postępowania z tkanką i jej przetwarzania przed barwieniem. Nieprawidłowe utrwalanie, zamrażanie, rozmrażanie, przemywanie, suszenie, podgrzewanie, ścinanie skrawków lub skażenie innymi tkankami lub płynami może powodować artefakty, zatrzymywanie przeciwciał lub wyniki fałszywie negatywne. Niespójne wyniki mogą wynikać z różnic w metodach utrwalania i zatapiania lub nieprawidłowości związanej z 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. Ocenę 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 utrwalono zgodnie z określonymi wymogami. Może wystąpić nieoczekiwana ekspresja antygenu, szczególnie w przypadku nowotworów. Interpretacja kliniczna wybarwionych skrawków musi obejmować analizę morfologiczną oraz ocenę przeprowadzoną w ramach odpowiednich kontroli.

Piśmiennictwo - ogólne.

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.

11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Nie dotyczy.

Data publikacji

19 października 2018

Immunohistochemiczne metody stosowania przeciwciał Novocastra™ na zamrożonej tkance mięśniowej.

Wymagane odczynniki niedołączone do zestawu

1. Standardowe rozpuszczalniki stosowane w immunohistochemii.
2. 50 mM roztworu soli fizjologicznej buforowanego odczynnikiem Tris (TBS) pH 7.6.
3. Rozcieńczalnik do przeciwciał - zwykła surowica optymalnie rozcieńczona w TBS.
4. Zwykła surowica pochodząca od gatunku, z którego otrzymywane jest przeciwciało drugorzędowe.
5. Przeciwciało drugorzędowe skoniugowane z peroksydazą - używać zgodnie z zaleceniami producenta.
6. Tetrachlorowodorek 3,3'-diaminobenzydyny (DAB) - przygotować i używać zgodnie z zaleceniami producenta.
7. Środek do zamykania preparatów mikroskopowych - użyć zgodnie z zaleceniami producenta.

Wymagany sprzęt niedołączony do zestawu

1. Inkubator ustawiony na 25°C.
2. Ogólne wyposażenie laboratorium immunohistochemicznego.
3. Wentylator elektryczny do suszenia preparatów.

Roztwory do odmaskowywania antygenu (zob. Zalecenia dotyczące stosowania)

Nie dotyczy zamrożonych skrawków.

Metodologia

Przed przystąpieniem do działań w ramach niniejszej metodologii użytkownik powinien zostać przeszkolony w zakresie technik immunohistochemicznych.
Użytkownicy powinni określić optymalne rozcieńczenia dla przeciwciał. O ile nie wskazano inaczej, wszystkie etapy należy przeprowadzać w temperaturze 25°C.

1. Odetnij i zamontuj skrawki o rozmiarach 4-10 µm na szkiełkach pokrytych odpowiednim klejem tkankowym i susz je na powietrzu przez co najmniej godzinę.
2. Inkubować skrawki w optymalnie rozcieńczonym przeciwciele pierwszorzędowym (zob. Zalecenia dotyczące stosowania).
3. Przemywać w buforzeTBS przez 2 x 5 minut, delikatnie potrząsając.
4. Inkubować skrawki w odpowiednim przeciwciele drugorzędowym skoniugowanym z peroksydazą.
5. Przemywać w buforzeTBS przez 2 x 5 minut, delikatnie potrząsając.
6. Inkubować preparat w DAB.
7. Opłucz preparaty w czystej wodzie.
8. Skrawki odwodnić, oczyścić i zamknąć.

Zmiany wprowadzone do poprzedniego wydania

Nie dotyczy..

Data publikacji

4 lutego 2008 r. (CEprotocol/Frozen Muscle).

Liofilizirano mišje monoklonsko protitelo Novocastra™ Delta-Sarcoglycan

Koda izdelka: NCL-d-SARC

Predvidena uporaba

Za diagnostično uporabo in vitro.
Izdelek NCL-d-SARC je namenjen za kvalitativno identifikacijo delta-sarkoglikana z imunohistokemijskim barvanjem s pomočjo svetlobne mikroskopije. Klinično razlago obarvanja ali odsotnosti le-tega morajo dopolnjevati morfološke študije ustreznih kontrolnih vzorcev, ki jih v okviru klinične anamneze bolnika in drugih diagnostičnih testov oceni usposobljen patolog.

Načelo postopka

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

Klon

δSarc3/12C1

Imunogen

Sintetični peptid, ki vsebuje aminokisline 1 do 19 na N-terminalnem koncu človeškega zaporedja delta-sarkoglikana (Jung D. et al., 1966).

Specifičnost

Humani delta-sarkoglikan (35 kD). Ne reagira z delta-sarkoglikanom v rezinah mišičnega tkiva miši, podgane, kunca, psa, piščanca, hrčka ali prašiča. Drugih vrst živali niso testirali.

Sestava reagenta

NCL-d-SARC je liofiliziran supernatant kulture tkiva in vsebuje natrijev azid kot konzervans. Uporabnik mora rekonstituirati vsebino viale z ustrezno količino sterilne distilirane vode, kot je navedeno na nalepki viale.

Razred Ig

IgG2a

Skupna koncentracija beljakovin Total Protein

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

Koncentracija protiteles

Višja ali enaka 24 mg/l. Za specifično koncentracijo Ig v seriji glejte oznako na viali.

Priporočila za uporabo

Imunohistokemija (glejte **Metodologija**) zamrznjenih rezin. Predlagano redčenje: 1:25 do 1:50 za 60 minut pri 25 °C. To so samo smernice; uporabniki naj poiščejo svoje lastne najbolj učinkovite delovne razredčine.

Shranjevanje in stabilnost

Neodprta protitelesa hraniti pri temperaturi 2–8 °C. Pod navedenimi pogoji ostane izdelek enako učinkovit do datuma izteka roka uporabnosti, ki je naveden na etiketi viale. Ne uporabljajte po datumu izteka roka uporabnosti, ki je naveden na oznaki na viali. Rekonstituirana protitelesa so stabilna najmanj dva meseca, če jih hranite pri temperaturi 2–8 °C. Pri dolgotrajnem shranjevanju priporočamo shranjevanje zamrznjenih rekonstituiranih alikvotov pri temperaturi –20 °C (zamrzovalniki brez zmrzali niso priporočeni). Izogniti se je treba ponovnemu zamrzovanju in odtajanju. Delovne razredčine pripravite na dan uporabe. Takoj po uporabi ohladite na temperaturo 2–8 °C. Uporabnik naj preveri pogoje shranjevanja, ki se razlikujejo od zgoraj navedenih.

Priprava vzorcev

Bloke vzorcev tkiva zamrznite v izopentanu, ohlajenem v tekočem dušiku (glejte poglavje Opozorila in previdnostni ukrepi). Vzorci ne potrebujejo dodatne fiksacije, temveč jih je treba vstaviti v spojino OCT™ (Sakura, kataloška št. Tissue-Tek 4583).

Opozorila in previdnostni ukrepi

Liofilizirana protitelesa Novocastra

Vsebuje mešanico: natrijev azid (< 10 %), benzilpenicilin natrij (< 10 %), streptomicin sulfat (< 10 %).

Signalne besede: Nevarno.

H302: Zdravju škodljivo pri zaužitju. H317: Lahko povzroči alergijski odziv kože. H334: Lahko povzroči simptome alergije ali astme ali težave z dihanjem pri vdihavanju.
H411: Strupeno za vodne organizme, z dolgotrajnimi učinki.
EUH032: V stiku s kislinami se sprošča zelo strupen plin.

P261: Ne vdihavati prahu/dima/plina/meglice/hlapov/razpršila.
P264: Po uporabi temeljito umiti roke.
P270: Ne jesti, piti ali kaditi med uporabo tega izdelka.
P272: Kontaminirana delovna oblačila niso dovoljena zunaj delovnega mesta.
P273: Preprečiti sproščanje v okolje.
P280: Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za oči/zaščito za obraz.
P284: Ob nezadostnem prezračevanju nositi opremo za zaščito dihal.
P301+312: PRI ZAUŽITJU: Ob slabem počutju pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika.
P302+352: PRI STIKU S KOŽO: Umiti z veliko mila in vode.
P304+340: PRI VDIHAVANJU: Prenesti osebo na svež zrak in jo pustiti v udobnem položaju, ki olajša dihanje.
P330: Izprati usta.
P333+313: Če nastopi draženje kože ali se pojavi izpuščaj: Poiščite zdravniško pomoč/oskrbo.
P342+311: Pri respiratornih simptomih: Pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika.
P362+364: Sleči kontaminirana oblačila in jih oprati pred ponovno uporabo.
P391: Prestreči razlito tekočino.
P501: Odstraniti vsebino/posodo na točko za zbiranje nevarnih ali posebnih odpadkov.

Vir priprave tega reagenta je supernatant celične kulture. Ker je to biološki izdelek, je treba z njim ravnati z ustrezno skrbnostjo.
Ta reagent vsebuje natrijev azid. Varnostni list je na voljo na zahtevo ali na naslovu www.LeicaBiosystems.com. Upoštevajte zvezne, državne ali lokalne predpise za odstranjevanje 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 skozi usta; pazite, da reagenti in vzorci ne pridejo v stik s kožo in sluznicami. Če reagenti ali vzorci pridejo v stik z občutljivimi deli, jih izperite z obilo vode. Poiščite zdravniško pomoč.
Pazite, da ne pride do mikrobne okužbe reagentov, saj lahko povzroči nespecifično barvanje.
Če uporabite čas ali temperature inkubacije, ki se razlikujejo od navedenih, lahko pridobite napačne rezultate. Uporabnik mora validirati morebitne spremembe.

Tekoči dušik zaradi svoje izjemno nizke temperature povzroča opekline, zato je treba pri ravnanju z njim uporabljati zaščitno obleko, vključno z rokavicami in vizirjem. Uporabljajte v dobro prezračenem prostoru.

Izopentan je zelo vnetljiv ter škodljiv ob zaužitju in vdihavanju. Draži tudi kožo in oči, v visoki koncentraciji pa deluje kot narkotik.

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, zamrznjeni 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 pozitivno kontrolo tkiva priporočamo tkivo skeletnih mišic.
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 protitelo.
Priporočenega tkiva za negativni kontrolni vzorec tkiva niso določili.
Drugače pa se kot negativni kontrolni vzorci pogosto uporablja vrsta različnih celic, ki so prisotne v večini rezin tkiv, vendar pa mora tako uporabo preveriti uporabnik.
Nespecifično barvanje, če je prisotno, je običajno razpršeno. Opazite lahko tudi posamično obarvanje vezivnega tkiva v rezinah tkiv, kot posledica premočnega fiksiranja s formalinom. Za razlago rezultatov obarvanja uporabite nespremenjene celice. Obarvanje nekrotičnih ali degeneriranih celic je pogosto nespecifično.[3] Lažno pozitivni rezultati se lahko pojavijo zaradi ne-imunološke vezave proteinov ali produktov reakcije substrata. Povzročijo jih lahko tudi endogeni encimi, kot so psevdoperoksidaza (eritrociti), endogena peroksidaza (citokromni C) ali endogeni biotin (npr. jetra, dojke, možgani, ledvice), odvisno od vrste uporabljenega imunskega barvila. Za razlikovanje med endogensko aktivnostjo encimov ali nespecifično vezavo encimov zaradi specifične imunske reaktivnosti, lahko barvate dodatna tkiva bolnika izključno ali s kromogenskim substratom ali encimskimi kompleksi (avidin-biotin, streptavidin, označeni polimer) in kromogenskim substratom. Če pride do specifičnega obarvanja negativnih kontrolnih vzorcev tkiva, morate rezultate vzorcev bolnika zavreči kot neveljavne.

Negativni kontrolni reagent

Za oceno nespecifičnega barvanja in boljšo razlago specifičnega obarvanja na antigenskem 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-d-SARC. 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 dSarc3/12C1 zazna protein delta-sarkoglikan v sarkolemi skeletnih, srčnih in gladkih mišičnih vlaken.

Nenormalna tkiva

Klon dSarc3/12C1 so v imunohistokemijskih študijah uporabili pri več kot 850 bolnikih za ugotovitev pomanjkanja z distrofinom povezanega glikoproteina 35 kD, delta-sarkoglikana.

NCL-d-SARC se priporoča za identifikacijo človeškega delta-sarkoglikana z imunohistokemijskim barvanjem.

Splošne omejitve

Imunohistokemija je diagnostični postopek z več koraki, ki zahteva specializirano usposabljanje za izbiro ustreznih reagentov, izbiro, fiksiranje in obdelavo tkiv, pripravo IHC preparata in razlago rezultatov obarvanja.
Obarvanje tkiva je odvisno od rokovanja s tkivom in njegovo obdelavo pred barvanjem. Nepravilno fiksiranje, zamrzovanje, odtajanje, izpiranje, sušenje, segrevanje, rezanje ali okužba z drugimi tkivi ali tekočinami lahko povzroči nastanek artefaktov, lovljenje protitelesa ali lažne negativne rezultate. Nedosledni rezultati so lahko posledica razlik pri metodah fiksiranja in priprave ali pa so del nepravilnosti tkiva samega.[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 določenimi zahtevami za fiksiranje. Lahko pride do nepričakovanega izražanja antigena, zlasti pri neoplazmah. Pri klinični razlagi obarvane rezine tkiva morate upoštevati morfološko analizo in oceno ustreznih kontrol.

Splošna literatura

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji

Navedba smiselno ni potrebna.

Datum izdaje

19 oktober 2018

Imunohistokemijska metodologija za uporabo protiteles Novocastra™ pri zamrznjenem mišičnem tkivu.

Potrebni reagenti, ki niso priloženi

1. Standardna topila, ki se uporabljajo v imunohistokemiji.
2. Fiziološka raztopina s 50 mM pufra tris (TBS), pH 7,6.
3. Redčilo za protitelesa – normalni serum, optimalno razredčen v TBS.
4. Normalni serum vrst, pri katerih je pridobljeno sekundarno protitelo.
5. Sekundarno s peroksidazo konjugirano protitelo – pripravite skladno s priporočili izdelovalca.
6. 3,3' diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) – pripravite in uporabite skladno s priporočili izdelovalca.
7. Medij za pritrjevanje – uporabljajte skladno s priporočili izdelovalca.

Potrebna oprema, ki ni priložena

1. Inkubator, nastavljen na 25 °C.
2. Splošna oprema za imunohistokemijski laboratorij.
3. Električni ventilator za sušenje preparatov z zrakom.

Raztopine za pridobivanje antigenov (glejte priporočila za uporabo)

Ne velja za zamrznjene rezine.

Metodologija

Preden uporabniki začnejo uporabljati to metodologijo, morajo biti usposobljeni za delo z imunohistokemijskimi tehnikami. Uporabniki morajo sami določiti optimalne razredčitve protiteles. Vse korake izvajajte pri temperaturi 25 °C, razen če je navedeno drugače.

1. Odrežite in namestite rezine debeline 4–10 µm na objektna stekelca, prevlečena z ustreznim lepilom za tkivo, ter sušite z zrakom najmanj eno uro.
2. Inkubirajte rezine z optimalno razredčenim primarnim protitelesom (glejte priporočila za uporabo).
3. Izpirajte v pufru TBS 2 x 5 minut in pri tem nežno stresajte.
4. Rezine inkubirajte v ustreznih s peroksidazo konjugiranih sekundarnih protitelesih.
5. Izpirajte v pufru TBS 2 x 5 minut in pri tem nežno stresajte.
6. Inkubirajte preparate v DAB.
7. Preparate izperite v čisti vodi.
8. Dehidrirajte, očistite in pritrdite rezine.

Dodatki in spremembe k prejšnji izdaji

Navedba smiselno ni potrebna.

Datum izdaje

4. februar 2008 (Protocol CE/zamrznjena mišica).

Novocastra™ Lyofilizovaná myší monoklonální protilátka Delta-Sarcoglycan

Kód výrobku: NCL-d-SARC

Zamýšlené použití

Pro diagnostické použití in vitro.

NCL-d-SARC je určen k imunohistochemickému kvalitativnímu stanovení delta-sarkoglykanu světelnou mikroskopií. 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

δSarc3/12C1

Imunogen

Syntetický peptid obsahující aminokyseliny 1-19 na N-terminu sekvence lidského delta-sarkoglykanu (Jung D. et al., 1966).

Specificita

Lidský delta-sarkoglykan (35 kD). Nereaguje s delta-sarkoglykanem v řezech ze svalů myši, krysy, králíka, psa, kuřete, křečka a vepře. Ostatní zvířecí druhy nebyly testovány.

Složení reagencie

NCL-d-SARC je lyofilizovaný supernatant z tkáňové kultury obsahující jako konzervační prostředek azid sodný. Uživatel musí obsah lahvičky rekonstituovat správným objemem sterilní destilované vody, jak je uvedeno na štítku na lahvičce.

Třída Ig

IgG2a

Koncentrace celkového proteinu Total Protein

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

Koncentrace protilátek

24 mg/l nebo vyšší. Koncentrace imunoglobulinu (Ig) specifická pro šarži je uvedena na štítku na lahvičce.

Doporučení k použití

Imunohistochemické vyšetření (viz Metodika) na zmrazených řezech. Doporučené ředění: 1:25–1:50 po dobu 60 minut při 25 ˚C. Toto doporučení je uvedeno jako vodítko; uživatelé musí stanovit vlastní optimální pracovní ředění.

Skladování a stabilita

Neotevřené protilátky uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Za těchto podmínek nedojde k významnému snížení funkčnosti produktu až do doby použitelnosti uvedené na štítku na lahvičce. Nepoužívejte po uplynutí data exspirace uvedeného na štítku na lahvičce. Pokud jsou rekonstituované protilátky uchovávány při teplotě 2–8 °C, jsou stabilní nejméně dva měsíce. Při dlouhodobém skladování se doporučuje, aby byly alikvoty rekonstituovaných protilátek uchovávány zmrazené při teplotě -20 °C (nedoporučují se beznámrazové mrazicí boxy). Je nutno zabránit opakovanému zmrazování a rozmrazování. Pracovní roztok připravte ve dnu použití. Okamžitě po použití vraťte do teploty 2–8 ˚C. Podmínky skladování jiné než výše uvedené musí uživatel validovat.

Příprava vzorku

Tkáňové bloky ze vzorku zmrazte v isopentanu chlazeném tekutým dusíkem (viz Varování a bezpečnostní opatření). Vzorky nevyžadují další fixaci, ale měly by být zality směsí OCT™ (Sakura, produkt č. Tissue-Tek 4583).

Varování a bezpečnostní opatření

Lyofilizované protilátky Novocastra

Obsahuje směs: azid sodný (<10 %), benzylpenicilin sodný (<10 %), streptomycin sulfát (<10 %).

Signální slova: Nebezpečí.

H302: Zdraví škodlivý při požití. H317 Může vyvolat alergickou kožní reakci.
H334: Při vdechování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže.
H411: Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.
EUH032: Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami.

P261: Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.
P264: Po manipulaci si důkladně omyjte ruce.
P270: Při používání tohoto výrobku nejezte, nepijte ani nekuřte.
P272: Kontaminovaný pracovní oděv nesmí být odnesen z pracoviště.
P273: Zabraňte uvolnění do životního prostředí.
P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P284: V případě nedostatečného větrání používejte vybavení pro ochranu dýchacích cest.
P301+312: PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře.
P302+352: PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla.
P304+340: PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání.
P330: Vypláchněte ústa.
P333+313: Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P342+311: Při dýchacích potížích: Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře.
P362+364: Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím jej vyperte.
P391: Uniklý produkt seberte.
P501: Obsah/nádobu zlikvidujte ve sběrném místě pro nebezpečný nebo zvláštní odpad.

Tato reagencie byla připravena ze supernatantu z buněčné kultury. Protože jde o biologický produkt, je nutno manipulaci s ní věnovat náležitou pozornost.
Tato reagencie 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] Reagencie nikdy nepipetujte ústy a zabraňte styku reagencií a vzorků s kůží a sliznicemi. Pokud se reagencie nebo vzorky dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte je velkým množstvím vody. Vyhledejte lékařskou pomoc.
Minimalizujte mikrobiální kontaminaci reagencií, 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.

Tekutý dusík způsobuje kvůli své mimořádně nízké teplotě popáleniny, proto se při manipulaci s ním musí používat ochranný oděv včetně rukavic a obličejového štítu. Používejte v dobře větraných prostorech.

Isopentan je vysoce hořlavý a zdraví škodlivý při požití a vdechování. Je rovněž dráždivý pro kůži a oči a ve vysoké koncentraci má narkotické vlastnosti.

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 pitevní/bioptické/operační vzorky co nejdříve zmrazené stejným způsobem jako vzorek/vzorky pacienta.

Pozitivní 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 reagencie je vhodnější tkáň se slabým pozitivním barvením než tkáň se silným pozitivním barvením.[2]

Doporučenou pozitivní tkáňovou kontrolou je kosterní sval.
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 kontrolní tkáň nebyla stanovena.
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 formalínem 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 neimunologické vazby proteinů nebo produktů reakčního substrátu. Mohou být také způsobeny endogenními enzymy, jako je např. pseudoperoxidáza (erytrocyty), endogenní peroxidáza (cytochrom C) nebo endogenní biotin (např. játra, prs, mozek, ledviny), podle typu použitého imunobarviva. K odlišení aktivity endogenních enzymů či nespecifické vazby enzymů od specifické imunoreaktivity mohou být barveny další tkáně pacienta výlučně

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-d-SARC. 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/tkáních přítomen. V případě potřeby použijte k identifikaci falešně negativních reakcí panel protilátek.

Očekávané výsledky

Normální tkáně

Klon βdSarc3/12C1 detekuje protein delta-sarkoglykan v sarkolemě vláken kosterních, srdečních a hladkých svalů.

Abnormální tkáně

Klon dSarc3/12C1 byl použit při imunohistochemických vyšetřeních u více než 850 pacientů ke stanovení deficience glykoproteinu spojeného s dystrofinem 35 kD, delta-sarkoglykanu.

NCL-d-SARC se doporučuje k imunohistochemickému stanovení lidského delta-sarkoglykanu.

Obecná omezení

Imunohistochemické vyšetření je vícekrokový diagnostický proces, který spočívá ve specializovaném školení ve výběru vhodných reagencií; 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 parafínových řezů se specifickými požadavky na fixaci. Může dojít k expresi neočekávaných antigenů, zejména u nádorů. Klinická interpretace jakéhokoli 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Opravy předchozího vydání

Nevztahuje se.

Datum vydání

19 říjen 2018

Imunohistochemická metodika při použití protilátek Novocastra™ na zmrazené svalové tkáni.

Potřebné reagencie, které nejsou součástí dodávky

1. Standardní rozpouštědla používaná v imunohistochemii.
2. Fyziologický roztok pufrovaný 50mM roztokem tris-pufru (TBS), pH 7,6.
3. Ředicí roztok na protilátky - normální sérum optimálně naředěné v TBS.
4. Normální sérum druhu, ze kterého byla získána sekundární protilátka.
5. Sekundární protilátka konjugovaná s peroxidázou - použijte podle doporučení výrobce.
6. 3,3' diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB) - připravte a použijte podle doporučení výrobce.
7. Fixační médium – použijte podle doporučení výrobce.

Potřebné vybavení, které není dodáno

1. Inkubátor nastavený na 25 °C.
2. Obecné vybavení imunohistochemické laboratoře.
3. Elektrický ventilátor k sušení sklíček vzduchem.

Odmaskovací roztoky pro antigen (viz Doporučení k použití)

Nevztahuje se na zmrazené řezy.

Metodika

Než uživatelé přistoupí k této metodice, musí být proškoleni v imunohistochemických technikách.
Uživatelé musí stanovit optimální ředění pro protilátky. Pokud není uvedeno jinak, provádějí se všechny kroky při 25 ˚C.

1. Nakrájejte řezy o tloušťce 4–10 µm, namontujte je na sklíčka potažená vhodným tkáňovým lepidlem a sušte na vzduchu po dobu nejméně jedné hodiny.
2. Řezy inkubujte v optimálně naředěné primární protilátce (viz Doporučení k použití).
3. Omývejte v pufru TBS po dobu 2 x 5 minut s lehkým kýváním.
4. Řezy inkubujte v příslušné sekundární protilátce konjugované s peroxidázou.
5. Omývejte v pufru TBS po dobu 2 x 5 minut s lehkým kýváním.
6. Sklíčka inkubujte v DAB.
7. Sklíčka opláchněte v čisté vodě.
8. Řezy odvodněte, projasněte a namontujte.

Opravy předchozího vydání

Nevztahuje se..

Datum vydání

4. února 2008 (CE protokol/zmrazený sval).

Lyofilizovaná myšia monoklonálna protilátka Novocastra™ Delta-Sarcoglycan

Kód produktu: NCL-d-SARC

Zamýšľané použitie

Na diagnostické použitie in vitro.
NCL-d-SARC slúži na kvalitatívnu identifikáciu delta-sarkoglykánu pomocou svetelnej mikroskopie pri imunohistochemickom postupe. Klinická interpretácia akéhokoľvek farbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfologickými vyšetreniami za použitia zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a iných diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.

Princíp postupu

Techniky imunohistochemického (IHC) zafarbenia umožňujú vizualizáciu antigénov sekvenčnou aplikáciou špecifickej protilátky proti antigénu (primárna protilátka), sekundárnej protilátky proti primárnej protilátke a enzymatického komplexu s chromogénnym substrátom. Medzi jednotlivými krokmi prebieha premývanie. Enzymatická aktivácia chromogénu vytvára v mieste antigénu viditeľné produkty reakcie. Môžete doplniť kontrastné zafarbenie vzorky a zakryť ju krycím sklíčkom. Výsledky sa interpretujú pomocou svetelného mikroskopu a napomáhajú pri diferenciálnej diagnostike patofyziologických procesov, ktoré môžu, ale nemusia byť spojené s určitým antigénom.

Klon

δSarc3/12C1

Imunogén

Syntetický peptid obsahujúci aminokyseliny 1-19 na N-konci sekvencie ľudského delta-sarkoglykánu (Jung D. et al.,1966).

Špecificita

Ľudský delta-sarkoglykán (35 kD). Nereaguje s delta-sarkoglykánom v rezoch svalov z myší, potkanov, králikov, psov, kurčiat, škrečkov ani prasiat. Ďalšie živočíšne druhy neboli testované.

Zloženie činidla

NCL-d-SARC je lyofilizovaný supernatant na tkanivovú kultiváciu obsahujúci azid sodný ako konzervačnú látku. Používateľ musí rekonštituovať obsah fľaštičky so správnym objemom sterilnej destilovanej vody, ako sa uvádza na štítku fľaštičky.

Trieda Ig

IgG2a

Celková koncentrácia proteínov Total Protein

Celkovú koncentráciu proteínov špecifickú pre šaržu nájdete na štítku fľaštičky.

Koncentrácia protilátok

Väčšia alebo rovná 24 mg/l. Koncentráciu Ig špecifickú pre šaržu nájdete na štítku fľaštičky.

Odporúčania na použitie

Imunohistochémia (pozri **Metóda**) zmrazených rezov. Odporúčané riedenie: 1 : 25 – 1 : 50 počas 60 minút pri teplote 25 °C. Táto hodnota je orientačná, používatelia si musia stanoviť svoje vlastné optimálne pracovné riedenia.

Uskladnenie a stabilita

Neotvorenú protilátku skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Za týchto podmienok nedôjde k významnej strate účinnosti produktu do dátumu exspirácie, ktorý sa uvádza na štítku fľaštičky. Nepoužívajte po uplynutí dátumu exspirácie uvedeného na štítku fľaštičky. Rekonštituovaná protilátka je stabilná minimálne dva mesiace, ak sa skladujte pri teplote 2 – 8 °C. Pri dlhodobom skladovaní sa odporúča uložiť alikvóty rekonštituovanej protilátky do mrazničky pri teplote -20 °C (mrazničky s technológiou frost-free sa neodporúčajú). Opakovanému zmrazovaniu je nutné zamedziť. Pracovné zriedené roztoky pripravte v deň ich použitia. Okamžite po použití vráťte do teploty 2 – 8 °C. Iné než vyššie uvedené podmienky skladovania si vyžadujú validáciu používateľom.

Príprava vzorky

Bloky tkaniva zamrazte v izopentáne chladenom tekutým dusíkom (pozri časť Varovania a bezpečnostné opatrenia). Vzorky si nevyžadujú ďalšiu fixáciu, ale majú sa zaliať do zlúčeniny OCT™ (Sakura, č. produktu Tissue-Tek 4583).

Varovania a bezpečnostné opatrenia

Lyofilizované protilátky Novocastra

Obsahuje zmes: azidu sodného (<10 %), benzylpenicilínu sodného (<10 %), streptomycín sulfátu (<10 %).

Signálne slová: Nebezpečenstvo.

H302: Škodlivý po požití.
H317: Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.
H334: Pri vdýchnutí môže vyvolať alergiu alebo príznaky astmy, alebo dýchacie ťažkosti.
H411: Toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.
EUH032: Pri kontakte s kyselinami uvoľňuje veľmi toxický plyn.

P261: Zamedzte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pary/aerosólov.
P264: Po manipulácii si dôkladne umyte ruky.
P270: Pri používaní výrobku nejedzte, nepite ani nefajčite.
P272: Je zakázané vyniesť kontaminovaný pracovný odev z pracoviska.
P273: Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia.
P280: Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.
P284: V prípade nedostatočného vetrania, používajte ochranu dýchacích ciest.
P301+312: PO POŽITÍ: Ak sa necítite dobre, zavolajte do TOXIKOLOGICKÉHO CENTRA alebo lekárovi.
P302+352: PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: Umyte veľkým množstvom mydla a vodou.
P304+340: PO VDÝCHNUTÍ: Presuňte osobu na čerstvý vzduch a umožnite jej pohodlne dýchať.
P330: Vypláchnite ústa.
P333+313: Ak sa prejaví podráždenie pokožky alebo sa vytvoria vyrážky: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
P342+311: Pri sťaženom dýchaní: Zavolajte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM alebo lekára.
P362+364: Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte.
P391: Zozbierajte uniknutý produkt.
P501: Obsah/zásobník zlikvidujte v zberni nebezpečného alebo špeciálneho odpadu.

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 stránkach 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 opatrní.[1] Činidlá nikdy nepipetujte ústami a zabráňte kontaktu činidiel a vzoriek s kožou a sliznicami. Ak sa činidlá alebo vzorky dostanú do kontaktu s citlivými oblasťami, umyte ich veľkým množstvom vody. Vyhľadajte lekársku pomoc.
Minimalizujte mikrobiálnu kontamináciu činidiel. V opačnom prípade môže dôjsť k zvýšeniu nešpecifického zafarbenia.
Nedodržanie predpísaných inkubačných dôb alebo teplôt môže viesť k nesprávnym výsledkom. Všetky takéto zmeny si vyžadujú validáciu používateľom.

Tekutý dusík vďaka svojej extrémne nízkej teplote spôsobuje popáleniny. Pri manipulácii s ním používajte ochranný odev vrátane rukavíc a štítu. Používajte na dobre vetranom mieste.

Izopentán je veľmi horľavý a škodlivý pri požití a vdýchnutí. Zároveň dráždi kožu a oči a vo vysokých koncentráciách má narkotické účinky.

Kontrola kvality

Rozdiely v spracovaní tkaniva a technických postupoch v laboratóriu používateľa môžu viesť k významnému kolísaniu výsledkov, čo si vyžaduje, okrem nasledujúcich postupov, aj pravidelné interné kontroly.
Kontroly by mali byť čerstvé pitevné/bioptické/chirurgické vzorky čo najskôr zmrazené 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 kostrový sval.
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 špecificitu značenia cieľového antigénu primárnou protilátkou.
Odporúčané tkanivo na negatívnu kontrolu nebolo stanovené.
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 difúzny vzhľad. V rezoch tkanív silne fixovaných formalínom môže byť pozorované sporadické farbenie spojiva. Na interpretáciu výsledkov farbenia používajte intaktné bunky. Nekrotické alebo degenerované bunky sa často farbia 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. pečeň, prsník, mozog, oblička) v závislosti od typu imunologického farbenia. S cieľom diferencovať endogénnu enzymatickú aktivitu alebo nešpecifickú väzbu enzýmov od špecifickej imunoreaktivity môžete nafarbiť ďalšie vzorky tkanív pacienta výhradne substrátovým chromogénom alebo enzymatickými komplexmi (avidín-biotín,

streptavidín, značený polymér), resp. substrátovým chromogénom. V prípade špecifického farbenia v negatívnej kontrole tkanivom je nutné výsledky vzoriek pacienta považovať za neplatné.

Negatívna kontrola činidlom

Na vyhodnotenie nešpecifického zafarbenia použite nešpecifickú negatívnu kontrolu činidlom miesto primárnej protilátky s rezom jednotlivých vzoriek pacienta, čo umožní lepšiu interpretáciu špecifického farbenia na mieste antigénu.

Tkanivo pacienta

Pacientske vzorky zafarbené prípravkom NCL-d-SARC preskúmajte ako posledné. Intenzitu pozitívneho farbenia je nutné vyhodnotiť v kontexte prípadného
nešpecifického zafarbenia negatívnej kontroly činidlom na pozadí. Podobne ako pri všetkých imunohistochemických testov znamená negatívny výsledok, že antigén nebol detegovaný. Nepotvrdzuje jeho absenciu v testovaných bunkách/tkanivách. V prípade potreby identifikujte falošne negatívne reakcie pomocou panelu protilátok.

Očakávané výsledky

Normálne tkanivá
Klon dSarc3/12C1 deteguje proteín delta-sarkoglykán v sarkoleme svalových vláken kostrového, srdcového a hladkého svalstva.

Abnormálne tkanivá
Klon dSarc3/12C1 sa používa v imunohistochemických štúdiách s viac ako 850 pacientmi s cieľom zistiť deficienciu glykoproteínu 35 kD asociovaného s dystrofínom, delta-sarkoglykánu.

NCL-d-SARC sa odporúča na identifikáciu ľudského delta-sarkoglykánu pri imunohistochemickom postupe.

Všeobecné limitácie

Imunohistochémia 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 správnosť interpretácie výsledkov.
Klinická interpretácia akéhokoľvek farbenia alebo jeho absencie musí byť kombinovaná s morfologickými vyšetreniami za použitia zodpovedajúcich kontrol. Výsledky je nutné vyhodnotiť v kontexte klinickej anamnézy pacienta a iných diagnostických testov vedených kvalifikovaným patológom.
Protilátky spoločnosti Leica Biosystems Newcastle Ltd sú určené na použitie na zmrazených rezoch alebo rezoch zaliatych 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 morfologickú 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. Anderson LVB. Multiplex Western blot analysis of the muscular dystrophy proteins. Chapter 22, p369–386, in Muscular Dystrophy: Methods and Protocols (number 43 in the Methods in Molecular Medicine series), edited by Bushby KMD & Anderson LVB. 2001. Humana Press: Totowa, New Jersey.
6. Pogue R, Anderson LVB, Pyle A, et al. Strategy for mutation analysis in the autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. Neuromuscular Disorders. 2001; 11(1):80–87.
7. Sheriffs IN, Rampling D and Smith VV. Paraffin wax embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. Journal of Clinical Pathology. 2001; 54(7):517–520.
8. Ueda H, Ueda K, Baba T, et al. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2001; 49:529–538.
9. Auranen M, Rapola J, Pihko H, et al. Muscle membrane-skeleton protein changes and histopathological characterization of muscle-eye-brain disease. Neuromuscular Disorders. 2000; 10(1):16–23.
10. Bornemann A and Anderson LVB. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. Brain Pathology. 2000; 10:193–214.
11. Vainzof M, Moreira ES, Canovas M, et al. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. Muscle Nerve. 2000; 23(6):984–988.
12. Anderson LVB and Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. American Journal of Pathology. 1999; 154(4):1017–1022.
13. Jung D, Duclos F, Aposol B, et al. Characterization of d-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. The Journal of Biological Chemistry. 1996; 271(50):32321–32329.

Úpravy predchádzajúceho vydania

Neuplatňuje sa.

Dátum vydania

19 október 2018

Imunohistochemická metóda použitia protilátok Novocastra™ na zmrazenom svalovom tkanive.

Požadované, ale nedodávané činidlá

1. Štandardné rozpúšťadlá používané v imunohistochémii
2. 50mM tris-pufrovaný fyziologický roztok (TBS), pH 7,6
3. Zrieďovadlo protilátok – normálne sérum optimáne zriedené v TBS.
4. Normálne sérum z druhu, z ktorého pochádza sekundárna protilátka.
5. Sekundárna protilátka konjugovaná s peroxidázou – používajte podľa odporúčania výrobcu.
6. 3,3' diaminobenzidín tetrahydrochlorid (DAB) – pripravte a používajte podľa odporúčania výrobcu.
7. Upevňovacie médium – používajte podľa odporúčania výrobcu.

Požadované, ale nedodávané vybavenie

1. Inkubátor nastavený na teplotu 25 °C.
2. Všeobecné vybavenie imunohistochemického laboratória
3. Elektrický ventilátor na sušenie sklíčok vzduchom.

Antigénový záchytný roztok (pozri časť Odporúčania na použitie)

Netýka sa zmrazených rezov.

Metóda

Používatelia musia byť vyškolení v oblasti imunohistochemických techník skôr, než pristúpia k tejto metóde.
Používateľ musí stanoviť optimálne riedenie protilátok. Ak nie je uvedené inak, všetky kroky sa vykonávajú pri teplote 25 °C.

1. Rezy narežte na 4 – 10 µm a upevnite na sklíčka pokryté vhodnou vrstvou tkanivového lepidla a nechajte ich minimálne jednu hodinu schnúť na vzduchu.
2. Rezy inkubujte s optimálne zriedenou primárnou protilátkou (pozri časť Odporúčania na použitie).
3. Premyte v TBS 2-krát po 5 minút s ľahkým kolísaním.
4. Rezy inkubujte vo vhodnej sekundárnej protilátke konjugovanej s peroxidázou.
5. Premyte v TBS 2-krát po 5 minút s ľahkým kolísaním.
6. Sklíčka inkubujte v DAB.
7. Sklíčka opláchnite v čistej vode.
8. Dehydratujte, očistite a upevnite rezy.

Úpravy predchádzajúceho vydania

Neuplatňuje sa.

Dátum vydania

4. februára 2008 (CE protokol/zmrazený sval).

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

© Leica Biosystems Newcastle Ltd · 95.8156 Rev A · D-SARC-CE 19/10/2018